فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۰ ص. ۳۴-۱۹

مقاله پژوهشی

مقایسه تأثیر عصاره سیر و جنتامایسین روی بیان ژن بیوفیلم *icaA* در *Staphylococcus aureus*

فاطمه کرمی[۱]، هادی حبیب‌الهی[۲] و محمد رضا صفری مطلق[۳*]

[۱] گروه زیست شناسی واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

[۲] گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

[۳] گروه گیاه‌پزشکی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): ssafarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۰

چکیده

Staphylococcus aureus یکی از شایع‌ترین بیمارگرهای باکتریایی است. جنتامایسین یکی از آنتی بیوتیک‌هایی است که برای درمان عفونت‌های استافیلوکوکوسی موثر است ولی متاسفانه به دلیل تولید بیوفیلم، تأثیر این آنتی‌بیوتیک گاهی با مشکل روبه‌رو می‌گردد. در این پژوهش، تأثیر عصاره سیر و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین روی سه سویه از باکتری‌های *S. aureus* بر اساس روش آنتی‌بیوگرام و آزمون MIC مورد سنجش قرار گرفت که نتایج آن تأییدکننده تأثیر ضد استافیلوکوکی عصاره سیر و اثر هم‌افزایی آن با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بود. بر اساس آزمون فنوتیپی، اثر عصاره سیر و جنتامایسین به‌تنهایی و توأم با هم بر کاهش میزان تولید بیوفیلم در این باکتری ارزیابی و اثبات شد. وجود ژن *icaA* در سویه‌های مورد مطالعه توسط PCR به اثبات رسید و با استفاده از تکنیک Real time PCR، میزان بیان ژن *icaA* تحت تیمار عصاره سیر، جنتامایسین و تیمار توأمان سیر و جنتامایسین نسبت به نمونه‌های بدون تیمار مورد مطالعه قرار گرفت. در مورد سویه استاندارد، جنتامایسین و عصاره سیر به ترتیب باعث کاهش ۵۹ درصدی و ۶۴ درصدی بیان ژن *icaA* شدند و استفاده توأم این دو ماده، بیان این ژن را به حدود ۲۵ درصد نمونه کنترل کاهش داد یعنی منجر به کاهش ۷۵ درصدی بیان این ژن گردید. این تیمارها در مورد سویه‌های بیمارگر نیز تأثیر زیادی بر کاهش بیان *icaA* نشان دادند به طوری که استفاده هم‌زمان عصاره سیر و جنتامایسین توانست بیان این ژن را به ۱۱ درصد نمونه بدون تیمار کاهش دهد و منجر به کاهش ۸۹ درصدی بیان *icaA* گردد. نتایج تمام این آزمون‌ها حاکی از تأثیر مطلوب عصاره سیر در مقابل باکتری *S. aureus* بود.

کلیدواژه‌ها: *Staphylococcus aureus*، عصاره سیر، جنتامایسین، بیوفیلم، ژن *icaA*.

مقدمه

Staphylococcus aureus یک باکتری گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که مهم‌ترین گونه در جنس استافیلوکوک محسوب می‌شود [۱]. این باکتری عامل بسیاری از عفونت‌های پوستی مانند جوشدانه، کورک، کفگیرک، گل مژه و آبسه تا بیماری‌های خطرناک مانند پنومونی، استئومیلیت، سندرم شوک سمی، منژیت و سپتی سمی) است [۲]. پپتیدوگلیکان باکتری دارای خاصیت آنتی‌ژنیک است. این ترکیب از واحدهای متناوب N- استیل مورامیک اسید و N- استیل گلوکز آمین تشکیل شده که توسط پل‌های پنتاگلایسین و زنجیره‌های تتراپپتیدی مستحکم می‌شود [۳]. *S. aureus* می‌تواند منجر به استئومیلیت یا پیوآرتیت، فولیکولیت و گاهی موجب پنومونی، منژیت و اندوکاردیت شود. *S. aureus* شایع‌ترین عامل باکتریایی و مسوول بیش از ۷۰ درصد عفونت‌های بافت نرم در بخش اورژانس است [۴].

امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی میکروب‌های بیماری‌زا تبدیل به یک مشکل جهانی شده که عواقب جدی در درمان بیماری‌های عفونی دارد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی به کاهش اثربخشی داروها در درمان بیماری منجر می‌شود [۵]. با توجه به این که *S. aureus* دارای ژنوم انعطاف‌پذیری است، سویه‌های بیماری‌زا و مقاوم آن به دارو رو به افزایش است [۶ - ۷]. علت شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های این باکتری، به سبب کسب فاکتورهای مقاومتی متعدد است. طی چندین دهه اخیر افزایش قابل‌توجهی در ظهور سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و سایر آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم به پنیسیلینازها به‌ویژه در عفونت‌های بیمارستانی مشاهده شده است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری با پلاسمید و کروموزوم کنترل می‌شود [۸].

بیوفیلم‌ها اجتماعاتی از باکتری‌ها، جانوران و گیاهان میکروسکوپی هستند که به یک سطح چسبیده و یک لایه ژله‌ای می‌سازند. این لایه‌ها افزون بر فراهم نمودن محیط مناسب برای زیستن، به بهتر چسبیدن و پایدار ماندن میکروب‌ها روی سطوح کمک می‌کنند و نقش محافظتی برای باکتری دارند [۹]. اصولا مقاومت باکتری‌ها با تشکیل بیوفیلم نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها زیاد می‌شود. در یک بیوفیلم ممکن است جذب مواد آلی و تغذیه کمتر از زمانی باشد که باکتری‌ها آزاد هستند ولی پایداری ژنتیکی در آنها بیشتر و پلاسمیدها در بیوفیلم پایدارتر می‌باشند [۱۰].

ژن‌هایی که مهم‌ترین مواد تشکیل‌دهنده بیوفیلم یعنی پروتئین‌ها و پلی‌ساکارید چسبنده را کد می‌کنند متعلق به اپرون *ica* می‌باشند. این اپرون شامل ژن‌های *icaADBC* و ژن تنظیم‌کننده *icaR* است که از رونویسی اپرون *ica* جلوگیری می‌کند. نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده روی مراحل تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهد که تجمع سلولی، انباشت بیوفیلم و سنتز کپسول پلی‌ساکارید (PIA) به‌واسطه اپرون *ica* انجام می‌شود [۱۱]. تولید بیوفیلم مستلزم وجود گروه ژنی *icaADBC* است و سویه‌های *S. aureus* به‌واسطه تولید بیوفیلم به یکدیگر چسبیده و مقاومت آنتی‌بیوتیکی پیدا می‌کنند [۱۲].

سیر (*Allium sativum*) گونه‌ای از خانواده Alliaceae است. این گیاه دارویی حاوی تعداد زیادی ترکیب گوگردی، چندین آنزیم و عناصر ژرمانیم، کلسیم، مس، آهن، پتاسیم، مینزیم، سلنیوم، روی و نیز ویتامین‌های A، B1، C و همچنین فیبر و آب است. در سیر ۱۷ اسید آمینه از جمله لیزین، هیستیدین، آرژنین، آسپارتیک اسید، ترئونین، گلوتامین، پرولین، گلیسین کشف شده است. گزارش‌های متعددی مبنی بر فعالیت ضدمیکروبی عصاره سیر در مقابل میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی وجود دارد. عصاره‌های آبی، الکلی و روغنی سیر در شرایط *in vitro* رشد استافیلوکوک، استرپتوکوک، باسیلوس و اشریشیا را مهار می‌کند [۱۳]. این گیاه دارای بالاترین ترکیبات سولفوری است که مسئول بوی تند سیر و اثرات درمانی آن است.

