Biological Journal of Microorganisms
Year 12, No.45, Spring 2023
Received: 2021-12-27
Accepted: 2022-3-13

(Research Paper)

Molecular Evaluation of *icaA* Gene Transcription by Treatment with Rifampin and Garlic Extract in *Staphylococcus aureus*

Zahra Ebrahimi Shekarbaghani
Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, elahe2015ebrahimi@gmail.com
Hadi Habibollahi
Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, hhabibollahi@yahoo.com
Mohammad Reza Safari Motlagh*
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, ssafarimotlagh@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Staphylococcus aureus* is one of the pathogenic bacteria in humans that causes a wide range of diseases. Biofilm formation protects *S. aureus* against adverse environmental conditions and the host immune system. The genes that encode the most important biofilm constituents belong to the ica operon, one of the most important of which is the *icaA* gene. Rifampin is a broad-spectrum antibiotic, and garlic has beneficial antimicrobial effects due to its active ingredient allicin. In the present study, the antimicrobial effect of garlic extract at the phenotypic and molecular level and its effect on *icaA* biofilm gene expression and its comparison with rifampin were investigated.

Materials and Methods: A standard and two pathogenic strains of *Staphylococcus aureus* were evaluated. Antibiogram tests, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration were performed with rifampin antibiotic and garlic extract. A biofilm phenotypic test was performed with a 96-well microplate. After RNA extraction from the samples treated with rifampin and garlic extract, cDNA synthesis and then Real-time PCR were performed and the expression of *icaA* gene was measured.

* Corresponding author

2322-5181/ © The Authors.
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

10.22108/BJM.2022.132045.1436

Results: The antibiogram test showed the antimicrobial effect of garlic extract on at least the standard strain and one of the pathogenic strains as compared to rifampin. The results of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined for all three strains for rifampin and the combined combination of rifampin and garcin were 375 and 750 µg / ml, respectively. Real-time PCR results showed that in all studied strains, garlic extract and rifampin were able to reduce the expression of *icaA* gene and the combined use of these two substances led to a significant reduction in the expression of this gene. For the standard strain, rifampin and garlic extract reduced *icaA* expression to 88% and 60% in the control sample, respectively, and the combination of these two substances resulted in a reduction of *icaA* biofilm gene expression by about 50%.

Discussion and Conclusion: In general, it can be concluded that rifampin antibiotic can be effective in inhibiting pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus*. Garlic extract can also be used as an anti-bacterial drug at both phenotypic and molecular levels.

Key words: *Staphylococcus Aureus*, Garlic Extract, Rifampin, Biofilm, *icaA* Gene

زیست شناسی میکروارگانیسم ها
سال دوازدهم، شماره ۴۵، بهار ۱۴۰۲ ، صفحه ۴۹ - ۳۱
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۶ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

مقاله پژوهشی

ارزیابی مولکولی رونویسی ژن *icaA* تیمارشده با ریفامپین و عصاره سیر در *استافیلوکوکوس اورئوس*

زهرا ابراهیمی شکرباغانی: کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، elahe2015ebrahimi@gmail.com
هادی حبیب‌الهی: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، hhabibollahi@yahoo.com
محمدرضا صفری مطلق*: دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکدهٔ علوم کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، ssafarimotlagh@yahoo.com

چکیده

مقدمه: *استافیلوکوکوس اورئوس* ازجمله باکتری‌های بیماری‌زا در انسان است که عامل طیف وسیعی از بیماری‌هاست. تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* را در برابر شرایط محیطی نامساعد و سیستم ایمنی میزبان در امان نگه می‌دارد. ژن‌هایی که مهم‌ترین مواد تشکیل‌دهندهٔ بیوفیلم را کد می‌کنند، متعلق به اپرون ica هستند که یکی از مهم‌ترین آنها ژن *icaA* است. ریفامپین یک آنتی‌بیوتیک با طیف گسترده است و سیر نیز به‌دلیل داشتن ماده مؤثره آلیسین دارای اثرات ضدمیکروبی مطلوبی است. در این پژوهش، اثر ضدمیکروبی عصاره سیر در سطح فنوتیپی و مولکولی و تأثیر آن بر میزان بیان ژن بیوفیلم *icaA* و مقایسهٔ آن با آنتی‌بیوتیک ریفامپین بررسی شد.

مواد و روش‌ها: یک سویهٔ استاندارد و دو سویهٔ بیماری‌زا از *استافیلوکوکوس اورئوس* ارزیابی شدند. آزمون‌های آنتی‌بیوگرام، حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی با آنتی‌بیوتیک ریفامپین و عصاره سیر انجام شدند. آزمون فنوتیپی بیوفیلم نیز با میکروپلیت ۹۶ چاهکی انجام شد. پس از استخراج *RNA* از نمونه‌های تیمارشده با ریفامپین و عصاره سیر، سنتز *cDNA* و سپس *Real time PCR* صورت گرفت و میزان بیان ژن *icaA* سنجیده شد.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © The Authors.
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)
10.22108/BJM.2022.132045.1436

نتایج: آزمون آنتی‌بیوگرام، اثر ضدمیکروبی عصاره سیر را حداقل دربارهٔ سویهٔ استاندارد و یکی از سویه‌های بیماری‌زا به اثبات رساند؛ به‌طوری‌که این تأثیر در مقایسه با ریفامپین درخور توجه بود. نتایج حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) دربارهٔ هر سه سویه برای ریفامپین و ترکیب توأم ریفامپین و گارسین به‌ترتیب ۳۷۵ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند. نتایج Real time PCR نشان دادند در همه سویه‌های مطالعه‌شده، عصاره سیر و ریفامپین قادر به کاهش بیان ژن *icaA* هستند و استفاده توأم این دو ماده به کاهش چشمگیر بیان این ژن منجر شد. دربارهٔ سویهٔ استاندارد، ریفامپین و عصاره سیر به‌ترتیب بیان *icaA* را به ۸۸ درصد و ۶۰ درصد نمونه کنترل کاهش دادند و ترکیب این دو ماده با یکدیگر به کاهش حدود ۵۰ درصدی بیان ژن بیوفیلم *icaA* منجر شد.

بحث و نتیجه‌گیری: در یک جمع‌بندی کلی استنباط می‌شود آنتی‌بیوتیک ریفامپین می‌تواند بر مهار باکتری‌های بیماری‌زایی همچون *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثر باشد. همچنین عصاره سیر در سطح فنوتیپی و در سطح مولکولی می‌تواند به‌عنوان داروی ضد این باکتری استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، عصاره سیر، ریفامپین، بیوفیلم، ژن *icaA*

مقدمه

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*[1] کوکسی گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری و کاتالاز مثبت با قطر ۰/۵ تا ۱/۵ میکرومتر است و متابولیسم اکسیداتیو و تخمیری دارد و مهم‌ترین گونه در جنس *استافیلوکوکوس اورئوس* ازنظر پزشکی محسوب می‌شود (۱). این باکتری در طبیعت انتشار وسیعی دارد و غالباً به‌عنوان فلور باکتریایی طبیعی پوست، قسمت قدامی مجرای بینی و بخش فوقانی دستگاه تنفس در انسان و حیوانات حضور دارد (۲). همچنین ازجمله باکتری‌های بیماری‌زا در انسان است که طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند ذات‌الریه، سندروم شوک سمی استافیلوکوکی، زرد زخم، عفونت‌های گوارشی و عفونت‌های ادراری را سبب می‌شود (۳). این باکتری باعث مسمومیت غذایی می‌شود؛ به این ترتیب که ابتدا در غذا رشد می‌کند و زیاد می‌شود و سپس سم تولید می‌کند. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی بیشترین موارد در مسمومیت‌های غذایی باکتریایی را شامل می‌شود و سموم متعددی ازجمله انتروتوکسین، پنتون والنتین و اگزوفولیاتیوتوکسین را می‌تواند تولید کند (۱ و ۴).

باکتری‌ها طی تکامل خود، با تولید عاملی بسیار کارآمد به نام بیوفیلم، با شرایط محیطی سازش بهتر و بیشتر یافته‌اند. بیوفیلم اجتماعی از میکروارگانیسم‌ها است که در مقایسه با سلول‌های پلانکتونی انفرادی به‌صورت تجمعی با یکدیگر ارتباط برقرار می‌کنند (۵). تشکیل بیوفیلم از عوامل بیماری‌زای مهم است و *استافیلوکوکوس اورئوس* را در برابر شرایط محیطی نامساعد و سیستم ایمنی میزبان در امان نگه می‌دارد (۶). زندگی در بیوفیلم برای میکروارگانیسم‌ها مزایای خاصی دارد. معمولاً اجتماعات میکروبی نسبت به استرس‌ها بسیار مقاوم‌ترند (۷). بیوفیلم ساختاری متشکل از یک جمعیت باکتریایی پیچیده و به‌هم‌چسبیده است که توسط یک ماده زمینه‌ای اگزوپلیمری تولیدشده توسط خود باکتری محصور شده است (۸). تشکیل بیوفیلم به باکتری امکان اتصال به سطوح مختلف را می‌دهد و با توجه به ایجاد واحدهای

چند لایه در تشکیل بیوفیلم، مرحله اصلی در افزایش عفونت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، گسترش نمونه‌های بیوفیلمی است که باعث کاهش بازده درمانی می‌شوند (۳). ساخته‌شدن بیوفیلم در اثر فعالیت اپرونی به نام ica ABCD است که مهم‌ترین عامل برای ایجاد ماتریکس اگزوپلی‌ساکاریدی بوده و از عوامل چسبندگی بین سلولی و عامل تجمع سلول‌های باکتریایی است (۹). لوکوس ica شامل ژن‌های *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* است. این ژن‌ها با سیستم‌های تنظیمی زیادی کنترل می‌شوند (۱۰). *استافیلوکوکوس اورئوس*، قابلیت تشکیل بیوفیلم و توانایی اتصال به سطوح مختلف ازجمله کاترها، لنزهای مصنوعی، ایمپلنت‌ها، مفاصل مصنوعی، ونیتلاتورهای مکانیکی و بافت‌های میزبان را دارد (۱۱).

