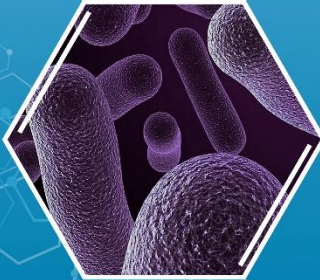
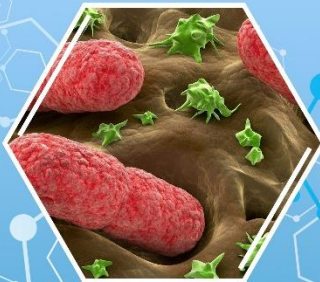




مجله علمی رہیافت های نوین در علوم سلولی و مولکولی

New approaches in Cellular and Molecular Sciences



فهرست

تشخیص واژینوز باکتریایی در ارتباط با گاردنرلا واژینالیس با استفاده از روش مولکولی در زنان مراجعه کننده به مراکز درمانی

پریسا معتمدیان، کیمیا گلستان فر، فاطمه خداوردی پور..... ۳

ژنوتایپینگ سویه‌های هلیکوباکترییلوری جدا شده از نمونه‌های بیوپسی در شهرستان شهرکرد به روش RAPD PCR

حسین آقاجانی، حسین خدابنده..... ۱۴

در سویه‌های استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس جدا شده از موارد کلینیکی شهرستان شهرکرد

فروغ صدیقی، حسین آقاجانی، حسین خدابنده، فاطمه نعمت الهی، الهه تاج بخش..... ۲۸

شیوع اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ در جدایه‌های اشیشیا کلی یورپاتوزنیک از بیماران دیابتی در کرمانشاه،

ایران

رسول پژوهش، فاطمه خداوردی پور، حسین آقاجانی..... ۴۷

بررسی مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از زخم و ادرار در کرمانشاه، ایران.

زینب احمدی، حسین آقاجانی، حسین خدابنده..... ۶۷

Review on Suspension & Nanosuspension

Chetan Borase , Amol Jagdale, Monika Sonawane , Shubham Kothawade ,Roshan Landge ,Akshay Katkale..... ۸۴



تشخیص واژینوز باکتریایی در ارتباط با گاردنرلا واژینالیس با استفاده از روش مولکولی در زنان مراجعه کننده به مراکز درمانی

پریسا معتمدیان^۱، کیمیا گلستان فر^۱، فاطمه خداوردی پور^۱

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

چکیده	اطلاعات مقاله
<p>عفونت های دستگاه تناسلی یکی از شایع ترین علل مراجعه زنان به مراکز درمانی به شمار می روند. گاردنرلا واژینالیس به عنوان یکی از عوامل شایع واژینوز باکتریایی، نقش مهمی در بروز علائمی نظیر ترشحات بدبو و مشکلات التهابی دارد. این عفونت با افزایش خطر ابتلا به بیماری هایی هم چون آندومتریس پس از سزارین یا سقط، عفونت زخم، بیماری التهابی لگن، زایمان زودرس، کوریوآمنیونیت و کاهش موفقیت در باروری آزمایشگاهی همراه است. تشخیص سریع و دقیق این عفونت، ضمن کمک به درمان به موقع بیماران، نقش مؤثری در پیشگیری از گسترش آلودگی دارد. در این مطالعه، ۲۵۰ نمونه از زنان مراجعه کننده با علائم واژینیت به درمانگاه های شهرستان شهرکرد جمع آوری و با استفاده از روش های ماکروسکوپی، میکروسکوپی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از روش PCR نشان داد که ۲۲۰ نمونه (۸۸ درصد) به گاردنرلا واژینالیس آلوده بودند. این یافته ها بر شیوع بالای گاردنرلا واژینالیس در میان زنان مراجعه کننده تأکید داشته و لزوم استفاده از روش های تشخیصی دقیق به منظور پیشگیری و درمان مؤثر واژینوز باکتریایی را روشن می سازد.</p>	<p>تاریخچه مقاله: دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۰۲ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۹ چاپ: ۱۴۰۴/۰۴/۱۵</p> <p>DOI:</p> <p>کلمات کلیدی: گاردنرلا واژینالیس، واژینوز باکتریایی، روش مولکولی.</p> <p>* نویسنده مسئول: Email: parisa.motamed69@gmail.com</p>

مقدمه

عفونت‌های دستگاه تناسلی به‌ویژه واژینیت، از شایع‌ترین مشکلات بهداشتی در میان زنان به‌ویژه در سنین باروری به‌شمار می‌رود که سالانه میلیون‌ها زن در سراسر جهان از جمله بیش از ده میلیون نفر در ایالات متحده، به دلیل این مشکل به مراکز درمانی مراجعه می‌کنند. واژینیت به‌عنوان یک بیماری التهابی شایع در ناحیه واژن، اغلب با علائمی مانند ترشحات غیرطبیعی، خارش، سوزش، و بوی ناخوشایند همراه است و می‌تواند کیفیت زندگی و سلامت جنسی زنان را به‌طور چشمگیری تحت تأثیر قرار دهد (۱،۲). سازمان جهانی بهداشت، سه عامل اصلی در ایجاد واژینیت را کاندیدا، *تریکوموناس واژینالیس* و *واژینوز باکتریایی* معرفی کرده است که حدود ۹۰ درصد عفونت‌های واژینال را شامل می‌شوند. در میان این عوامل، *واژینوز باکتریایی* یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین انواع واژینیت است که با تغییر در فلور طبیعی واژن، یعنی کاهش جمعیت *لاکتوباسیلوس‌های مفید* و افزایش رشد باکتری‌های بی‌هوازی و پاتوژن، به‌ویژه گونه‌ی *گاردنرلا واژینالیس*، شناخته می‌شود. این اختلال در تعادل میکروبی واژن، منجر به بروز علائمی مانند ترشحاتی با بوی ماهی و رنگ خاکستری-سفید، تحریک واژن، و افزایش احتمال ابتلا به سایر عفونت‌های تناسلی می‌گردد (۳،۴).

گاردنرلا واژینالیس به‌عنوان یکی از باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری و اعضای طبیعی فلور واژن، در صورت رشد بیش از حد، نقش کلیدی در بروز *واژینوز باکتریایی* ایفا می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که این باکتری دارای توانایی چسبندگی به اپیتلیوم واژن و تولید بیوفیلم است که در برابر پاسخ ایمنی میزبان و درمان‌های آنتی‌بیوتیکی مقاومت ایجاد می‌کند. هم‌چنین *واژینوز باکتریایی* علاوه بر ایجاد علائم آزاردهنده، با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های

التهابی لگن، آندومتریت پس از زایمان، زایمان زودرس، سقط جنین، کاهش موفقیت در درمان‌های ناباروری، و حتی افزایش ریسک انتقال ویروس HIV همراه است (۵،۶). در حال حاضر، تشخیص *واژینوز باکتریایی* عمدتاً بر اساس بررسی علائم بالینی، معاینه فیزیکی و آزمایش‌های میکروسکوپی انجام می‌شود. با این حال، این روش‌ها گاهی وقت‌گیر، وابسته به تفسیر شخصی، و از دقت کافی برخوردار نیستند. از سوی دیگر، نظر به اهمیت تشخیص دقیق و به‌موقع، استفاده از روش‌های مولکولی نوین مانند PCR که حساسیت و ویژگی بالایی دارند، می‌تواند به‌عنوان راهکاری مؤثر در شناسایی دقیق عوامل بیماری‌زا، به‌ویژه *گاردنرلا واژینالیس*، مورد استفاده قرار گیرد (۷-۹).

بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع *گاردنرلا واژینالیس* به‌عنوان عامل اصلی *واژینوز باکتریایی* در زنان مراجعه‌کننده به مراکز درمانی و ارزیابی کارایی روش‌های مولکولی در تشخیص این پاتوژن طراحی گردیده است. نتایج حاصل می‌تواند گامی مؤثر در ارتقای کیفیت تشخیص، درمان به‌موقع، و پیشگیری از عوارض ناشی از این بیماری رایج و در عین حال مهم در سلامت باروری زنان باشد.

مواد و روش کار

نوع مطالعه و جمع‌آوری نمونه‌ها

این مطالعه ی توصیفی مقطعی با هدف شناسایی *گاردنرلا واژینالیس* به‌عنوان عامل *واژینوز باکتریایی* در زنان مبتلا به علائم واژینیت انجام شده است. در این تحقیق، نمونه‌های واژینال از زنان مراجعه‌کننده به مراکز درمانی شهرکرد که دارای علائم بالینی واژینیت بودند، جمع‌آوری شد. پس از نمونه‌گیری، آزمایش‌های مورد نیاز شامل مراحل کشت میکروبی، رنگ‌آمیزی و تشخیص

مولکولی با روش PCR جهت شناسایی دقیق عامل بیماری‌زا انجام شد.

نمونه‌گیری و نگهداری نمونه‌ها

در مجموع، ۲۵۰ نمونه ترشح واژینال از بیماران دارای علائم واژینیت توسط متخصص زنان به روش سواب واژینال تهیه شد. نمونه‌ها در دو محیط جداگانه، شامل نرمال سالین و محیط انتقالی استوارت قرار گرفتند و به آزمایشگاه منتقل شدند. از نمونه‌های موجود در محیط استوارت، جهت کشت در محیط کلمبیا آگار و آماده‌سازی اسمیر برای رنگ‌آمیزی استفاده شد. نمونه‌های حاوی نرمال سالین نیز برای انجام آزمون‌های مولکولی، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

کشت میکروبی و تست‌های بیوشیمیایی نمونه‌های

جمع‌آوری شده

نمونه‌های سواب واژینال بیماران پس از انتقال به آزمایشگاه، روی محیط کشت اختصاصی کلمبیا آگار تلقیح شدند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۱۰ درصد CO₂ انکوبه شدند. تشکیل کلنی‌های سفید، ریز و سرسجاقی نشانگر رشد احتمالی *گاردنرلا واژینالیس* بود. جهت تأیید، کلنی‌ها تحت مجموعه‌ای از تست‌های بیوشیمیایی قرار گرفتند، از جمله: تست اندول، احیای نیتрат، متیل رد، اوره‌آز، لیزین دکربوکسیلاز، تست‌های کاتالاز و اکسیداز، هیدرولیز هیپورات، و تخمیر گلوکز و مالتوز (۱۰، ۱۱).

تهیه محیط کشت کلمبیا آگار

برای تهیه محیط کشت کلمبیا آگار، ۳۹ گرم پودر آماده محیط در یک لیتر آب مقطر حل شده و محلول حاصل تا شفاف شدن به جوش آورده شد. پس از بستن درب ظرف، محلول به مدت

۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند در اتوکلاو استریل شد. پس از پایان فرایند، محیط خارج شده و پس از رسیدن به دمای حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد، ترکیبات مکمل شامل ۲ میلی‌گرم جنتامایسین، ۵ میلی‌گرم آمفوتریسین B، ۱ میلی‌گرم نالیدیکسیک اسید و ۱ درصد خون گوسفند استریل به آن اضافه شد. محیط به‌خوبی با استایرر هم زده شد و سپس در پلیت‌های استریل به ضخامت تقریبی ۲ سانتی‌متر ریخته شد.

استخراج DNA از نمونه‌ها

استخراج DNA از نمونه‌های واژینال و کلنی‌های کشت‌شده با استفاده از روش جوشاندن انجام شد. در این روش، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند تا لیز سلولی انجام و DNA آزاد شود. نمونه‌ها پس از سرد شدن، جهت مراحل بعدی تشخیص مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند (۱۲).

بررسی کمی و کیفی DNA استخراج‌شده

برای سنجش غلظت و خلوص DNA استخراج‌شده، از روش UV اسپکتروفوتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ بهره گرفته شد. این روش بر پایه اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام می‌شود. DNA به‌دلیل داشتن بازهای آروماتیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر جذب نوری دارد و پروتئین‌ها در ۲۸۰ نانومتر جذب می‌کنند. نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ شاخصی برای سنجش خلوص DNA است؛ نسبت بین ۱/۸ تا ۲ نشان‌دهنده خلوص مناسب است. نسبت کمتر از ۱/۸ نشان‌دهنده آلودگی با پروتئین و بالاتر از ۲ نشان‌دهنده حضور RNA می‌باشد. در این مطالعه، ۳ میکرولیتر از هر نمونه توسط نانودراپ اندازه‌گیری شد و نمونه‌های دارای غلظت مناسب ($\geq 150 \text{ ng}/\mu\text{l}$) و خلوص

استاندارد، در دمای ۲۰- درجه ی سانتی گراد تا انجام PCR نگهداری شدند.

تشخیص مولکولی گاردنرلا واژینالیس

برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز با هدف شناسایی و تکثیر ناحیه ای اختصاصی از ژنوم باکتری گاردنرلا واژینالیس، ابتدا توالی ژن هدف از پایگاه های اطلاعاتی نظیر NCBI استخراج شد و سپس طراحی پرایمرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزار Oligo نسخه ۷ صورت گرفت. پرایمرهای طراحی شده به گونه ای انتخاب شدند که از ویژگی های ضروری مانند اختصاصیت بالا، دمای اتصال مناسب و عدم تشکیل ساختارهای دوم برخوردار باشند. توالی پرایمرها طراحی شده در این پژوهش در جدول ۱ نشان شده است. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل

DNA الگو، پرایمرهای رفت و برگشت، مسترمیکس حاوی Taq DNA polymerase، dNTP، و $MgCl_2$ و بافر مناسب، به همراه آب دیونیزه جهت تنظیم حجم نهایی بود. نمونه ها پس از آماده سازی، در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند و چرخه حرارتی استاندارد شامل دناتوراسیون اولیه، ۳۰ تا ۴۰ سیکل دناتوراسیون، اتصال پرایمر و طولی سازی، و در نهایت مرحله پایانی طولی سازی اجرا گردید. دمای اتصال بسته به خصوصیات پرایمرها تنظیم شد. در پایان، برای ارزیابی صحت تکثیر، محصولات PCR توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت و باندهای حاصل با استفاده از رنگ اختصاصی و تحت تابش UV مشاهده و ثبت شدند (۱۳)..

جدول (۱): پرایمرهای مورد استفاده

پرایمر	توالی	سایز باند	TM	درصد CG
Forward	5- GGGCGGGCTAGAGTGCA -3	۳۰۰	۷۰	۶۲
Revers	5- GAACCCGTGGAATGGnGCC-3			

آنالیز آماری

برای تحلیل داده های به دست آمده در این مطالعه از روش های آماری مناسب با توجه به نوع داده ها و اهداف تحقیق استفاده شد. ورود داده ها به نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ صورت گرفت و توصیف داده ها از طریق شاخص های آماری نظیر میانگین، انحراف معیار و فراوانی نسبی انجام شد. برای بررسی ارتباط بین متغیرهای کیفی، آزمون مجذور کای و در صورت لزوم آزمون دقیق فیشر به

کار گرفته شد. سطح معناداری در تمامی تحلیل ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (۱۴).

