Comparison of antibacterial property of chitosan nanoparticles against Escherichia coli and Staphylococcus aureus

Z. Zahedi Yeganeh* M. Hadizadeh**

*M.Sc. Student of Nanobiotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
**Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

Abstract

Background: With the advent of modern sciences such as nanotechnology, the hope for treatment of infectious diseases has increased. Nanochitosan is one of the most widely used nanomaterials in this field that has been considered due to its characteristics such as biocompatibility, nontoxicity and bactericidal activity.

Objective: The aim of this study was to compare the antibacterial properties of chitosan nanoparticles against Escherichia coli and Staphylococcus aureus.

Methods: This in vitro study was performed at Iranian Research Organization for Science and Technology in 2014. Chitosan nanoparticles were prepared based on the ionic gelation. The characteristics of the prepared nanoparticles were determined by DLS and SEM. The antibacterial activities of chitosan nanoparticles against Escherichia coli and Staphylococcus aureus were evaluated by determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Data were analyzed using One-way ANOVA and T-test.

Findings: Chitosan nanoparticles were formed with an average size of 160 nm. The MIC and MBC of chitosan nanoparticles were 0.25 and 1 mg/ml for Escherichia coli and were 0.5 and 2 mg/ml for Staphylococcus aureus. The diameter of zones of inhibition was 19 mm for Escherichia coli and 14 mm for Staphylococcus aureus in 10 mg/ml concentration of chitosan nanoparticles.

Conclusion: With regards to the results, it seems that nanochitosan has acceptable antibacterial activity against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. But Escherichia coli is more sensitive to chitosan nanoparticles than Staphylococcus aureus.

Keywords: Nanotechnology, Chitosan, Anti-Bacterial Agents, Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus

Citation: Zahedi Yeganeh Z, Hadizadeh M. Comparison of antibacterial property of chitosan nanoparticles against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J Qazvin Univ Med Sci. 2016; 19 (6): 21-28.

Corresponding Address: Mahnaz Hadizadeh, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
Email: hadizadeh@irost.org
Tel: +98-912-5236745
Received: 19 Apr 2015
Accepted: 29 Aug 2015

مقایسه خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات کیتوزان بر علیه اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس

زهرا زاهدی یگانه* دکتر مهناز هادی‌زاده**

* دانشجوی کارشناسی ارشد نانو زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
** استادیار بیوشیمی پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری، تلفن ۰۹۱۲۵۲۳۶۷۴۵
Email: hadizadeh@irost.org

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۷

چکیده

زمینه: با ظهور علوم جدیدی مانند فناوری نانو، امید برای درمان بیماری‌های عفونی افزایش یافته است. نانوکیتوزان از جمله نانو مواد پُرکاربرد در این زمینه است که به دلیل ویژگی‌هایی مانند زیست سازگاری، عدم سمیت و باکتری‌کشی، مورد توجه قرار گرفته است.

هدف: مطالعه به منظور مقایسه خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات کیتوزان بر علیه باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه برون‌تنی در سال ۱۳۹۳ در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد. نانوذرات کیتوزان با روش ژلی شدن یونی تهیه شدند. مشخصات نانوذرات حاصله توسط پراکندگی نوری دینامیک و میکروسکوپ الکترونی روبشی و فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان علیه اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس توسط تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی شد. داده‌ها با آزمون‌های آماری واریانس یک‌طرفه و تی تحلیل شدند.

یافته‌ها: نانوذرات کیتوزان با اندازه متوسط ۱۶۰ نانومتر به دست آمدند. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات، ۰/۲۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای اشریشیاکلی و ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای استافیلوکوکوس اورئوس تعیین شد. قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات کیتوزان برای اشریشیاکلی، ۱۹میلی‌متر و برای استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۴ میلی‌متر بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، به نظر می‌رسد نانوکیتوزان فعالیت ضدباکتریایی خوبی بر علیه باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس دارد. اما اشریشیاکلی در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نانوذرات کیتوزان حساس‌تر است.

