فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۹ ص. ۲۸-۱۷

مقاله پژوهشی

تعیین سطح بیان ژن *icaD* در *Staphylococcus aureus* تحت تیمار با عصاره سیر و ریفامپین

سیده الهام حسینی سالکده[۱]، هادی حبیب الهی[۱]، محمد رضا صفری مطلق[۳*]

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

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

*Email: ssafarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۹

چکیده

Staphylococcus aureus به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای مهم در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند با تشکیل بیوفیلم، عفونت‌های مزمن ایجاد کرده و از سیستم دفاعی میزبان در امان باشد و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دهد. ژن‌های به رمز درآورنده متعلق به اپرون ica از جمله *icaD* از مهم‌ترین مواد و پروتئین‌های بیوفیلم، به‌ویژه در ماده چسبنده پلی‌ساکاریدی محسوب می‌شوند. سیر دارای خواص درمانی ضد میکروبی زیادی است که این خاصیت به عنصر کلیدی آن یعنی آلیسین مربوط می‌شود. ریفامپین نیز یکی از قوی‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر عوامل بیماری‌زای باکتریایی است که در سطح مولکولی، با متوقف ساختن سنتز RNA، بر متابولیسم باکتری‌ها تأثیرگذار است. هدف از این تحقیق، بررسی خواص ضدمیکروبی و مقایسه اثر عصاره سیر و ریفامپین بر روی بیان ژن بیوفیلم icaD بود. دو سویه بیمارگر و یک سویه استاندارد از *S. aureus*، انتخاب و تأیید گردید. در این تحقیق از تست‌های آنتی‌بیوگرام، پایین‌ترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و پایین‌ترین غلظت باکتری‌کشی (MBC) با غلظت‌های مشخصی از آنتی‌بیوتیک ریفامپین و عصاره سیر (قرص گارسین) استفاده گردید. آزمون فنوتیپی بیوفیلم نیز با میکروپلیت ۹۶ چاهکی و با غلظت‌های مختلف ریفامپین و گارسین انجام شد. به دنبال استخراج RNA از نمونه‌های متأثر از ریفامپین و گارسین و نیز شاهد، سنتز cDNA و سپس Real time PCR صورت گرفت و سطح بیان ژن icaD در نمونه‌های مورد مطالعه سنجیده شد. MIC و MBC تحت تیمار ریفامپین و ترکیب گارسین و ریفامپین برای همه سویه‌ها به ترتیب ۳۷۵ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. بر اساس نتایج Real time PCR، بیان ژن icaD تحت تاثیر عصاره سیر و ریفامپین واقع شده و در سویه‌های مورد مطالعه دچار کاهش معنی‌داری گردید و علاوه بر این، ترکیب ریفامپین و عصاره سیر، منجر به کاهش بیشتری در بیان این ژن شد. براین اساس استفاده از هر یک از دو عصاره سیر و ریفامپین در سویه استاندارد، به ترتیب به میزان ۳۸ و ۵۶ درصد و استفاده توأم از این دو ماده به میزان ۶۷ درصد، بیان ژن icaD را کاهش داد.

کلیدواژه‌ها: بیوفیلم، ریفامپین، ژن *icaD*، عصاره سیر، *Staphylococcus aureus*.

مقدمه

استافیلوکوک‌ها باکتری‌های گرم مثبت با قطر ۰/۵ μm تا ۱/۵ و به شکل خوشه انگور هستند. تا به امروز، ۳۲ گونه و هشت زیرگونه در جنس استافیلوکوک شناسایی شده‌اند. اکثر گونه‌ها دارای تغذیه‌ای پیچیده بوده اما به طور کلی نیازمند منبع آلی نیتروژن هستند که از پنج تا ۱۲ اسید آمینه ضروری از جمله آرژنین، والین و ویتامین‌های گروه B (تیامین و نیکوتین آمید) تأمین می‌شود. *Staphylococcus aureus* بیمارگری فرصت‌طلب و عامل اصلی عفونت‌های متعدد بیمارستانی و اجتماعی [۱۲] و یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی است که باعث ایجاد ضایعات پوستی و آبسه‌های موضعی در نواحی مختلف بدن و همچنین باعث عفونت‌های عمیق مانند استئومیلیت و اندوکاردیت می‌گردد [۱۳]. *S. aureus* معمولا با عفونت‌های جسمی ناشی از کاتتر ارتباط دارد و اگر توسط پاسخ ایمنی ذاتی میزبان حذف نشود به پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی رسیده و تشکیل بیوفیلم می‌دهد [۲۱]. شواهد نشان می‌دهد که توانایی تشکیل بیوفیلم به بیماری‌زایی این باکتری کمک می‌کند [۱۵]. این باکتری قادر است بیوفیلم چند لایه با پروتئین‌های ناهمگن تولید کند و با توجه به میزان مرگ و میر سالانه ناشی از آن، یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای باکتریایی محسوب می‌شود [۲]. بیوفیلم، یک جامعه سلولی متصل به سطوح است که در یک ماتریکس خارج سلولی قرار گرفته است. در یک عفونت باکتریایی، سلول‌های بسته‌بندی شده با بیوفیلم از درمان آنتی‌بیوتیک و پاسخ ایمنی میزبان محافظت می‌شوند و این سلول‌های بسته‌بندی شده می‌توانند به یک عفونت مزمن تبدیل شوند [۶]. توانایی تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در بیماری‌زایی دارد. باکتری‌های تولید کننده بیوفیلم به آنتی بیوتیک‌ها مقاوم هستند [۵]. پس از تشکیل بیوفیلم، سلول‌های میکروبی از سیستم دفاعی میزبان در امان خواهند بود و نسبت به فعالیت آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت کسب می‌کنند که این موضوع به نوبه خود نشان‌دهنده این است که بیوفیلم یک استراتژی مهم برای پایدار ماندن این میکروارگانیسم‌ها است. ژن‌های به‌رمز درآورنده مهم‌ترین مواد و پروتئین‌های بیوفیلم، به‌ویژه ماده چسبنده پلی‌ساکاریدی، متعلق به اپرون ica است. این اپرون حاوی ژن‌های *icaADBC* و ژن تنظیمی *icaR* است که در جهت مخالف اپرون *icaA* رونویسی می‌شود. بیان هم‌زمان *icaA* و *icaD* به افزایش قابل‌توجه فعالیت N- استیل گلوکوزآمین ترانسفراز منجرمی‌گردد [۱۹]. حالت بیوفیلم *S. aureus* به شدت توسط عوامل ژنتیکی پیچیده تنظیم می‌شود. به‌منظور درک مبنای مولکولی و مکانیسم‌های ایجاد بیماری در عفونت‌های استافیلوکوکی مزمن، شناسایی ژن‌های درگیر در تشکیل بیوفیلم ضروری است و درک بهتر مکانیسم مولکولی بیوفیلم می‌تواند کشف گزینه‌های نوآورانه درمان را تسهیل کند [۸].