نتایج

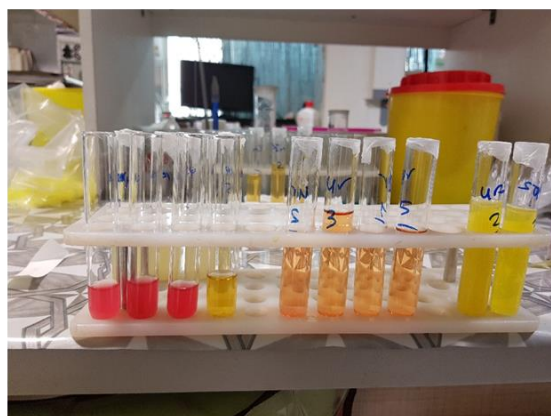
این مطالعه با هدف شناسایی و جداسازی گاردنرلا واژینالیس در زنان مبتلا به علائم واژینیت که به مراکز درمانی شهرستان شهرکرد مراجعه کرده بودند، انجام شد. از مجموع ۲۵۰ نمونه واژینال جمع آوری شده، بررسی های میکروبیولوژیک و آزمون های

سرسنجاکی بودند. از نظر میکروسکوپی نیز، باسیل‌های گرم منفی یا گرم متغیر دیده شدند و همچنین حضور سلول‌های اپیتلیال کلوسل در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ گرم تأیید شد (شکل ۲). علاوه بر این، آزمون تعیین pH (Diff test) نیز بر روی نمونه‌ها انجام گرفت.

بیوشیمیایی وجود گاردنرلا واژینالیس را در ۲۲۰ نمونه (معادل ۸۸ درصد) تأیید کرد. باکتری‌های جداسازی‌شده دارای ویژگی‌های بیوشیمیایی مشخصی بودند؛ به‌طوری‌که در تست‌های اندول، اوره‌آز، لیزین دکربوکسیلاز، کاتالاز، اکسیداز و احیای نیتрат نتیجه منفی و در آزمون‌های هیدرولیز هیپورات، تخمیر گلوکز و مالتوز، نتیجه مثبت مشاهده شد (شکل ۱). بررسی‌های ماکروسکوپی نشان داد که کلنی‌های حاصل، کوچک، به رنگ سفید یا خاکستری با نمایی

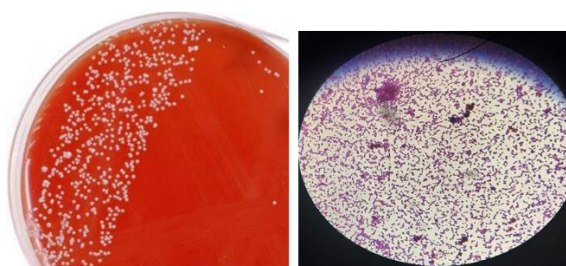


A

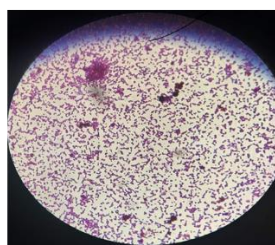


B

شکل ۱- نتایج تست‌های بیوشیمیایی. (SIM) نتایج تست (B) نتایج تست‌های اوره و اندول. A شکل ۱- نتایج تست‌های بیوشیمیایی.



A



B

شکل ۲- (A) باکتری گاردنرلا واژینالیس بر روی محیط

کلمبیا آگار. (B) رنگ آمیزی گرم باکتری گاردنرلا واژینالیس.

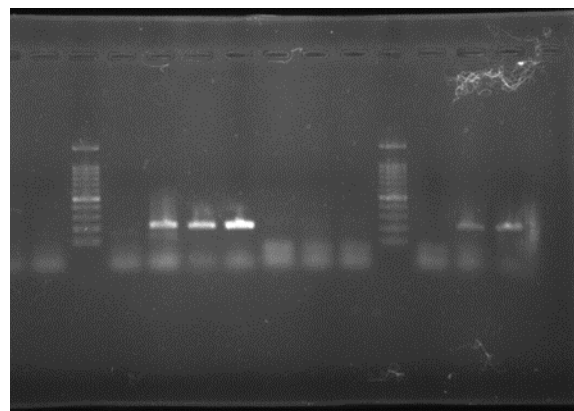
نتایج حاصل از واکنش PCR

پس از استخراج DNA از نمونه‌های ترشحات واژینال، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *16S rRNA* باکتری گاردنرلا واژینالیس انجام

نتایج مربوط به ردیابی ژن *16S rRNA*

جهت تأیید مولکولی وجود گاردنرلا واژینالیس، پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده بررسی گردید و سپس نمونه‌ها با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *16S rRNA* مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از واکنش PCR نشان داد که در ۲۲۰ نمونه از ۲۵۰ نمونه (۸۸ درصد)، باند اختصاصی به طول ۳۰۰ جفت‌باز ظاهر شد که بیانگر حضور ژنوم باکتری گاردنرلا واژینالیس و تأیید قطعی این عامل در بیماران مذکور بود.

گرفت. به منظور بررسی محصولات PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد صورت پذیرفت. همان گونه که در نتایج ژل الکتروفورز مشاهده شد، نمونه های مثبت دارای باند مشخصی در موقعیت ۳۰۰ جفت باز بودند که حضور ژن هدف و در نتیجه شناسایی قطعی گاردنرلا واژینالیس را تأیید می کند.



شکل ۳- الکتروفورز محصولات PCR ژن 16srRNA گاردنرلا

واژینالیس.

بحث

واژینوز باکتریایی از شایع ترین اختلالات واژینال در زنان سنین باروری است که عمدتاً در نتیجه تغییر در تعادل فلور طبیعی واژن، به ویژه کاهش لاکتوباسیل های محافظ و افزایش باکتری های بی هوازی فرصت طلب مانند گاردنرلا واژینالیس ایجاد می شود. در مطالعه حاضر، میزان آلودگی به گاردنرلا واژینالیس در میان زنان مبتلا به واژینیت برابر با ۸۸ درصد بود. این میزان بالاتر از اغلب مطالعات مشابه داخلی و خارجی گزارش شده و بیانگر یک هشدار اپیدمیولوژیک برای جمعیت مورد مطالعه است.

در مقایسه با نتایج ما، مطالعه ای که در کلینیک زنان بیمارستان شهریار نور انجام شد، میزان شیوع گاردنرلا واژینالیس را تنها ۳۴/۶ درصد گزارش کرده است. همچنین، پژوهش اشرفی

گنجوی در کرمان شیوع ۳۷/۷ درصد و هزارجریبی در ساری، شیوع ۴۶ درصد را برای این باکتری در بین زنان مبتلا به واژینیت گزارش کرده اند. این اختلاف چشمگیر ممکن است به عوامل مختلفی از جمله تفاوت در روش های نمونه گیری، ابزار تشخیصی، شرایط فرهنگی و بهداشتی منطقه، و تفاوت های رفتاری میان جمعیت ها مرتبط باشد. در سطح بین المللی نیز، داده های متعددی از اختلاف در میزان شیوع گاردنرلا واژینالیس حکایت دارند. به عنوان مثال، در پرتغال شیوع تنها ۳/۸ درصد بوده و در مطالعه ای که بر روی زنان استرالیایی و آفریقایی-آمریکایی انجام شد، میزان شیوع بین ۳۳ تا ۵۰ درصد گزارش گردید (۱۵). در مقابل، مطالعه ای Janulaitiene و همکارانش در لیتوانی (۲۰۱۷) نشان داد که تمامی بیماران مبتلا به واژینوز (۱۰۰ درصد) به گاردنرلا واژینالیس آلوده بودند. این تفاوت ها بر اهمیت ملاحظات جغرافیایی، نژادی، رفتاری و اجتماعی در تعیین الگوی شیوع این بیماری تأکید دارند (۱۶).