ریفامپین یک آنتی‌بیوتیک با طیف گسترده و باکتریوساید است که ازطریق مهار سنتز RNA باکتریایی اثر خود را اعمال می‌کند. ریفامپین، RNA پلیمراز وابسته به DNA و درنتیجه، رونویسی و پروتئین‌سازی باکتری را مهار می‌کند. باکتری‌های مقاوم، توان تولید RNA پلیمرازهایی با تفاوت جزئی در زیرواحد بتا را دارند که توسط ریفامپین مهار نمی‌شود. درواقع با تأثیر بر زیرواحد β از RNA پلیمراز موجب مهار این آنزیم می‌شود. معمولاً از ریفامپین در ترکیب با سایر داروها استفاده می‌شود؛ زیرا میزان جهش در ژن RNA پلی‌مراز شایع است. این جهش‌ها باعث مقاومت دارویی سریع می‌شوند (۱۲). در زمان حاضر به‌جز درصد کمی از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، تمام آنها آنزیم بتا - لاکتاماز تولید می‌کنند و نسبت به پنی‌سیلین مقاوم‌اند. با مشاهده اولین سویهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، به تدریج میزان شیوع عفونت‌های بیمارستانی و مرگ‌ومیر ناشی از این عوامل به شدت زیاد شد (۱۳).

سیر با نام علمی *Allium sativum* L.، گیاه علفی دو ساله و متعلق به خانواده *Liliaceae* است که اثرات ضدمیکروبی دارد و برای مقابله با عوامل عفونت‌زا استفاده می‌شود (۱۴). در طب گیاهی، سیر به‌عنوان یک مکمل طبیعی برای درمان انواع بیماری‌ها و اختلالات از قبیل فشار خون بالا، آلزایمر، ترومبوز، تب یونجه، آسم، عفونت گوش کودکان و حتی سرطان مطرح بوده است. این گیاه برای تنظیم کلسترول خون، قند خون و محافظت از سیستم قلبی - عروقی مفید است و سیستم ایمنی را برای مبارزه با بیماری‌های مختلف تقویت می‌کند. همچنین با توجه به خواصی مانند قابلیت آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدالتهابی، از این گیاه برای درمان بیماری‌های متعددی استفاده می‌شود (۱۵). سیر خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدالتهابی دارد. سیر به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی قوی شناسایی شده و خاصیت ممانعت‌کنندگی آن، علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* به اثبات رسیده است. از عملکردهای سیر، افزایش توانایی گلبول‌های سفید برای مقابله با عفونت‌ها و بیماری‌ها، تقویت سلول‌های فاگوسیتوز، تحریک سلول‌های ایمنی نظیر ماکروفاژ و سلول‌های T برای مقابله با باکتری‌ها و عفونت‌های ویروسی و تضعیف سلول‌های سرطانی است (۱۶). اصلی‌ترین ماده ضدمیکروبی موجود در سیر، آلیسین نامیده می‌شود که اثرات ضدمیکروبی آن به‌واسطهٔ واکنش شیمیایی با گروه‌های تیول آزاد آنزیم‌هایی مانند RNA پلیمراز و به تأخیر انداختن یا مهار سنتز DNA، RNA و پروتئین‌ها رخ می‌دهد (۱۷).

هدف از این پژوهش، بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره سیر در سطح فنوتیپی و مولکولی و تأثیر آن بر میزان بیان ژن بیوفیلم *icaA* و مقایسهٔ آن با آنتی‌بیوتیک ریفامپین بود.

مواد و روش‌ها

سویه‌های مطالعه‌شده: سویهٔ استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 و دو سویهٔ پاتوژن جمع‌آوری‌شده از بیمارستان‌های شهر رشت استفاده شدند.

روش تهیه محلول‌ها و محیط کشت

محیط مولر هینتون آگار: از پودر مولر هینتون آگار شرکت QUELAB استفاده شد و طبق دستورالعمل این شرکت، ۳۴ گرم پودر محیط کشت در ۱ لیتر آب مقطر، حل و حرارت داده شد تا کاملاً شفاف شد. پس از اتوکلاو و رسیدن حرارت محیط کشت به ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد، در شرایط استریل داخل پلیت‌ها تقسیم شد.

محیط مولر هینتون براث: از پودر مولر هینتون براث شرکت QUELAB استفاده شد و براساس دستورالعمل، ۲۴ گرم از پودر این محیط کشت در ۱ لیتر آب مقطر، حل و تا شفافیت کامل حرارت داده شد. سپس به مقدار مورد نیاز محلول درون لوله آزمایش ریخته و درون اتوکلاو استریل شد و پس از اتوکلاو و خنک‌شدن کامل محیط کشت، استفاده شد.

استاندارد ۰/۵ مک فارلند: محیط ۰/۵ مک فارلند محیطی در تست آنتی‌بیوگرام است که می‌توان میزان کدربودن نمونهٔ خود را با آن مقایسه کرد. کدورت این محیط، معادل محیط حاوی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری است. چگالی نوری کدورت استاندارد با استفاده از اندازه‌گیری جذب در اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ تعیین شد.

تهیه آنتی‌بیوتیک ریفامپین: از کپسول ریفامپین ۳۰۰ میلی‌گرم استفاده شد. دو عدد کپسول ریفامپین در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و به این ترتیب استوک شماره ۱ با غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از استوک اول، ۹ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و استوک شماره ۲ با غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۶۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به دست آمد.

تهیه عصاره سیر: از قرص گارسین ۳۰۰ میلی‌گرم (شرکت گل دارو) استفاده شد که ماده موثره آلیسین در هریک از این قرص‌ها ۰/۸ تا ۱/۶ میلی‌گرم بود. دو قرص در هاون، خرد و در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند و به این ترتیب استوک شماره ۱ با غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از استوک اول، ۹ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و استوک شماره ۲ با غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۶۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به دست آمد.

سویه‌های مطالعه‌شده: باکتری‌های استفاده‌شده در این مطالعه، سه سویهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* شامل یک نمونه استاندارد ATCC 25923 و دو سویهٔ بیماری‌زا مربوط به بیماران بیمارستان‌های شهر رشت بودند. باکتری‌های مطالعه‌شده با روش‌های استاندارد میکروبیولوژی نظیر رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز، کواگولاز و اکسیداز تأیید شدند.

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام)

آنتی‌بیوگرام با استفاده از دیسک بلانک: ابتدا بلانک دیسک‌ها به عصاره سیر با غلظت‌های ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ریفامپین با همین دو غلظت و ترکیبی از نسبت مساوی سیر و ریفامپین آغشته شدند و پس از ۵-۳ دقیقه و آغشتگی کامل به‌منظور دیسک‌گذاری در سطح پلیت استفاده شدند. در سه پلیت مولر هینتون آگار، دو سویهٔ بیماری‌زا و سویهٔ استاندارد از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کشت چمنی داده شدند. سپس دیسک‌های آغشته‌شده به ریفامپین و عصاره سیر، روی محیط کشت حاوی باکتری قرار داده و به

مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. وجود هالهٔ عدم رشد باکتری در اطراف دیسک، نشان‌دهندهٔ ضدمیکروبی‌بودن دیسک‌های آغشته‌شده بود. برای حصول اطمینان، این آزمایش سه بار تکرار شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با ایجاد چاهک: پس از کشت باکتری‌های سویهٔ استاندارد و دو سویهٔ پاتوژن روی محیط مولر هینتون آگار، پنج چاهک در هر پلیت ایجاد شدند. برای اینکه قسمت تحتانی محیط بعد از ایجاد چاهک باز نباشد، مقداری محیط کشت آگار (کمتر از ۱۰ میکرولیتر) درون چاهک، ریخته و قسمت تحتانی چاهک مسدود شد. سپس مقدار ۶۰ میکرولیتر از عصاره سیر و ریفامپین هرکدام با دو غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ترکیب مساوی عصاره سیر و ریفامپین به هریک از پنج چاهک اضافه شد. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. وجود هالهٔ عدم رشد باکتری در اطراف چاهک نشان‌دهندهٔ ضدمیکروبی‌بودن مواد بود.