سیر مانند تمام سبزیجات از جنس *Allium* حاوی طیف وسیعی از تیوسولفینات مانند آلیسین است که عاملی ضد باکتری است [۱۷]. آلیسین، يكي از تركيبات فعال هموژنيک سير خرد شده تازه، داراي انواع فعاليت‌هاي ضد ميكروبي مي‌باشد. فعالیت ضد باکتریایی آلیسین در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت نشان داده شده است [۱۶]. اثر ضد میکروبی اصلی آلیسین به علت واکنش شیمیایی آن با گروه‌های تیول آنزیم‌های مختلف نظیر آلدهید دهیدروژناز، تیورودوکسین ردوکتاز و RNA پلیمراز است که می‌تواند بر روی متابولیسم‌های اساسی میکروارگانیسم‌ها تأثیر بگذارد [۱].

ریفامپین (Rifampin) یا ریفامپیسین (Rifampicin) آنتی‌بیوتیکی است که توانایی کشتن باکتری‌های مسهل متابولیکی را دارد و برای عفونت‌های عضلانی اسکلتی بسیار مفید است. ریفامپیسین یکی از قوی‌ترین و گسترده‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر عوامل بیماری‌زای باکتریایی است و عاملی کلیدی در درمان‌های ضد سل است. ریفامپین آنتی‌بیوتیک لیپوفیلیکی است که در سطح مولکولی، با متوقف ساختن سنتز RNA، بر متابولیسم باکتری‌ها تأثیرگذار است. این اثر ناشی از اتصال دارو به یک سایت پیوند بسیار اختصاصی در RNA پلیمراز وابسته به DNA است [۱۴]. ریفامپین به طور گسترده‌ای برای درمان بیماری سل استفاده می‌شود و همچنین به عنوان یک عامل شیمی درمانی برای بیماران مبتلا به بیماری مننگوکوک و مننژیت هموفیلوس آنفولانزا مورد استفاده قرار می‌گیرد [۷].

مشخص گردید که سیر دارای غلظت بالایی از ترکیبات گوگرددار نسبت به گونه‌های دیگر *Allium* است که مسئول بوی تند سیر و بسیاری از اثرات دارویی آن است [۱۱]. Gattringer و همکاران [۱۰] اثرات ریفامپین روی بیوفیلم‌های *Staphylococcus epidermidis* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ایمپلنت قلب و باکتری‌های مرتبط با کاتتر را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که ریفامپیین در غلظت ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بلافاصله بیوفیلم‌های تشکیل شده توسط *S. epidermidis* را کاهش می‌دهد. Perlroth و همکاران [۲۰] استفاده کمکی از ریفامپین برای درمان عفونت‌های *S. aureus* را مورد بررسی قرار دادند. این محققان دریافتند که با استفاده از روش‌های *in vitro*، می‌توان ریفامپین را با بسیاری از گروه‌های آنتی‌بیوتیکی ترکیب کرد. Fani و همکاران [۹] در مطالعات خود با عنوان فعالیت مهاری عصاره سیر (*Allium sativum*) بر روی *Streptococcus mutans* مقاوم به چند دارو دریافتند که دهان‌شویه یا خمیردندان حاوی غلظت بهینه عصاره سیر اثر مهاری بر رشد باکتری‌های مقاوم به دارو داشته و می‌تواند برای جلوگیری از پوسیدگی دندان موثر باشد. در مطالعه‌ای دیگری محققان به اثرات سیر بر روی گونه‌های باکتریایی دهانی به ویژه بیمارگرهای پریودنتال و آنزیم‌های تولید شده توسط این باکتری‌ها پرداختند [۴]. این تحقیق نشان داد که عصاره سیر باعث مهار رشد بیمارگرهای خوراکی و پروتئازهای خاص می‌شود و بنابراین سیر می‌تواند ارزش درمانی برای پریودنتیت داشته باشد.

هدف از این پژوهش بررسی اثر عصاره سیر همراه با آنتی‌بیوتیک ریفامپین بر 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 ریفامپین تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو سویه بیمارگر (پاتوژن) از بیماران بستری در بیمارستان‌های رشت و نیز یک سویه استاندارد *S. aureus* با شناسه ATCC 25923 استفاده گردید. سپس اقدام به آماده‌سازی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار، مولر هینتون براث و تیمارها شد. به منظور تهیه محیطی حاوی $1/5\times10^{8}$ باکتری، محیط استاندارد نیم مک فارلند که کدورتی معادل این میزان باکتری دارد آماده شد. در این پژوهش از کپسول‌های ۳۰۰ میلی‌گرمی ریفامپین استفاده شد به طوری‌که دو عدد کپسول در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل و استوک اول ریفامپین با غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر میلی-لیترتهیه گردید. در مرحله بعد از استوک اول رقت ۱ به ۱۰ تهیه و استوک دوم ریفامپین با غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۶۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) آماده شد. همچنین قرص ۳۰۰ میلی‌گرمی گارسین (شرکت گل دارو) مورد استفاده قرار گرفت. هر یک از این قرص‌ها حاوی ماده موثره آلیسین به میزان ۰/۸ تا ۱/٦ میلی‌گرم بود. با خرد کردن دو قرص گارسین و حل کردن آن‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، استوک اول گارسین با غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. با رقیق‌سازی استوک اول به نسبت ۱ به ۱۰، استوک دوم گارسین با غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آماده گردید. در مرحله‌ی بعد تست آنتی‌بیوگرام مانند تعیین حساسیت ضد میکروبی با دیسک بلانک و بررسی اثر ضد میکروبی با ایجاد چاهک انجام شد.

برای انجام آزمون پایین‌ترین غلظت مهارکنندگی (MIC: Minimum Inhibitory Concentration)، کشت تازه‌ی ۱۸ تا ۲٤ ساعته از هر سه سویه مورد مطالعه با محیط مولرهینتون آگار آماده شد. سپس بخشی از کلنی‌های رشد یافته، به محیط کشت مولرهینتون براث منتقل و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. از سوسپانسیون میکروبی حاصل، کدورتی معادل کدورت نیم مک فارلند آماده شد. سپس سوسپانسیون‌ها تحت تیمار ریفامپین و گارسین واقع شدند. این آزمون با استوک آنتی‌بیوتیک ریفامپین وگارسین (با غلظت ۶۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) شروع گردید. برای هر یک از سه سویه مورد مطالعه به طور جداگانه، سه سری لوله آزمایش ۱۲ تایی در نظر گرفته شد و در همه آن‌ها ۲ میلی‌لیتر محیط مولرهینتون براث افزوده و اتوکلاو گردید. در هر سه لوله شماره ۱، به ترتیب غلظت ۶۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ریفامپین، گارسین و ترکیب هر دو تهیه گردید. پس از این مرحله،