از دیگر یافته های مهم مطالعه حاضر، ارتباط آماری معنادار میان سطح تحصیلات پایین و افزایش شیوع واژینوز باکتریایی بود. این نتیجه با یافته های Stanhope و Lancaster هم راستا است که در مطالعات شان گزارش دادند سطح سواد پایین، با کاهش آگاهی بهداشتی و در نتیجه افزایش احتمال ابتلا به واژینوز باکتریایی همراه است. در مطالعه ای رامازانی تهرانی نیز همین ارتباط مشاهده شد؛ زنانی که اطلاعات کافی درباره ی مراقبت های بهداشتی و بیماری های واژینال نداشتند، بیشتر در معرض ابتلا قرار داشتند. این موضوع نشان می دهد که آموزش سلامت جنسی و باروری، به ویژه در زنان کم سواد یا بدون تحصیلات آکادمیک، می تواند نقش اساسی در پیشگیری از این بیماری داشته باشد.

موضوع قابل توجه دیگر در پژوهش حاضر، ارتباط معنادار میان استفاده از IUD (به‌ویژه نوع غیرهورمونی یا مسی) و افزایش شیوع واژینوز باکتریایی بود. در حالی که بسیاری از مطالعات داخلی به این رابطه نپرداخته‌اند، مطالعات جهانی متعددی چنین ارتباطی را تأیید کرده‌اند. در مطالعه‌ی Baeten و همکاران (۲۰۰۱)، گزارش شد که زنان استفاده‌کننده از روش‌های پیشگیری هورمونی نظیر دیومدروکسی پروژسترون، در مقایسه با سایر روش‌ها، کمتر دچار BV می‌شوند. این یافته‌ها حاکی از آن‌اند که روش‌های پیشگیری می‌توانند به شکل معناداری بر ترکیب میکروبی واژن تأثیر بگذارند.

در مرور سیستماتیک و متاآنالیز جامع Vodstreil و همکاران (۲۰۱۳)، که بر پایه‌ی ۵۵ مطالعه انجام شده بود، مشخص شد که استفاده از روش‌های هورمونی پیشگیری از بارداری، با کاهش خطر شیوع اولیه، بروز جدید و عود واژینوز باکتریایی همراه است. این مطالعه نشان داد که نسبت شانس (odds ratio) برای این ارتباط‌ها به ترتیب ۰٫۶۸، ۰٫۸۲ و ۰٫۶۹ بوده است. در مقابل، استفاده از IUD، به‌ویژه نوع مسی، به‌دلیل ایجاد التهاب موضعی و تغییرات در میکروبیوتای واژن، می‌تواند زمینه‌ساز افزایش خطر واژینوز باکتریایی باشد (۱۷).

در تأیید یافته‌های ما، مطالعه‌ی مرور Daniel و همکاران (۲۰۲۳) نیز نشان داد که IUDها، به‌ویژه نوع غیرهورمونی (Cu-IUD)، با افزایش خطر واژینوز باکتریایی همراهند. این مطالعه که شامل مرور ۱۵ تحقیق بود، اختلافات موجود را ناشی از ناهمگونی در نوع IUD، طراحی مطالعه، و حجم نمونه دانست. با این حال، آن‌ها اذعان داشتند که IUDهای هورمونی (LNG-IUD) اثر متفاوتی داشته و در برخی موارد حتی با کاهش خطر واژینوز

باکتریایی همراه بوده‌اند، هرچند داده‌ها در این زمینه کافی نیست (۱۸).

از منظر درمانی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی گاردنرلا واژینالیس یکی از چالش‌های بالینی مهم در مدیریت واژینوز باکتریایی است. در مطالعه‌ای داخلی، مقاومت بالا به مترونیدازول (۸۶/۱۲ درصد) و مقاومت پایین‌تر به کلیندامایسین (۱۷/۳۴ درصد) گزارش شده که نشان‌دهنده‌ی کارآمدی نسبی کلیندامایسین و ضرورت بررسی مقاومت پیش از درمان است. یافته‌های Abbe و Mitchell (۲۰۲۲) نیز این موضوع را تأیید می‌کند؛ آن‌ها در بررسی خود به این نتیجه رسیدند که درمان‌های موجود (مترونیدازول و کلیندامایسین)، در نیمی تا ۸۰٪ از موارد، منجر به عود بیماری ظرف ۱۲ ماه می‌شوند (۱۹).

علت اصلی این بازگشت مکرر، به گفته‌ی آنان، ناتوانی لاکتوباسیل‌های مفید، در بازسازی اکوسیستم واژینال پس از درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها است. آن‌ها پیشنهاد کردند که علاوه بر درمان دارویی، باید از پروبیوتیک‌ها، روش‌های ترمیم بیوفیلم، تنظیم pH واژن، و حتی پیوند میکروبیوم واژینال استفاده شود. همچنین، اصلاح سبک زندگی نظیر ترک دخانیات، استفاده از کاندوم، انتخاب روش‌های مناسب پیشگیری از بارداری و آموزش سلامت جنسی نیز از راهبردهای پیشگیرانه‌ی مکمل به شمار می‌روند (۲۰).

از نظر پاتوفیزیولوژی، افزایش تعداد باکتری‌های بی‌هوازی و کاهش لاکتوباسیل‌های محافظ منجر به افزایش pH واژن و ایجاد محیطی نامناسب می‌شود که زمینه را برای رشد باکتری‌های پاتوژن نظیر گاردنرلا واژینالیس فراهم می‌سازد. در غیاب درمان مناسب، این وضعیت می‌تواند به عوارضی نظیر زایمان زودرس، بیماری‌های

التهابی لگن، ناباروری، و افزایش خطر ابتلا به عفونت‌های آمیزشی (مانند HIV) بینجامد (۲۱).

بررسی دقیق‌تر عوامل مؤثر بر واژینوز باکتریایی انجام شود تا بتوان راهکارهای بومی و مؤثرتری برای کنترل آن ارائه کرد.

در مجموع، یافته‌های این مطالعه در کنار شواهد موجود در ادبیات علمی، بر اهمیت انجام مداخلات چندلایه برای پیشگیری، تشخیص زودهنگام، و درمان مؤثر واژینوز باکتریایی تأکید دارند. از جمله این اقدامات می‌توان به آموزش بهداشت باروری برای زنان در معرض خطر، غربالگری منظم، استفاده آگاهانه از روش‌های پیشگیری از بارداری با در نظر گرفتن وضعیت میکروبیوم واژینال، و رویکردهای درمانی تلفیقی اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که واژینوز باکتریایی به‌ویژه با شیوع بالای گاردنرلا واژینالیس، یکی از مشکلات شایع و نگران‌کننده در میان زنان مراجعه‌کننده به مراکز درمانی است. ارتباط معنادار میان شیوع بالای این عفونت با عواملی مانند سطح تحصیلات پایین، استفاده از IUD به عنوان روش پیشگیری از بارداری، و عدم آگاهی کافی از بهداشت فردی و جنسی، اهمیت توجه به آموزش و پیشگیری را دوچندان می‌کند. در کنار یافته‌های اپیدمیولوژیک، اهمیت غربالگری زودهنگام، تشخیص دقیق و درمان مؤثر به منظور جلوگیری از عوارض جدی مانند ناباروری، بیماری‌های التهابی لگن و زایمان زودرس نیز بار دیگر تأیید شد. با توجه به شیوع بالا و پیامدهای گسترده این بیماری، برنامه‌ریزی برای ارتقاء سطح آگاهی زنان در مورد علائم، راه‌های پیشگیری و مراقبت‌های بهداشتی واژینال، و همچنین انتخاب آگاهانه روش‌های پیشگیری از بارداری، می‌تواند نقش مهمی در کاهش شیوع و بهبود کیفیت زندگی زنان ایفا کند. در نهایت، پیشنهاد می‌شود مطالعات گسترده‌تری با حجم نمونه بیشتر و در مناطق مختلف کشور برای

