Archive of SID

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 74, Number 4, 2019
Original Article

# Assessment of Prevalence and Molecular Characterization of Beta-lactams Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteria Isolated From Raw Minced Beef in Semnan and Effect of Red Pepper (*Capsicum frutescens*) and Red Onion (*Allium cepa*) Extracts Against Them

**Ashkan Jebelli Javan[1], Hamid Staji[2], Najmeh Rezaei[3], Ghazal Shemshadi[3], Soghra Birgani Farhani[2], Mansooreh Kanani[1]**

[1]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*
[2]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*
[3]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*

10.22059/jvr.2018.256753.2790
*J Vet Res, 74(4), 464-473*

## Abstract

**BACKGROUND:** *Staphylococcus aureus* is one of the most important pathogenic microorganisms in meat products, especially those that are repeatedly handled by hand in the production process. Beta-lactam drugs, especially new generations of Cephalosporins, are used for treatment of most infections that are caused by *Staphylococcus aureus*. But the production of beta-lactamase enzyme by some strains has led to the failure for treating the infections that are associated with this organism.

**OBJECTIVES:** The present study was conducted to evaluate the prevalence and comparison of the antimicrobial effect of methanolic extracts of red pepper and red onion on *Staphylococcus aureus* with beta-lactamase gene that was isolated from minced meat in Semnan city.

**METHODS:** For this reason, sampling from 30 distribution and supply centers of packaged meat in Semnan city was performed in hygienic conditions and all of the samples were tested for presence of *Staphylococcus aureus* with beta-lactamase gene by biochemical methods and molecular confirmation by PCR assay. Also, the antibacterial effect of red pepper and red onion extracts on these isolates was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bacterial concentration (MBC), well distribution and bacterial growth curve tests.

**RESULTS:** The results showed that 16.6 percent of samples were contaminated with *Staphylococcus aureus* with beta-lactamase gene. Red pepper and red onion extracts had good antibacterial effects on these isolates and in all the tests, the red pepper extract was more effective than the red onion extract.

**CONCLUSIONS:** By proving stronger antimicrobial effect of red pepper, it is recommended to use pepper in sufficient amounts along with onion in foods that are made from minced meat like all kinds of Kebab.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, Beta-lactamase, Extract, Red pepper, Red onion, Mixed meat

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

**Corresponding author's email:** jebellija@profs.semnan.ac.ir **Tel/Fax:** 023-33654214, 33654215

**How to cite this article:**

Jebelli Javan, A., Staji, H., Rezaei, N., Shemshadi, Gh., Birgani Farhani, S., Kanani, M. (2019). Assessment of Prevalence and Molecular Characterization of Beta-lactams Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteria Isolated From Raw Minced Beef in Semnan and Effect of Red Pepper (*Capsicum frutescens*) and Red Onion (*Allium cepa*) Extracts Against Them. J Vet Res, 74(4), 464-473. https://10.22059/jvr.2018.256753.2790

## Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Primer used for amplification of 16s rRNA and blaZ gene.
**Table 2.** Total conditions used in investigation of the effect of different concentrations of pepper and onion extracts on *S.aureus* growth chart.
**Table 3.** Number of samples contaminated with *S. aureus.*
**Table 4.** Antibacterial activity of red pepper and red onion extracts on isolated *S. aureus* bacteria with beta-lactamase gene.
**Figure 1.** Results of agarose gel electrophoresis of PCR products. M: 100bp ladder; B1: Negative control (*Ecoli* isolate) for *S. aureus* approval. test; Sa+: *S. aureus* positive control (ATCC29213); lanes 1-5: *S. aureus* positive samples; B2: Negative control for blaZ tracking; Bla+: Positive control for blaZ obtained from sequencing results (Table 2); lanes 6-10: Positive samples with blaZ gene.
**Figure 2.** *Staphylococcus aureus* growth curve and linear gradient (additive growth rate) in the presence of different conditions including control, Red pepper and Red onion extracts each one exclusively and also in combination simultaneously (O: *Onion*, P: Pepper).


www.SID.ir

Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۴، شماره ۴، ۱۳۹۸
مقاله پژوهشی

# بررسی میزان آلودگی به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن بتالاکتاماز در گوشت چرخ‌کرده‌های بسته‌بندی شده در شهر سمنان و تاثیر عصاره‌های متانولی فلفل‌قرمز (*Capsicum frutescens*) و پیازقرمز (*Allium cepa*) بر ضد آن‌ها

**اشکان جبلی جوان[۱]، حمید استاجی[۲]، نجمه رضایی[۳]، غزل شمشادی[۳]، صغری بیرگانی فرهانی[۲]، منصوره کنعانی[۱]**

[۱] گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
[۲] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
[۳] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

10.22059/jvr.2018.256753.2790
**تاریخ دریافت:** ۸ اردیبهشت ماه ۱۳۹۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۲ تیر ماه ۱۳۹۸ **تاریخ انتشار آنلاین:** ۰۱ آذرماه ۱۳۹۸

## چکیده

**زمینهٔ مطالعه:** : یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در فرآورده‌های گوشتی به ویژه آن‌هایی که طی تولید مکررا با دست تماس دارند، *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. برای درمان اغلب عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* از داروهای بتالاکتام به خصوص نسل‌های جدید سفالوسپورین‌ها استفاده می‌شود، اما تولید آنزیم بتالاکتاماز توسط برخی از سویه‌ها موجب ناموفق بودن درمان عفونت‌های وابسته به این ارگانیسم شده است.

**هدف:** تحقیق حاضر با هدف ارزیابی میزان آلودگی و مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره‌های متانولی فلفل‌قرمز و پیازقرمز بر *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های واجد ژن بتالاکتاماز جدا شده از گوشت چرخ‌کرده در شهر سمنان انجام شد.

**روش‌کار:** بدین منظور نمونه‌برداری از ۳۰ مرکز توزیع و عرضه گوشت بسته‌بندی شده در شهر سمنان تحت شرایط بهداشتی انجام شد و تمام نمونه‌ها از نظر حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن بتالاکتاماز مورد آزمایش جداسازی با روش‌های بیوشیمیایی و تایید مولکولی با تست PCR قرار گرفتند. همچنین اثر ضد باکتریایی عصاره‌های فلفل‌قرمز و پیازقرمز بر جدایه‌های مذکور با تست‌های حداقل اثر مهاری (MIC)، حداقل اثر کشندگی (MBC)، انتشار چاهک و منحنی رشد باکتری ارزیابی شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد که ۲۰ درصد نمونه‌ها آلوده به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن بتالاکتاماز بودند. عصاره‌های فلفل‌قرمز و پیازقرمز اثر ضد باکتریایی خوبی را بر ضد این جدایه‌ها نشان دادند و در تمام تست‌ها عصاره فلفل‌قرمز نسبت به پیازقرمز موثرتر بود.