آزمون تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC: Minimum Inhibitory Concentration): به‌منظور انجام آزمون MIC، کشت تازه (۱۸ تا۲۴ ساعته) سه سویهٔ مدنظر روی محیط مولر هینتون آگار صورت گرفت. سپس مقداری از کلنی‌های محیط کشت تازهٔ سه سویه به‌صورت جداگانه به محیط کشت مولر هینتون براث، منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سوسپانسیون میکروبی حاصل با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث، معادل کدورت نیم مک فارلند رقیق شد. برای این منظور از استوک شماره ۲ (با غلظت ۶۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) آنتی‌بیوتیک ریفامپین و عصاره سیر استفاده شد. برای هر سویه، سه سری لوله آزمایش ۱۲تایی آماده شد و در همه لوله‌ها ۲ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث ریخته و اتوکلاو شد. بعد از خنک‌شدن لوله‌ها، همه آنها نام‌گذاری شدند. سپس به لوله شماره ۱ از سری اول، ۲ میلی‌لیتر از استوک شماره ۲ ریفامپین، به لوله شماره ۱ از سری دوم، ۲ میلی‌لیتر از استوک شماره ۲ عصاره سیر و به لوله شماره ۱ از سری سوم نیز ۲ میلی‌لیتر مخلوط عصاره سیر و ریفامپین اضافه شد. به این ترتیب، در لوله شماره ۱ از هر سه سری لوله، غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ریفامپین، عصاره سیر و ترکیب هر دو فراهم شد. سپس رقیق‌سازی سریالی انجام شد؛ به این صورت که ۲ میلی‌لیتر از لوله شماره ۱ برداشته و به لوله شماره ۲ منتقل شد و به این ترتیب غلظت آنتی‌بیوتیک و عصاره سیر در لوله شماره ۲ هر سه سری به نصف لوله اول رسید؛ یعنی غلظت آنتی‌بیوتیک ریفامپین و عصاره سیر در لوله شماره ۲، ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شد. این روند رقیق‌سازی تا لوله شماره ۱۰ ادامه یافت و به‌ترتیب غلظت‌های تیمار ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲ و ... ایجاد شدند. دو لوله شماره ۱۱ و ۱۲ به‌عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت گذاشته شدند که لوله کنترل منفی فاقد باکتری و لوله کنترل مثبت فاقد آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شد. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مدنظر با کدورت معادل نیم مک فارلند به همه لوله‌ها به‌جز لوله شماره ۱۱ (کنترل منفی) اضافه شد (کنترل منفی حاوی محیط کشت، آنتی‌بیوتیک یا عصاره سیر یا ترکیبی از هر دو و فاقد باکتری بود و کنترل مثبت حاوی محیط کشت و باکتری و فاقد آنتی‌بیوتیک بود). تمام این لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پایین‌ترین غلظتی از آنتی‌بیوتیک، عصاره سیر و ترکیبی از آن دو که در آن رشد باکتری (ازنظر کدورت) قابل

مشاهده نبود، به‌عنوان MIC آنتی‌بیوتیک و عصاره سیر برای باکتری در نظر گرفته شد.

آزمون تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC: Minimum Bactericidal Concentration): برای هر سویه، سه سری پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار در نظر گرفته شد تا با ریفامپین، عصاره سیر و ترکیبی از این دو تیمار شوند. از لوله‌های MIC که در آن رشد میکروارگانیسم قابل مشاهده نبود و لولهٔ حاوی اولین کدورت استفاده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هرکدام از لوله‌های مدنظر MIC در پلیت مولر هینتون آگار به‌صورت چمنی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در این مرحله پایین‌ترین غلظتی از آنتی‌بیوتیک، عصاره سیر و ترکیبی از آن دو که در آن رشد باکتری قابل مشاهده نبود، به‌عنوان MBC آنتی‌بیوتیک و عصاره سیر برای باکتری در نظر گرفته شد.

بررسی تشکیل بیوفیلم به روش فنوتیپی در سویه‌های بیماری‌زا واستاندارد: در این روش از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، سه سویهٔ مدنظر در محیط مولر هینتون براث، کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت، کدورت این سوسپانسیون معادل با نیم مک فارلند شد و از هر سوسپانسیون رقت ۱ به ۲۰ ساخته شد. در هریک از چاهک‌های پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث اضافه شد. هر چهار ستون از پلیت ۹۶ خانه برای یک سویه در نظر گرفته شد و برای هر سویه، در اولین چاهک از هر ستون مشخص‌شدهٔ پلیت، به‌ترتیب به میزان ۱۰۰ میکرولیتر عصاره سیر، ۱۰۰ میکرولیتر ریفامپین و ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط عصاره سیر و ریفامپین، اضافه و یک ستون نیز به‌عنوان کنترل، بدون تیمار در نظر گرفته شد (در مجموع برای سه سویه، سه ستون کنترل در نظر گرفته شد). سپس در بقیه چاهک‌های هر ستون از میکروپلیت، آزمون سری رقت‌ها انجام شد. سپس به چاهک‌های ستون‌های مشخص‌شده برای هر سویه، به‌ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از سویهٔ استاندارد و دو سویهٔ بیماری‌زا، اضافه و درنهایت میکروپلیت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از این زمان میکروپلیت‌ها در ظرف حاوی آب مقطر دو بار آب‌کشی شدند تا باکتری‌های پلانکتونی شسته شوند و سپس در دمای اتاق خشک شدند. در مرحله بعد، برای رنگ آمیزی بیوفیلم تولیدشده توسط باکتری در هر چاهک، ۱۲۵ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۰/۲ درصد به هر چاهک اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه، رنگ اضافی کریستال ویوله تخلیه شد و میکروپلیت‌ها در ظرف حاوی آب مقطر دو بار آب‌کشی و در دمای اتاق خشک شدند. برای آزادسازی رنگ موجود در دیواره باکتری‌های مولد بیوفیلم، ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۰ درصد به هر چاهک اضافه شد. بعد از پیپتینگ و حل‌شدن رنگ کریستال ویوله با اسید، درنهایت رنگ آزادشده در هر چاهک در طول موج نوری ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر بررسی شد.

استخراج RNA از نمونه‌های مطالعه‌شده: با استفاده از نتایج MIC و MBC از غلظت ۱۸۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ریفامپین و عصاره سیر برای استخراج RNA استفاده شد. برای هر سویه، چهار لوله آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد تا هر سویه با ریفامپین، عصاره سیر و مخلوطی از ریفامپین و عصاره سیر تیمار شود؛ یک لوله کنترل مثبت بدون تیمار در نظر گرفته شد. سپس سویه‌های مدنظر به لوله‌های مشخص‌شدهٔ همان سویه، اضافه و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت

در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس تمامی لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و رسوب به‌دست‌آمده به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. این میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. از رسوب به‌دست‌آمده برای استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت استخراج RNAشرکت سیناکلون استفاده شد.

ارزیابی استخراج RNA: برای این منظور الکتروفورز انجام شد. با استفاده از بافر TBE 0.5x (شرکت سیناژن) و پودر آگارز (شرکت سیناکلون)، ژل آگارز ۱ درصد تهیه شد و ۵ میکرولیتر از محصول استخراج RNA به همراه پاورلود، مخلوط و درون چاهک‌ها بارگذاری شد. در یک چاهک نیز DNA Ladder 100bp بارگذاری شد. پس از الکتروفورز در ولتاژ ۱۱۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه، با قراردادن ژل روی دستگاه UV-transluminator، باندهای RNA مشاهده شدند.

سنتز cDNA: با استفاده از محصول استخراج RNA، طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز، cDNA سنتز شد و سپس این cDNAها به‌منظور Real Time PCR استفاده شدند.

واکنش Real Time PCR: برای انجام واکنش Real Time PCR ابتدا دومین استوک از آغازگرها ساخته شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از آغازگر با ۹۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، مخلوط و مراحل واکنش Real Time PCR انجام شد. در ابتدا به هر میکروتیوب مخصوص ریل تایم، ۱۰ میکرولیتر SYBR Green Premix اضافه شد. سپس به هر میکروتیوب ۰/۸ میکرولیتر آغازگر Forward و بعد از آن ۰/۸ میکرولیتر آغازگر Reverse اضافه شد. در مرحله بعد، ۲ میکرولیتر cDNA و سپس ۰/۴ میکرولیتر ROX Reference Dye به آن اضافه شد. برای رسیدن به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، به میزان ۶ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز اضافه شد. سپس مواد با Spin مخلوط شدند و ۱۸ میکرولیتر از این مخلوط برداشته و به هر میکروتیوب استریپ اضافه شد و درپوش مخصوص روی استریپ‌ها قرار داده شد. از ژن *16s rRNA* به‌عنوان ژن رفرنس برای نرمال‌سازی استفاده شد. برنامه دمایی این واکنش شامل دمای واسرشتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای گسترش آغازگر ۷۲ درجه سانتی‌گراد است که به مدت ۴۵ ثانیه و طی ۳۵ سیکل صورت گرفت. در پایان، متد $\Delta\Delta CT$ به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. توالی آغازگرهای این پژوهش (برگرفته از مقاله اتشان و همکاران (۹)) در جداول ۱ و ۲ و اطلاعات مربوط به نمونه‌ها، نوع تیمار و الگوی مقایسه نمونه‌ها در جداول ۳، ۴ و۵ آمده است.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های این مطالعه در قالب فایل اکسل، تنظیم و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش حداقل اختلاف معنی‌دار LSD صورت گرفت.