رقیق‌سازی سریالی صورت گرفت. لوله‌های شماره ۱۱ و ۱۲ به ترتیب برای کنترل منفی و کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. کنترل منفی، فاقد باکتری و کنترل مثبت، فاقد آنتی‌بیوتیک بود. از سوسپانسیون باکتری مورد نظر با کدورت معادل نیم‌مک‌فارلند به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به همه لوله‌ها به‌جز کنترل منفی افزوده شد. تمام لوله‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک، گارسین و ترکیب هر دو که مانع رشد باکتری شده بود به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای انجام آزمون پایین‌ترین غلظت باکتری‌کشی (MBC: Minimum Bactericidal Concentration)، از لوله‌های MIC فاقد رشد باکتری و اولین لوله دارای کدورت برای این آزمون استفاده شد و ۱۰۰ میکرولیتر از لوله‌های مورد نظر MIC به‌صورت چمنی در پلیت مولرهینتون آگار با ته لوله آزمایش استریل کشت داده و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک، گارسین و ترکیبی از آن دو که در آن باکتری رشد نکرده نبود به‌عنوان MBC تعیین شد.

برای ارزیابی فنوتیپی تولید بیوفیلم در سویه‌های مورد مطالعه، کشت تازه ۲٤ ساعته از هر سه سویه مورد نظر در محیط مولر هینتون براث تهیه شد و کدورت سوسپانسیون‌ها بر اساس نیم مک فارلند معادل‌سازی و سپس رقیق‌سازی سوسپانسیون‌ها به‌نسبت ۱ به ۲۰ انجام گردید. میکروپلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۸ ساعت قرار داده شدند. به منظور رنگ‌آمیزی بیوفیلم تشکیل شده در هر چاهک، به میزان ۱۲۵ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۰/۲ درصد به هر چاهک افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه، تخلیه رنگ اضافی کریستال ویوله صورت گرفت. اسیداستیک ۳۰ درصد به‌میزان ۲۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد تا آزادسازی رنگ موجود در دیواره باکتری‌هایی که مولد بیوفیلم بوده‌اند صورت گیرد. پس از حل شدن رنگ کریستال ویوله در اسید، میزان جذب رنگ آزاد شده در هر چاهک با به کارگیری دستگاه Elisa Reader و در طول موج نوری ۵۷۰ نانومتر ارزیابی گردید.

بر اساس نتایج حاصل از MIC و MBC، غلظت ۱۸۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ریفامپین و گارسین به‌منظور مطالعات مولکولی انتخاب شد. برای هر سویه، ۳ میلی‌لیتر محیط کشت مولرهینتون براث در چهار لوله ریخته شد و به سه لوله به ترتیب ریفامپین، گارسین و مخلوطی از ریفامپین و گارسین افزوده گردید و یک لوله نیز بدون تیمار و به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. به لوله‌های مورد نظر، سویه‌ها افزوده گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱٦ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. باکتری‌های رشد یافته پس از ته‌نشین-سازی با رعایت اصول پیشگیری از آلودگی و در شرایط سرمایی، به‌منظور استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند. مشخصات و توالی آغازگرهای مربوط به ژن *icaD* و همچنین ژن مرجع *16s rRNA* در شرکت سیناکلون ایران سنتز شد [۳] که مشخصات آنها در جدول ۱ ذکر شده است.

پس از آماده‌سازی و رقیق‌سازی آغازگرها، Real Time PCR انجام گرفت. در میکروتیوب‌های ریل تایم، ۱۰ میکرولیتر SYBR Green Premix ریخته شد. پس از افزودن آغازگرها و cDNA، محلول ROX Reference نیز اضافه گردید و با استفاده از آب فاقد نوکلئاز، حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. ژن 16s rRNA به‌عنوان ژن رفرنس مورد استفاده قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش $\Delta\Delta CT$ استفاده شد. مقایسه هر یک از سویه‌ها به‌طور جداگانه و میان نمونه‌های کنترل و نمونه‌های تحت تیمار ریفامپین، گارسین و تیمار توأم گارسین و ریفامپین صورت گرفت و بر این اساس نمودارها ترسیم شدند.

نتایج

هر سه نمونه مورد مطالعه با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و میکروبی نظیر رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست کواگولاز، تست اکسیداز و تخمیر قند مانیتول مورد آزمون قرار گرفته و جنس و گونه آنها یعنی *Staphylococcus aureus* تأیید گردید. آزمون آنتی‌بیوگرامی با استفاده از استوک‌های گارسین و ریفامپین انجام شد. از آن جایی که هر بلانک دیسک حدود ۳۰ میکرولیتر ظرفیت جذب یک محلول را دارد، بنابراین بلانک دیسک آغشته شده به استوک شماره ۱ ریفامپین یا گارسین، ۱/۸ میلی‌گرم جذب می‌کند و

هر بلانک دیسک در استوک شماره ۲ نیز به میزان ۰/۱۸ میلی‌گرم از گارسین یا ریفامپین را جذب خواهد کرد. بلانک دیسک‌های حاوی غلظت‌های ۱/۸ و ۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر از آنتی‌بیوتیک ریفامپین و گارسین در پلیت‌های مربوط به سویه استاندارد و دو سویه بیمارگر به کار گرفته شد و قطر هاله عدم رشد این سویه‌ها اندازه‌گیری شد (شکل ۱، جدول ۲).

پایین‌ترین غلظت گارسین و ریفامپین که مانع از تکثیر سویه‌ها شوند با انجام آزمون MIC تعیین شد. در مورد سویه استاندارد *S. aureus*، MIC ریفامپین ۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MIC ترکیب گارسین و ریفامپین، ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید ولی گارسین در غلظت‌های مورد آزمون، اثر مهاری نشان نداد. در مورد سویه شماره ۲۴ و همچنین سویه شماره ٦ نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد به‌طوری که MIC مربوط به ریفامپین میکروگرم بر میلی‌لیتر و MIC مربوط به ترکیب ریفامپین و گارسین، ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد و گارسین به تنهایی نتوانست در غلظت‌های مورد آزمون، اثر مهاری نشان دهد.