کلیدواژه‌ها: نانوتکنولوژی، کیتوزان، عوامل ضدباکتریایی، اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس

مقدمه:

وقوع عفونت‌های باکتریایی و قارچی علی‌رغم پیشرفت‌های چشمگیر پزشکی رو به افزایش است. استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی باکتری‌هایی هستند که باعث طیف وسیعی از بیماری‌های عفونی می‌شوند.[۱و۲] بسیاری از گونه‌های استافیلوکوکوس بی‌خطر هستند و در سطح پوست و مخاط یا در خاک زندگی می‌کنند، اما در بین آن‌ها انواع بیماری‌زا نیز وجود دارد. یکی از انواع بیماری‌زای این جنس، استافیلوکوکوس اورئوس معروف به استافیلوکوکوس طلایی است که بعد از اشریشیاکلی به عنوان دومین عامل عفونت‌های بیمارستانی مطرح است.[۳و۴] استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که به طور نسبی به حرارت مقاوم است و می‌تواند در محیط‌های حاوی نمک با درصد بالا زندگی کند.[۴] این باکتری می‌تواند طیف وسیعی از عفونت‌ها را ایجاد کند از جمله؛ عفونت‌های گوارشی، عفونت‌های ساده پوستی مانند جوش، کورک، کفگیرک، گل مژه و آبسه و حتی بیماری‌های مهلک مانند پنومونی، منتژیت، استئومیلیت، اندوکاردیت، سندرم شوک سمی و سپتی‌سمی.[۵و۶]

اشریشیاکلی اولین عامل عفونت‌های بیمارستانی و یک باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکترویاسه است.[۷] این باکتری به طور شایع در روده جانوران خون‌گرم وجود دارد

و موجب مسمومیت غذایی و اسهال می‌شود.[۸] تاکنون برای از بین بردن سمیت و عفونت‌های حاصل از این دو باکتری، آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی از قبیل بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و ماکرولیدها تولید و استفاده شده است.[۹و۱۰] اما متأسفانه باکتری‌ها پس از مدتی نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند. با توجه به این که مقاومت آنتی‌بیوتیکی موجب گسترش عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها و افزایش مشکلاتی همچون صدمه وارده به بیماران بستری، مدت بستری در بیمارستان، هزینه‌های درمان و مرگ و میر می‌شود؛ بنابراین تحقیق جهت یافتن راهکار درمانی مناسب‌تری در ارتباط با عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها، امری لازم به نظر می‌رسد. یکی از گزینه‌های مطرح در این راستا، کمک گرفتن از فناوری نانو است؛ چرا که امروزه خواص زیست سازگار و در حین حال ضدمیکروبی قوی بعضی از نانو مواد گزارش شده است که از جمله می‌توان به پلیمر کیتوزان اشاره کرد.[۱۱-۱۳] کیتوزان پلی‌ساکاریدی کاتیونی است که از فرایند استیل‌زدایی کیتین در شرایط قلیایی به‌دست می‌آید. منابع عمده تولید کیتوزان، دیواره سلولی قارچ‌ها و پوست سخت پوستان است.[۱۴و۱۵] گلوکز آمین و N- استیل گلوکز آمین واحدهای تشکیل‌دهنده کیتوزان هستند که با پیوند بتا گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند.[۱۶] کیتوزان به خاطر ویژگی‌های مختلفی مثل زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و عدم سمیت، مزایا و کاربردهای زیادی دارد که گستره وسیعی از صنایع را در بر می‌گیرد. یکی از خواص مهم کیتوزان، خاصیت ضدمیکروبی آن است که برخی محققین علت آن را تأثیر متقابل گروه آمین آزاد کیتوزان حاوی بار مثبت با اجزای آنیونی دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها ذکر کرده‌اند که باعث تغییراتی در نفوذپذیری دیواره سلولی آن‌ها می‌شود.[۱۷] نتیجه این فرایند، تراوش بخشی از مواد داخل سلول به بیرون و جلوگیری از ورود مواد غذایی به داخل سلول است. کیتوزان همچنین بعد از ورود به داخل سلول و پیوند با DNA، از ساخته شدن RNA و تولید پروتئین‌های مختلف جلوگیری می‌کند.[۱۸]

گزارش‌های متعددی در مورد سمیت ناچیز و تحریک سیستم ایمنی نانوذرات کیتوزان در شرایط درون‌تنی در مدل‌های حیوانی وجود دارد. نانوذرات کیتوزان با افزایش تجمع و فعال کردن ماکروفاژها و نیز القای ترشح سیتوکین‌ها باعث ایجاد مقاومت نسبت به عفونت‌های میکروبی می‌شود.[۱۹و۲۰] هدف این مطالعه، مقایسه خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات کیتوزان بر علیه باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بود.