**نتیجه‌گیری نهایی:** با اثبات اثر ضد میکروبی قوی‌تر فلفل‌قرمز توصیه می‌شود در غذاهایی مانند انواع کباب که از گوشت چرخ‌کرده تهیه می‌شوند حتما در کنار پیاز از فلفل نیز به میزان مناسب استفاده شود.

**کلمات کلیدی:** *استافیلوکوکوس اورئوس*، بتالاکتاماز، عصاره، فلفل‌قرمز، پیازقرمز، گوشت چرخ‌کرده

**کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.**

*نویسنده مسئول: اشکان جبلی جوان، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران*
*پست الکترونیکی: jebellija@profs.semnan.ac.ir*

## مقدمه

در طول دهه گذشته وقوع بیماری‌های میکروبی ناشی از مواد غذایی نه تنها در کشورهای در حال توسعه دارای فقر بهداشتی، بلکه در کشورهای توسعه یافته با استاندارد بالای بهداشتی نیز رو به افزایش بوده است (۱۷).

یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (پاتوژن) در فرآورده‌های گوشتی به ویژه آن‌هایی که طی تولید مکررا با دست تماس دارند، *استافیلوکوکوس اورئوس* (عامل مسمومیت غذایی استافیلوکوکال) می‌باشد و در حال حاضر سلامت عمومی را در سراسر جهان به خطر انداخته است. در انسان، این باکتری در قسمت قدامی بینی بزرگسالان وجود دارد و در ۲۰ تا ۳۰ درصد از جمعیت انسانی به صورت دائم و پایدار و در ۶۰ درصد افراد به صورت متناوب دیده می‌شود. لذا افرادی که در مراکز تهیه، عمل‌آوری و توزیع غذا



www.SID.ir

Archive of SID



فعالیت دارند، در صورت عدم رعایت مسائل بهداشتی قادرند باکتری را به غذا انتقال دهند (۵).

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای توکسین‌های مختلفی مانند لوکوسیدین، همولیزین و انتروتوکسین است، که در بیماری‌های غذازاد، انتروتوکسین از اهمیت زیادی برخوردار بوده و مصرف مواد غذایی آلوده به این توکسین موجب بروز مسمومیت غذایی می‌گردد (۴). از دلایل شیوع بالای مسمومیت استافیلوکوکی می‌توان به وجود باکتری در پوست و مخاط کارکنان، مقاومت و رشد باکتری در محیط های قندی نمکی و از همه مهم‌تر تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت اشاره کرد (۱۸، ۱۵).

برای درمان اغلب عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* از داروهای بتالاکتام به خصوص نسل‌های جدید سفالوسپورین‌ها استفاده می‌شود، اما افزایش سریع مقاومت به این داروها موجب ناموفق بودن درمان عفونت‌های وابسته به این ارگانیسم شده است. اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام در استافیلوکوکوس‌ها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز و یا تغییر پروتئین‌های دیواره (Penicillin Binding Proteins, PBPs) می‌باشد که تمایل کاهش‌یافته آن‌ها به دارو منجر به مقاومت وسیعی نسبت به پنی سیلین‌های نیمه سنتزی، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها می‌شود. بتالاکتامازها به طور انتخابی حلقه بتالاکتام را باز می‌کنند به نحوی که ساختار تغییریافته دارو نمی‌تواند اتصال موثری با PBSها برقرار نماید و در نتیجه سنتز سلولی ادامه می‌یابد (۲۲) همبستگی بین مقاومت به پنی‌سیلین در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* و تولید بتالاکتاماز، اولین بار در سال ۱۹۴۴ گزارش شد. طبق آمار، سویه‌های مقاوم باکتری از میزان ۵ درصد در سال ۱۹۴۶، به ۵۰ درصد در سال ۱۹۵۰ و به بیش از ۹۰ درصد تا سال ۲۰۰۰، رسیده است (۷).

دو مکانیسم مقاومت اولیه در برابر بتالاکتام‌ها در گونه‌های استافیلوکوکوس قابل توجه است: بیان آنزیم‌های بتالاکتاماز کدگذاری شده توسط ژن blaZ و تولید پروتئین‌های اتصال دهنده پنی‌سیلین 2a که توسط ژن MecA کدگذاری شده است. شیوع مقاومت پنی سیلین در بیماری‌های جانوری ناشی از استافیلوکوکوس اغلب به دلیل ژن blaZ است. ژن blaZ بخشی از اپران سه قسمتی bla است. اپران bla شامل blaZ، blaI و blaR1 است (۱۰).

تست‌های مختلفی برای ارزیابی محصولات بتالاکتاماز در استافیلوکوکوس‌ها می‌تواند انجام شود. یک روش کیفی برای جداسازی بتالاکتاماز، استفاده از دیسک‌های Nitrocefin است. در این روش از سوسپانسیون‌های باکتریایی در سرم فیزیولوژی بر روی این دیسک‌ها استفاده می‌شود و تغییر رنگ دیسک مورد بررسی قرار می‌گیرد. یک روش دیگر، استفاده از تست میکروبیولوژیک clover leaf است. در این تست، بر روی محیط آگار مولر هینتون، یک سویه آکسفورد *استافیلوکوکوس اورئوس*، به عنوان شاخص، و از دیسک های حاوی یک میکروگرم بنزیل پنی‌سیلین استفاده می‌شود (۲۳).

با توجه به اینکه این تست‌های فنوتیپی حساسیت کمتر از ۷۲ درصد دارند، ردیابی blaZ با استفاده از روش PCR، به عنوان gold standard توصیه می‌شود (۱۰).