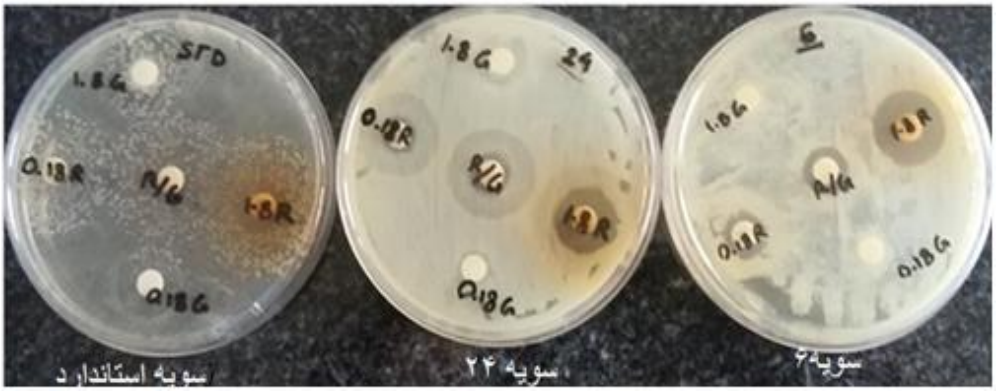
پایین‌ترین غلظت گارسین و ریفامپین که منجر به مرگ باکتری‌ها شوند، بر اساس تست MBC تعیین گردید. در مورد همه سویه‌های مورد مطالعه، MBC مربوط به ریفامپین و ترکیب ریفامپین و گارسین به‌ترتیب برابر ۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و گارسین نیز در هیچ یک از غلظت‌های مورد نظر، اثر کشندگی نشان نداد (شکل ۲ و ۳).

با استفاده از میکروپلیت ۹٦ چاهکی و طبق غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک ریفامپین و گارسین، مقدار بیوفیلم تولید شده توسط سویه‌های بیمارگر و استاندارد *S. aureus* ارزیابی و با نمونه‌های بدون تیمار (شاهد) مقایسه شد (شکل ۴، جدول ۳).

بر اساس آزمون MBC، به طور یکسان غلظت ۱۸۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ریفامپین، گارسین و ترکیب هر دو ماده در نظر گرفته شد و از تمام سویه‌های مورد مطالعه، تحت تیمار این مواد، کشت تازه تهیه شد. یک کشت نیز بدون تیمار (کنترل) آماده گردید. در شرایط استریل و طبق اصول برودتی، با استفاده از کیت شرکت سیناکلون، RNA کل (Total RNA) استخراج و کیفیت آن با الکتروفورز و بر روی ژل آگارز بررسی شد (شکل ۵).

جدول ۱- مشخصات و توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های *icaD* و *16s rRNA*

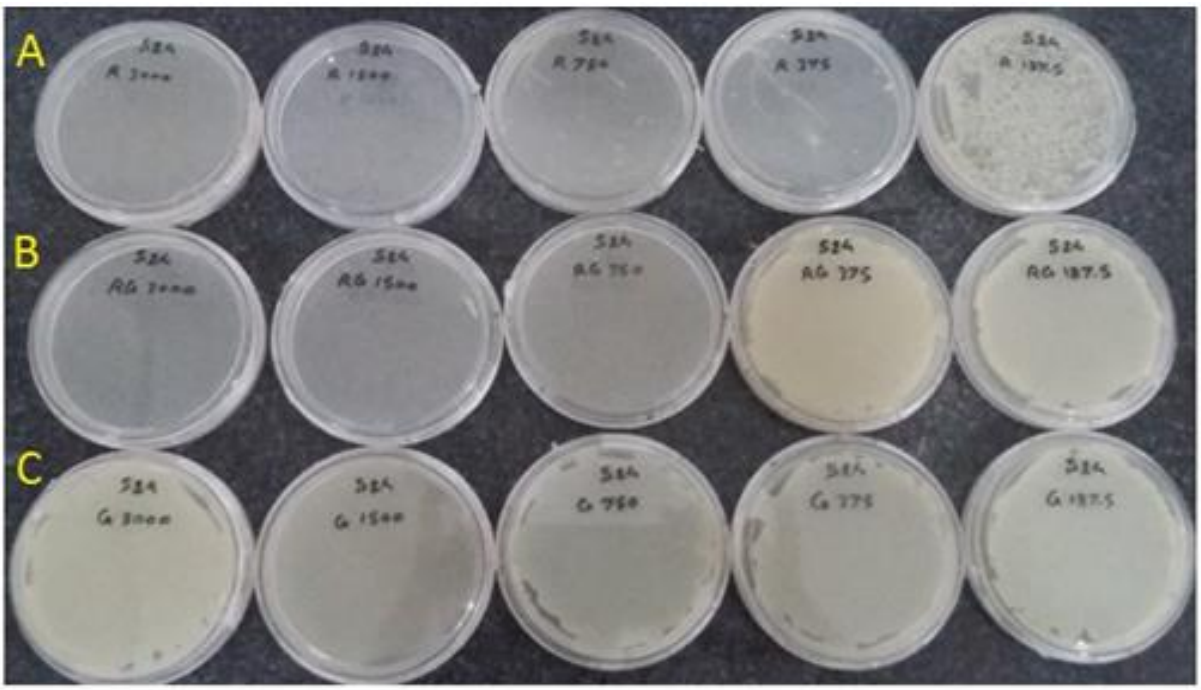
Genes	Nucleotide sequence of primers	Accession numbers	Annealing temperature	Amplicon size (bp)
icaD-F	5-ACCCAACGCTAAAATCATCG-3	AF086783	60	211
icaD-R	5-GCGAAAATGCCCATAGTTTC-3	AF086783	60	211
16S rRNA-F	GGGACCCGCACAAGCGGTGG	L37597.1	60	191
16S rRNA-R	GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA	L37597.1	60	191



شکل ۱- نتایج بلانک دیسکی آنتی‌بیوگرام ریفامپین و گارسین در ایجاد هاله عدم رشد سویه‌های بیمارگر و استاندارد

جدول ۲- اندازه هاله عدم رشد نمونه‌های مورد مطالعه به روش بلانک دیسک با تیمارهای ریفامپین و گارسین

سویه باکتری	غلظت و نوع تیمار (mg/μl)	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
استاندارد	۱/۸ گارسین	۲۱
	۰/۱۸ گارسین	۱۵
	۱/۸ ریفامپین	۱۲
	۰/۱۸ ریفامپین	۰
	۰/۱۸ گارسین+ریفامپین	۰
بیمارگر شماره ٦	۱/۸ گارسین	۰
	۰/۱۸ گارسین	۰
	۱/۸ ریفامپین	۱۸
	۰/۱۸ ریفامپین	۱۰
	۰/۱۸ گارسین+ریفامپین	۱۱
بیمارگر شماره ۲٤	۱/۸ گارسین	۱۲
	۰/۱۸ گارسین	۸
	۱/۸ ریفامپین	۲۰
	۰/۱۸ ریفامپین	۱۵
	۰/۱۸ گارسین+ریفامپین	۲۲