جدول ۱- آغازگرهای ژن *icaA*

Genes	Nucleotide sequence of primers (5′-3′)	Accession numbers	Annealing temperature	Amplicon size (bp)
icaA (Forward)	5′-GAGGTAAAGCCAACGCACTC-3′	AF086783	60	151
icaA (Reverse)	5′-CCTGTAACCGCACCAAGTTT-3′			

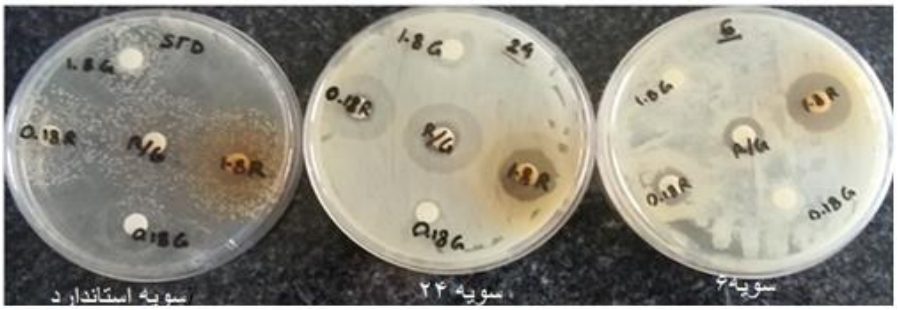
جدول ۲- آغازگر ژن رفرنس *16s rRNA*

Genes	Nucleotide sequence of primers (5′-3′)	Accession numbers	Annealing temperature	Amplicon size (bp)
16S rRNA (Forward)	5′-GGGACCCGCACAAGCGGTGG-3′	L37597.1	60	191
16S rRNA (Reverse)	5′-GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA-3′			

نتایج

تأثیر ضدمیکروبی عصاره سیر در مقایسه با ریفامپین: برای انجام این آزمایش از استوک شماره‌های ۱ و ۲ عصاره سیر و ریفامپین استفاده شد. با توجه به اینکه حداکثر میزان جذب هر بلانک دیسک از یک محلول، ۳۰ میکرولیتر است، هر بلانک دیسک غوطه‌ورشده در استوک شماره ۱ عصاره سیر یا ریفامپین، ۱/۸ میلی‌گرم و هر بلانک دیسک قرارگرفته در استوک شماره ۲ عصاره سیر یا ریفامپین نیز ۰/۱۸ میلی‌گرم جذب کردند.

روش بلانک دیسک: این آزمون برای هر سه سویهٔ استاندارد و بیماری‌زا (شماره‌های ۶ و ۲۴) با استفاده از بلانک دیسک با غلظت‌های ۱/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۱۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره سیر و آنتی‌بیوتیک ریفامپین انجام شد (شکل ۱) که نتایج قطر هالهٔ عدم رشد این باکتری‌ها در جدول ۳ نشان داده شده‌اند.



شکل ۱- هاله ممانعت از رشد بلانک دیسک حاوی عصاره سیر و ریفامپین در سویه‌های مطالعه‌شده

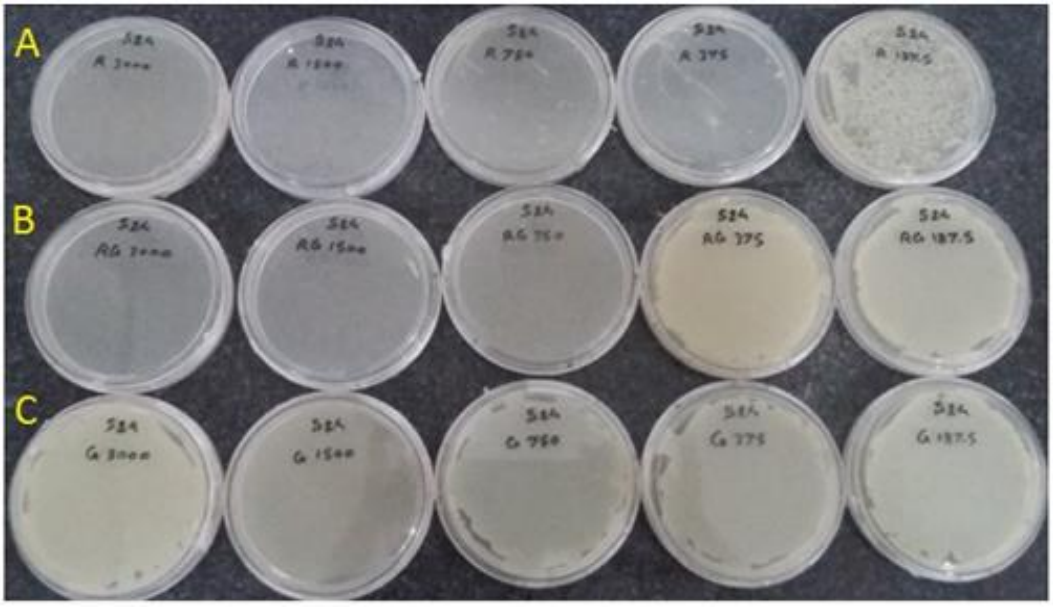
جدول ۳- قطر هالهٔ عدم رشد سویه‌های مطالعه‌شده تیمارشده با سیر و ریفامپین به روش بلانک دیسک

سویهٔ باکتری	غلظت و نوع تیمار	قطر هالهٔ عدم رشد (میلی‌متر)
استاندارد	۱/۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر سیر	۲۱
	۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر سیر	۱۵
	۱/۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر ریفامپین	۱۲
	۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر ریفامپین	۰
	۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر ترکیبی از سیر و ریفامپین	۰
بیماری‌زای اول (شماره ۶)	۱/۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر سیر	۰
	۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر سیر	۰
	۱/۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر ریفامپین	۱۸
	۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر ریفامپین	۱۰
	۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر ترکیبی از سیر و ریفامپین	۱۱
بیماری‌زای دوم (شماره ۲۴)	۱/۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر سیر	۱۲
	۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر سیر	۸

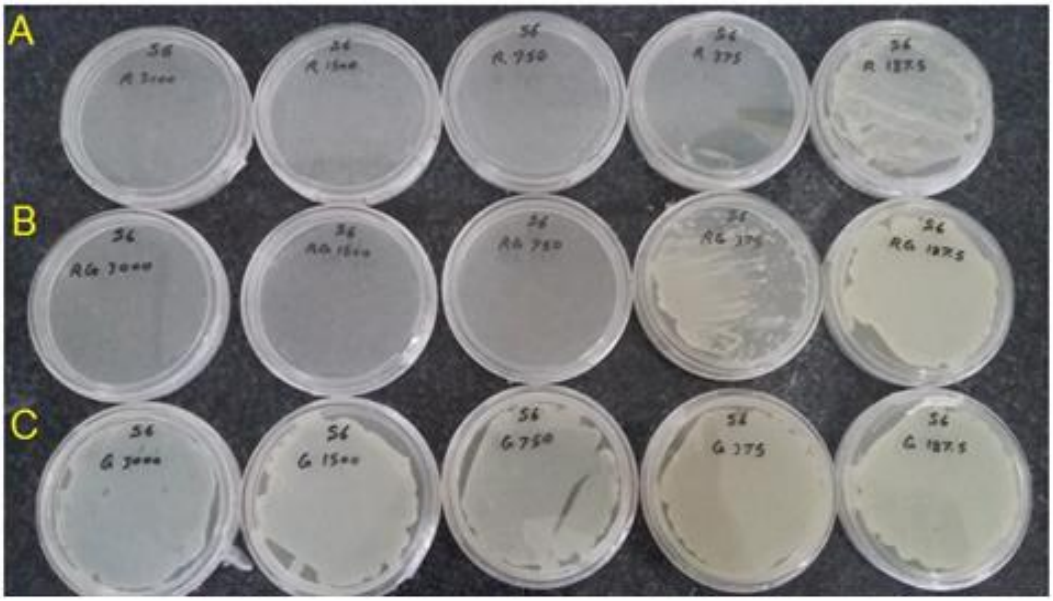
	۱/۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر ریفامپین	۲۰
	۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر ریفامپین	۱۵
	۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر ترکیبی از سیر و ریفامپین	۲۲

آزمون MIC تیمارشده با عصاره سیر و ریفامپین: با انجام آزمون MIC حداقل غلظت عصاره سیر و آنتی‌بیوتیک ریفامپین مشخص شد که می‌توانند مانع از فعالیت باکتری‌ها شوند. MIC ریفامپین و ترکیبی از ریفامپین و عصاره سیر برای سویهٔ استاندارد به‌ترتیب برابر ۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و عصاره سیر به تنهایی در غلظت‌های انجام‌شده، اثر مهاری روی این سویه نداشت. MIC ریفامپین و ترکیبی از ریفامپین و عصاره سیر برای سویهٔ شماره ۲۴ نیز به‌ترتیب برابر ۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و دربارهٔ این سویه نیز عصاره سیر به تنهایی در غلظت‌های انجام‌شده، اثر مهاری نشان نداد. سویهٔ شماره ۶ نیز همانند دو سویهٔ قبل توان رشد در غلظت ۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپین و غلظت ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترکیبی از ریفامپین و عصاره سیر را نداشت و عصاره سیر نیز در غلظت‌های مدنظر اثر مهاری روی این سویه نشان نداد.

آزمون MBC تیمارشده با عصاره سیر و ریفامپین: با انجام آزمون MBC حداقل غلظت عصاره سیر و آنتی‌بیوتیک ریفامپین مشخص شد که می‌توانند باعث مرگ باکتری‌ها شوند. MBC ریفامپین و ترکیبی از ریفامپین و عصاره سیر برای سویهٔ شماره ۲۴ به‌ترتیب برابر ۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و عصاره سیر نیز در غلظت‌های انجام‌شده، اثر کشندگی روی این سویه نشان نداد (شکل ۲). سویهٔ شماره ۶ نیز همانند سویهٔ دیگر توان رشد در غلظت ۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپین و غلظت ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترکیبی از ریفامپین و عصاره سیر را نداشت و عصاره سیر نیز در غلظت‌های مدنظر اثر مهاری روی این سویه نداشت (شکل ۳).