جنتامایسین یکی از آنتی بیوتیک‌هایی است که برای درمان عفونت‌های استافیلوکوکوسی موثر است ولی متاسفانه به دلیل تولید بیوفیلم، تاثیر این آنتی‌بیوتیک گاهی با مشکل روبه‌رو می‌شود. به همین دلیل محققان سعی بر آن دارند که ترکیبی از آنتی‌بیوتیک‌ها با مواد طبیعی برای چیره شدن بر عفونت های استافیلوکوکوسی را مورد سنجش قرار دهند که از جمله آنها می‌توان به استفاده از نانوذره آهن برای مقابله با *S. aureus*

مقاوم به جنتامایسین [۱۴]، ترکیب جنتامایسین با اسید آسکوربیک برای غلبه بر این باکتری [۱۵] و فعالیت ضدمیکروبی عصاره چای سبز روی *S. aureus* و مقایسه آن با جنتامایسین [۱۶] اشاره نمود.

بکائیان و همکاران [۱۷]، اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی سیر روی سویه‌های *S. aureus* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را بررسی کرده و به تأثیر کشندگی این عصاره روی باکتری مذکور اشاره کردند. محسنی‌پور و همکاران [۱۸] به مطالعه اثر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی آویشن و سیر بر باکتری *S. aureus* به صورت منفرد و بیوفیلم پرداختند و به این نتیجه رسیدند که قابلیت مهار تشکیل بیوفیلم در تیمار با عصاره‌های متانولی سیر بسیار بیشتر از نوع اتانولی است و این گیاهان قابلیت مهار باکتری در حالت منفرد و بیوفیلم را دارا هستند.

در مطالعه‌ای روی *S. aureus* جداشده از ۱۰۷ بیمار، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ۴۰ درصد گزارش گردید [۱۹]. مطالعه در مورد اثر ضدمیکروبی عصاره آبی و کلروفرمی گیاه سیر روی باکتری *S. aureus* نشان داد که عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به‌دلیل عوارض جانبی کمتر نسبت به عوامل درمانی رایج، باارزش به‌نظر می‌رسند و عصاره کلروفرمی اثر ضدمیکروبی قوی‌تری نسبت به عصاره آبی نشان داد و بیشترین میزان حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به نافسیلین مشاهده شد [۲۰]. مطالعه روی تولید بیوفیلم در میان سویه‌های *S. aureus* جدا شده از افراد سالم نشان داد که این باکتری مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم است که می‌تواند عاملی برای مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی باشد [۲۱].

مطالعه دیگری نشانگر تأثیر ممانعتی عصاره سیر بر کئوروم سنسینگ و پاکسازی سریع عفونت‌های ریوی سودوموناسی بود [۲۲]. در پژوهشی روی شیوع ژن *icaA* و *icaD* در سویه‌های *S. aureus* و *S. epidermidis* جدا شده از بیماران و کارکنان بیمارستانی مشخص گردید که که ۳۵/۲ درصد از استافیلوکوک اورئوس‌ها و ۴۸ درصد از استافیلوکوک اپیدرمیدیس‌ها دارای هر دو ژن *icaA* و *icaD* هستند [۲۳].

هدف از این پژوهش بررسی اثر عصاره سیر همراه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین روی تولید و بیان ژن بیوفیلم *icaA* بود و برای این منظور سطح بیان ژن *icaD* در *S. aureus* در اثر تیمار با عصاره سیر و جنتامایسین تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

تیمارهای مورد استفاده

جنتامایسین

در این پژوهش از آنتی‌بیوتیک تزریقی جنتامایسین (۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده گردید.

عصاره سیر

برای این منظور از قرص گارسین[1] ۵۰۰ میلی‌گرم (از شرکت دارویی گل دارو) استفاده گردید. در هر یک از این قرص‌ها، ۲ تا ۴ میلی‌گرم از ماده مؤثره آلیسین موجود است. یک قرص در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و عصاره محلول سیر با غلظت (۵۰ میلی‌گرم بر میکرو لیتر) تهیه گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول با ۹ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و بدین ترتیب عصاره سیر با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میکرولیتر آماده شد.

نمونه‌های باکتریایی

یک نمونه *S. aureus* استاندارد ATCC 25923 (تهیه شده از شرکت آریا اورتو) و همچنین دو نمونه بیمارگر به شماره‌های ۲۹ و ۴۱ از میان جدایه‌های *S. aureus* که از بیماران چند بیمارستان در رشت جمع آوري شده بود، انتخاب گردید. سپس به‌صورت چمنی روی محیط کشت مولر هینتون آگار در داخل پلیت کشت داده شد. پلیت‌های حاوی باکتری به‌مدت ۲۴ ساعت آنکوبه گردید و سپس در محیط مولر هینتون براث کشت داده شد. ۲۴ ساعت پس از کشت، کدورتی معادل محیط نیم مک فارلند آماده گردید.

روش‌های بررسی تأثیر ضدمیکروبی عصاره سیر و جنتامایسین

روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک

روی محیط مولر هینتون آگار حاوی باکتری، با استفاده از پیپت پاستور سه چاهک در پلیت ایجاد گردید. مقداری محیط‌کشت آگار (کمتر از ۱۰ میکرولیتر) با استفاده از

[1] Garcin

سمپلر درون چاهک ریخته و قسمت تحتانی چاهک بسته شد تا قسمت تحتانی محیط‌کشت بعد از ایجاد چاهک باز نباشد و عصاره به زیر محیط‌کشت نرود. سپس با استفاده از سمپلر به ترتیب مقدار ۶۰ میکرولیتر عصاره سیر، جنتامایسین، و ترکیب عصاره سیر و جنتامایسین به هر یک از سه چاهک ایجاد شده اضافه گردید. درب پلیت بسته و به منظور عدم نفوذ آلودگی با پارافیلم پوشانده شد و در انکوباتور با دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید.

روش دیسک بلانک برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

مقدار ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ی سیر داخل میکروتیوب ریخته شد و سپس از دیسک‌های بلانک به داخل میکروتیوب اضافه گردید. بدین ترتیب که دیسک‌های بلانک در لوله‌ی حاوی غلظت فوق قرار گرفت. بعد از ۳ تا ۵ دقیقه و پس از جذب کامل، دیسک‌ها روی محیط کشت حاوی باکتری و در انکوباتور به‌مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. برای حصول اطمینان این آزمایش سه بار تکرار گردید. همچنین، از سویه‌ی استاندارد ATCC (*S. aureus* 25923) برای کنترل آزمایش‌های تعیین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده شد.

روش حداقل غلظت مهارکنندگی[1] (MIC)

کشت تازه‌ی (۱۸ تا ۲۴ ساعته) سه سویه‌ی مورد نظر روی محیط مولرهینتون آگار انجام شد. سپس مقداری از کلنی‌های محیط کشت تازه به محیط کشت مولر هینتون براث منتقل گردید و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محیط مایع میکروبی با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث، معادل کدورت نیم مک‌فارلند رقیق سازی شد. برای انجام MIC، از آنتی‌بیوتیک تزریقی جنتامایسین و همچنین سوسپانسیون سیر تهیه شده از قرص گارسین استفاده شد. از جنتامایسین با استفاده از سرم فیزیولوژی، محلولی با غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم بر لیتر تهیه گردید. از عصاره سیر نیز، محلولی با غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر تهیه شد. سه سری لوله آزمایش ۱۰ تایی آماده شد و در لوله آزمایش شماره ۱ سری اول، ۲ میلی‌لیتر جنتامایسین، در لوله آزمایش شماره ۱ سری دوم، ۲ میلی‌لیتر عصاره سیر و در لوله آزمایش شماره ۱ سری سوم نیز مخلوط سیر و جنتامایسین ریخته شد. در هر یک از لوله‌های شماره ۲ تا شماره ۱۰ به میزان ۲ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث ریخته و اتوکلاو گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از لوله شماره ۱ برداشته و به لوله شماره ۲ منتقل شد. بدین ترتیب غلظت آنتی‌بیوتیک و عصاره سیر در لوله شماره ۲ به نصف لوله اول رسید. به همین ترتیب ۱ میلی‌لیتر از لوله شماره ۲ به لوله شماره ۳ منتقل شد و این روند متوالی از هر لوله به لوله بعدی ادامه یافت و عملیات رقیق‌سازی سریالی انجام شد. از سوسپانسیون باکتری‌های مورد نظر با کدورت نیم مک‌فارلند به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر به لوله‌های ۱ تا ۹ اضافه شد. لوله شماره ۱۰ به‌عنوان شاهد بدون باکتری در نظر گرفته شد. تمام این لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و سپس میزان کدورت یا عدم ایجاد کدورت لوله‌های MIC بررسی شد.