نتایج مطالعات انجام شده بر روی آلودگی باکتریایی غذاهای مصرفی در برخی از دانشگاه‌ها نشان داد که کباب‌کوبیده و ماهی از نظر شمارش کلی باکتری‌ها آلوده‌ترین نوع غذاها بوده‌اند و ۵۵/۶ درصد نمونه‌ها دارای آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده‌اند و همچنین آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* فقط در نمونه‌های مربوط به کباب‌کوبیده وجود داشته است (۲۶).

از زمان کشف داروهای شیمیایی و ترکیبات ضد میکروبی، گرچه کنترل عفونت‌های غذایی امکان‌پذیر گردیده، ولی با این همه، برخی باکتری‌ها به ترکیبات فوق مقاوم هستند و علاوه بر این نگرانی هایی در خصوص ایمنی و پتانسیل اثر افزودنی‌های مصنوعی و عوارض جانبی نگهدارنده‌های شیمیایی بر سلامت مصرف‌کنندگان مطرح شده که معطوف شدن توجهات به بحث جایگزینی آن‌ها با ترکیبات ضد میکروبی طبیعی را در پی داشته است. در این میان، توجه تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان به استفاده از ترکیبات گیاهی معطوف شده که خواص ضد میکروبی ترکیبات فوق، مورد مطالعه قرار گرفته و اثرشان علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها به اثبات رسیده است (۱۹).

پیاز و فلفل از مهم‌ترین و پرکاربردترین افزودنی‌های گیاهی در مواد غذایی تهیه شده از گوشت چرخ کرده مانند کباب کوبیده می باشند. پیاز نوعی گیاه غده‌ای گوشتی زیر زمینی از خانواده لاله با نام علمی *Allium cepa* است. پیاز دارای بخش هوایی و بخش ریشه خوراکی است. بو و مزه پیاز مربوط به ترکیب محیط و ژنتیک آن است. بوی پیاز مربوط به مواد گوگردی فراری است که در هنگام تقطیر در حرارت معمولی اتاق تجزیه می‌گردند. فلاوونوئیدهای پیاز ترکیبات شیمیایی هستند که در برابر میکروارگانیسم‌ها فعال می‌شوند و در محیط آزمایشگاه، در برابر رشد میکروارگانیسم‌ها اثر آنتی باکتریال از خود نشان می‌دهند (۳۱).


www.SID.ir

Archive of SID


فلفل قرمز از جمله گیاهانی است که در طب سنتی در درمان عفونت‌های چرکی استفاده می‌شوند. فلفل گیاهی است علفی و دارای ساقه بی کرک که از تیره Piperaceae است. برخی از ترکیبات ضد میکروبی استخراج شده از آن عبارتند از: کاپسانتین، ترپینر، بتاپینن، آلفاپینن، لینالئول و ترپینئول (۳۳).

بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی و مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره‌های متانولی فلفل‌قرمز و پیازقرمز بر *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن بتالاکتاماز جدا شده از گوشت چرخ‌کرده، انجام شد.

## مواد و روش‌کار

**تهیه عصاره الکلی:** پس از تهیه میوه فلفل‌قرمز و پیازقرمز از فروشگاه‌های محلی و شناسایی دقیق آن ناخالصی‌های احتمالی موجود جدا گردید، قسمت‌های خوراکی گیاه خرد و در سایه خشک گردید و پس از آسیاب کردن بصورت پودر درآمد و سپس با نسبت ۱ به ۵ با متانول ۷۰ درصد در آب مقطر (v/v) به صورت سوسپانسیون درآورده شدند و در محیط آزمایشگاه نگه داشته شدند و پس از ۲۴ ساعت مخلوط حلال و گیاه از هم جدا شدند و به وسیله کاغذهای صافی بزرگ (واتمن شماره ۴۱) و کوچک (واتمن شماره ۱)، فیلتراسیون دقیق انجام شد تا عصاره خالص حاصل شود. عصاره خالص در دستگاه تبخیر کننده دوار تحت خلا (روتاری) ( ساخت آلمان، شرکت IKA) قرار گرفت و در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد حلال آن به مدت ۱ ساعت به آرامی تبخیر و عصاره غلیظ شده به دست آمد (۲۰).

**نمونه‌برداری و جداسازی استافیلوکوکوس:** نمونه‌برداری از ۳۰ مرکز توزیع و عرضه گوشت بسته‌بندی شده در شهر سمنان تحت شرایط بهداشتی و به صورت کاملاً تصادفی انجام شد و نمونه‌ها در بسته‌های ۵۰۰ گرمی در کنار یخ به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی منتقل شدند. برای جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* ابتدا ۲۵ گرم از نمونه به ۲۲۵ سی‌سی پپتون واتر بعنوان غنی کننده اولیه افزوده شد و پس از مخلوط کردن کامل، ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. ۰/۱ سی سی از هر نمونه در محیط کشت اختصاصی *استافیلوکوکوس اورئوس* (آگار برد پارکر) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید (۳۰). تایید بیوشیمیایی کلنی‌های سیاه با هاله شفاف اطرافی به وسیله آزمون‌های تولید کواگولاز و نوکلئاز مقاوم به حرارت و کاتالاز صورت گرفت (۲). پس از تایید بیوشیمیایی کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش PCR از نظر جنس و گونه و حضور ژن بتالاکتاماز مورد بررسی و تایید قرار گرفتند. جدایه‌های تایید شده به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط آبگوشت قلب و مغز (BHI) کشت داده شد. سپس کشت مجدد از کشت اول داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. از کشت دوم برای تهیه استوک به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری در لوله‌های اپندورف استریل در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱۶).

**استخراج اسیدهای نوکلئیک:** جهت استخراج DNA از جدایه‌های ذخیره شده *S. aureus* ابتدا نمونه‌ها از یخچال خارج شده و بمدت ۲۴ ساعت در محیط لوریا برتانی آگار (LB) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت شدند. سپس از پرگنه‌های رشد یافته برداشت کرده و به میکروتیوب‌های حاوی ۲۵ میکرولیتر NaOH نیم نرمال افزوده شد تا شیرابه‌ای یکنواخت بدست آید. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، ۲۵ میکرولیتر تریس یک مولار به سوسپانسیون فوق اضافه گردید تا عمل هضم باکتری‌ها توسط سود متوقف شده و محلولی با pH نهایی ۷/۵ تهیه شود. بلافاصله با افزودن ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به مجموعه حجم محلول به ۵۰۰ میکرولیتر رسیده و رقت نهایی از عصاره DNA جهت انجام آزمون PCR تهیه گردید.