شکل ۲- MBC سویهٔ بیماری‌زا شماره ۲۴، A) MBC آنتی‌بیوتیک ریفامپین (۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، B) MBC آنتی‌بیوتیک ریفامپین و عصاره سیر (۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، C) MBC عصاره سیر



شکل ۳- MBC مربوط به سویهٔ بیماری‌زا شماره ۶، A) MBC مربوط به آنتی‌بیوتیک ریفامپین (۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، B) MBC مربوط به آنتی‌بیوتیک ریفامپین و عصاره سیر (۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، C) MBC مربوط به عصاره سیر

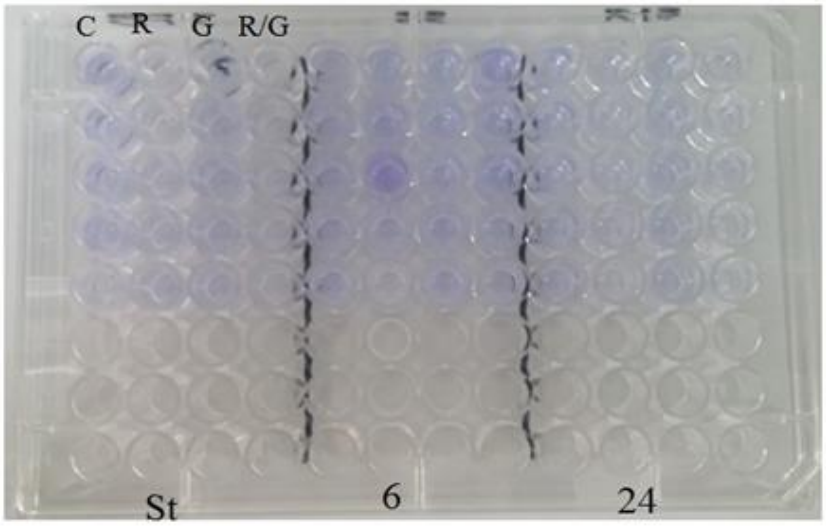
میزان تولید بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس*: براساس غلظت‌های مناسب MIC و با استفاده از میکروپلیت و رنگ کریستال ویوله در OD= 570 nm، میزان تولید بیوفیلم در سویه‌های مطالعه‌شدهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمارشده با آنتی‌بیوتیک ریفامپین، عصاره سیر و تیمار توأم ریفامپین و عصاره سیر، بررسی و با نمونه‌های شاهد (بدون تیمار) مقایسه شد (شکل ۴ و جدول ۴). دربارهٔ سویهٔ استاندارد، ریفامپین به تنهایی در غلظت‌های بالا تأثیر ضدبیوفیلمی نسبت به نمونه کنترل نشان داد. عصاره سیر بی‌تأثیر به نظر رسید؛ اما در غلظت‌های پایین، ریفامپین و عصاره سیر اثر هم‌افزایی نسبتاً خوبی در کاهش تولید بیوفیلم نشان دادند.

براساس تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از آزمون بیوفیلم در سویهٔ استاندارد، نمونه‌های تیمارشده با ترکیب ریفامپین و سیر در غلظت‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) با نمونه‌های شاهد نشان دادند و در این سویه تیمار توأم ریفامپین و سیر تأثیر زیادی در کاهش تولید بیوفیلم داشت. در سویهٔ بیماری‌زای شماره ۲۴ نیز اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های شاهد با نمونه‌های تیمار توأم ریفامپین و سیر در غلظت‌های مختلف مشاهده شد (جدول ۴).

بررسی کیفیت استخراج RNA: پس از انجام MBC و براساس غلظت‌های به‌دست‌آمده، از هر سه سویهٔ تیمارشده با عصاره سیر، ریفامپین و تیمار هم‌زمان ریفامپین و عصاره سیر، با استفاده از کیت استخراج شرکت سیناکلون و با رعایت تمام اصول برودتی و شرایط استریل، RNA کل، استخراج و کیفیت این استخراج روی ژل آگارز بررسی شد (شکل ۵).

سنتز cDNA و نتایج Real time PCR: پس از استخراج RNA از تمام نمونه‌های تیمارشده و کنترل، با رعایت تمام اصول برودتی و ممانعت از آلودگی و با استفاده از

کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز، سنتز انجام و محصول آن برای Real time PCR استفاده شد (شکل‌های ۶ تا ۸). در هر سه سویهٔ مطالعه‌شده، تأثیر توأم سیر و ریفامپین بیشترین اثر کاهشی را در بیان ژن بیوفیلم *icaA* نشان داد؛ به‌طوری‌که در هر سه سویه، بیان این ژن تحت‌تأثیر ترکیب عصاره سیر و ریفامپین تقریباً به حدود ۵۰ درصد نمونه شاهد رسید. تأثیر عصاره سیر به تنهایی و همچنین ریفامپین نیز در کاهش بیان ژن *icaA* مشهود بود؛ اما نسبت به اثر ترکیبی این دو ماده کمتر نشان داده شد.



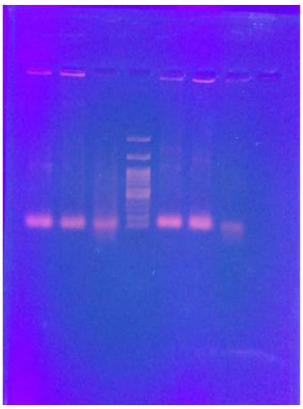
شکل ۴- نتایج تست بیوفیلم در میکروپلیت با تیمارهای ریفامپین و عصاره سیر در سویه‌های بیماری‌زا و استاندارد
(C: کنترل، R: ریفامپین، G: عصاره سیر و R/G: تیمار توأم)

جدول ۴- میزان جذب بیوفیلم تولیدشده از سویه‌ها با تیمارهای مختلف (OD= 570 nm)

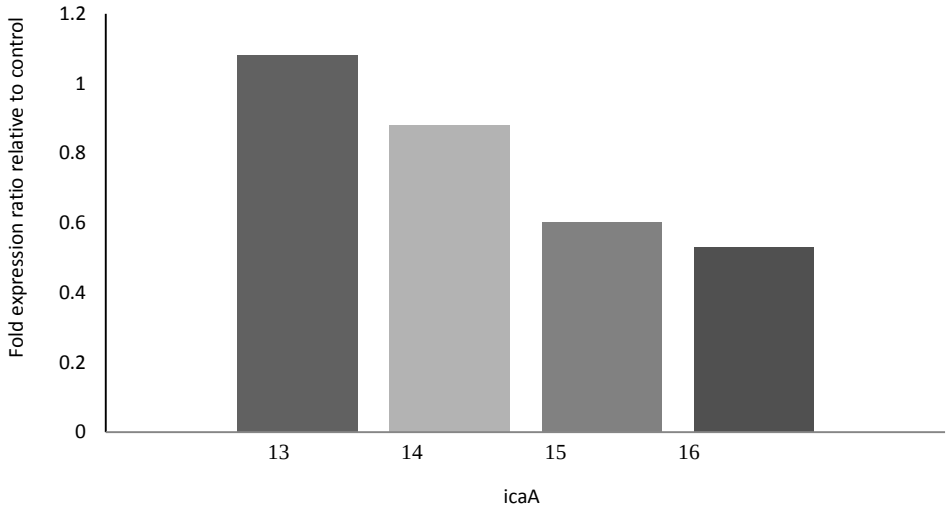
سویه استاندارد	۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۱۸۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر
کنترل (بدون تیمار)	۰/۱۳۲^{ab}	۰/۱۴۱^{b}	۰/۱۴۳^{b}	۰/۱۴۴^{a}	۰/۱۶۲^{a}
تیمارشده با ریفامپین	۰/۰۸۲^{c}	۰/۰۹۳^{c}	۰/۱۲۰^{c}	۰/۱۳۳^{a}	۰/۰۹۰$_{b}$
تیمارشده با سیر	۰/۱۷۶^{a}	۰/۱۹۸^{a}	۰/۱۶۸^{a}	۰/۱۴۵^{a}	۰/۱۴۴^{a}
تیمار توأم ریفامپین با سیر	۰/۰۹۳^{bc}	۰/۱۱۰^{c}	۰/۰۵۸^{d}	۰/۰۵۳^{b}	۰/۰۵۶^{c}
سویه شماره ۶	۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۱۸۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر
کنترل (بدون تیمار)	۰/۰۷۰^{bc}	۰/۰۶۹^{bc}	۰/۰۷۰^{b}	۰/۰۶۲^{c}	۰/۰۶۷^{a}
تیمارشده با ریفامپین	۰/۰۶۹^{c}	۰/۰۶۵^{c}	۰/۰۷۰^{b}	۰/۰۹۱^{a}	۰/۰۵۴^{b}

تیمارشده با سیر	۰/۰۷۷^{ab}	۰/۰۷۴^{ab}	۰/۰۷۵^{a}	۰/۰۸۱^{b}	۰/۰۷۴^{a}
تیمار توأم ریفامپین با سیر	۰/۰۸۴^{a}	۰/۰۸۲^{a}	۰/۰۶۹^{b}	۰/۰۵۵^{c}	۰/۰۵۵^{b}
سویه شماره ۲۴	۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۱۸۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر
کنترل (بدون تیمار)	۰/۰۶۷^{a}	۰/۰۶۷^{a}	۰/۰۶۴^{b}	۰/۰۶۱^{b}	۰/۰۶۴^{a}
تیمارشده با ریفامپین	۰/۰۶۰^{b}	۰/۰۵۷^{b}	۰/۰۶۰^{c}	۰/۰۵۴^{c}	۰/۰۵۵^{b}
تیمارشده با سیر	۰/۰۶۹^{a}	۰/۰۶۹^{a}	۰/۰۷۲^{a}	۰/۰۶۹^{a}	۰/۰۶۶^{a}
تیمار توأم ریفامپین با سیر	۰/۰۶۲^{b}	۰/۰۵۹^{b}	۰/۰۵۸^{c}	۰/۰۵۵^{c}	۰/۰۵۹^{ab}

برای هرکدام از سویه‌ها، حروف مشترک بیان‌کنندهٔ نبود اختلاف معنی‌دار (P<0.05) بین تیمارها است.