روش بررسی تشکیل بیوفیلم

در این آزمون، ابتدا باکتری‌های مورد نظر در محیط مایع مولر هینتون براث کشت داده شد و انکوبه گردید. پس از ۲٤ساعت، کدورت محیط حاوي باکتري برابر با ۰/۵ مك فارلند تعیین شد. از هر سوسپانسون رقت ۱ به ۲۰ ساخته شد. در این روش از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. در هر یک از خانه‌های پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث اضافه شد. سپس به هر خانه‌ي مشخص شده پلیت، به میزان ۱۰۰میکرولیتر عصاره سیر، ۱۰۰ میکرولیتر جنتامایسین و ۱۰۰میکرولیتر مخلوط عصاره سیر و جنتامایسین اضافه شد (دو ستون از میکروپلیت نیز بدون تیمار به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد). سپس در بقیه خانه‌های هر ستون از میکروپلیت، عملیات رقیق‌سازی انجام و پس از این مرحله به خانه‌هاي موجود در ستون‌های مشخص شده برای هر باکتری، به‌ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از سویه‌های استاندارد، سویه‌های شماره‌های ۲۹ و ۴۱ اضافه شد و در نهایت میکروپلیت به‌مدت ٤٨ ساعت در

[1] Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

انکوباکتور قرار گرفت. پس از این زمان، بیوفیلم با اتانول تثبیت شد و میکروپلیت‌ها در ظرف حاوی آب مقطر تخلیه و به آرامی شستشو و در دمای اتاق خشک گردیدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۰/۲ درصد به هر خانه اضافه گردید و پس از ۱۰ دقیقه، رنگ اضافی کریستال ویوله تخلیه شده و میکروپلیت دو بار آب‌کشی و در دمای اتاق خشک گردید. در نهایت کریستال ویوله متصل به سلول‌ها و بیوفیلم در اسید استیک ۳۰ درصد حل گردید و میزان بیوفیلم در طول موج ۵۷۰ نانومتر (بالاترین میزان جذب کریستال ویوله در ۵۷۰ نانومتر است) با استفاده از دستگاه Micro plate reader تعیین شد.

روش استخراج DNA از سویه‌های مورد مطالعه

سویه‌های مورد نظر در محیط کشت مولر هینتون براث به‌مدت حداکثر ۲۴ ساعت و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس تمامی نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه تحت سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور قرار گرفتند و باکتری‌های رسوب‌یافته به‌منظور استخراج DNA به‌کار گرفته شدند. استخراج DNA ژنومی از باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* با استفاده از کیت و طبق دستورالعمل شرکت پیشگامان انتقال ژن انجام شد.

بررسی وجود ژن *icaA*

با استفاده از روش PCR، وجود ژن *icaA* در سه سویه *S. aureus* مورد مطالعه، بررسی گردید. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، برگرفته از مقاله Atshan و همکاران [۲۴] است که توسط شرکت تکاپو زیست سنتز شد و مشخصات آن در جدول ۱ آمده است. شرایط زمانی و دمایی بهینه برای انجام PCR و میزان واکنش‌گرهای PCR به‌ترتیب در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

بررسی کیفیت محصول PCR

کیفیت محصول PCR با الکتروفورز ارزیابی شد. با استفاده از بافر TBE و پودر آگارز، ژل آگارز ۱% تهیه گردید و ۵ میکرولیتر از محصول PCR با پاورلود مخلوط و به درون چاهک‌ها تزریق شد. از DNA Ladder 100 bp نیز برای تعیین اندازه باندها استفاده شد. پس از الکتروفورز در ولتاژ ۱۲۰ ولت و استفاده از دستگاه ***UV*** Transilluminator، باندهای محصول PCR رؤیت شد و مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱. آغازگرهای ژن *ica A*

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. آغازگرهای ژن مرجع *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′			

جدول ۳. برنامه دمایی ترموسایکلر برای PCR ژن *icaA*

برنامه	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	
Initial denaturation	۵ دقیقه	۹۴	
Denaturation	۴۵ ثانیه	۹۴	
Annealing	۴۵ ثانیه	۶۰	۳۵ سیکل
Extension	۴۵ ثانیه	۷۲	
Final extension	۵ دقیقه	۷۲	

جدول ۴. مواد و مقادیر واکنش‌گرها جهت PCR ژن *icaA*

ماده	مقدار
Distilled water	15.5 µl
PCR buffer (10X)	2.5 µl
MgCl2 (10mM)	1.5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Forward primer (10p.mol)	0.5 µl
Reverse primer (10p.mol)	0.5 µl
Template DNA	3 µl
Taq polymerase (100U/µl)	0.5 µl
Total volume	25 µl

نحوه استخراج RNA و سنتز cDNA

بر اساس نتایج آزمون MIC، نمونه‌های تیمار شده و بدون تیمار به روش sub MIC حدود ۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از سانتریفیوژ، رسوب حاصل برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت. استخراج RNA در شرایط استریل و با رعایت تمام اصول برودتی، طبق دستورالعمل شرکت BIONEER صورت گرفت و صحت استخراج RNA با استفاده از ژل آگارز ۱% و بارگذاری ۵ میکرولیتر از محصول استخراج RNA مورد تأیید واقع شد. از این محصول به‌منظور سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA شرکت بایونیر[1] استفاده شد و سپس این cDNA ها به‌منظور Real time PCR به‌کار گرفته شدند.

واکنش Real Time PCR

به‌منظور مقایسه بیان ژن *icaA* در نمونه‌های تیمار شده با عصاره سیر و جنتامایسین و نمونه‌های شاهد Real-Time PCR انجام شد. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر از آغازگر با ۹۰ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط گردید. سپس مراحل انجام واکنش Real- Time PCR انجام گرفت. یعنی در ابتدا ۱۰ میکرولیتر SYBR Green Premix به هر میکروتیوب مخصوص ریل تایم اضافه گردید. سپس ۰/۸ میکرولیتر آغازگر Forward و پس از آن ۰/۸ میکرولیتر آغازگر Reverse به هر میکروتیوب اضافه شد. در مرحله‌ی بعد، ۲ میکرولیتر cDNA و سپس ۰/۴ میکرولیتر از ROX Reference Dye و برای رسیدن به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، ۶ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز اضافه گردید. سپس مواد با Spin مخلوط شدند. بعد از آن ۱۸ میکرولیتر از این مخلوط برداشته و به هر میکروتیوب استریپ اضافه گردید. Cap مخصوص روی استریپ‌ها قرار داده شد. از ژن *16SrRNA* به‌عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی استفاده گردید. در پایان، متد $\Delta\Delta CT$ برای آنالیز داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. جداول ۵، ۶ و ۷، اطلاعات مربوط به نمونه‌ها و نوع تیمار و الگوی مقایسه نمونه‌ها را نشان می‌دهند.