**انجام آزمون PCR جهت تایید مولکولی *S. aureus* و ردیابی ژن blaZ:** پس از انجام مراحل استخراج DNA از سوش‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* مورد مطالعه، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مطابق پروتکل ارائه شده توسط Trung و همکاران در سال ۲۰۱۵ با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی توالی 16SrRNA گونه *S.aureus* و جهت ردیابی ژن بتالاکتاماز blaZ از پرایمرها و پروتکل ارائه شده توسط Haveri و همکاران در سال ۲۰۰۵ درون دستگاه ترموسایکلر XP (BIOER tech. China) در ۳۵ سیکل و تحت شرایط دمایی زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد ، دناتوراسیون ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال ۴۰ ثانیه در ۵۷/۳ درجه سانتیگراد، طویل‌سازی ۴۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد و طویل‌سازی نهایی ۴ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام پذیرفت (۲۷، ۱۳). توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۳ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس، ۱ میکرولیتر از پرایمرها (جدول ۱)، ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری تهیه شد.

برای قرائت نتایج PCR، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. شاهد مثبت و منفی در تمام واکنش‌های PCRمورد استفاده قرار گرفت. به عنوان شاهد مثبت گونه *استافیلوکوکوس آرئوس* از سویه استاندارد ۲۹۲۱۳ و به عنوان شاهد


www.SID.ir

Archive of SID



منفی از گونه اشریشیاکلی استفاده شد. بدلیل عدم وجود سویه استاندارد واجد ژن blaZ جهت استفاده در مطالعه حاضر، محصولات تکثیر شده در آزمون مورد نظر جهت تعیین توالی به شرکت سیناکلون ارسال شده و نتایج اخذ شده پس از انجام Nucleotide BLAST مشخص نمود که توالی مربوط به محصولات تکثیر شده دقیقاً متعلق به ژن blaZ می‌باشند. بعلاوه صحت نتایج PCR با استفاده از سوش فاقد مقاومت فنوتیپی در تست آنتی‌بیوگرام علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از لحاظ وجود باندهای غیراختصاصی کنترل گردید. در گوده اول ژل نیز مارکر bp-plus100 استفاده شد (تصویر ۱). برای رنگ‌آمیزی ژل از رنگ Ethidium Bromide استفاده شده و زیر دستگاه UV نتایج بررسی شد

**اثر ضد میکروبی عصاره‌ها بر جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*- تهیه میزان تلقیح باکتری:** جهت تهیه میزان تلقیح باکتری از کشت استوک گلیسیرینه به داخل محیط آبگوشت BHI برده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس از کشت اول کشت مجددی داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. از کشت دوم مقادیر مختلفی به داخل لوله کووتی که حاوی ۴ میلی‌لیتر آبگوشت BHI استریل بود، منتقل شد تا جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به دست آید. سپس با انتقال ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی داخل کووت، به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد رقت‌های متوالی تا ۱۰ به نمای منفی شش، از طریق انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی BHI آگار از رقت‌های تهیه شده، کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد و پس از این مدت، تعداد باکتری شمارش شد و از این طریق میانگین تعداد باکتری درکووت حاوی سوسپانسیون باکتری با جذب نوری معادل ۰/۱ با دو بار تکرار محاسبه شد. با مشخص شدن این عدد، هرگاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده بوده و می‌توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دلخواه را تهیه نمود. البته در هر مورد تعداد دقیق باکتری تلقیح شده از طریق کشت هم زمان باکتری و شمارش تعداد کلونی محاسبه شد (۱۱).

**روش انتشار از چاهک در آگار (agar well diffusion):** در این روش از محیط آگار مولر هینتون استفاده گردید (۲۸). بدین ترتیب که سواب های پنبه ای استریل، درون سوسپانسیون باکتریایی با غلظت $10^6$ CFU در هر میلی لیتر غوطه ور شدند و درون لوله در قسمت بالای سطح مایع، به دیواره لوله فشرده شدند. سپس سواب به سرعت در تمام سطح پلیت حرکت داده شد تا تلقیح به خوبی انجام شود. در هر پلیت شش چاهک با فواصل یکسان به قطر ۶ میلی متر، یکی در مرکز و پنج تا در اطراف ساخته شد، به گونه‌ای که ۲ میلی متر از لبه پلیت فاصله داشت. ۵ تا از چاهک‌ها به صورت آسپتیک با ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف هر عصاره (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در BHI براث حاوی ۵ درصد DMSO) پر شدند. یکی از چاهک‌ها نیز به عنوان کنترل با ۵۰ میکرولیتر محیط استریل BHI براث حاوی ۵ درصد DMSO پر شد. پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا عصاره در آگار پخش شود و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. در نهایت محدوده ممانعت بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. آزمایش با سه بار تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردید (۱).

**تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش میکرودایلوشن:** در مطالعه حاضر، جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن از پلیت ۹۶ خانه با چاهک ته گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده گردید. غلظت‌های متوالی از عصاره‌ها در آبگوشت BHI حاوی ۵ درصد DMSO تهیه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌ها به هر کدام از پلیت‌های ۹۶ خانه انتقال داده شد و تا ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری نیز اضافه شد (با غلظت نهایی $5 \times 10^5$ CFU در هر میلی‌لیتر باکتری در هر چاهک)، که با تهیه رقت‌های متوالی از سوسپانسیون باکتری و کشت در پلیت و شمارش تعداد کلونی تایید گردید. محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه توسط Plate Reader مجهز به شیکر مخلوط شد. سپس جذب نوری با استفاده از Plate Reader در زمان صفر و با طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند و بعد از اتمام گرمخانه گذاری کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده گردید و با جذب نوری خوانده شده بعد از گرمخانه گذاری توسط Plate Reader تایید شد. روش کار به این صورت بود که افزایش جذب نوری به میزان بزرگتر یا مساوی ۰/۱ نسبت به زمان صفر به معنای رشد باکتری و ایجاد کدورت و اولین غلظت از عصاره‌ها که فاقد کدورت بودند به منزله حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) در نظر گرفته شدند (۲۴ ، ۱۶).