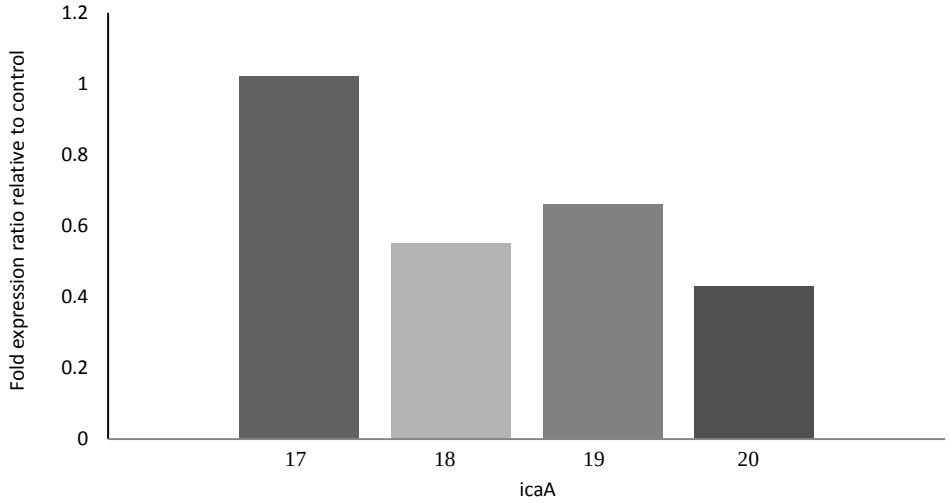


شکل ۵- باندهای RNA استخراج‌شده از سویه‌های مطالعه‌شده (100 bp ladder)



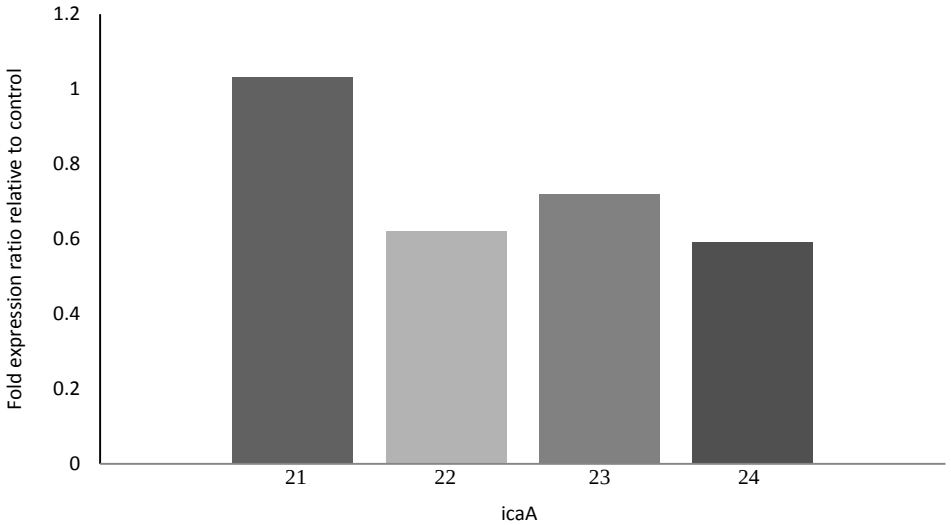
	13	14	15	16
ica A	1.06±0.64	0.88±0.97	0.6±0.45 >0.01	0.53±0.76 >0.01

شکل ۶- میزان بیان ژن *icaA* سویهٔ استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه کنترل (شماره ۱۳)، تیمارشده با ریفامپین (شماره ۱۴)، تیمارشده با عصاره سیر (شماره ۱۵) و تیمار توأم ریفامپین و سیر (شماره ۱۶)



	17	18	19	20
ica A	1.02±0.34	0.55±0.48 >0.01	0.66±0.32 >0.01	0.43±0.29 >0.001

شکل ۷– میزان بیان ژن *icaA* سویهٔ بیماری‌زا شماره ۶/*استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه کنترل (شماره ۱۷)، تیمارشده با ریفامپین (شماره ۱۸)، تیمارشده با عصاره سیر (شماره ۱۹) و تیمار توأم ریفامپین و سیر (شماره ۲۰)



	21	22	23	24
ica A	1.03±0.34	0.62±0.89 >0.01	0.72±0.85 >0.01	0.59±0.97 >0.001

شکل ۸– میزان بیان ژن *icaA* سویهٔ بیماری‌زا شماره ۲۴/*استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه کنترل (شماره ۲۱)، تیمارشده با ریفامپین (شماره ۲۲)، تیمارشده با عصاره سیر (شماره ۲۳) و تیمار توأم ریفامپین و سیر (شماره ۲۴)

بحث

انسان و باکتری‌های پاتوژن همواره در تقابل با یکدیگر بوده‌اند. با کشف اولین آنتی‌بیوتیک‌ها و نتایج ضدمیکروبی بسیار مطلوب آنها چنین تصور می‌شد که

دوران بیماری‌زایی باکتری‌ها به سر آمده است؛ اما دیری نپایید که باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها پدیدار شدند و ذهن و تلاش محققان به سمت کشف و تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید متمرکز شد؛ این داستان به‌طور پیوسته تکرار شد. در برهه‌ای از زمان، انسان با آنتی‌بیوتیک‌های جدید بر باکتری‌های پاتوژن غلبه یافت؛ اما پس از اندک زمانی باکتری‌ها توانستند بر انسان هوشمند چیره شوند و بقای نسل خود را حفظ کنند. علاوه بر این، مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها عوارض سوء و جانبی زیادی بر بیماران تحمیل می‌کند؛ ازجمله حساسیت‌های آنتی‌بیوتیکی و تأثیر سوء آنتی‌بیوتیک‌ها بر فلور نرمال میکروبی بدن. امروزه با مطالعات مولکولی دقیق توانسته‌اند با توجه به اختلاف مکانیسم‌های مولکولی پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها، آنتی‌بیوتیک‌هایی طراحی کنند که کمترین تأثیر نامطلوب بر انسان را داشته باشند؛ اما در هر صورت باکتری‌های مقاوم پدیدار شده‌اند.

از گذشته‌های بسیار دور بشر به خواص دارویی گیاهان پی برده و براساس تحقیقات انجام‌شده، خواص ضدمیکروبی بسیاری از گیاهان به اثبات رسیده است و در این میان، سیر در جایگاه بسیار ویژه‌ای قرار دارد. تحقیقات داخلی و خارجی بسیار زیادی در زمینه تأثیر ضدباکتریایی عصاره سیر روی انواع باکتری‌های گرم مثبت و منفی وجود دارد؛ اما این تحقیقات در حد مطالعات فنوتیپی، مشاهدات میکروبی و آزمون‌های بیوشیمیایی بوده است. در پژوهش حاضر سعی شد براساس آزمون‌های مولکولی، تأثیر عصاره سیر روی بیان ژن بیوفیلم *icaA* سنجش شود که در بیماری‌زایی باکتری‌های پاتوژن ازجمله *استافیلوکوکوس اورئوس* اهمیت دارد. اثر آنتی‌بیوتیک ریفامپین نیز روی بیان این ژن صورت گرفت تا بتوان مقایسه‌ای میان این دو ترکیب انجام داد.

در مطالعه‌ای تأثیر مهاری سیر در مقایسه با دی‌آلیل سولفید روی عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در موش سنجش شد و تجویز خوراکی این مواد به‌طور چشمگیری باعث کاهش ماندگاری باکتری مقاوم به متی‌سیلین در پلاسما، کبد، کلیه و طحال شد. درمان با عصاره سیر و دی‌آلیل سولفید با کاهش مالون دی‌آلدهید، حفاظت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد و براساس این، مشخص شد عصاره سیر، دی‌آلیل سولفید و دی‌آلیل دی‌سولفید عملکرد محافظتی چندگانه‌ای در برابر عفونت MRSA دارند (۱۸).

در مطالعه دیگری در بررسی خواص ضدمیکروبی دو گونه سیر و آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به پنی‌سیلین (PSSA) و مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) گزارش شد عصاره سیر قادر است عفونت ناشی از باکتری حساس به پنی‌سیلین را کاهش دهد؛ اما روی عفونت ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بی‌تأثیر است (۱۹). استفاده از سیر برای جلوگیری و درمان بیماری‌های مختلف بررسی و مشخص شد عصاره سیر باعث کاهش خطر بیماری‌های قلبی - عروقی می‌شود، اثرات ضدتوموری و ضدمیکروبی دارد و برای کاهش غلظت قند خون نیز مؤثر است (۲۰).