مراجع

1. Coleman JS, Gaydos CAJJocm. Molecular diagnosis of bacterial vaginosis: an update. J Clin Microbiol. 2018; 56(9): 1-9.
2. Evans A, Doshi R, Yeaw J, Coyle K, Goldberg S, Wang E, et al. Healthcare utilization and costs following molecular diagnostic testing among patients with vaginitis. J Comp Eff Res. 2025;14(1):e240173.
3. Sanchez-Garcia EK, Contreras-Paredes A, Martinez-Abundis E, Garcia-Chan D, Lizano M, de la cruz-Hernandez EJJomm. Molecular epidemiology of bacterial vaginosis and its association with genital micro-organisms in asymptomatic women. J Med Microbiol. 2019;68(9):1373-1382.
4. Hassan M, Suliman ZJ. Evaluation of RT-PCR in molecular diagnosis of *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* infection in comparison with other conventional method in Tikrit province. Med J Tikrit Univ. 024; 30 (2): 220-229.
5. Schwebke JR, Muzny CA, Josey WE. Role of *Gardnerella vaginalis* in the pathogenesis of bacterial vaginosis: a conceptual model. J Infect Dis. 2014; 210(3):338-343.
6. Morrill S, Gilbert NM, Lewis AL. *Gardnerella vaginalis* as a cause of bacterial vaginosis: appraisal of the evidence from in vivo models. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 24:10:168 178. Schellenberg JJ, Patterson MH, Hill JE. *Gardnerella vaginalis* diversity and ecology in relation to vaginal symptoms. 2017;168 (9-10): 837-844.
8. Vanechoutte M, Guschin A, Van Simaey L, Gansemans Y, Van Nieuwerburgh F, Cools PJJjos, et al. Emended description of *Gardnerella vaginalis* and description of *Gardnerella leopoldii* sp. nov., *Gardnerella piovii* sp. nov. and *Gardnerella swidsinskii* sp. nov., with delineation of 13 genomic species within the genus *Gardnerella*. 2019;69(3):679-87.
9. Suliman ZT. Evaluation of RT-PCR in molecular diagnosis of *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* infection in comparison with other conventional method in Tikrit province. 2024; 30 (2): 78-85.
10. Mohseni M, Khosravi, F %J Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran. Bioremediation activity of Pb (II) resistance *Citrobacter* sp. MKH2 isolated from heavy metal contaminated sites in Iran. J Clin Microbiol. 2014; 25 (2):105-10.
11. Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult DJCID. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. Clin Infect Dis. 2008; 47(1):3 3-43.
12. Mohseni M, Khosravi F, Mohadjerani M, Chaichi MJMLJ. Biosorption of lead and copper by heavy metal resistance bacterium using Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT IR). 2014; 8(3):30-39.
13. Kusters J, Reuland E, Bouter S, Koenig P, Dorigo-Zetsma JJEJoCM, Diseases I. A multiplex real-time PCR assay for routine diagnosis of bacterial vaginosis. 2015; 34:1779-1785.
14. Rostami H, Khosravi F, Mohseni M, Rostami AAJJJoBM. Biosynthesis of Ag nanoparticles using isolated bacteria from contaminated sites and its application as an efficient catalyst for hydrazine electrooxidation. Int J Biol Macromol. 2018; 107: 343-348.
15. Rashidifar S, Harzandi N, Honarmand Jahromi S, Gharavi MJ. Prevalence of *Gardnerella vaginalis* infection and antibiotic resistance pattern of isolates of gynecology clinic patients at Shahriar Noor Hospital from January to June 2020 by PCR and culture methods. Iran j Microbiol. 2023;15(4):513-520.
16. Janulaitiene M, Paliulyte V, Grinceviciene S, Zakareviciene J, Vladisauskiene A, Marcinkute A, Pleckaityte M. Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* subgroups

in women with and without bacterial vaginosis. BMC infect Dis . 2017;17(1):394-360.

17. Vodstrcil LA, Hocking JS, Law M, Walker S, Tabrizi SN, Fairley CK, et al. Hormonal contraception is associated with a reduced risk of bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. PloS one. 2013;v8(9):e73055.

18. Daniel AL, Auerbach S, Nazarenko D, Agbemenu K, Lorenz R. An Integrative Review of the Relationship Between Intrauterine Devices and Bacterial Vaginosis. Nursing for women's health. 2023; 27(2):141-151.

19. Abbe C, Mitchell CM. Bacterial vaginosis: a review of approaches to treatment

and prevention. Front Reprod Health. 2023; (5): 1-13.

20. Eschenbach DA DP, Williams BL, Klebanoff SJ, YoungSmith K, Critchlow CM, et al. Prevalence of hydrogen peroxide producing Lactobacillus species in normal women and women with vaginal vaginosis. J Clin Microbiol. 2002; 27(2): 25-29.

21. Carey JC KM, Hauth JC, Hillier SL, Thom EA, Ernest J, et al. . Metronidazole to prevent preterm delivery in pregnant women with asymptomatic bacterial vaginosis. New England J Med. 2000; 342 (8):534-540.

Detection of Bacterial Vaginosis Associated with *Gardnerella vaginalis* Using Molecular Methods in Women Attending Healthcare Centers

Parisa Motamediyan¹, Kimia Golestanfar¹, Fatemeh Khodavardipour¹

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: parisa.motamed69@gmail.com

Abstract

Genital tract infections are among the most common reasons for women to seek medical care. *Gardnerella vaginalis* is a predominant pathogen in bacterial vaginosis and plays a significant role in producing symptoms such as malodorous vaginal discharge and inflammatory complications. This infection is associated with an increased risk of upper genital tract diseases, including endometritis after cesarean section or abortion, surgical site infections, pelvic inflammatory disease, preterm labor, chorioamnionitis, and reduced success rates in assisted reproductive technologies. Rapid and accurate diagnosis not only facilitates timely treatment but also helps prevent the spread of infection. In this study, 250 samples were collected from women presenting with vaginitis symptoms at clinics in Shahrekord. The samples were analyzed using macroscopic, microscopic, biochemical, and molecular (PCR) methods. Results revealed that 220 out of 250 samples (88%) were positive for *Gardnerella vaginalis* infection. These findings highlight the high prevalence of *Gardnerella vaginalis* among symptomatic women and emphasize the importance of using accurate diagnostic tools for effective management and prevention of bacterial vaginosis.

Keywords: *Gardnerella vaginalis*, Bacterial Vaginosis, Molecular Method.



رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۲ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۳

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



ژنوتایپینگ سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های بیوپسی در شهرستان شهرکرد به روش RAPD PCR

حسین آقاجانی^{۱*}، حسین خداپنده^۱

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخچه مقاله:</p> <p>دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۵</p> <p>پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۸</p> <p>چاپ: ۱۴۰۴/۰۴/۱۵</p> <p>DOI:</p> <p>کلمات کلیدی: بیوپسی، ژنوتایپینگ، هلیکوباکتر پیلوری، RAPD-PCR</p> <p>* نویسنده مسئول: Email: bardiyaaghajanjidezaki@gmail.com</p>	<p>هلیکوباکتر پیلوری از عوامل مهم بیماری‌های گوارشی می‌باشد. از آن‌جا که تنوع ژنتیکی درون جمعیت هلیکوباکتر پیلوری به میزان زیاد رخ می‌دهد، با روش‌هایی مانند RAPD-PCR رابطه‌ی احتمالی بین ژنوتیپ‌های ویژه‌ی هلیکوباکتر پیلوری و بیماری‌های مختلف معده را تعیین کرد. در این تحقیق الگوی ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مختلف دچار سوهاضمه با روش RAPD-PCR بررسی شدند. طی این مطالعه نمونه‌های بیوپسی ۴۰ بیمار شامل ۲۰ بیمار طبیعی، ۱۶ بیمار دچار زخم و ۴ بیمار دچار سرطان، با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن، استخراج DNA آن‌ها صورت گرفت و در حضور پرایمر <i>16srRNA</i> تشخیص قطعی سویه‌ها انجام شد و ژنوتایپینگ سویه‌ها به روش RAPD-PCR صورت گرفت. در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی هلیکوباکتر پیلوری تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۱۰۹ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. در دندروگرام به‌دست آمده در آزمون RAPD-PCR در ۴۰ سویه هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی در نمونه‌های بیوپسی به‌طور کلی قرابتی بین ۵۴ تا ۹۸ درصد در میان جدایه‌ها مشهود است. تمامی جدایه‌ها در ۹ خوشه اصلی از یکدیگر متمایز شدند. در ضریب تشابه ۸۰ درصد مجموعاً ۳۰ پروفایل شامل ۹ خوشه و ۲۱ نقطه جداگانه شناسایی شد. در بررسی قطعات DNA الکتروفورتیک اشکال زیر مشاهده گردید که نتایج به‌دست آمده از نظر ژنتیکی متنوع و ناهمگن است. نتایج به دست آمده بر روی ۲۰ سویه جدا شده از بیماران طبیعی نشان داد که هر یک از سویه‌ها الگوی انگشت نگاری ژنتیکی مخصوص به خود را دارند.</p>

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری باسیل گرم منفی و میکروآتروفیلی است که در مخاط معده اغلب به صورت مارپیچی و در محیط کشت به صورت خمیده دیده می‌شود. این باکتری پاتوژنی با پتانسیل بالای تغییرات ژنتیکی است که می‌تواند میلیون‌ها انسان را به صورت مزمن در سراسر جهان آلوده کند. این باکتری عامل بیماری‌هایی مانند گاستریت، زخم‌های گوارشی، سرطان معده و سرطان غدد لنفاوی دستگاه گوارش است. آنالیز ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری نشان داده است که ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری درجه‌ی بالایی از تغییرات ژنتیکی را نشان می‌دهند. گوناگونی ژنتیکی بسیار زیادی میان سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از فردی در مقایسه با سویه‌ی جدا شده از فرد دیگر وجود دارد. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد که تفاوت‌های ژنتیکی ممکن است نقش مهمی را در نتایج کلینیکی عفونت بازی کند (۱-۳).

عفونت با این باکتری در سراسر جهان گسترده است به طوری که در کشورهای در حال توسعه به بیش از ۸۰ درصد می‌رسد؛ اما بیماری‌های مربوط به هلیکوباکتر پیلوری تنها در ۲۰-۱۰ درصد این جمعیت‌ها دیده می‌شود. محققان این تفاوت در بیماری‌زایی را مربوط به دو عامل می‌دانند:

(۱) عواملی که به میزان وابسته است و شامل خصوصیات ژنتیکی و ایمونولوژیک افراد، مصرف سیگار و داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی و غیره است که آن‌را خطری برای ابتلا به بیماری دانند.

(۲) عواملی که به باکتری وابسته است که هلیکوباکتر پیلوری را با توجه به تفاوت‌های ژنوتیپی و فنوتیپی به سویه‌ها و تیپ‌های مختلفی تقسیم بندی می‌کند. بیماری‌زایی هر سویه با توجه به میزان تبادل علائم بین باکتری و سلول‌های پوششی میزان متفاوت است. مهم‌ترین تفاوت‌های بین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری، دو ژن *vacA* (کد کننده ی سیتوتوکسین واکوئل زا) و ژن *cagA* (کد کننده ی پروتئین وابسته به سیتوتوکسین) است (۴-۶).

روش‌های گوناگونی بر اساس استفاده از DNA برای تشخیص و شناسایی گوناگونی ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری تا کنون به کار رفته است. نوعی از PCR که مبتنی بر تکثیر تصادفی یا رندوم DNA است اولین بار توسط ویلیام و همکارانش در دهه ۱۹۹۰ معرفی گردید و این روش را به اختصار^۱ RAPD-PCR می‌نامند. در این روش یک پرایمر غیر اختصاصی به طول ۸ تا ۱۲ نوکلئوتید برای واکنش PCR استفاده می‌گردد. پس از الکتروفورز محصول PCR

^۱ - Random Amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)

واکنش در نمونه‌های مختلف برای هر نمونه یک پروفایل نسبتاً منحصربه‌فردی به‌دست می‌آید که می‌توان از آن برای شناسایی سریع بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی استفاده کرد. این روش برای مطالعه‌ی گوناگونی و انتقال ژنتیکی هلیکوباکتر پیلوری بسیار ارزشمند است. این روش بسیار حساس و با کارایی و سرعت بالا می‌باشد. تقریباً ۳ تا ۱۰ قطعه‌ی مشخص DNA به ازای هر سویه هلیکوباکتر پیلوری به دست می‌آید. هر ایزوله از هلیکوباکتر پیلوری به طور مشخص یک الگوی مشخص تولید می‌کند که به طور قابل تکراری از ایزوله‌های دیگر متفاوت است. تعیین ژنوتیپ این پاتوژن تاثیر مناسبی در روشن سازی نقشه‌های ژنومیک و درمان آنتی بیوتیکی به همراه خواهد آورد.

مواد و روش کار:

طی این مطالعه‌ی مقطعی نمونه‌های بیوبسی ۴۰ بیمار شامل ۲۰ بیمار طبیعی (که به علت سوءهاضمه آندوسکپی شده بودند)، ۱۶ بیمار دچار زخم و ۴ بیمار دچار سرطان توسط پزشک به منظور تشخیص قطعی هلیکوباکتر پیلوری از ردیابی توالی ژن *16srRNA* استفاده گردید. آزمایش PCR به منظور تشخیص قطعی هلیکوباکتر پیلوری در حضور زوج پرایمرهای نشان داده‌شده در جدول (۱) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تنظیم گردید.

در سویه های هلیکوباکتر پیلوری *16srRNA* توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن

ژن	توالی پرایمر (۵-۳)	bp اندازه محصول
<i>16srRNA</i>	HP 1F CTGGAGAGACTAAGCCCTCC	۱۰۹
	HP 1R ATTACTGACGCTGATTGTGC	

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *16srRNA* به صورت

زیر بود:

۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه، ۶۰ سیکل تکراری ۹۴

درجه ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه ۶۰ ثانیه و ۶۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک

سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۳ دقیقه. مشاهده باند ۱۰۹ جفت بازی

نشان دهنده مثبت بودن تست است.

جهت انجام تکنیک RAPD-PCR روی ایزوله‌های

هلیکوباکتر پیلوری مورد مطالعه از تک پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی

۱۲۸۱ با توالی AACGCGCAAC معرفی شده توسط

Akopyanz و همکاران استفاده شد. واکنش PCR در حجم

۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR buffer و ۲

میلی مول $MgCl_2$ ، ۲۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۲ میکرومول

از تک پرایمر، ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۵

میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه تنظیم گردید.