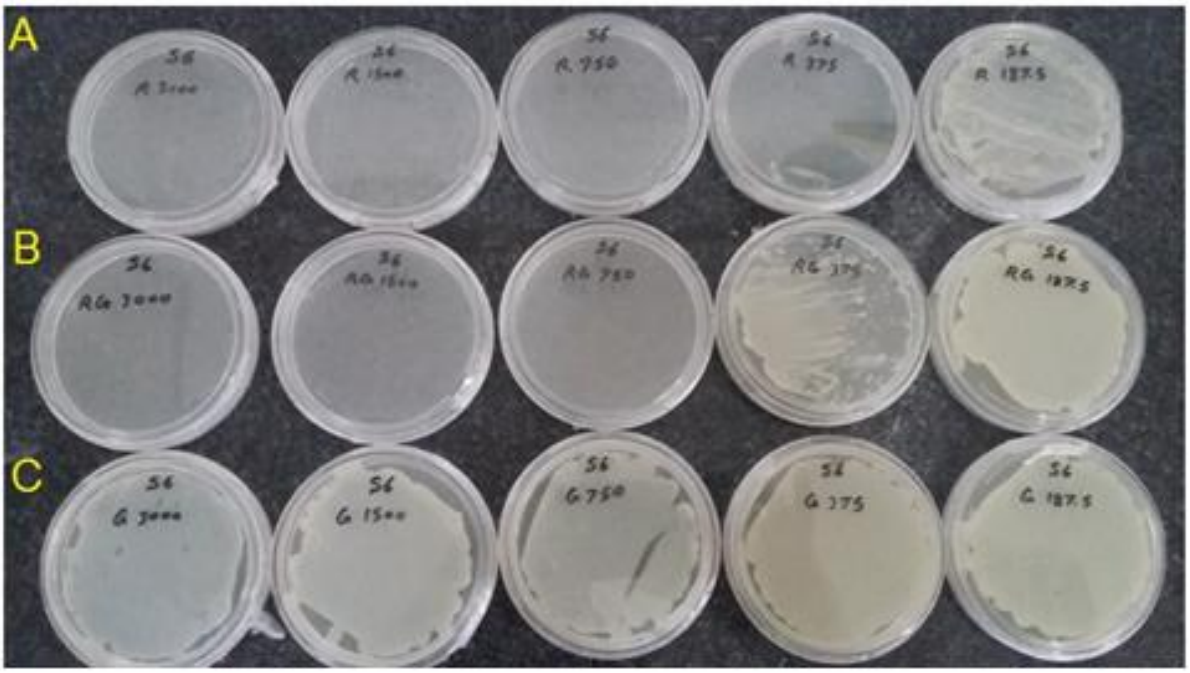


شکل ۲- نتایج آزمون MBC مرتبط با سویه بیمارگر شماره ۲۴

A) تحت تأثیر ریفامپین(۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

B) تحت تأثیر ریفامپین و گارسین (۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

C) تحت تأثیر گارسین (فاقد اثر کشندگی در غلظت‌های مورد آزمون)

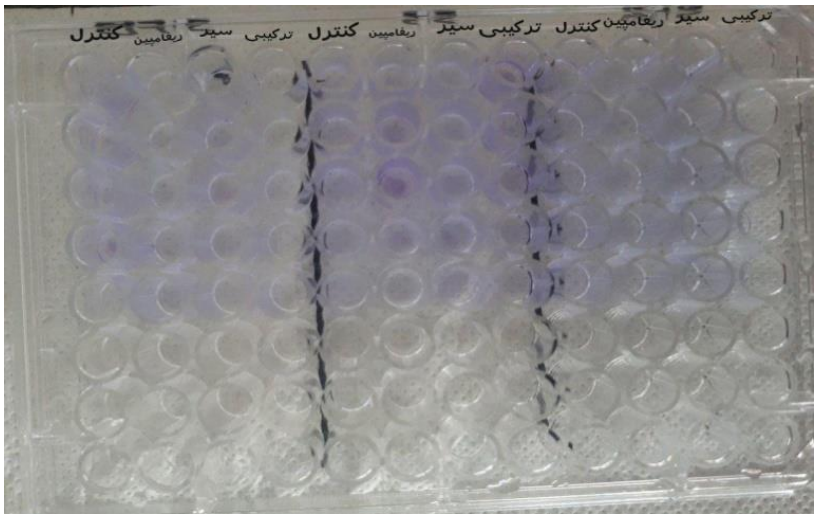


شکل ۳- نتایج آزمون MBC مرتبط با سویه بیمارگر شماره ۶

A) تحت تأثیر ریفامپین (۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

B) تحت تأثیر ریفامپین و گارسین (۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

C) تحت تأثیر گارسین (فاقد اثر کشندگی در غلظت‌های مورد آزمون)



شکل ۴- نتایج آزمون بیوفیلم تحت تأثیر تیمارهای گارسین و ریفامپین در سویه‌های بیمارگر و استاندارد

RNA استخراج شده از نمونه‌های متأثر از ریفامپین و گارسین و نیز نمونه‌های کنترل، با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز و طبق شرایط برودتی و جلوگیری از آلودگی، برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت و حاصل این استخراج، مورد استفاده Real time PCR قرار گرفت.

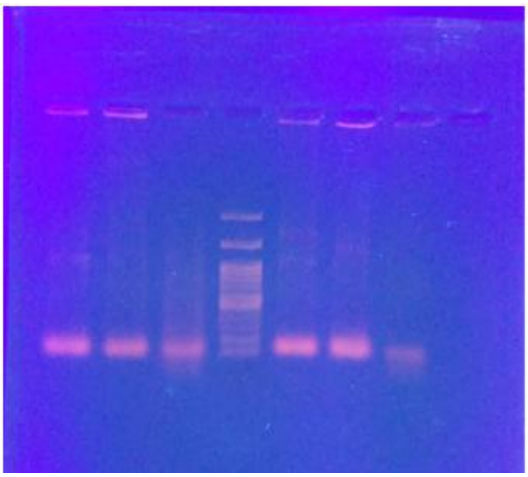
مقایسه میزان بیان ژن *icaD* بین نمونه‌های کنترل و متأثر از ریفامپین و گارسین در سویه استاندارد و دو سویه بیمارگر شماره ۶ و ۲۴ به‌ترتیب در شکل‌های ۶، ۷ و ۸ نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

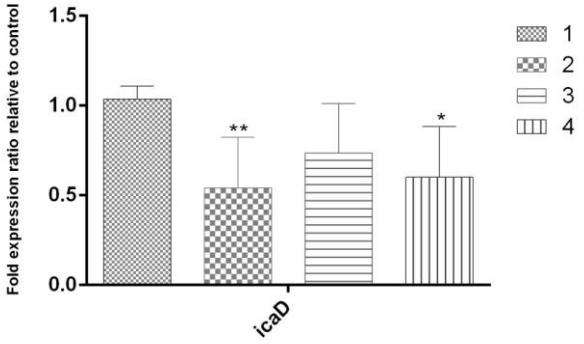
شیوه درمانی مرسوم برای مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها است. آنتی‌بیوتیک‌های بسیار زیادی کشف یا طراحی و تولید شده‌اند که در برهه‌ای از زمان مؤثر واقع شده و سلامتی را برای انسان به ارمغان می‌آوردند ولی این تأثیر دائمی نبوده و متأسفانه با ایجاد مقاومت‌های دارویی در باکتری‌ها، مشکلات و بیماری‌های گذشته از سر گرفته شدند. با توجه به سرعت گرفتن روند ایجاد مقاومت‌های دارویی در باکتری‌هایی نظیر *S. aureus*، روی آوردن به داروهای گیاهی که پیشینیان به صورت تجربی در درمان‌های میکروبی استفاده می‌نمودند ذهن بشر امروزی را البته به شکل علمی به خود معطوف کرده است. پژوهش حاضر نیز بر همین اساس شکل گرفته و سعی بر آن بوده که تأثیر ضد میکروبی عصاره سیر و مقایسه آن با تأثیر آنتی‌بیوتیک ریفامپین مورد سنجش قرار گیرد. این مطالعه هم در سطح فنوتیپی و هم در سطح مولکولی صورت گرفت.