❋مواد و روش‌ها:

این پژوهش برون‌تنی (In vitro) در سال ۱۳۹۳ در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد. کیتوزان با وزن ملکولی متوسط و سدیم تری پلی فسفات از شرکت سیگما آلدریچ (Sigma-Aldrich- آمریکا) خریداری شد. سویه‌های اشریشیاکلی (ATCC 25992) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شدند.

برای ساخت نانوکیتوزان، ابتدا محلول ذخیره ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان با حل کردن ۱۰ میلی‌گرم کیتوزان در ۱۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۰/۱۷۵ درصد تهیه شد. محلول حاصله به مدت یک ساعت روی همزن قرار گرفت تا خوب حل شود و در نهایت فیلتر شد تا هیچ‌گونه ناخالصی نداشته باشد. از طرف دیگر، محلول ذخیره ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سدیم تری‌پلی‌فسفات با حل کردن ۱۰ میلی‌گرم سدیم تری‌پلی‌فسفات در ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه تهیه شد. سپس روی همزن ، ۱ میلی‌لیتر از محلول سدیم تری‌پلی‌فسفات به ۳ میلی‌لیتر محلول کیتوزان به آرامی و به صورت قطره قطره اضافه شد. محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ و پس از سه بار شستشو با آب مقطر مجدداً سانتریفیوژ شد. در نهایت محلول حاصله در حمام فراصوت قرار گرفت و برای نگه‌داری طولانی مدت نانوذرات کیتوزان به دست آمده، از خشک‌کن انجمادی

(freeze dryer) استفاده شد.[۲۱و۲۲]

میانگین اندازه و شاخص پراکندگی نانوذرات با روش پراکندگی نوری دینامیک (Dynamic Light Scattering) توسط دستگاه مال ورن (Malvern instrument) با زاویه پراکندگی ۹۰ درجه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. برای بررسی شکل ظاهری نمونه‌های ساخته شده نیز از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد. بدین ترتیب که پودر نانوذرات کیتوزان پس از پوشش‌دهی با طلا در ولتاژ ۱۵ کیلووات با میکروسکوپ الکترونی مطالعه شد.[۲۳]