جدول ۵. مقایسه نمونه‌های سویه استاندارد با تیمارهای مختلف

سویه	آغازگر	ژن مرجع	مشخصات نمونه
استاندارد	*icaA*	*16s rRNA*	تیمارشده با جنتامایسین
استاندارد	*icaA*	*16s rRNA*	تیمارشده با جنتامایسین و عصاره سیر
استاندارد	*icaA*	*16s rRNA*	تیمارشده با عصاره سیر
استاندارد	*icaA*	*16s rRNA*	کنترل (بدون تیمار)

[1] Bioneer

جدول ۶. مقایسه نمونه‌های سویه شماره ۲۹ با تیمارهای مختلف

سویه	آغازگر	ژن مرجع	مشخصات نمونه
شماره ۲۹	*icaA*	*16s rRNA*	تیمارشده با جنتامایسین
شماره ۲۹	*icaA*	*16s rRNA*	تیمارشده با جنتامایسین و عصاره سیر
شماره ۲۹	*icaA*	*16s rRNA*	تیمارشده با عصاره سیر
شماره ۲۹	*icaA*	*16s rRNA*	کنترل (بدون تیمار)

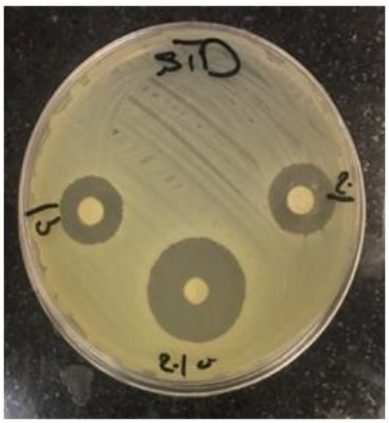
جدول ۷. مقایسه نمونه‌های سویه شماره ۴۱ با تیمارهای مختلف

سویه	آغازگر	ژن رفرنس	مشخصات نمونه
شماره ٤١	*icaA*	*16s rRNA*	تیمارشده با جنتامایسین
شماره ٤١	*icaA*	*16s rRNA*	تیمارشده با جنتامایسین و عصاره سیر
شماره ٤١	*icaA*	*16s rRNA*	تیمارشده با عصاره سیر
شماره ٤١	*icaA*	*16s rRNA*	کنترل (بدون تیمار)

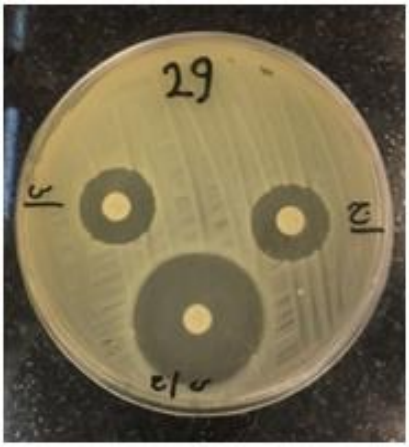
نتایج

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره سیر و جنتامایسین

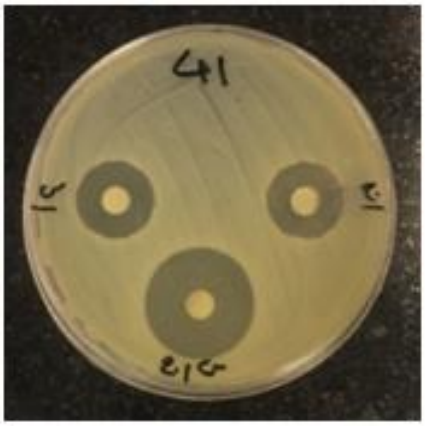
در این پژوهش، از محلول ۵۰۰۰ میکروگرم بر لیتر عصاره سیر و محلول ٤۰۰۰ میکروگرم بر لیتر جنتامایسین برای آغشته‌کردن دیسک بلانک استفاده گردید. همچنین برای سنجش تأثیر توأم سیر و جنتامایسین نیز دیسک بلانک با مخلوطی از محلول سیر ۵۰۰۰ میکروگرم بر لیتر و جنتامایسین ٤۰۰۰ میکروگرم بر لیتر آغشته شد. تأثیر عصاره سیر، آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و استفاده توأم سیر و جنتامایسین در سویه استاندارد *S. aureus* (شکل ۱)، سویه شماره ۲۹ (شکل ۲) و سویه شماره ۴۱ (شکل ۳) نشان داده شده است.



شکل ۱. هاله‌ی عدم رشد تحت تیمار عصاره‌ی سیر (س)، جنتامایسین (ج) و تیمار توأم سیر و جنتامایسین (س / ج) در سویه استاندارد



شکل ۲. هاله‌ی عدم رشد تحت تیمار عصاره‌ی سیر(س)، جنتامایسین (ج) و تیمار توأم سیر و جنتامایسین (س / ج) در سویه شماره ۲۹



شکل ۳. هاله‌ی عدم رشد تحت تیمار عصاره‌ی سیر(س)، جنتامایسین(ج) و تیمار توأم سیر و جنتامایسین(س / ج) در سویه شماره ۴۱

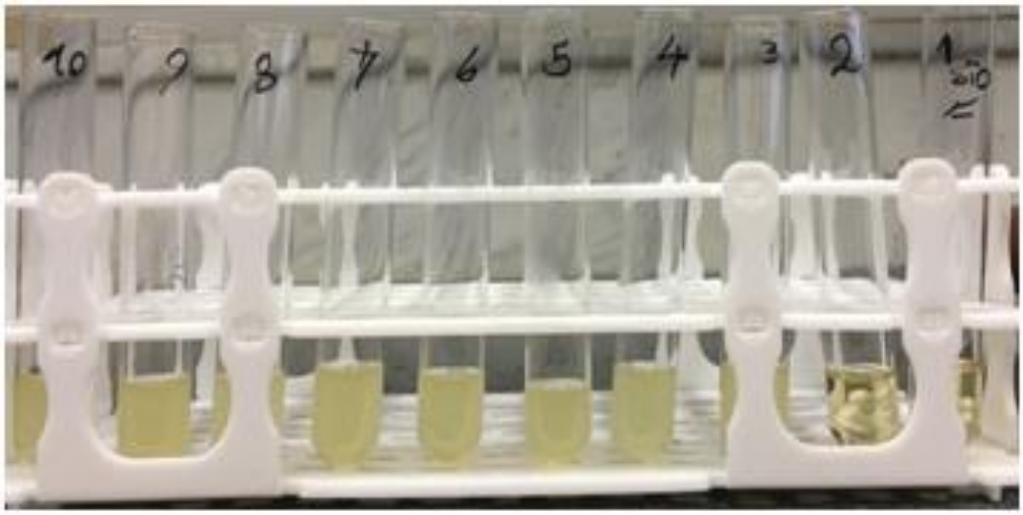
قطر هاله عدم رشد باکتری در سه سویه مورد مطالعه تحت تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد (جدول ۸).

بررسی حداقل غلظت مهاری (MIC) تحت تیمار عصاره سیر و جنتامایسین

با انجام آزمون MIC، حداقل غلظت عصاره‌ی سیر و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین که می‌توانند مانع از فعالیت سویه‌های استاندارد و سویه‌های نیمه‌حساس (شماره های ۲۹ و ۴۱) *S. aureus* شود، مشخص گردید. بر همین اساس، سویه‌ی شماره ۲۹ توان رشد در غلظت ۱۰۰۰ میکرو گرم برمیلی لیترآنتی‌بیوتیک جنتامایسین و نیز عصاره‌ی سیر را نداشت. تیمار هم‌زمان سیر و جنتامایسین نیز MIC ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر را نشان داد. MIC آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و عصاره‌ی سیر و تیمار هم‌زمان عصاره سیر و جنتامایسین برای سویه‌ی شماره‌ی ۴۱ نیز برابر ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در مورد سویه استاندارد *S. aureus* نیز حداقل غلظت مهاری ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای هر سه حالت تعیین گردید (شکل‌های ۴، ۵ و ۶).