جدول ۳- مقدار جذب بیوفیلم حاصل از سویه‌های بیمارگر و استاندارد تحت تأثیر ریفامپین و گارسین (OD= 570 nm)

سویه استاندارد	3000 µg/ml	1500 µg/ml	750 µg/ml	375 µg/ml	187.5 µg/ml
کنترل (بدون تیمار)	۰/۰۸۷	۰/۰۷۷	۰/۰۷۷	۰/۰۸۵	۰/۰۶۱
تیمارشده با ریفامپین	۰/۰۵۱	۰/۰۵۰	۰/۰۵۴	۰/۰۵۶	۰/۰۶۴
تیمارشده با گارسین	۰/۰۹۱	۰/۰۷۴	۰/۰۷۹	۰/۰۷۱	۰/۰۶۶
تیمارتوأم	۰/۰۵۰	۰/۰۵۳	۰/۰۵۳	۰/۰۶۰	۰/۰۶۳
سویه شماره ۶	**3000 µg/ml**	**1500 µg/ml**	**750 µg/ml**	**375 µg/ml**	**187.5 µg/ml**
کنترل (بدون تیمار)	۰/۰۷۱	۰/۰۶۷	۰/۰۶۹	۰/۰۶۸	۰/۰۶۹
تیمارشده با ریفامپین	۰/۰۸۴	۰/۰۸۵	۰/۱۰۶	۰/۰۷۱	۰/۰۵۹
تیمارشده با گارسین	۰/۰۸۴	۰/۰۸۱	۰/۰۷۹	۰/۰۷۷	۰/۰۷۴
تیمارتوأم	۰/۱۰۷	۰/۰۸۰	۰/۰۸۷	۰/۰۷۱	۰/۰۶۹
سویه شماره ۲۴	**3000 µg/ml**	**1500 µg/ml**	**750 µg/ml**	**375 µg/ml**	**187.5 µg/ml**
کنترل (بدون تیمار)	۰/۰۷۳	۰/۰۷۵	۰/۰۶۹	۰/۰۷۰	۰/۰۷۲
تیمارشده با ریفامپین	۰/۰۶۹	۰/۰۵۶	۰/۰۶۱	۰/۰۶۰	۰/۰۵۸
تیمارشده با گارسین	۰/۰۷۹	۰/۰۷۴	۰/۰۷۶	۰/۰۷۰	۰/۰۷۲
تیمارتوأم	۰/۰۶۱	۰/۰۶۰	۰/۰۶۱	۰/۰۵۷	۰/۰۵۹

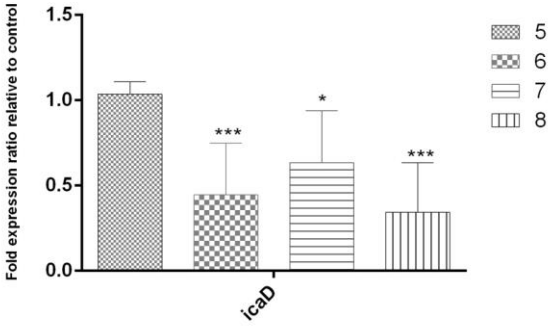


شکل ۵- چند نمونه از باندهای استخراجی RNA از سویه‌های بیمارگر و استاندارد (100 bp ladder)



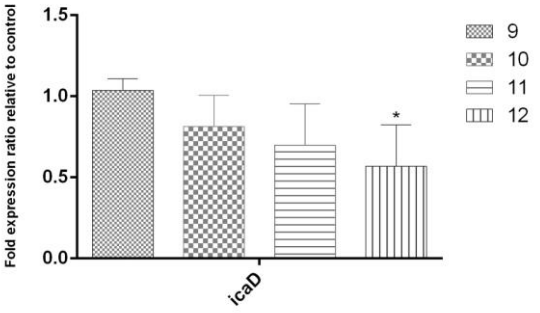
	1	2	3	4
icaD	1.01±0.43	0.54±1.3 >0.01	0.74±1.12	0.6±1.4 >0.05

شکل ۶- مقایسه بیان ژن *icaD* در نمونه کنترل (شماره ۱)، متأثر از ریفامپین (شماره ۲)، متأثر از گارسین (شماره ۳) و متأثر از ترکیب گارسین و ریفامپین (شماره ۴) سویه استاندارد *S. aureus*



	5	6	7	8
icaD	1.02±0.65	0.44±1.2 >0.001	0.62±1.5 >0.05	0.33±1.4 >0.001

شکل ۷- مقایسه بیان ژن *icaD* در نمونه کنترل (شماره ۵)، متأثر از ریفامپین (شماره ۶)، متأثر از گارسین (شماره ۷) و متأثر از ترکیب گارسین و ریفامپین (شماره ۸) سویه بیمارگر شماره ۶ *S. aureus*



	9	10	11	12
icaD	1.05±0.43	0.82±0.78	0.69±0.93	0.54±0.89 >0.05

شکل ۸- مقایسه بیان ژن *icaD* در نمونه کنترل (شماره ۹)، متأثر از ریفامپین (شماره ۱۰)، متأثر از گارسین (شماره ۱۱) و متأثر از ترکیب گارسین و ریفامپین (شماره ۱۲) سویه بیمارگر شماره ۲۴ *S. aureus*