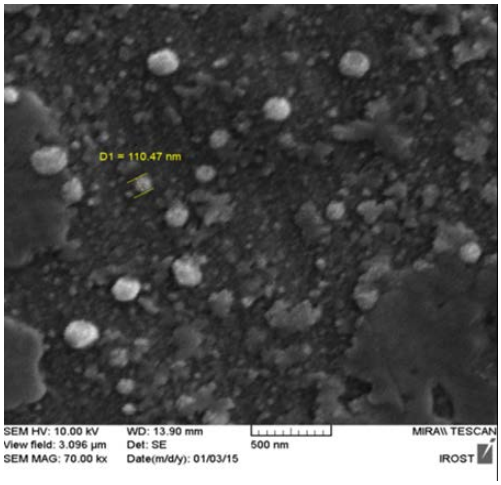
به منظور انجام مطالعه‌های میکروبی، باکتری‌ها بر روی محیط نوترینت آگار شیب‌دار کشت داده شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. هنگام تهیه کشت مایع، یک لوپ (loop) پر از هر نمونه باکتری در شرایط کاملاً سترون در ۵۰ میلی‌لیتر محیط آبگوشت قلب و مغز (Brain Heart Infusion Broth) کشت داده شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با ۱۴۰ تا ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در نهایت کشت‌ها با استفاده از آب مقطر سترون تا رسیدن به جمعیت میکروبی مورد نیاز برای کشت سطحی؛ 10^{-6} – 10^{-5} واحد تشکیل‌دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر (CFU/ml) رقیق شدند. حساسیت باکتری‌ها، با استفاده از روش نفوذ انتشار سنجش شد. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی بر روی محیط کشت ریخته شد و با یک سوآپ کتان سترون بر روی محیط کشت گسترش یافت. سپس چاهک‌هایی به قطر ۸ میلی‌متر بر روی محیط کشت ایجاد شد. داخل هر چاهک، غلظت‌های مختلف نانوذره کیتوزان ریخته شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. هاله عدم رشد باکتری‌ها با استفاده از کولیس ورنیه اندازه‌گیری و ثبت شد.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات کیتوزان با روش رقت لوله‌ای تعیین گردید، به این منظور از یک سری لوله آزمایش ۹ تایی به شرح زیر استفاده شد: ۷ لوله برای رقت‌های مختلف، یک لوله برای شاهد مثبت (محیط کشت باکتری، بدون نانوکیتوزان) و یک لوله برای شاهد منفی (محیط کشت بدون باکتری). به لوله‌های آزمایش، ۹ میلی‌لیتر محلول نوترینت براث اضافه و سترون شد. ۱۰۰۰ میکرولیتر از یک رقت نانوکیتوزان به لوله اول اضافه و پس از هموژن شدن، ۱۰۰۰ میکرولیتر از مایع هموژن به لوله دوم اضافه شد و این عمل تا لوله هفتم ادامه یافت. از لوله هفتم، ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول هموژن دور ریخته شد. به تمامی لوله‌ها (غیر از شاهد منفی) ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با کدورت ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. همه لوله‌ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آن، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری به صورت چشمی بررسی شدند. آخرین لوله‌ای که در آن هیچ کدورتی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. از تمامی لوله‌های فاقد کدورت رشد جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی کیتوزان به روش پورپلیت کشت داده شد و آخرین غلظتی از کیتوزان که قادر به مرگ ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های زنده اولیه بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفته شد.[۲۴]

تمام آزمایش‌های مربوط به تهیه نانوذرات کیتوزان، تعیین قطر هاله عدم رشد، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شدند. داده‌ها با نرم افزار SPSS۱۶ و آزمون‌های آماری واریانس یک طرفه و تی تحلیل شدند.

❋ یافته‌ها:

میانگین اندازه نانوذرات به‌دست آمده توسط پراکندگی نوری دینامیک، ۱۶۰ نانومتر و شاخص پراکندگی اندازه ذرات ۰/۳۱۵ تعیین شد. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، شکل ظاهری نانوذرات کیتوزان به دست آمده به صورت کروی با لبه‌های صاف و اندازه نانوذرات حاصله کم‌تر از ۲۰۰ نانومتر بود (شکل شماره ۱).



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات کیتوزان

مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی برای اشریشیاکلی به ترتیب ۰/۲۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. در لوله شاهد منفی که حاوی نانوذرات کیتوزان بود کدورتی مشاهده نشد.

اندازه بزرگ‌تر قطر هاله عدم رشد برای اشریشیاکلی نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات کیتوزان، بیان‌گر حساسیت بیش‌تر اشریشیاکلی در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به این نانوذرات بود (جدول شماره ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف نانوذرات کیتوزان

غلظت نانوذرات کیتوزان (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	میانگین قطر هاله عدم رشد ± خطای استاندارد (میلی‌متر)	
	اشریشیاکلی	استافیلوکوکوس اورئوس
≤۴ (۰/۲۵، ۰/۵۰، ۱، ۲ و ۴)	۰	۰
۸	۱۰±۰/۲	۸±۰/۳
۱۰	۱۹±۰/۳	۱۴±۰/۴

❋بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد باکتری گرم منفی اشریشیاکلی در مقایسه با باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نانوذرات کیتوزان با میانگین اندازه کم‌تر از ۲۰۰ نانومتر حساسیت بیش‌تری داشت؛ به طوری که در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات کیتوزان، حداقل غلظت مهارکنندگی کم‌تر و قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تری برای اشریشیاکلی در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمد.