اثر مهاری روغن سیر بر تشکیل بیوفیلم توسط پاتوژن‌های باکتریایی بررسی و مشخص شد روغن سیر مانع توسعه بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود و حتی بیوفیلم تولیدشده توسط این باکتری را به‌طور جزئی تخریب می‌کند. در اثر آسیب‌های پوستی ناشی از حرارت، سد فیزیکی محافظتی بافت‌های زیرین با نفوذ میکروارگانیسم‌ها به خطر می‌افتد و سیستم ایمنی

میزبان با تسهیل کلونیزاسیون ناشی از عفونت زخم‌های سوختگی با میکروارگانیسم‌ها سرکوب می‌شود. فعالیت ضداستافیلوکوکی روغن سیر بیش از سه ماه در درجه حرارت اتاق پایدار می‌ماند و روغن سیر می‌تواند به‌عنوان دارو برای جلوگیری از بیوفیلم ایجادشده توسط باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی استفاده شود (۲۱).

در مطالعه‌ای، اثر هم‌افزایی بین ریفامپین با نوعی دارو بر مبنای عسل (Medihoney) در مقابل سویه‌های کلینیکال *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین نشان داده شد. درمان ترکیبی زخم‌های مزمن با عسل و آنتی‌بیوتیک‌های رایج، هم‌افزایی فعالیت ضدباکتریایی، کاهش دوز مؤثر آنتی‌بیوتیک و کاهش خطر آنتی‌بیوتیک را سبب شد. استفاده ترکیبی از مدی‌هانی و ریفامپین، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ریفامپین را در شرایط آزمایشگاهی متوقف کرد (۲۲).

در بررسی برهمکنش‌های احتمالی بین سیر و داروهای مرسوم مشخص شد گیاهان می‌توانند بر عملکرد بدن تأثیر بگذارند؛ بنابراین، هنگامی که گیاهان به‌طور هم‌زمان با دارو مصرف می‌شوند اثر متقابل دارند. تعامل گیاهان دارویی ممکن است شامل افزایش یا کاهش مقدار دارو در خون، تغییر در جذب، پخش، متابولیسم و حذف دارو و بروز اثر هم‌افزایی یا اثر ضد آن با داروهای شیمیایی باشند؛ به‌طوری‌که مشخص شد سیر و گلی‌بنکلامید اثر هم‌افزایی دارند و باعث افزایش اثر هیپوگلیسمیک این دارو می‌شوند. همچنین استفاده هم‌زمان سیر با Docetaxel باعث افزایش اثر آپیتوزیز این دارو شد (۲۳). اتشان و همکاران (۹) در مطالعه‌ای ساختار بیوفیلم و اثرات ضدآنتی‌بیوتیکی آن را تشریح کردند و ژن‌های اپرونی ica را مسئول تولید بیوفیلم دانستند.

پژوهش‌های فنوتیپی و آزمون‌های آنتی‌بیوگرام حاضر دربارهٔ سویهٔ استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند سیر با غلظت ۱/۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر (با ایجاد هاله‌ای به قطر ۲۱ میلی‌متر) تأثیر ضداستافیلوکوکی قوی‌تری نسبت به همین غلظت ریفامپین (با ایجاد هاله‌ای به قطر ۱۲ میلی‌متر) دارد. در غلظت پایین‌تر یعنی ۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر نیز عصاره سیر تأثیر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک ریفامپین نشان داد. سویه‌های پاتوژن مطالعه‌شده، نتایج آنتی‌بیوگرامی متفاوتی نسبت به سویهٔ استاندارد بروز دادند. دربارهٔ سویهٔ پاتوژن شماره ۲۴، عصاره سیر در غلظت‌های ۱/۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر و ۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر به‌ترتیب هاله‌ای به قطر ۱۲ و ۸ میلی‌متر تولید کرد؛ در صورتی که ریفامپین در همین غلظت‌ها مؤثرتر بود و هاله‌هایی به قطر ۲۰ و ۱۵ میلی‌متر ایجاد کرد. دربارهٔ این سویه گفتنی است عصاره سیر و ریفامپین با یکدیگر اثر هم‌افزایی داشتند و ترکیب این دو ماده در غلظت ۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر باعث ایجاد هاله‌ای بزرگ‌تر (۲۲ میلی‌متر) شد. سویهٔ پاتوژن شماره ۶ نتیجهٔ کاملاً متفاوتی نسبت به دو سویهٔ دیگر نشان داد. در این سویه، عصاره سیر در هر دو غلظت مطالعه‌شده هیچ هالهٔ قابل رؤیتی ایجاد نکرد؛ در صورتی که ریفامپین هاله‌هایی به قطر ۱۸ و ۱۰ میلی‌متر تشکیل داد؛ البته در این سویه، ترکیب عصاره سیر و ریفامپین در غلظت پایین نقش مؤثرتری نسبت به ریفامپین تنها داشت. بررسی این نتایج نشان داد سویهٔ استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* و یکی از سویه‌های بیماری‌زا نسبت به عصاره سیر حساسیت بالایی دارند؛ اما یکی از سویه‌های بیماری‌زای مطالعه‌شده توانسته بود نسبت به عصاره سیر مقاومت زیادی کسب کند. محققان زیادی تأثیر ضدمیکروبی سیر بر *استافیلوکوکوس اورئوس* را

مطالعه کرده‌اند (۱۸ و ۲۰) که همه آنها به تأثیر آنتی‌باکتریایی عصاره سیر اذعان داشته‌اند؛ نتایج پژوهش حاضر نیز تأییدکنندهٔ این موضوع است. دربارهٔ اثر هم‌افزایی ضدمیکروبی سیر و ریفامپین تحقیقی انجام نشده است؛ اما در مطالعه‌ای (۲۲) تأثیر ترکیبی ریفامپین با نوعی داروی مبتنی بر عسل بر ضد سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تحقیق و تأیید شد. در تحقیق حاضر، اثر هم‌افزایی ریفامپین و عصاره سیر حداقل دربارهٔ یکی از سویه‌های بیماری‌زا به خوبی مشاهده شد.

نتایج MIC و MBC این پژوهش، هر سه سویهٔ بیماری‌زا و استاندارد را مشابه گزارش کرد و در همه این موارد ریفامپین مؤثرتر از عصاره سیر معرفی شد؛ البته آزمون‌های MIC و MBC در غلظت‌های ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به پایین انجام شد و احتمالاً غلظت‌های بالاتر عصاره سیر می‌توانند تأثیر ضدمیکروبی خود را در این آزمون نشان دهند. گفتنی است در آزمون‌های آنتی‌بیوگرام، بلانک دیسک‌ها به غلظت‌های ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۶۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۶۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) آغشته شده بودند.

سنجش فنوتیپی میزان تولید بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمارشده با عصاره سیر، ریفامپین و ترکیب هر دو ماده برای نخستین‌بار انجام شد. دربارهٔ سویهٔ استاندارد، ریفامپین به تنهایی در غلظت‌های بالا تأثیر ضدبیوفیلمی نسبت به نمونه کنترل نشان داد. عصاره سیر بی‌تأثیر به نظر رسید؛ اما در غلظت‌های پایین، ریفامپین و عصاره سیر اثر هم‌افزایی نسبتاً خوبی در کاهش تولید بیوفیلم نشان دادند؛ به‌طوری‌که مثلاً در غلظت ۱۸۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، استفاده توأم ریفامپین و عصاره سیر به کاهش ۲/۵ برابری میزان جذب بیوفیلم منجر شد. دربارهٔ هر دو سویهٔ بیماری‌زا، تفاوت محسوسی در میزان تولید بیوفیلم بین نمونه‌های کنترل و نمونه‌های متأثر از ریفامپین یا عصاره سیر مشاهده نشد. در مطالعه دیگری (۲۱) دربارهٔ تأثیر مهاری روغن سیر بر تشکیل بیوفیلم، نقش ضدبیوفیلمی این روغن بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. در پژوهش حاضر، نقش ضدبیوفیلمی روغن سیر حداقل به‌صورت ترکیب با آنتی‌بیوتیک ریفامپین دربارهٔ سویهٔ استاندارد واضح بود؛ اما تولید بیوفیلم در سویه‌های بیماری‌زا احتمالاً به‌دلیل جهش‌ها و تغییرات ژنتیکی، حداقل در غلظت‌های مطالعه‌شده، متأثر از ترکیبات مدنظر نیست.