تأثیر فنوتیپی عصاره سیر بر روی باکتری‌های مختلف توسط محققان زیادی مورد مطالعه قرارگرفته است. از جمله این که Bakri و Dorglas [۴] و نیز Fani و همکاران [۹] به اثرات ضد میکروبی استافیلوکوکی و استرپتوکوکی سیر اذعان داشتند. اثر ریفامپین بر روی استافیلوکوک نیز توسط Gattringer و همکاران [۱۰] گزارش شده است. در پژوهش حاضر، اثر ضد استافیلوکوکی عصاره سیر در قالب قرص گارسین و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک ریفامپین صورت گرفت. بر اساس نتایج حاصل از سویه استاندارد، غلظت‌های ۱/۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر و ۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر گارسین (عصاره سیر) به ترتیب هاله عدم رشدی به قطر ۲۱ و ۱۵ میلی‌متر ایجاد نمود در صورتی که هاله عدم رشد حاصل از ریفامپین کمتر بود و در غلظت ۱/۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر به ۱۲ میلی‌متر رسید و در مورد غلظت کمتر ریفامپین، هاله‌ای تشکیل نشد. اما سویه بیمارگر شماره ۶ نسبت به هر دو غلظت مورد مطالعه گارسین، حساسیتی نشان نداد در حالی که در برابر ریفامپین حساس بوده و در غلظت ۱/۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر ریفامپین، هاله‌ای به قطر ۱۸ میلی‌متر ایجاد نمود. سویه بیمارگر شماره ۲۴ هم به ریفامپین و هم به گارسین حساس بود. در غلظت ۱/۸ میلی-گرم بر میکرولیتر ریفامپین و گارسین به ترتیب هاله‌ای به قطر ۲۰ و ۱۲ میلی‌متر تشکیل شد و در غلظت ۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر ریفامپین و گارسین به ترتیب قطر هاله عدم رشد ۱۵ و ۸ میلی‌متر بود. نکته چشمگیر در مورد این سویه، اثر هم افزایی ریفامپین و گارسین بود به طوری که قطر هاله عدم رشد این سویه در این حالت و در غلظت ۰/۱۸ میلی‌گرم بر میکرولیتر افزایش یافت و به ۲۲ میلی‌متر رسید. نتایج این آزمون بیانگر این است که این سه سویه احتمالا از لحاظ ژنتیکی متفاوت از یکدیگر هستند به طوری که حساسیت این سه سویه نسبت به عصاره سیر و ریفامپین با یکدیگر تفاوت نسبتا زیادی دارد. نتایج این تحقیق موید یافته‌های محققان ذکرشده بود.

از نتایج آزمون‌های MIC وMBC چنین استنباط می‌شود که سه سویه مورد مطالعه، تفاوتی ندارند. سویه استاندارد و دو سویه بیمارگر تحت تیمار ریفامپین با غلظت ۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر توان رشد نداشتند ولی عصاره سیر تأثیر مهاری در این غلظت‌ها نشان نداد. تیمار توأم ریفامپین و عصاره سیر نیز در غلظت ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر مهاری نشان دادند. البته MIC از غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گارسین و ریفامپین شروع شد و با توجه به نتایج آنتی‌بیوگرام که از غلظت‌های ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گارسین استفاده شده بود چنانچه از غلظت‌های بالاتر گارسین در MIC استفاده می‌شد احتمالا اثر مهاری و کشندگی عصاره سیر مشخص می‌گردید.

اثر آنتی‌بیوتیک ریفامپین بر میزان تولید بیوفیلم توسط Gattringer و همکاران [۱۰] بررسی شد و طبق گزارش این پژوهش، ریفامپین با غلظت ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در کاهش تولید بیوفیلم ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس تأثیر دارد. نتایج حاصل از پژوهش کنونی در رابطه با تأثیر ضد بیوفیلمی عصاره سیر و ریفامپین نشان داد که ریفامپین به خصوص در غلظت‌های بالا در کاهش میزان بیوفیلم ناشی از سویه استاندارد *S. aureus* مؤثر است ولی عصاره سیر (گارسین) تأثیر محسوسی در این رابطه ندارد. در مورد دو سویه بیمارگر مورد مطالعه، ریفامپین و گارسین تأثیر چندانی در میزان تولید بیوفیلم نداشتند. این نتایج نیز حاکی از تفاوت سویه استاندارد با سویه‌های بیمارگر است.

نتایج حاصل از مطالعات کنونی نشان داد که در سویه استاندارد *S. aureus*، میزان بیان ژن بیوفیلم *icaD* تحت تأثیر ریفامپین به ۵۴ درصد نمونه کنترل می‌رسد و گارسین نیز می‌تواند بیان این ژن را به ۷۴ درصد نمونه کنترل کاهش دهد. استفاده توأم از این دو ماده نیز باعث می‌شود که بیان *icaD* به ۶۰ درصد نمونه کنترل برسد. در سویه بیمارگر شماره ۶، ریفامپین و گارسین به ترتیب باعث شدند که بیان ژن *icaD* به ۴۴ و ۶۲ درصد نمونه کنترل برسد. اما این دو ماده با یکدیگر اثر افزایشی نشان داده و بیان ژن *icaD* را به ۳۳ درصد نمونه شاهد کاهش دادند. در مورد سویه بیمارگر شماره ۲۴، عصاره سیر اثر مطلوب‌تری نسبت به ریفامپین در کاهش بیان ژن *icaD* نشان داد و باعث شد که بیان آن به ۶۹ درصد نمونه کنترل برسد در حالی که در مورد ریفامپین، این

کاهش تا ۸۲ درصد نمونه کنترل بود. در مورد این سویه نیز ریفامپین و گارسین اثر هم‌افزایی خوبی داشته و بیان *icaD* را تا ۵۴ درصد نمونه کنترل کاهش دادند.

Hartmann و همکاران [۱۴] به این نتیجه رسیدند که آنتی‌بیوتیک ریفامپین با اتصال بسیار اختصاصی به RNA پلی‌مراز می‌تواند منجر به توقف سنتز RNA و رونویسی شود و بدین ترتیب بیان ژن‌ها را کاهش دهد. پژوهش حاضر نشان داد که عصاره سیر نیز در کاهش بیان ژن بیوفیلم *icaD* می‌تواند با مکانیسم مولکولی ناشناخته‌ای همچون ریفامپین و در مواردی حتی بهتر از ریفامپین تأثیرگذار باشد. نکته حائز اهمیت این است که در مورد کاهش بیان ژن *icaD*، عصاره سیر و ریفامپین با یکدیگر اثر هم‌افزایی خوبی داشته و تأثیرگذاری بهتری داشتند. در بسیاری از مطالعات قید شده است که ریفامپین در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های دیگر مورد استفاده قرار گیرد. به‌عنوان مثال Laplante و Woodmansee [۱۸] در مطالعه‌ای استفاده ترکیبی ریفامپین با وانکومایسین یا داپتومایسین و اثر ضد بیوفیلمی بهتر این ترکیبات را نشان داده‌اند. با توجه به عوارض جانبی متعدد و اثرات سوء آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیب ریفامپین با داروهای گیاهی منطقی‌تر به نظر می‌رسد چرا که در تحقیق حاضر، اثر هم‌افزایی مطلوب عصاره سیر با ریفامپین در کاهش میزان بیان ژن بیوفیلم *icaD* به خوبی به چشم می‌خورد.