در این مطالعه برای آماده‌سازی نانوذرات کیتوزان از روش ژلی شدن یونی به عنوان روشی ساده، سریع و بدون نیاز به مواد شیمیایی سمی استفاده شد. اساس این روش، میان‌کنش بین بار مثبت کیتوزان با بار منفی تری‌پلی‌فسفات است.[۲۵]

گزارش‌های اندکی درباره اثر ضدباکتریایی نانوذرات کیتوزان به تنهایی موجود است و بیش‌تر مطالعه‌های انجام شده در این زمینه مربوط به نانوکامپوزیت‌های کیتوزان با فلزها و پلیمرهای مختلف است. اما در تحقیقی مشابه، نانوذرات کیتوزان توسط ما (Ma) و همکاران با روش تجزیه توسط هیدروژن پراکسید و با میانگین اندازه ۳۶ نانومتر تهیه شدند. آن‌ها نشان دادندکه نانوذرات حاصله در محدوده غلظتی ۱ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بر روی رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس اثر مهاری داشتند. نتایج آزمایش‌های آن‌ها همچنین نشان داد که خواص ضدمیکروبی نانوذرات کیتوزان با افزایش غلظت این ذرات افزایش می‌یافت و اثر ضدمیکروبی این ذرات بر علیه اشریشیاکلی بیش‌تر از استافیلوکوکوس اورئوس بود. آن‌ها نشان دادند که حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات کیتوزان برای اشریشیاکلی به ترتیب ۱ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.[۲۶] در حالی‌که در مطالعه حاضر، مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی برای اشریشیاکلی به ترتیب ۰/۲۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و

برای استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. این اختلاف می‌تواند به دلیل تفاوت روش تهیه نانوذرات و همچنین اندازه و بار سطحی متفاوت آن‌ها باشد و البته پی بردن به علت آن به تحقیق بیش‌تری نیاز دارد. از طرف دیگر نتایج مطالعه حاضر مانند این محققان بیان‌گر وابستگی خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات کیتوزان به غلظت آن و همچنین اثربخش‌تر بودن نانوذرات کیتوزان در کاهش رشد و از بین بردن باکتری گرم منفی اشریشیاکلی در مقایسه با باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بود.

گزارش‌های متعددی مبنی بر خاصیت ضدمیکروبی قوی‌تر نانوذرات کیتوزان بر علیه باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت وجود دارد.[۲۷و۲۸] علت این پدیده را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که به دلیل بار منفی بیش‌تری که در لایه ضخیم لیپوپلی‌ساکاریدی باکتری‌های گرم منفی وجود دارد، نانوذرات کیتوزان با توجه به نوع خاص ساختمان، عدم کریستالی بودن و بار مثبت خود، در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت می‌توانند اتصال بیش‌تری را با این نوع باکتری‌ها داشته باشند.

❋سپاس‌گزاری:

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد نانو زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران است.

❋مراجع:

1. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children: executive summary. Clin Infect Dis 2011 Feb 1; 52 (3): 285-92.

2. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di llio C. Escherichia coli in Europe: an overview. Int J Environ Res Public Health 2013 Nov 25; 10 (12): 6235-54.

3. Rezazadeh M, Yousefi Mashouf R, Ghaznavi-Rad E. Antibiotic profile of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr hospital of Arak. J Arak Univ Med Sci 2013; 16 (2): 29-37. [In Persian]

4. Sihto HM, Tasara T, Stephan R, Johler S. Temporal expression of the staphylococcal enterotoxin D gene under NaCl stress conditions. FEMS Microbiol Lett 2015 Mar; 362 (6): 1-7.

5. Omuse G, Kabera B, Revathi G. Low prevalence of methicillin resistant Staphylococcus aureus as determined by automated identification system in two private hospitals in Nairobi, Kenya: a cross sectional study. BMC Infect Dis 2014 Dec 14; 14: 669.

6. Toro CM, Janvier J, Zhang K, Fonseca K, Greqson D, Church D, et al. Community-associated methicillin - resistant Staphylococcus aureus necrotizing pneumonia without evidence of antecedent viral upper respiratory infection. Can J Infect Dis Med Microbiol 2014 May; 25 (3): e76-82.