یکی از اهداف اصلی این پژوهش، بررسی میزان بیان ژن بیوفیلم *icaA* تیمارشده با ریفامپین و عصاره سیر در سویه‌های مطالعه‌شده بود. رقیب (۲۴) در مطالعه خود تأثیر آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و عصاره سیر بر ژن بیوفیلم *icaA* را بررسی و اثر هم‌افزایی این دو ماده در کاهش بیان ژن *icaA* را گزارش کرد. در پژوهش حاضر، دربارهٔ سویهٔ استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*، ریفامپین میزان بیان ژن *icaA* را به ۸۸ درصد نمونه کنترل کاهش داد؛ اما عصاره سیر به تنهایی مؤثرتر بود و بیان این ژن را به ۶۶ درصد نمونه کنترل تغییر داد و مهم‌تر اینکه اثر هم‌افزایی این دو ماده باعث شد میزان بیان این ژن تقریباً به نصف (۵۳ درصد) نمونه کنترل برسد. در سویهٔ بیماری‌زای شماره ۶، ریفامپین به تنهایی نقش مؤثری در کاهش بیان ژن *icaA* داشت و بیان این ژن را به ۵۵ درصد کاهش داد. عصاره سیر نیز بیان این ژن را به ۶۶ درصد کاهش داد؛ اما تیمار توأم با این دو ماده به کاهش بیان ژن تا حد ۴۳ درصد منجر شد. دربارهٔ سویهٔ بیماری‌زای شماره ۲۴، ریفامپین و عصاره سیر هرکدام به تنهایی توانستند میزان بیان ژن *icaA* را

به‌ترتیب به ۶۲ درصد و ۷۲ درصد کاهش دهند و دربارهٔ این سویه نیز استفاده هم‌زمان ریفامپین و عصاره سیر باعث شد بیان این ژن به ۵۹ درصد کاهش یابد. ریفامپین، آنتی‌بیوتیکی است که بر RNA پلی‌مراز و رونویسی ژن‌ها اثر می‌گذارد؛ این موضوع دربارهٔ هر سه سویهٔ مطالعه‌شده به‌طور واضح به چشم می‌خورد. براساس مطالعه‌ای (۱۲)، با توجه به افزایش میزان جهش در ژن‌های مربوط به RNA پلی‌مراز باکتری‌ها، سویه‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک رو به گسترش هستند؛ به همین دلیل، محققان اظهار داشتند باید ریفامپین در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های دیگر تجویز شود. مطالعات ما نشان دادند عصاره سیر به تنهایی در کاهش رونویسی ژن بیوفیلم *icaA* مؤثر است و این تأثیر حتی دربارهٔ سویهٔ استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از ریفامپین است؛ اما گفتنی است عصاره سیر همراه با ریفامپین حتی دربارهٔ سویه‌های بیماری‌زا، اثر هم‌افزایی در کاهش بیان ژن *icaA* نشان می‌دهد؛ بنابراین، به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک یا حداقل همراه با آنتی‌بیوتیک ریفامپین می‌تواند تجویز شود تا این آنتی‌بیوتیک مؤثرتر واقع شود.

در یک جمع‌بندی کلی استنباط می‌شود که طبق آزمون‌های آنتی‌بیوگرام، MIC و MBC، آنتی‌بیوتیک ریفامپین بر مهار باکتری‌های بیماری‌زایی همچون *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثر است. همانند مقاومت‌های ایجادشده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر، استفاده بی‌رویه از ریفامپین نیز به شیوع سویه‌های مقاوم *استافیلوکوکوس اورئوس* منجر خواهد شد. با توجه به خواص اثبات‌شدهٔ ضدمیکروبی سیر و با در نظر گرفتن نتایج این پژوهش در زمینهٔ کاهش بیان ژن بیوفیلم *icaA* و نیز اثر ضدمیکروبی، عصاره سیر هم در سطح فنوتیپی و هم در سطح مولکولی به‌عنوان داروی ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند استفاده شود. براساس مطالعات پیشین، پیشنهاد شده است ریفامپین همراه با آنتی‌بیوتیک‌های دیگر به مصرف برسد. با توجه به عوارض جانبی و سوء انواع آنتی‌بیوتیک‌ها بر ساختارهای سلولی و فیزیولوژیکی بدن و با در نظرگرفتن نتایج مطلوب حاصل از این پژوهش، عصاره سیر حداقل به‌صورت ترکیب با آنتی‌بیوتیک ریفامپین می‌تواند تجویز و مصرف شود تا از این طریق هم ریفامپین مؤثرتر باشد و هم بیماران از خواص متعدد دارویی سیر بهره‌مند شوند.

پژوهش حاضر با توجه به جدیدبودن می‌تواند شروعی برای مطالعات بیشتر و دقیق‌تر و راه‌گشایی برای کشف شیوه‌های درمانی نوین باشد. بر همین اساس، بررسی تأثیر ضدبیوفیلمی عصاره سیر و ریفامپین بر تعداد بیشتری از سویه‌های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس*، مطالعه ژن‌های دیگری از اپرون icaADBC تحت‌تأثیر عصاره سیر و ریفامپین، مقایسه تأثیر ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی عصاره سیر با انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و پژوهش در زمینهٔ تأثیر هم‌افزایی عصاره سیر با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر ضد بیان ژن‌های بیوفیلم برای مطالعات آینده پیشنهاد می‌شوند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری‌های حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت در حمایت‌های لازم از این تحقیق قدردانی می‌شود.

References

(1) Adwan, G., Abu-Shanab, B., & Adwan, K. (2006). Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in raw milk in the North of Palestine.

Prince a/Rhman Sidery hospital, al-Jouf, Saudi Arabia. Journal of Medical Genetics and Genomics, 3(3), 41-45.

(5) Anghel, I., Grumezescu, A. M., Andronescu, E., Anghel, A. G., Ficai, A., Saviuc, C., ... & Chifiriuc, M. C. (2012). Magnetite nanoparticles for functionalized textile dressing to prevent fungal biofilms development. Nanoscale Research Letters, 7(1), 1-6.

(6) Yarwood, J. M., Bartels, D. J., Volper, E. M, & Greenberg, E. P. (2004). Quorum sensing in Staphylococcus aureus biofilms. Journal of Bacteriology, 186(6), 1838-1850.

(7) Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiology Letters, 236(2), 163-173.

(8) Ghasemian, E., Naghoni, A., Rahvar, H., Kialha, M., & Tabaraie, B. (2015). Evaluating the effect of copper nanoparticles in inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* and Listeria monocytogenes biofilm formation. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *8*(5), e17430. doi: 10.5812/jjm.17430.

(9) Atshan, S. S., Nor Shamsudin, M., Sekawi, Z., Lung, L. T. T., Hamat, R. A., Karunanidhi, A., ... & Pei Pei, C. (2012). Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of Staphylococcus aureus. *Journal of BioMedicine and biotechnology*, *2012*. Retrieved from: http//doi: 10.1155/2012/976972.

(10) Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., & Shirtliff, M. E. (2011). Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, *2*(5), 445-459.

(11) Sajith Khan, A., Shetty, P. J., Lakshmi Sarayu, Y., Chidambaram, A., & Ranganathan R. (2012). Detection of mecA genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *International Journal of Health and Rehabilitation Sciences*, *1*(2), 64-68.

(12) Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., & Turkish Journal of Biology, 29(4), 229-232.

(2) Petrelli, D., Repetto, A., D'ercole, S., Rombini, S., Ripa, S., Prenna, M., & Vitali, L. A. (2008). Analysis of meticillin-susceptible and meticillin-resistant biofilm-forming Staphylococcus aureus from catheter infections isolated in a large Italian hospital. Journal of Medical Microbiology, 57(3), 364-372.

(3) Rahimi, F., Bouzari, M., Katouli, M., & Pourshafie, M. R. (2012). Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in Iran. Archives of Virology, 157(9), 1807-1811.

(4) Al-Ruaily, M. A., & Khalil, O. M. (2011). Detection of (mecA) gene in methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) at Darst, S. A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, *104*(6), 901-912.

(13) Rahimi, F., Katouli, M., & Pourshafie, M. R. (2014). Characteristics of hospital-and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Journal of Medical Microbiology*, *63*(6), 796-804.

(14) Charu, K., Yogita, S., & Sonali, S. (2014). Neutraceutical potential of organosulfur compounds in fresh garlic and garlic preparations. *International Journal of Pharma and Biosciences*, *5*(1), 112-126.

(15) Banerjee, S. K., & Maulik, S. K. (2002). Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutrition Journal*, *1*(1), 1-14.

(16) Ankri S., & Mirelman D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Journal of Microbes and Infection*, *1*(2), 125-129.

(17) Curtis, H., Noll, U., Störmann, J., & Slusarenko, A. (2004). Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *65*(2), 79-89.

(18) Tsao, S. M., Hsu, C. C., & Yin, M. C. (2003). Garlic extract and two diallyl sulphides inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in BALB/cA mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *52*(6), 974-980.

(19) Venâncio, P. C., Figueroba, S. R., Nani, B. D., Ferreira, L. E. N., Muniz, B. V., Del Fiol, F. D. S., ... & Groppo, F. C. (2017). Antimicrobial activity of two garlic species (*Allium sativum* and *A. tuberosum*) against Staphylococci infection. *in vivo* study in rats. *Journal of Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *7*(1), 115.

(20) Bayan, L., Koulivand, P. H., & Gorji, A. (2014). Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, *4*(1), 1-14.

(21) Nidadavolu, P., Amor, W., Tran, P. L., Dertien, J., Colmer-Hamood, J. A., & Hamood, A. N. (2012). Garlic ointment inhibits biofilm formation by bacterial pathogens from burn wounds. *Journal of Medical Microbiology*, *61*(5), 662-671.

(22) Müller, P., Alber, D. G., Turnbull, L., Schlothauer, R. C., Carter, D. A., Whitchurch, C. B., & Harry, E. J. (2013). Synergism between Medihoney and rifampicin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *PloS one*, *8*(2), e57679.

(23) Kansara, M. B., & Jani, A. J. (2017). Possible interactions between garlic and conventional drugs: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biological Evaluations*, *4*(2), 73-81.

(24) Raghib, Z. (2017). Molecular study of the effect of erythromycin and garlic extract on *icaA* biofilm gene expression in *Staphylococcus aureus*. MSc Thesis. Islamic Azad University, Rasht Branch.

[1]- *Staphylococcus aureus*