**MBC: تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (باکتری کشی):** برای تعیین MBC، ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی عصاره و


www.SID.ir

Archive of SID


سوسپانسیون باکتری که در تست MIC فاقد کدورت بودند، در محیط تازه نوترینت آگار به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. کمترین غلظتی که فاقد رشد در محیط نوترینت آگار بود، به عنوان MBC گزارش شد (۱).

**بررسی اثر عصاره‌های پیاز و فلفل بر نمودار رشد باکتری:** در این مرحله بر اساس نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره‌ها (جدول ۴) اثر غلظت‌های تحت بازدارنده عصاره‌های پیاز و فلفل به تنهایی و به صورت توام با هم روی رشد یکی از ایزوله‌های تایید شده در طی ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده عبارت بودند از عصاره متانولی فلفل صفر و ۷/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر و عصاره متانولی پیاز ۰ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. مجموع حالات مورد استفاده در جدول ۲ آمده است. ۱۰ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده (در غلظت‌های مختلف) در لوله‌ها توزیع شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری (با غلظت نهایی $5 \times 10^5$ CFU در میلی‌لیتر) به هر ۴ لوله اضافه گردید. لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند و در ساعت‌های صفر، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴ رقت‌های مورد مطالعه از هر ۴ لوله در زمان‌های فوق تهیه شد و در پلیت آگار BHI به صورت سه تایی کشت داده شد و بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد شمارش تعداد کلونی انجام شد و تعداد باکتری‌ها در ساعات مورد نظر بر حسب لگاریتم CFU در هر میلی‌لیتر (log CFU/ml) محاسبه شد.

نمودارهای مربوط به منحنی رشد باکتری با نرم افزار Graphpad prism 4 ترسیم شد و کلیه تحلیل‌های آماری بین لگاریتم تعداد باکتری‌ها در ساعات مختلف و همچنین شیب خط منحنی‌های رشد با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 صورت گرفت. جهت مقایسه داده‌ها از تست One-way ANOVA همراه تست تکمیلی توکی و همچنین آنالیز ارزیابی‌های مکرر (Repeated measure) برای بررسی روند رشد استفاده شد و اختلاف میانگین داده‌ها در سطح ۵ درصد از لحاظ آماری، معنی‌دار تلقی گردید.

## نتایج

**میزان آلودگی نمونه‌ها:** میزان آلودگی به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و تایید ملکولی باکتری و ژن بتالاکتاماز جدایه‌ها در نمونه‌های گوشت چرخ‌کرده به ترتیب در جدول ۲ و تصویر ۱ نمایش داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود از ۲۲ نمونه از گوشت‌های چرخ‌کرده (۷۳/۳ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا گردید که تمام جدایه‌ها با تست *PCR* نیز تایید شدند (تصویر ۱). ردیابی ژن *blaZ* نیز نشان داد که ۵ نمونه از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۲/۷ درصد از نمونه‌های آلوده و ۱۶/۶ درصد از کل نمونه‌ها) حاوی ژن بتالاکتاماز بودند (تصویر ۱).

**اثر ضد میکروبی عصاره‌ها:** بر اساس نتایج این پژوهش، فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های پیاز و فلفل‌قرمز بر روی ۵ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی ژن بتالاکتاماز در جدول ۴ آمده است. همان گونه که مشاهده می‌گردد در تمامی آزمایش‌ها و بر ضد تمام جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* عصاره فلفل‌قرمز اثر مهاری قوی‌تری دارد که این برتری در ارتباط با آزمایش انتشار چاهک از نظر آماری نیز معنادار می‌باشد ($P<0/05$).

**جدول ۱.** مشخصات پرایمرهای استفاده شده جهت ردیابی ژن 16s rRNA و blaZ.

| ژن هدف | اندازه‌ی محصول | توالی پرایمر | نام پرایمر |
|---|---|---|---|
| *16S rRNA* | 515 bp | 5'- AAGGGCGAAATAGAAGTGCCGG-3' | *S. aureus.F* |
| | 515bp | 5´- ATGGTCGGTTCCTTAGAAAACAAACTTG-3' | *S. aureus.R* |
| *blaZ* | 579bp | 5'- AAGAGATTTGCCTATCCTTC-3' | blaZ. F |
| | 579bp | 5'- GCTTGACCACTTTTATCAGC-3' | blaZ. R |

**جدول ۲.** مجموع حالات مورد استفاده در بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های فلفل قرمز و پیاز قرمز روی نمودار رشد باکتری.

| | حالت اول | حالت دوم | حالت سوم | حالت چهارم |
|---|---|---|---|---|
| غلظت عصاره پیاز (میلی گرم در میلی لیتر) | صفر | ۱۲/۵ | صفر | ۱۲/۵ |
| غلظت عصاره فلفل ( میلی گرم در میلی لیتر) | صفر | صفر | ۷/۵ | ۷/۵ |


www.SID.ir

Archive of SID



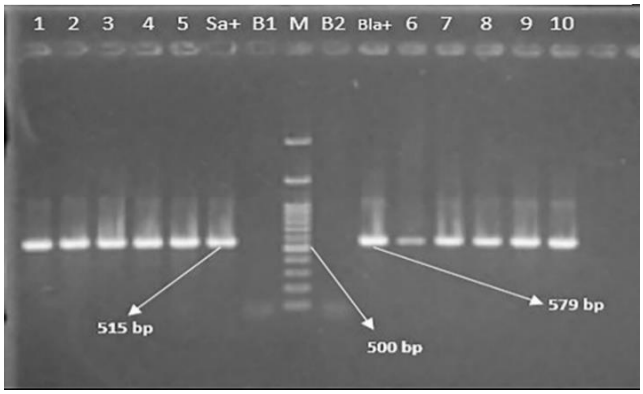
**جدول ۳.** تعداد نمونه‌های آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس*.

| تعداد نمونه‌ها | ۳۰ |
|---|---|
| تعداد نمونه‌های آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۲۲ (۷۳/۳ درصد) |
| تعداد نمونه‌های آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن بتالاکتاماز | ۵ (۱۶/۶ درصد) |