چرخه دمایی مورد استفاده جهت تکثیر قطعات پلی

مورفیک DNA در این آزمایش عبارت بود از: یک سیکل ۹۴

درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، ۴۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه

سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰

ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی

۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (۸).

جدایه‌های مورد بررسی ۳ نوبت با شرایط فوق به روش

PCR آزمایش شد تا از تعداد و الگوی بانندی ایجاد شده در هر

نمونه اطمینان حاصل شود. بعد از RAPD-PCR محصول به

دست آمده در ژل آگارز ران شد و با استفاده از UV ترانس

المنیتور باندهای حاصله مشاهده گردید. در تکنیک RAPD-

PCR روی جدایه‌های مورد مطالعه سه نوبت انجام و پس از

اطمینان تعداد اندازه باندهای ایجاد شده در هر جدایه با نشان گر

RAPD، الگوی بانندی حاصله به کمک نرم افزار Gel J آنالیز

و با در نظر گرفتن قرابت بالای ۸۰ درصد، ژنوتیپ‌های

(پروفایل‌های) مربوط با روش شباهت Dice و پیوند

UPGMA شناسایی و دندوگرام مربوط به هر نشان گر ترسیم

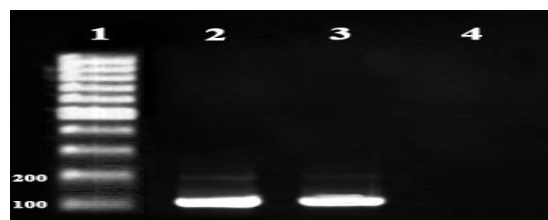
گردید.

در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور

تشخیص قطعی باکتری *16srRNA* هلیکوباکتر پیلوری و

حضور توالی ژن *16srRNA*، تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۱۰۹

جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند.



شکل (۱): ژل حاصل از PCR ژن *16srRNA* هلیکوباکتر پیلوری
ستون ۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون های ۲ و ۳ نمونه های
مثبت از نظر ژن *16srRNA*. ستون ۴ مارکر ۱۰۰ جفت بازی
(فرمتناز).

ترسیم گردید. در این الگوریتم ایزوله‌هایی با ضریب تشابه
بالای ۸۰ درصد در یک کلاستر (پروفایل = تیپ) قرار گرفتند.

در دندروگرام به‌دست آمده در آزمون RAPD-PCR

در تکنیک RAPD-PCR روی ایزوله‌های مورد مطالعه

سه نوبت انجام و پس از اطمینان تعداد اندازه باندهای ایجاد شده

در هر ایزوله با هر نشان‌گر، الگوی باندهای حاصله به کمک نرم

افزار Gel J آنالیز و با در نظر گرفتن قرابت بالای ۸۰ درصد،

ژنوتیپ‌های (پروفایل‌های) مربوط با روش شباهت Dice و

پیوند UPGMA شناسایی و دندوگرام مربوط به هر نشان‌گر

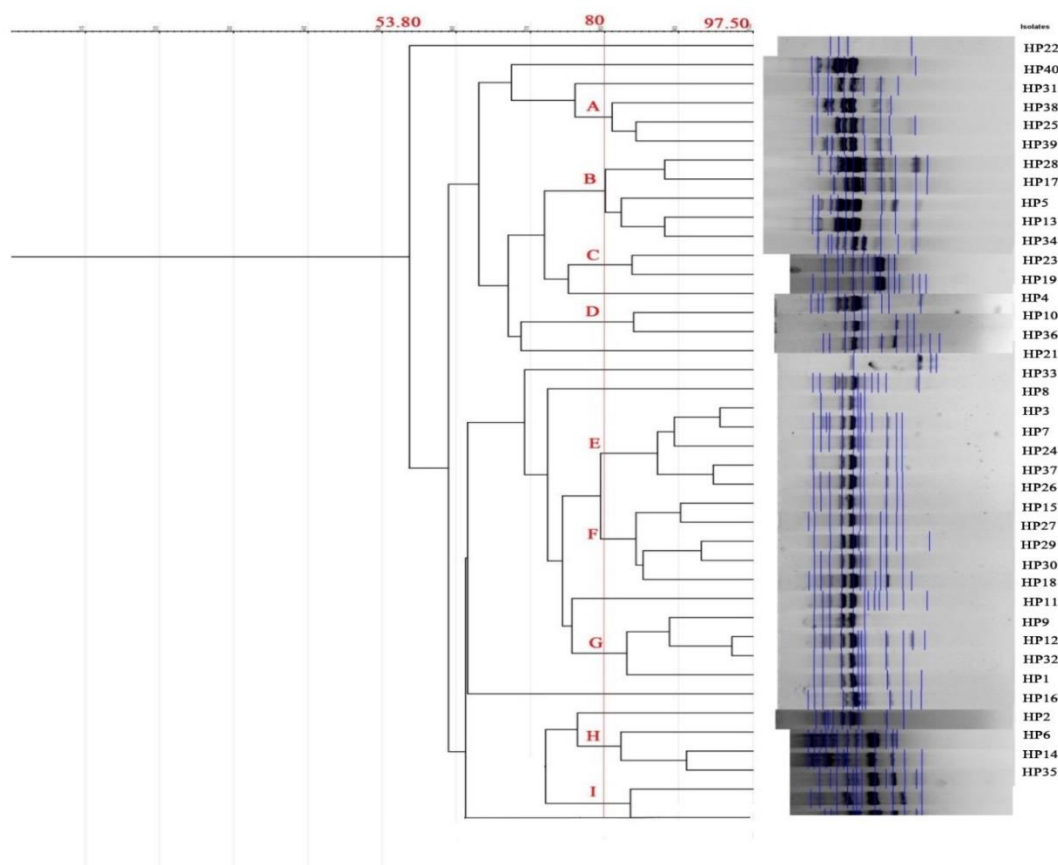
در ۴۰ سویه هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی در نمونه های

بیوپسی به‌طور کلی قرابتی بین ۵۴ تا ۹۸ درصد در میان جدایه‌ها

مشهود است. تمامی جدایه‌ها در ۹ خوشه اصلی از یکدیگر

متمایز شدند. در ضریب تشابه ۸۰ درصد مجموعاً ۳۰ پروفایل

شامل ۹ خوشه و ۲۱ نقطه جداگانه شناسایی شد.



دندوگرام RAPD-PCR در سویه های هلیکوباکتر پیلوری

الکتروفوریتیک DNA در بررسی قطعات

دست آمده از ۱۶ سویه ی جدا شده از بیماران مبتلا به زخم

گوارشی ۲ تا ۱۲ باند با اندازه ی بین ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت بار

بودند (نمونه های ۳۶-۲۱). الگوی انگشت نگاری ژنتیکی ۴

سویه ی جدا شده از موارد سرطان معده شامل ۶ تا ۸ باند به

اندازه ی ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ جهت باز تعیین شد (نمونه های ۴۰-۳۷).