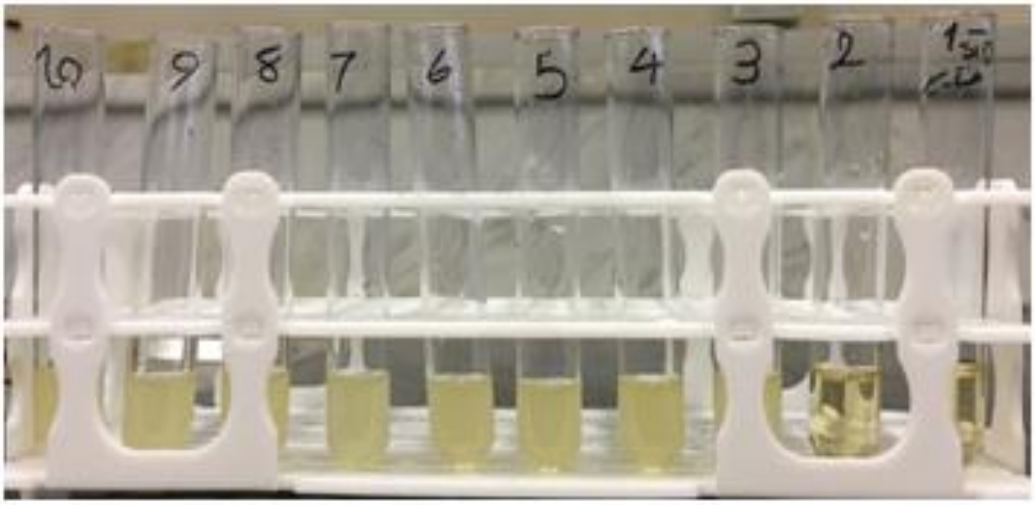
جدول ۸. قطر هاله عدم رشد سویه‌های مورد مطالعه تحت تیمارهای سیر و جنتامایسین

سویه باکتری	نوع تیمار	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
استاندارد	عصاره سیر با غلظت 5000 µg/ml	۱۱
	جنتامایسین با غلظت 4000 µg/ml	۱۳
	ترکیب عصاره سیر و جنتامایسین	۲۵
۲۹	عصاره سیر با غلظت 5000 µg/ml	۱۳
	جنتامایسین با غلظت 4000 µg/ml	۱۳
	ترکیب عصاره سیر و جنتامایسین	۳٤
٤۱	عصاره سیر با غلظت 5000 µg/ml	۱۳
	جنتامایسین با غلظت 4000 µg/ml	۱۳
	ترکیب عصاره سیر و جنتامایسین	۳۰



شکل ۴. MIC مربوط به سویه‌ی استاندارد تحت تیمار عصاره سیر (۱۰۰۰µg/ml)

شکل ۵. MIC مربوط به سویه‌ی استاندارد تحت تیمار جنتامایسین (۱۰۰۰µg/ml)



شکل ۶. MIC مربوط به سویه‌ی استاندارد تحت تیمار جنتامایسین و عصاره سیر (۱۰۰۰µg/ml)

بررسی میزان تولید بیوفیلم

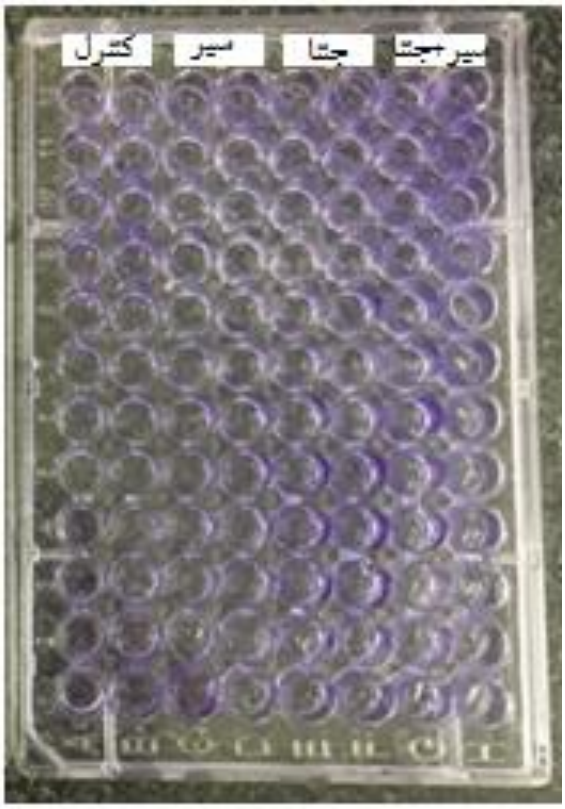
با استفاده از میکروپلیت و رنگ کریستال ویوله و طبق غلظت‌های مناسب MIC، میزان تولید بیوفیلم سویه‌های *S. aureus*، تحت تیمارهای عصاره سیر، آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و تیمار همزمان جنتامایسین و عصاره سیر در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی و با نمونه‌های شاهد (بدون تیمار) مقایسه گردید (شکل ۷) که نتایج آن در جدول ۹ نشان داده شده است.

استخراج DNA

از سویه‌های استاندارد، شماره ۲۹ و ٤١، با استفاده از کیت شرکت پیشگامان انتقال ژن، استخراج DNA انجام شد و کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز مشخص گردید (شکل ۱۵).

تأیید وجود ژن بیوفیلم *icaA*

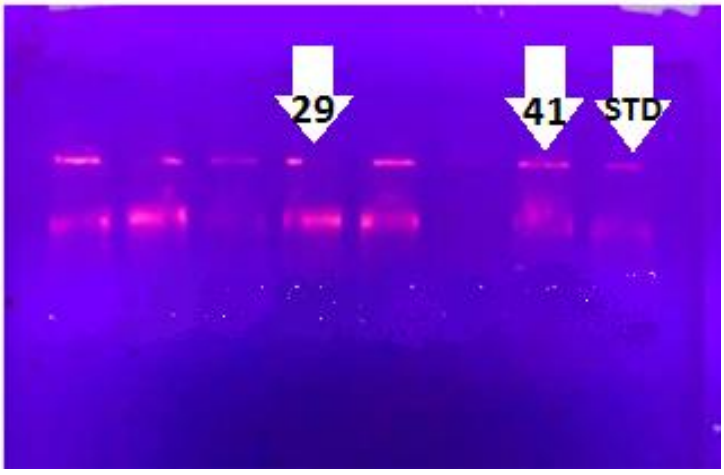
با استفاده از روش PCR در شرایط مطلوب دمایی و زمانی و با به‌کارگیری آغازگرهای اختصاصی، وجود ژن *icaA* در سویه‌های *S. aureus* استاندارد، شماره ۲۹ و ۴۱، مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس آنچه که در مقالات ثبت شده است، تک باندی در محدوده ۱۵۰ bp مورد انتظار بود که چنین باندی در الکتروفورز مشاهده گردید (شکل ۹).