بنابراین نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، انواع باکتری‌های مقاوم از جمله *S. aureus* را افزیش می‌دهند. به‌علاوه استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها غالبا دارای عوارض جانبی است و فلور نرمال میکروبی بدن را نیز متأثر می‌سازد. همچنین داروهای گیاهی که از گذشته به صورت تجربی مصرف می‌شدند، گزینه‌های خوبی برای تحقیقات علمی بوده و می‌توانند جایگزین و یا حداقل همراه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج مصرف شوند. در این پژوهش علاوه بر تأیید خواص ضد استافیلوکوکی عصاره سیر، اهمیت عصاره سیر در کاهش بیان ژن بیوفیلم *icaD* به اثبات رسید. بنابراین عصاره سیر می‌تواند در این رابطه مورد مصرف قرار گیرد. همچنین ریفامپین نیز به عنوان یک آنتی‌بیوتیک نقش ضد استافیلوکوکی نشان داد و کاهنده بیان ژن بیوفیلم *icaD* بود و استفاده هم‌زمان عصاره سیر با آنتی‌بیوتیک ریفامپین می‌تواند مؤثرتر واقع شده و حداقل در مورد کاهش بیان ژن *icaD* از اهمیت زیادی برخوردار است.

سپاسگزاری

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

منابع

[1] Ankri, S., Mirelman, D., 1999, Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes and Infection, 1(2): 125-129.

[2] 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.

[3] Atshan, S. S., Shamsudin, M. N., Karunanidhi, A., van Belkum, A., Lung, L. T. T., Sekawi, Z., Abduljaleel, S. A., 2013, Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Infection, Genetics and Evolution, 18: 106-112.

[4] Bakri, I., Douglas, C., 2005, Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. Archives of Oral Biology, 50 (7): 645-651.

[5] Belley, A., Neesham-Grenon, E., McKay, G., Arhin, F. F., Harris, R., Beveridge, T., Parr, T. R., Moeck, G., 2009,. Oritavancin kills stationary-phase and biofilm *Staphylococcus aureus* cells *in vitro*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53 (3): 918-.925.

[6] Boles, B. R., Horswill, A. R., 2008, Agr-mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. PLoS Pathogens, 25 (4): e1000052. doi:10.1371/journal.ppat.1000052.

[7] Chrencik, J. E., Orans, J., Moore, L. B., Xue, Y., Peng, L., Collins, J. L., Wisely, G. B., Lambert, M. H., Kliewer, S. A., Redinbo, M. R., 2005, Structural disorder in the complex of human pregnane X receptor and the macrolide antibiotic rifampicin. Molecular Endocrinology, 19 (5): 1125-1134.

[8] Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., Penadés, J. R., 2001, Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. Journal of Bacteriology, 183 (9): 2888-2896.

[9] Fani, M., Kohanteb, J., Dayaghi, M., 2007. Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry, 25(4): 164-168.

[10] Gattringer, K. B., Suchomel, M., Eder, M., Lassnigg, A. M., Graninger, W., Presterl, E., 2010, Time-dependent effects of rifampicin on staphylococcal biofilms. The International Journal of Artificial Organs, 33(9): 621-626.

[11] Gebreyohannes, G., Gebreyohannes, M., 2013, Medicinal values of garlic: A review. International Journal of Medicine and Medical Sciences, 5 (9): 401-408.

[12] Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F., DeBoy, R. T., Ravel, J., Paulsen, I. T., Kolonay, J.F., Brinkacand, L., Beanan, M., 2005, Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. Journal of Bacteriology, 187 (7): 2426-2438.

[13] Harris, L., Foster, S., Richards, R., 2002, An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. European Cells and Materials, 4: 39-60.

[14] Hartmann, G. R., Heinrich, P., Kollenda, M. C., Skrobranek, B., Tropschug, M., Weib, W., 1985, Molecular mechanism of action of the antibiotic rifampicin. Angewandte Chemie International Edition in English, 24 (12): 1009-1014.

[15] Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B., Kaplan, J. B., 2008, Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 74 (2): 470-476.

[16] Jabar, M. A., Al-Mossawi, A., 2007, Susceptibility of some multiple resistant bacteria to garlic extract. African Journal of Biotechnology, 6 (6): 771-776.

[17] Jonkers, D., Van den Broek, E., Van Dooren, I., Thijs, C., Dorant, E., Hageman, G., Stobberingh, E., 1999, Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 43(6): 837-839.

[18] LaPlante, K. L., Woodmansee, S., 2009, Activities of daptomycin and vancomycin alone and in combination with rifampin and gentamicin against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in an experimental model of endocarditis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53 (9): 3880-3886.

[19] Oliveira, A., Cunha, M. L. R. S., 2010, Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. BMC Research Notes, 3: 260.

[20] Perlroth, J., Kuo, M., Tan, J., Bayer, A. S., Miller, L.G., 2008, Adjunctive use of rifampin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review of the literature. Archives of Internal Medicine, 168 (8): 805-819.

[21] Shanks, R. M., Donegan, N. P., Graber, M. L., Buckingham, S. E., Zegans, M. E., Cheung, A. L., O'Toole, G. A., 2005. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. Infection and Immunity, 73 (8): 4596-4606.

Determination of *icaD* gene expression level in *Staphylococcus aureus* by treatment with garlic extract and rifampin

Hosseini Salekdeh S. E[1]., Habibollahi H. [1], Safari Motlagh M. R[2*].

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

[*] Email: ssafarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir

Received: July 2019 Accepted: January 2021

Abstract

Staphylococcus aureus is considered as an important pathogen, which can create chronic infections through the formation of biofilms and protect itself from the host defense system and become resistant to antibiotic activity. The genes encoding the most important biofilm materials and proteins, especially the polysaccharides agent, belong to ica operon and one of the most important of these genes is *icaD*. Garlic has many health benefits, including antimicrobial, which is attributed to its key element, Allicin. Rifampin is also one of the strongest antibiotics against bacterial pathogens, affecting the metabolism of bacteria by interrupting RNA synthesis at the molecular level. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial properties and compare the effect of garlic extract and rifampin on the expression of *icaD* biofilm gene. Two pathogenic strains and one standard strain of *S. aureus*, selected and approved. In this research, antibiogram, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests were conducted with specific concentrations of rifampin antibiotic and garlic extract (garlic tablet). Biofilm phenotypic test was performed with 96 wells microplate and with different concentrations of rifampin and garlic. Following the extraction of RNA from rifampin and garlic-affected specimens, as well as control, cDNA synthesis and then real time PCR were performed and the *icaD* gene expression level was measured in the samples. The results of MIC and MBC under rifampin treatment and the combination of garlic and rifampin for all strains were 375 and 750 µg/ml, respectively. Based on Real time PCR results, *icaD* gene expression was influenced by garlic extract and rifampin, and decreased significantly in the strains. In addition, the rifampin composition and garlic extract resulted in a further reduction in the expression of this gene. Garlic extract and rifampin in the standard strain reduced the *icaD* expression to 38% and 56%, respectively and the combination of rifampin and garlic extract led to a reduction of 67% of the *icaD* biofilm gene expression.

Keywords: Biofilm, Garlic extract, *icaD* gene, Rifampin, *Staphylococcus aureus*.