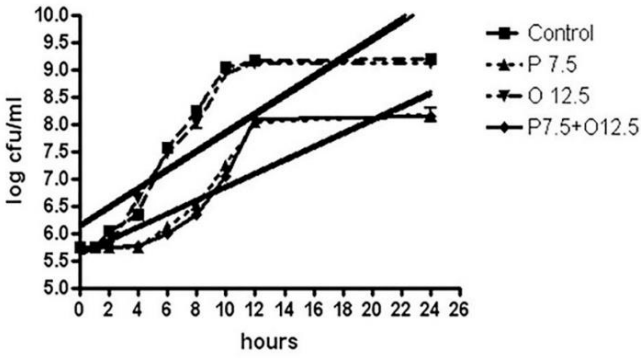
**جدول ۴.** فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های فلفل قرمز و پیاز قرمز بر روی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی ژن بتالاکتاماز.

| | عصاره پیازقرمز | | | عصاره فلفل‌قرمز | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| جدایه ها | MBC (mg/ml) | MIC (mg/ml) | IZ (mm) | MBC[c] (mg/ml) | MIC[b] (mg/ml) | IZ[a] (mm) |
| ۱ | ۳۵ | ۲۵ | $^{B}$۸ ±۰/۶ | ۲۰ | ۱۵ | $^{A*}$۱۵ ±۰/۶ |
| ۲ | ۴۰ | ۲۵ | $^{B}$۷ ±۰/۵ | ۲۵ | ۱۵ | $^{A}$۱۶ ±۰/۹ |
| ۳ | ۴۰ | ۲۵ | $^{B}$۵ ±۰/۴ | ۲۰ | ۱۵ | $^{A}$۱۵ ±۱/۰ |
| ۴ | ۳۵ | ۲۵ | $^{B}$۷ ±۰/۶ | ۲۰ | ۱۰ | $^{A}$۱۷ ±۰/۸ |
| ۵ | ۴۰ | ۲۵ | $^{B}$۶ ±۰/۳ | ۲۵ | ۱۵ | $^{A}$۱۵ ±۰/۵ |

[a] (Inhibition Zone) : میانگین ±انحراف معیار قطر هاله مهاری به میلی‌متر، [b] MIC: حداقل غلظت مهاری (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، [c] MBC : حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، * حروف غیر مشابه در ستون‌های مربوط به IZ نشان دهنده تفاوت معنادار آماری ($P<$ ۰/۰۵) بین دو عصاره می‌باشند.




**تصویر ۱.** نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز. M: مارکر به اندازه ۱۰۰ باز، B1: شاهد منفی (جدایه *اشریشیاکلی*) مربوط به آزمون تایید استافیلوکوکوس آرئوس، +Sa: شاهد مثبت *استافیلوکوکوس آرئوس* (۲۹۲۱۳)، ۱-۵: نمونه‌های مثبت تشخیص داده شده به عنوان *S. aureus*، B2: شاهد منفی جهت ردیابی blaZ، +Bla: نمونه شاهد مثبت blaZ (تعیین توالی شده مطابق جدول ۲)، ۶-۱۰ : نمونه‌های مثبت از لحاظ حضور ژن blaZ.




**نمودار۱.** منحنی رشد و شیب خطی رشد (روند افزایشی) باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور کنترل، عصاره فلفل به تنهایی، عصاره پیاز به تنهایی و ترکیب عصاره‌های پیاز و فلفل (O: پیاز، P: فلفل).

## بررسی اثر عصاره‌های پیاز و فلفل بر نمودار رشد باکتری:

نمودار ۱ منحنی‌های رشد و همچنین شیب خطی (روند افزایشی) جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی ژن بتالاکتاماز را در حضور عصاره‌های هیدروالکلی پیازقرمز و فلفل‌قرمز نشان می‌دهند. تحلیل آماری روی منحنی رشد باکتری در نمودار ۱ نشان داد که از ساعت ۲ گرمخانه گذاری در تمامی ساعات میزان باکتری در گروه کنترل و گروه حاوی عصاره پیازقرمز بیشتر از گروه‌های عصاره فلفل-قرمز و گروه ترکیبی بود ($P<$۰/۰۰۱) و بین دو گروه کنترل و عصاره پیاز و همچنین بین دو گروه عصاره فلفل و گروه ترکیبی اختلاف معنادار دیده نشد ($P>$۰/۰۵). مقایسه و تحلیل آماری لگاریتم تعداد باکتری‌ها در هر گروه و بررسی افزایش معنادار در تعداد باکتری‌ها ($P<$۰/۰۰۱) نشان داد که دوره فاز تاخیر در گروه‌های کنترل، عصاره پیاز، عصاره فلفل و ترکیب پیاز و فلفل به ترتیب ۱، ۲، ۴ و


www.SID.ir

Archive of SID


۴ ساعت بود. مقایسه شیب خطی منحنی‌های رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور عصاره‌های پیاز و فلفل نیز نشان داد که بین روند افزایشی تعداد باکتری در دو گروه کنترل (با شیب ۰/۰۲±۰/۱۷) و پیاز به تنهایی (با شیب ۰/۰۲±۰/۱۷) و همچنین بین دو گروه فلفل به تنهایی (با شیب ۰/۰۲±۰/۱۲) و ترکیب پیاز و فلفل (با شیب ۰/۰۱±۰/۱۲) اختلاف معنادار وجود ندارد ($P>0/05$) ولی روند افزایشی تعداد باکتری در گروه‌های فلفل به تنهایی و ترکیب پیاز و فلفل به صورت معنادار کندتر از گروه کنترل و گروه پیاز به تنهایی است ($P<0/05$)

## بحث

اخیرا به دلیل بروز مقاومت‌های دارویی و طولانی بودن زمان درمان عفونت باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، اولویت تحقیقات برای ساخت داروهای جدید و موثر افت پیدا کرده و اهمیت یافتن راهی جدید برای درمان دوچندان شده است. در این راستا با اثبات اثر ترکیبات گیاهی علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها، مخمرها و قارچ ها توجه تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان به استفاده از این ترکیبات معطوف شده است (۸). یکی از مهم‌ترین مزایای ترکیبات گیاهی نسبت به داروهای سنتزی این است که بر خلاف این ترکیبات شیمیایی علاوه بر تاثیر مستقیم بر پیکر باکتری‌ها محیط اطرافی را بر ضد آن‌ها و در جهت مهار رشدشان تغییر داده و به این ترتیب از ایجاد سویه‌های میکروبی مقاوم به دارو نیز جلوگیری می‌شود (۳).

*استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های پاتوژن در مواد غذایی می‌باشد که می‌تواند عامل انتقال عفونت‌های استافیلوکوکی و همچنین مسمومیت غذایی به انسان گردد (۵). نتایج این مطالعه نشان داد که ۷۳/۳ درصد از نمونه‌های بسته‌بندی شده گوشت چرخ‌کرده آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. بالا بودن آلودگی در نمونه‌های خام می تواند به دلایل مختلفی از جمله آلودگی اولیه و ثانویه (ناشی از آماده‌سازی با دست و عدم رعایت صحیح اصول بهداشتی در حین آماده‌سازی باشد (۲۱). در مطالعه‌ای که توسط Mustafa و همکاران در سال ۲۰۰۹ در یک پادگان نظامی در هند انجام گرفت، آلودگی ۷۷/۷ درصد از مواد گوشتی خام به *استافیلوکوکوس اورئوس* تایید شد که این میزان بسیار به مطالعه حاضر شباهت داشت (۲۱). TavaKoli و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز در مطالعه‌ای که بر روی غذاهای سرو شده در رستورآن‌های مراکز نظامی انجام دادند آلودگی ۵۵/۶ درصدی غذاهای گوشتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* را گزارش نمودند (۲۵). با اینکه این میزان آلودگی کمتر از نتایج این تحقیق بود ولی با توجه به اینکه نمونه‌های مورد آزمایش آن‌ها غذاهای آماده مصرف بودند این میزان آلودگی بسیار قابل توجه می‌باشد.

در این تحقیق نمونه‌های آلوده به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن بتالاکتاماز نیز ردیابی شدند و نتایج نشان داد که ۱۶/۶ درصد از نمونه‌ها آلوده به این سویه‌ها بودند. فنوتیپ‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک از نظر مسمومیت غذایی اهمیت زیادی ندارند زیرا این بیماری گوارشی از طریق مصرف آنتی‌بیوتیک مدیریت نمی‌شود اما فرضیه‌ای وجود دارد که تماس، دستکاری و مصرف گوشت‌های آلوده از دلایل انتقال و کلونیزه شدن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در روی پوست و مخاطات بینی و دهان می‌باشد و بدین ترتیب حضور این سویه‌های واجد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های خام و آماده مصرف حتی با میزان بسیار کمتر از نتیجه این تحقیق می‌تواند سلامت عمومی جامعه را به طور جدی تهدید کند (۶). مطالعات در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از گوشت بیشتر بر پایه *استافیلوکوکوس اورئوس*های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) بوده است و در ارتباط با باکتری‌های حامل ژن اختصاصی بتالاکتاماز تحقیقات زیادی صورت نگرفته است. در این ارتباط Hanson و همکاران در سال ۲۰۱۱ شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس*های مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های گوشت عرضه شده در فروشگاه‌ها را مورد بررسی قرار دادند و میزان آلودگی ۱/۲ درصد را گزارش نمودند (۱۲). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Igbinosa و همکاران در سال ۲۰۱۵ در نیجریه صورت گرفت ۲۰ درصد از نمونه‌های گوشت گاو آلوده به MRSA بودند (۱۴).

نتایج این تحقیق نشان دهنده اثر خوب عصاره‌های فلفل و پیاز بر ضد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن بتالاکتاماز می باشد. این اثر ضد باکتریایی در مورد عصاره پیازقرمز می‌تواند مربوط به حضور ترکیبات فلاونوئیدی و پلی فنلی موجود در این عصاره باشد که اثر مهاری آن‌ها بر رشد باکتری‌ها ثابت شده است (۹). نتایج این مطالعه حاکی از تاثیر قوی‌تر عصاره فلفل‌قرمز نسبت به پیازقرمز در تمام تست‌های ضد میکروبی و نمودار رشد میکروبی بود. در مطالعات پیشین ثابت شده است که عصاره‌های بعضی از گیاهان از جمله فلفل علاوه بر اثر روی غشای باکتری‌ها (که در مورد بسیاری از نگهدارنده‌ها به عنوان تنها مکانیسم ضد میکروبی پیشنهاد می‌شود) بر روی سنتز آنزیم‌های مختلف باکتری‌ها نیز نقش مهاری دارند (۳۲). این مطلب می‌تواند یکی از دلایل برتری عصاره فلفل‌قرمز نسبت به پیازقرمز در این مطالعه باشد.