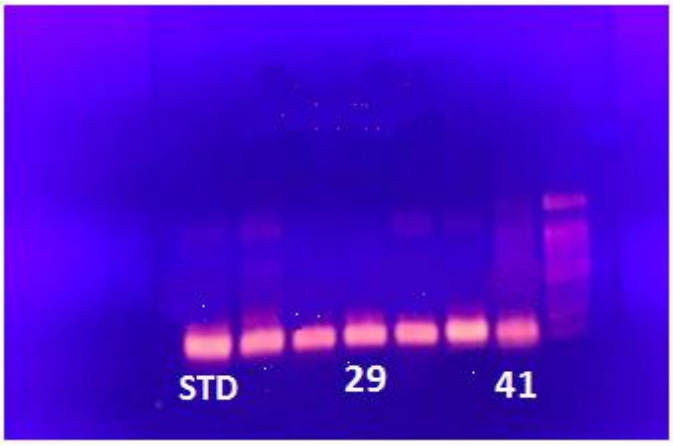
شکل ۷. نتایج تست بیوفیلم در میکروپلیت با تیمارهای جنتامایسین و عصاره سیر

جدول ۹. بیوفیلم حاصل از سویه‌ها تحت تیمارهای مختلف (میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر)

نوع تیمار	سویه استاندارد	سویه شماره ۴۱	سویه شماره ۲۹
تیمار شده با عصاره سیر (غلظت ۵۰۰۰ µg/ml)	۰/۰۲۹	۰/۰۲۶	۰/۰۷۲
تیمار شده با جنتامایسین (غلظت۴۰۰۰ µg/ml)	۰/۰۲۲	۰/۰۲۷	۰/۰۶۳
تیمار توأم جنتامایسین و عصاره سیر	۰/۰۳۵	۰/۰۳۸	۰/۰۹۰
نمونه‌های کنترل (بدون تیمار)	۰/۰۲۵	۰/۰۳۰	۰/۱۱۹



شکل ۸. باندهای DNA استخراج شده از سویه‌های استاندارد، ۲۹ و ۴۱ روی ژل الکتروفورز ۱%



شکل ۹. باندهای *icaA* در سویه‌های مورد مطالعه روی ژل آگارز ۱% (100 bp ladder)

نتایج استخراج RNA و سنتز cDNA

با تهیه SubMIC از هر سه سویه مورد مطالعه تحت تیمارهای عصاره سیر، جنتامایسین و تیمار توأم جنتامایسین و عصاره سیر، با استفاده از کیت و دستورالعمل شرکت Bioneer، استخراج RNA کل[1] انجام شد و کیفیت آن روی ژل آگارز بررسی گردید. این RNA نیز به‌منظور سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز BIONEER و آغازگرهای تصادفی هگزامر، مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج Real time PCR

پس از سنتز cDNA، محصول این سنتز به‌منظور ارزیابی میزان بیان ژن *icaA* تحت تأثیر عصاره سیر و جنتامایسین در هر سه سویه مورد نظر برای Real-time PCR مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش، از ژن *16s rRNA* به‌عنوان ژن مرجع استفاده گردید.

نتایج ارزیابی بیان ژن *icaA* در سویه استاندارد

تیمار سویه استاندارد با عصاره سیر، آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و ترکیب سیر و جنتامایسین منجر به کاهش بیان ژن *icaA* شد که این موضوع در نمودار حاصل از آنالیز نتایج Real time PCR نشان داده شده است (شکل ۱۰).

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، سویه استاندارد *S. aureus* تحت تأثیر همه تیمارهای مورد نظر، کاهش بیان ژن بیوفیلم *icaA* را نشان می‌دهد. تیمار با جنتامایسین، بیان ژن *icaA* را به ۴۱ درصد نمونه کنترل کاهش داد. تیمار با عصاره سیر نیز بیان این ژن را به ۳۶ درصد نمونه کنترل کاهش داد و بیان ژن *icaA* تحت تیمار همزمان عصاره سیر وجنتامایسین به ۲۵ درصد نمونه کنترل کاهش یافت.

نتایج ارزیابی بیان ژن *icaA* در سویه ۲۹

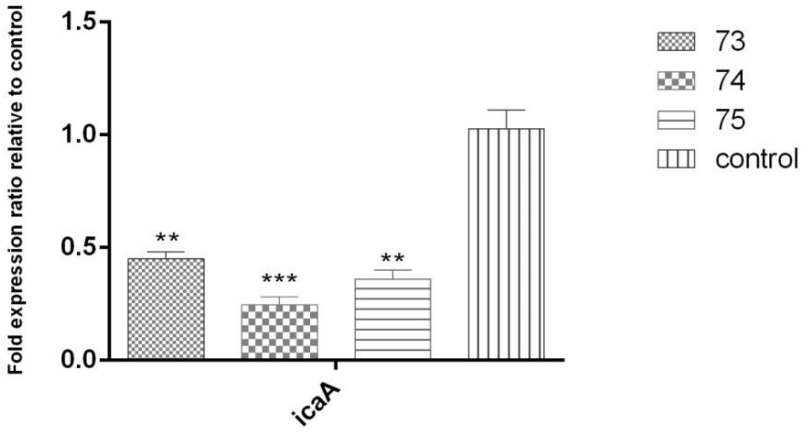
با آنالیز نتایج حاصل از Real time PCR، تأثیر جنتامایسین و عصاره سیر بر میزان بیان ژن *icaA* در سویه شماره ۲۹ مقایسه شد (شکل ۱۱). بر این اساس ترکیب عصاره سیر و جنتامایسین تأثیر بسیار خوبی روی کاهش بیان ژن بیوفیلم *icaA* داشت، به‌طوری که بیان این ژن را به ۱۸ درصد حالت بدون تیمار کاهش داد. عصاره سیر به‌تنهایی میزان بیان ژن بیوفیلم *icaA* در سویه شماره ۲۹ را به ۲۹ درصد نمونه کنترل کاهش داد و کاهش بیان این ژن تحت تأثیر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نیز ۳۹ درصد نمونه کنترل بود.

نتایج ارزیابی بیان ژن *icaA* در سویه ۴۱

کاهش بسیار زیاد بیان ژن بیوفیلم در سویه شماره ۴۱ *S. aureus* در اثر تیمار با عصاره سیر و جنتامایسین مشاهده گردید (شکل ۱۲). ترکیب عصاره سیر و جنتامایسین باعث شد که بیان ژن بیوفیلم *icaA* به حدود ۱۱ درصد نمونه کنترل کاهش یابد. عصاره سیر به‌تنهایی تأثیر بسیار خوبی در روند کاهش بیان این ژن داشت و منجر به کاهش ۲۰ درصدی نمونه کنترل شد. آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نیز نسبت

[1] Total RNA

به نمونه بدون تیمار بیان این ژن را به ۴۵ درصد نمونه کنترل کاهش داد.

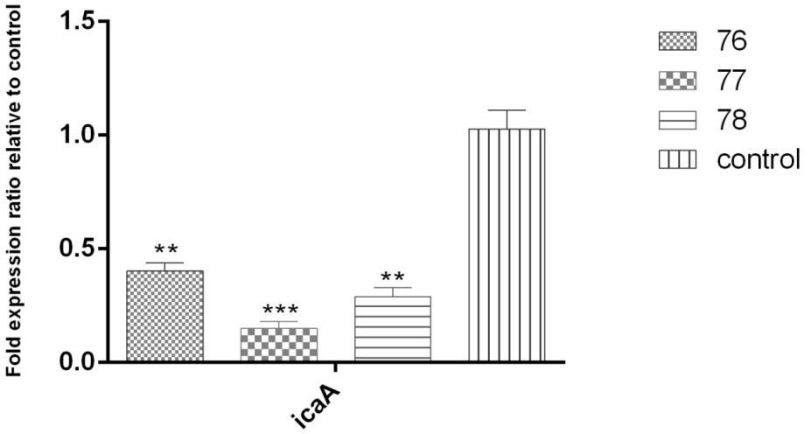


	73	74	75	control
icaA	0.41±0.18 >0.01	0.25±0.22 >0.001	0.36±0.25 >0.01	1.00±0.58

شکل ۱۰. نمودار و اطلاعات حاصل از آنالیز نتایج Real time PCR سویه استاندارد

(شماره ۷۳: تیمار با جنتامایسین، شماره ۷۴: تیمار توأم سیر و جنتامایسین، شماره ۷۵: تیمار با عصاره سیر)

(کنترل = بدون تیمار)