7. de Kraker ME, Davey PG, Grundmann H; BURDEN study group. Mortality and hospital stay associated with resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. PLoS Med 2011 Oct; 8 (10): e1001104.

8. Belanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM. Escherichia coli from animal reservoirs as potential source of human extraintestinal pathogenic E. coli. FEMS Immunol Med

Microbiol 2011 Jun; 62 (1): 1-10.
9. Kocaoglu O, Carlson EE. Profiling of β-lactam selectivity for penicillin-binding proteins in Escherichia coli DC2. Antimicrob Agents Chemother 2015 May; 59 (5): 2785-90.
10. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Baqaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis 2010 Sep; 10 (9): 597-602.
11. Youssef AM, Abou-Yousef H, El-Sayed SM, Kamel S. Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/ nanocomposite films. Int J Biol Macromol 2015 May; 76: 25-32.
12. Archana D, Singh BK, Dutta J, Dutta PK. Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: in vitro and in vivo evaluation. Int J Biol Macromol 2015 Feb; 73: 49-57.
13. Mohamed RR, Sabaa MW. Synthesis and characterization of antimicrobial cross linked carboxymethyl chitosan nanoparticles loaded with silver. Int J Biol Macromol 2014 Aug; 69: 95-9.
14. Kaya M, Seyyar O, Baran T, Turkes T. Bat guano as new and attractive chitin and chitosan source. Frontiers in Zoology 2014; 11 (1): 59-66.
15. Kaya M, Baran T, Mentes A, Asaroglu M, Sezen G, Tozak K. Extraction and characterization of α-chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates. Food Biophysics 2014 Jun; 9 (2): 145-57.
16. Landge A, editors. Isolation and characterization of chitosan producing bacteria from soil samples obtained from river banks. National Conference on Advances and Challenges in Green technology 2015 Feb; At Sinhgad College of Science, Pune; 1: 96-99.
17. Li Z, Yang F, Yang R. Synthesis and for improved nanotoxicity evaluation. Nano Today 2011; 6 (5): 446-65.
18. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. Int J Food Microbiol 2010 Nov 15; 144 (1): 51-63.
19. Wen ZS, Xu YL, Zou XT, Xu ZR. Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice. Mar Drugs 2011; 9 (6): 1038-55.
20. Villiers C, Chevallet M, Diemer H, Couderc R, Freitas H, Van Dorsselaer A, et al. From secretome analysis to immunology: chitosan induces major alterations in the activation of dendritic cells via a TLR4-dependent mechanism. Mol Cell Proteomics 2009 Jun; 8 (6): 1252- 64.
21. Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. Adv Drug Deliv Rev 2010 Jan 31; 62 (1): 59-82.
22. Avadi MR, Sadeghi AM, Mohammadpour N, Abedin S, Atyabi F, Dinarvand R, et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. Nanomedicine 2010 Feb; 6 (1): 58-63.
23. Honary S, Ghajar K, Khazaeli P, Shalchian P. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-chitosan nanocomposites using different molecular weight grades of chitosan. Trop J Pharm Res 2011 Feb; 10 (1): 69-74.
24. Islam M, Masum SM, Mahbub KR, Haque MZ. Antibacterial Activity of Crab-Chitosan against Sphylococcus aureus and

Escherichia coli. J Adv Scient Res 2011; 2 (4): 63-6.
25. Sailaja AK, Amareshwar P, Charkravarty P. Different techniques used for the preparation of nanoparticles using natural polymers and their application. Int J Pharm Pharm Sci 2011; 3 (Suppl 2): 45-50.
26. Ma Y, Liu P, Si C, Liu Z. Chitosan nanoparticles: preparation and application in antibacterial paper. J Macromol Sci Phys 2010 Aug; 49 (5): 994-1001.
27. Cruz-Romero MC, Murphy T, Morris M, Cummins E, Kerry JP. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. Food Control 2013; 34 (2): 393-7.
28. Tang H, Zhang P, Kieft TL, Ryan SJ, Baker SM, Wiesmann WP, et al. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. Acta Biomater 2010 Jun; 6 (7): 2562-71.