www.SID.ir

Archive of SID



در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های فلفل‌قرمز و پیازقرمز دارای اثر ضد باکتریایی بر *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های واجد ژن بتالاکتاماز جدا شده از گوشت‌های چرخ‌کرده می‌باشند. با توجه به اینکه استفاده از منابع گیاهی در ایجاد سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک تاثیر بسیار کمتری نسبت به نگهدارنده‌های شیمیایی دارد، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده از مواد موثر این عصاره‌ها به صورت خالص در فراوری محصولات گوشتی استفاده گردد و همچنین با اثبات اثر ضد میکروبی قوی‌تر فلفل‌قرمز توصیه می‌شود در غذاهایی مانند انواع کباب که در آن‌ها از گوشت چرخ‌کرده استفاده می‌شود حتماً در کنار پیاز از فلفل نیز به میزان مناسب استفاده شود.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از خانم مهندس بهناز رئیسیان و خانم لیلا رضایی به خاطر کمک‌های ارزنده‌شان در مراحل کارهای آزمایشگاهی و ویراستاری مطالب اعلام می‌دارند.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Abew, B., Sahile, S., Moges, F. (2014). In vitro antibacterial activity of leaf extracts of *Zehneria scabra* and *Ricinus communis* against Escherichia coli and methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. Asian Pac J Trop Biomed, 4(10), 816-820. https://doi.org/10.12980/APJTB.4.201414B16
2. Adams, M., Moss, M. (2000). Food Microbiology, UK, Cambridge, 2nedn, The Royal Society of Chemistry. p. 256.
3. Ani, V., Varadaraj, M., Naidu, K. A. (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). Eur FoodRes Technol, 224(1), 109-115. http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0408-8
4. Atanassova, V., Meindl, A., Ring, C. (2001). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. Int J Food Microbiol, 68(1-2), 105-113. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00479-2
5. Best, N., Fraser, J. D., Rainey, P. B., Roberts, S. A., Thomas, M. G., Ritchie, S. R. (2011). Nasal carriage of S*taphylococcus aureus* in healthy Aucklanders. N Z Med J, 124(1332), 31-39.
6. Bortolaia, V., Espinosa-Gongora, C., Guardabassi, L. (2016). Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. Clin Microbiol Infect, 22(2), 130-140. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.003
7. Chambers, H. F. (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerging infectious diseases, 7(2), 178. PMID: 11294701
8. Cohen, M. L. (1992). Epidemiology of drug resistance: implications for a post—antimicrobial era. Science, 257(5073), 1050-1055.
9. Shinkafi, S. A., Dauda, H. (2013). Antibacterial Activity of *Allium Cepa* (Onion) On Some Pathogenic Bacteria Associated With Ocular Infections. Sch J App Med Sci, 1(3), 147-151.
10. Ferreira, A. M., Martins, K. B., Silva, V. R. d., Mondelli, A. L., Cunha, M. d. L. R. d. (2017). Correlation of phenotypic tests with the presence of the blaZ gene for detection of beta-lactamase. Braz J Microbiol, 48(1), 159-166. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.011
11. Gandomi, H., Abbaszadeh, S., JebelliJavan, A., Sharifzadeh, A. (2014). Chemical constituents, antimicrobial and antioxidative effects of *Trachyspermum ammi* essential oil. J. Food Process Preserv, 38(4), 1690-1695. https://doi.org/10.1111/jfpp.12131
12. Hanson, B., Dressler, A., Harper, A., Scheibel, R., Wardyn, S., Roberts, L., Smith, T. (2011). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. J Infect Public Health, 4(4), 169-174. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2011.06.001
13. Haveri, M., Suominen, S., Rantala, L., Honkanen-Buzalski, T., Pyörälä, S. (2005). Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. Vet microbiol, 106 (1-2), 97-102. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.12.015
14. Igbinosa, E. O., Beshiru, A., Akporehe, L. U., Oviasogie, F. E., Igbinosa, O. O. (2016). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other Staphylococcus species in raw meat samples intended for human consumption in Benin City, Nigeria: implications for public health. Int J Environ Res Public Health, 13(10), 949. https://doi.org/1 0.3390 /ijerph 13100949
15. Jay, J. M., Loessner, M., Golden, D. (2005). Modern food microbiology, USA, New York, 7 th, Springer Since, Business Media, LLC. p. 480.
16. Jebelli Javan, A. (2016). Combinational effects of *Trachyspermum ammi* and *Zataria multiflora* Boiss essential oils on some pathogenic food-borne bacteria. Koomesh, 17(2), 374-383.
17. Khalifezade, S., Sadeghi, Z. M., Nahaee, M. (2015). Prevalence and antibiotics susceptibility of Staphylococcus aureus in traditional Kouzeh cheese at Saqqez retails. Journal of Food Hygiene, 4(16), 1-9.
18. Lues, J., Van Tonder, I. (2007). The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. Food control, 18(4), 326-332. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.010
19. Mitscher, L. A., Drake, S., Gollapudi, S. R., Okwute, S. K. (1987). A modern look at folkloric use of anti-infective agents. J Nat Prod, 50(6), 1025-1040. https://doi.org/10.1021/np50054a003



www.SID.ir

Archive of SID



20. Mozdastan, S., Ebrahimzadeh, M. A., Khalili, M. (2015). Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant activities of myrtle (Myrtus communis L.). J Mazandaran Uni Med Sci, 25(127), 10-24.

21. Mustafa, M., Jain, S., Agrawal, V. (2009). Food poisoning outbreak in a military establishment. Armed Forces Med J India, 65(3), 240-243.

22. Olsen, J. E., Christensen, H., Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Antimicrob Chemother. 57(3), 450-460.

23. Pitkälä, A., Salmikivi, L., Bredbacka, P., Myllyniemi, A. L., Koskinen, M. (2007). Comparison of tests for detection of β-lactamase-producing staphylococci. J Clin Microbiol, 45(6), 2031-2033.

24. Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A.C. (2007). Antimicrobial susceptibility testing protocols, USA, New York, 3th ed, Crc Press. p. 564-566.

25. Tavakoli, H., Farhang, K., A, K. Z., Heydari, E. (2012). Bacteriological quality of ready to eat food in four military restaurants. Journal Mil Med, 13(4), 207-212.

26. Tavakoli, H. R., Riazipour, M. (2008). Microbial quality of cooked meat foods in Tehran University's Restaurants. Pak J Med Sci, 24(4), 595-599.

27. Trung, N.T., Hien, T.T.T., Huyen, T.T.T., Quyen, D.T., Binh, M.T., Hoan, P.Q. Velavan, T.P. (2015). Simple multiplex PCR assays to detect common pathogens and associated genes encoding for acquired extended spectrum betalactamases (ESBL) or carbapenemases from surgical site specimens in Vietnam. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 14(1), 23.

28. Uddin, B., Hossan, T., Paul, S., Ahmed, T., Nahar, T., Ahmed, S. (2010). Antibacterial activity of the ethanol extracts of Hibiscus rosa-sinensis leaves and flowers against clinical isolates of bacteria. Bangladesh J Life Sci, 22(2), 65-73.

29. Udo, E. E., Al-Mufti, S., Albert, M. J. (2009). The prevalence of antimicrobial resistance and carriage of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers in Kuwait City restaurants. BMC Res Notes, 2(1), 108.

30. Varnam, A. Evans, M. G. (1991). Foodborne Pathogens—an Illustrated Text. UK, London, (1st ed.). Wolfe Publishing. p. 345.

31. Zamanzad, B. (2010). The antibacterial properties of *Allium cepa* (onion) and *Zingiber officinale* (ginger) extracts on Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa Escherichia coli and Candida albicans isolated from vaginal specimens. J Shahrekord Univ Med Sci, 11(4), 81-87.

32. Zaringhalam, M., Sattari, M., Zaringhalam, J., Rezazadeh, S. (2007). Effect of black pepper, red pepper and *Zataria multiflora* Boiss. alcoholic extracts on growth and DNase activity of Staphylococcus aureus. J Med Plants, 4(24), 17-21.

33. Zarringhalam, M., Zaringhalam, J., Shadnoush, M., Safaeyan, F., Tekieh, E. (2013). Inhibitory effect of black and red pepper and thyme extracts and essential oils on enterohemorrhagic *Escherichia coli* and DNase activity of *Staphylococcus aureus*. Iran J Pharm Res, 12(3), 363. PMID: 24250643



www.SID.ir