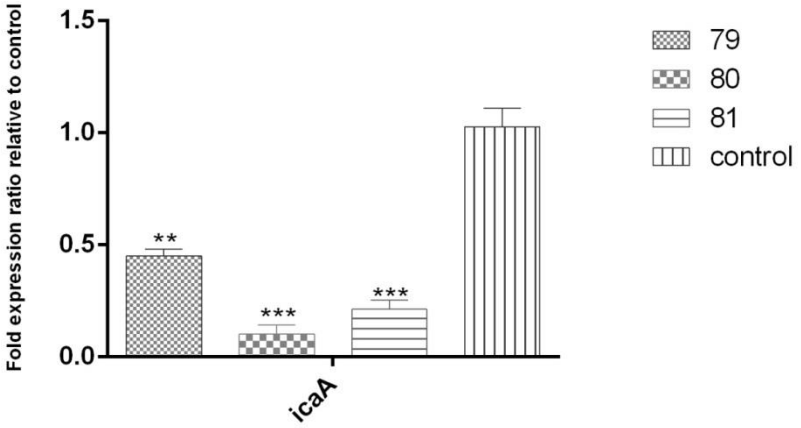


	76	77	78	control
icaA	0.39±0.23 >0.01	0.18±0.25 >0.001	0.29±0.21 >0.01	0.99±0.63

شکل ۱۱. نمودار و اطلاعات حاصل از آنالیز نتایج Real time PCR سویه شماره ۲۹

(شماره ۷۶: تیمار با جنتامایسین، شماره ۷۷: تیمار توأم سیر و جنتامایسین، شماره ۷۸: تیمار با عصاره سیر)

(کنترل = بدون تیمار)



	79	80	81	control
icaA	0.45±0.21 >0.01	0.11±0.28 >0.001	0.2±0.25 >0.001	1.02±0.66

شکل ۱۲. نمودار و اطلاعات حاصل از آنالیز نتایج Real time PCR سویه شماره ۴۱

(شماره ۷۹: تیمار با جنتامایسین، شماره ۸۰: تیمار توأم سیر و جنتامایسین، شماره ۸۱: تیمار با عصاره سیر)
(کنترل = بدون تیمار)

بحث

گزارش‌های متعددی در مورد تأثیر ضدمیکروبی عصاره سیر وجود دارد. بکائیان و همکاران [۱۷]، محسنی‌پور و همکاران [۱۸] و مرادخانی و ملا عباس‌زاده [۲۰] به تأثیر اثر ضد استافیلوکوکی عصاره سیر اشاره کرده و بیان داشتند که استفاده از عصاره سیر به دلیل عوارض جانبی بسیار کمتری که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد، بسیار حائز اهمیت است که با نتایج تحقیقات ما مشابه بود. ال‌اصنافی [۱۳] نیز در پژوهش خود به خواص ضد استافیلوکوکی عصاره سیر تأکید کرده است و در این تحقیق نیز نتیجه مشابهی حاصل گردید.

بر اساس مطالعه حاضر، طبق نتایج آنتی‌بیوگرام تأثیر ضد استافیلوکوکی عصاره سیر در هر سه سویه مورد مطالعه حائز اهمیت است و قطر هاله عدم رشد باکتری ناشی از اثر عصاره سیر با قطر هاله عدم رشد متأثر از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین برابری می‌کند و نکته جالب توجه این است که استفاده همزمان عصاره سیر و جنتامایسین، تأثیر ضد استافیلوکوکی آن‌ها را دو برابر می‌کند. نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) در مورد سویه‌های استاندارد و بیمارگر نیز تأثیر ضدمیکروبی عصاره سیر و جنتامایسین را تأیید نمود.

در این مطالعه هر سه سویه مورد نظر توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند که با مطالعه شاهکرمی و راشکی [۲۵] سازگار بود. این محققان گزارش کردند که از ۲۷ جدایه *S. aureus*، ۲۵ جدایه توانایی تشکیل بیوفیلم را دارا بودند. پژوهش حاضر در بررسی فنوتیپی میزان تولید بیوفیلم نشان داد که سویه‌های بیمارگر به‌ویژه سویه شماره ۲۹ تحت اثر تیمار با عصاره سیر و جنتامایسین، کاهش تولید بیوفیلم را به‌خوبی نشان می‌دهند. پژوهش دیگری [۱۸] نیز نشان داده بود که عصاره متانولی سیر می‌تواند باعث مهار تولید بیوفیلم از *S. aureus* شود.

مطالعه مولکولی و ارزیابی میزان بیان ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم تحت تأثیر عصاره سیر و جنتامایسین مهم‌ترین هدف این پژوهش بود. وجود اپرون *icaADBC* در سویه‌های *S. aureus* توسط محققانی همچون اسزودا [۱۲] اثبات شده بود. در این تحقیق نیز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *icaA* و تکنیک PCR، وجود این ژن در سویه استاندارد و همچنین سویه‌های بیمارگر به اثبات رسید. اما آنچه که در پژوهش حاضر حائز اهمیت است، بررسی میزان بیان این ژن تحت تأثیر عصاره سیر و جنتامایسین بود که تحقیقی در این مورد صورت نگرفته بود.

در این تحقیق مشخص شد که بیان ژن *icaA* که یکی از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم است، تحت تأثیر عصاره سیر و جنتامایسین کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از Real time PCR نشان داد که در هر سه سویه مورد مطالعه، عصاره سیر توان بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در کاهش بیان ژن بیوفیلم *icaA* دارد و در برخی موارد بیان این ژن را حدود ۸۰ درصد کاهش می‌دهد. اما تأثیر همزمان عصاره سیر و جنتامایسین بر کاهش بیان این ژن بیشتر است به‌طوری که در مورد یکی از سویه‌های بیمارگر *S. aureus*، منجر به کاهش نزدیک به ۹۰ درصدی بیان ژن *icaA* گردید. تولید بیوفیلم حاصل عملکرد چندین ژن می‌باشد و ژن *icaA* یکی از ژن‌هایی است که با تولید آنزیم *N*-acetylglucosaminyltranferase دخیل در مسیر تولید بیوفیلم حائز اهمیت است ولی به‌طورکلی فعالیت تمام ژن‌های اپرون *icaADBC* و به‌ویژه ژن *icaD* در تولید بیوفیلم باکتریایی موثر است. بنابراین بررسی هم‌زمان بیان ژن‌های *icaA* و *icaD* تحت تأثیر عصاره سیر می‌تواند نتایجی منطبق‌تر بر نتایج فنوتیپی تولید بیوفیلم داشته باشد. با این حال در این پژوهش، نتایج آنالیز مولکولی ژن بیوفیلم *icaA* و همچنین آزمون فنوتیپی بیوفیلم تأیید کننده یکدیگر هستند و احتمالا با تأثیر عصاره سیر و جنتامایسین بر کاهش بیان ژن *icaA*، تولید بیوفیلم نیز دچار تقلیل می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

طبق بررسی‌های فنوتیپی، عصاره سیر کارآیی زیادی در جلوگیری از رشد باکتری *S. aureus*، دارد به‌طوری که این تأثیر با اثر ضدمیکروبی جنتامایسین قابل مقایسه است. اثر ضدمیکروبی ترکیبی از عصاره سیر و جنتامایسین دو چندان است. با توجه به این‌که *S. aureus*، با تولید بیوفیلم، نسبت به اثرات ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت کسب می‌کند، عصاره سیر در روند کاهش تولید بیوفیلم مؤثر است. عصاره سیر منجر به کاهش قابل‌توجه بیان ژن بیوفیلم *icaA* در *S. aureus*، می‌گردد و با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین اثر هم‌افزایی در کاهش بیان ژن *icaA* و کاهش تولید بیوفیلم توسط این باکتری دارد. با توجه به نتایج این پژوهش، استفاده از عصاره سیر به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها یا حداقل استفاده توأم سیر با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین برای مقابله با *S. aureus* مطلوب و مؤثر به‌نظر می‌رسد. به‌منظور درک بیشتری از تأثیر ضدمیکروبی عصاره سیر مواردی همچون مطالعه اثر عصاره سیر روی تعداد بیشتری از سویه‌های *S. aureus*، مقایسه تأثیر عصاره سیر با آنتی‌بیوتیک‌های دیگر و بررسی دیگر ژن‌های اپرون *icaADBC* تحت تیمار عصاره سیر پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مساعدت و همکاری معاونت محترم پژوهشی واحد رشت در حمایت از پژوهش حاضر قدردانی می‌گردد.

منابع

[1] Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. 1997, Nasal carriage of *Staphylococcus aureus:* epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clinical Microbiology Reviews, 10 (3):505-520.

[2] Waldvogel FA. 2000, *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., (eds.), Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2069-2092.

[3] Rahimi MK. 2003, Zinser Microbiology (translation). Abijah Publications. Tehran. 344 pp.

[4] Tseng CW, Biancotti JC, Berg B, Gate D, Kolar SL, Muller S, Rodriguez MD, Rezai-Zadeh K, Fan X, Beenhouwer DO, Town T, Liu GY. 2015, Increased susceptibility of humanized NSG mice to panton-valentine leucocidin and *Staphylococcus aureus* skin infection. *PLOS Pathogens, 10 (10):* doi: 10.1371/journal.ppat.1005292.

[5] Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizv, SMD, Kamal MA. 2015, Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi Journal of Biological Sciences, 22(1): 90-101.

[6] Holden MT, Feil EJ, Lindsa JA, Peacock SJ, Day NP, Enright MC, Atkin R. 2004, Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and

drug resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(26): 9786-9791.

[7] Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. 2003, Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resistance Updates, 6 (1): 41-52.

[8] Carvalho MJD, Pimenta FC, Hayashida M, Gir E, Silva AMD, Barbosa C P, da Silva Canini SRM, Santiago S. 2009, Prevalence of methicillin-resistant methicillin-susceptible *S. aureus* in the saliva of health professionals. Clinics, 64(4): 295-302.

[9] Liu M, Lut J. 2003, A comparison of additional treatment processes to limit particle accumulation and microbial growth during drinking water distribution. *Water Research***,** 47(8): 2719-2728.

[10] Otto M. 2009, *Staphylococcus epidermidis* – the 'accidental' pathogen. Nature Reviews Microbiology, 7(8): 555-67.

[11] Chokr A, Watier D, Eleaume H, Pangon B, Ghnassia JC, Mack D, Jabbouri S. 2006, Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesion in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. International Journal of Medical Microbiology, 296 (6):381-388.

[12] Szweda P, Schielmann M, Milewski S, Frankowska A, Jakubczak A. 2012. Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *Polish Journal of Microbiology*, 61(1): 65-69.

[13] Al-Snafi AE. 2015, Therapeutic properties of medicinal plants: a review of their antibacterial activity (part 1). International Journal of Pharmacology and Toxicology, 6 (3): 137-158.

[14] Subbiahdoss G, Sharifi S, Grijpma DW, Laurent S, van der Mei HC, Mahmoudi M, Busscher HJ. 2012, Magnetic targeting of surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles yields antibacterial efficacy against biofilms of gentamicin-resistant staphylococci. Acta Biomaterialia, 8(6): 2047-2055.

[15] Mal P, Dutta S, Bandyopadhyay D, Dutta K, Basu A, Bishayi B. 2012, Gentamicin in combination with ascorbic acid regulates the severity of *Staphylococcus aureus* infection–induced septic arthritis in mice. Scandinavian Journal of Immunology, 76(6): 528-540.

[16] Radji M, Agustama RA, Elya B, Tjampakasari CR. 2013, Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* and multi–drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3(8): 663-667.

[17] Bokaeian M, Farazmand R, Keyghobadi S, Saeeidi S. 2015, The antimicrobial activity of extract of *Allium sativum* against *Staphylococcus aureus* resistant antibacterial. Journal of Plant Research, 28 (1): 34-41.

[18] Mohsenipour Z, Hasanshahian M, Moradi M. 2014, Investigation of antimicrobial effect of thyme and garlic plant extracts on *Staphylococcus aureus* bacteria individually and biofilm. The First national conference on medicinal plants and sustainable agriculture, Hamedan. https://civilica.com/doc/241604.

[19] Akbarzadeh Khiavi T, Nahaei M, Rahmati A, Asgharzadeh M, Sadegi J. 2007, Plasmid profiles and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers in hemodialysis patients in Imam Khomeini Hospital of Tabriz. Journal of Ardabil University of Medical Sciences, 7 (1): 7-14.

[20] Moradkhani S, Mollaabaszadeh H. 2016, Antimicrobial effect of aqueous extract and chloroform of *Allium sativum* on *Staphylococcus aureus*. Journal of Infectious and Tropical Diseases, 20 (68): 67-73.

[21] Rahimi F, Arebestani MR. 2016, Biofilm production among Staphylococcus epidermidis strains isolated from healthy people. Biological Journal of Microorganism, 5 (18): 107-116.

[22] Bjarnsholt T, Jensen PØ, Rasmussen TB, Christophersen L, Calum H, Hentzer M, Høiby N. 2005, Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa*

infections. Microbiology, 151 (12): 3873-3880.

[23] Satorres SE, Alcaráz LE. 2007, Prevalence of *icaA* and *icaD* genes of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. Central European Journal of Public Health, 15 (2):87-90.

[24] Atshan SS, Shamsudin MN, Karunanidhi A, van Belkum A, Lung LTT, Sekawi Z, Abduljaleel SA. 2013, Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Infection, Genetics and Evolution, 18: 106-112.

[25] Shahkarami F, Rashki S. 2016, *Prevalence of ica operon related genes in* Staphylococcus aureus *and* Staphylococcus epidermidis *clinical isolates. Iranian Journal of Medical Microbiology*, 9 (4): 16-23.

Comparison of the effect of garlic extract and gentamicin on *icaA* biofilm gene expression in *Staphylococcus aureus*

Karami F. [1], Habibollahi H. [2] and Safari Motlagh M. R. [3]*

[1] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University. Rasht, Iran.
[2] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University. Rasht, Iran.
[3] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University. Rasht, Iran.

* (Corresponding author): ssafarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir

Received: March 2021 Accepted: December.2021

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the most common bacterial pathogens. Gentamicin is one of the antibiotics that is effective in treating staphylococcal infections, but unfortunately due to biofilms, the effect of this antibiotic is sometimes confronted with the problem. In this study, the effect of garlic extract and its comparison with gentamicin antibiotic on three strains of *S. aureus* bacteria was evaluated based on antibiogram method and MIC test, the results of which confirm the anti-staphylococcal effect of garlic extract and its synergistic effect with gentamicin antibiotic. Based on phenotypic test, the effect of garlic extract and gentamicin alone and together on reducing the production of biofilm in this bacterium was evaluated and proven. The presence of *icaA* gene in the studied strains was confirmed by PCR and using Real time PCR technique, the expression of *icaA* gene under the treatment of garlic extract, gentamicin and the combined treatment of garlic and gentamicin compared to the untreated samples was studied. For the standard strain, gentamicin and garlic extract reduced *icaA* gene expression by 59% and 64%, respectively, and combined use of these two substances reduced the expression of this gene by about 25% compared to the control sample. In other words, it led to a 75% reduction in the expression of this gene. In the case of pathogenic strains, these treatments also showed a significant effect on reducing *icaA* expression, so that the simultaneous use of garlic extract and gentamicin could reduce the expression of this gene to 11% of the untreated sample. In other words, it leads to an 89% reduction in *icaA* expression. The results of all these tests showed the favorable effect of garlic extract against *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, garlic extract, gentamicin, biofilm, *icaA* gene.