اشکال زیر مشاهده گردید که نتایج به دست آمده از نظر ژنتیکی

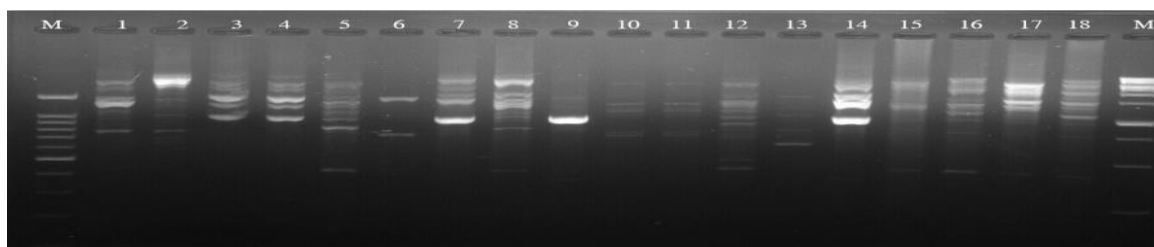
متنوع و ناهمگن است. نتایج به دست آمده بر روی ۲۰ سویه

جدا شده از بیماران طبیعی نشان داد که هر یک از سویه ها

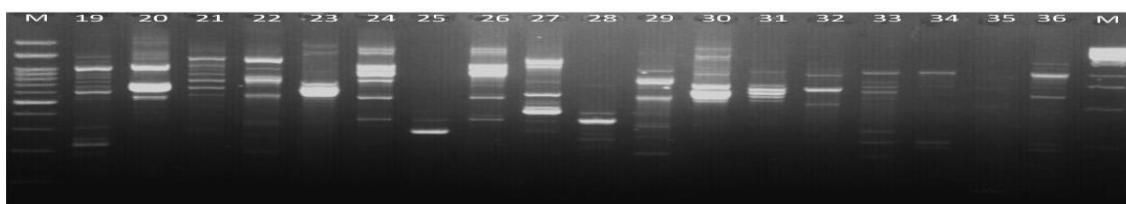
الگوی انگشت نگاری ژنتیکی مخصوص به خود را دارند. تعداد

و اندازه ی باندها بین ۲۵۰ تا DNA باندها از ۲ تا ۱۳ قطعه

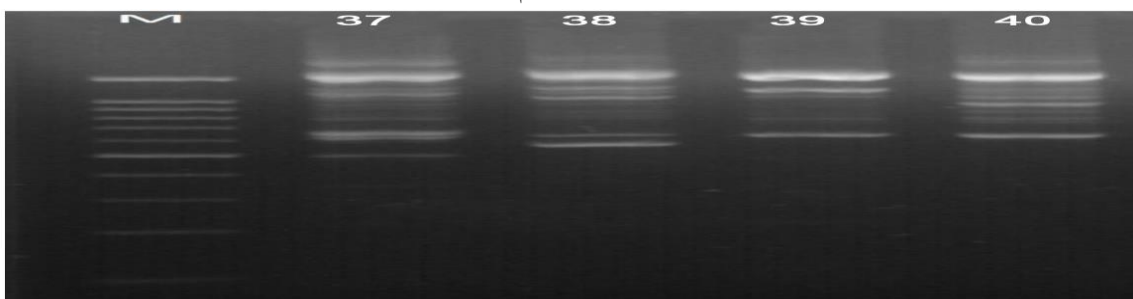
به PCR ۳۰۰۰ جفت باز متغیر بود (نمونه های ۲۰-۱). نتایج



شکل (۲): الگوی ژنتیکی سویه های طبیعی جدا شده با روش RAPD-PCR نمونه های ۲۰-۱.



شکل (۳): الگوی ژنتیکی سویه های جدا شده از بیماران دچار زخم گوارشی با روش RAPD-PCR نمونه های ۳۶-۲۱.



شکل (۴): الگوی ژنتیکی سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان با روش RAPD-PCR نمونه های ۴۰-۳۷.

بحث

عفونت هلیکوباکتر پیلوری شایع ترین بیماری باکتریال معده-روده‌ای در سرتاسر جهان است. این عفونت در ۹۵ درصد از بیماران مبتلا به زخم دوازدهه و در ۸۰-۷۰ درصد از بیماران مبتلا به زخم معده دیده می‌شود. تقریباً ۱۷ درصد از افراد هلیکوباکتر پیلوری مثبت، مبتلا به زخم معده می‌شوند و هر ساله ۱-۲ درصد از این افراد مبتلا به خونریزی، سوراخ شدگی و یا انسداد خروجی معده می‌شوند. در سوراخ شدگی بدون زخم حدود ۵۰ درصد از بیماران مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری می‌باشند. مطالعات نشان داده که عفونت هم‌زمانی با هلیکوباکتر پیلوری در ۹۰ درصد موارد سرطان معده شامل لنفوم‌های معده وجود دارد (۹).

هریک از عوامل ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری یک روند چند عاملی است که به ویژگی‌های خاص ارگانیزم، میزبان و محیط بستگی دارد. عوامل وابسته به میزبان شامل خصوصیات ژنتیکی و ایمونولوژیکی افراد، مصرف سیگار، داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی و غیره است که آن‌ها را خطری برای ابتلا به بیماری می‌دانند. عوامل مربوط به باکتری شامل خصوصیات ژنوتیپی و فنوتیپی باکتری است (۱۰).

بر اساس منابع معتبر موجود بررسی هیستولوژیکی نمونه‌ی بیوپسی و کشت نمونه‌ی بیوپسی به همراه آزمون سریع

اوره‌از از جمله روش‌های تشخیصی تهاجمی به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص این میکروارگانیزم عنوان شده است. هلیکوباکتر پیلوری دارای فاکتورهای بیماری‌زایی زیادی است که باعث بقاء آن در محیط اسیدی معده می‌شود و همچنین اجازه می‌دهد تا باکتری در مخاط معده کلونیزه شود و با سیستم ایمنی میزبان مقابله کند و باعث تخریب بافتی شود. گسترش جغرافیایی ژنوتیپ‌های مختلف باکتری بین شرق آسیا و کشورهای اروپایی متفاوت است و بررسی اپیدمیولوژیک در ایران به دلیل قرار گرفتن در محل ارتباطی این کشورها دارای اهمیت فراوانی است که به نظر می‌رسد گسترش بیماری به فاکتورهای بیماری‌زایی سویه‌ی باکتری، حساسیت میزبان و فاکتورهای کمکی محیط بستگی دارد. مهم‌ترین تفاوت بین سویه‌های مختلف هلیکوباکتر پیلوری حضور یا عدم حضور ژن *cagA* و ژنوتیپ‌های مختلف ژن *vacA* است. به نظر می‌رسد حضور هم‌زمان ژن‌های *cagA* و آللهایی از *vacA* که دارای خاصیت واکوئله‌کنندگی هستند، باعث افزایش بیماری‌زایی باکتری می‌شود که در تیپ I طبقه‌بندی شده‌اند. تنها سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت تیپ II و III بوده‌اند (۱۱).

میزان شیوع عفونت در نقاط مختلف جهان، متفاوت است. در کشورهای غربی گاستریت و بیماری‌های خفیف

گوارشی و در کشورهای آسیای شرقی بیماری‌های گوارشی خطرناک‌تر از جمله سرطان معده رواج بیشتری دارند. از آنجا که ایران در خاور میانه واقع شده و از لحاظ اقتصادی و فرهنگی هم با کشورهای آسیای شرقی و هم با کشورهای غربی در ارتباط است، بررسی شیوع عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* و فاکتورهای ویروالانس در این کشور جهت درمان و کنترل بیماری ضروری به نظر می‌رسد. شیوع عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در ایران مانند بسیاری از کشورها بالا است. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهند که عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* با بیماری‌های دستگاه گوارش فوقانی ارتباط نزدیک دارد. از طرف دیگر نشان داده شده که عفونت با همه‌ی سویه‌های این باکتری منجر به بیماری نمی‌شود. با این که نقش عوامل بیماری‌زایی مثل *vaccA* و *cagA* در باکتری مورد بحث است؛ هنوز تفاوت‌های موجود بین باکتری‌هایی که در انسان ایجاد زخم یا سرطان می‌کنند با آن‌هایی که بیماری خفیف تولید می‌کنند یا عفونت آن‌ها با عارضه‌ای همراه نیست، مشخص نشده است. در این زمینه تأثیر عواملی مثل خصوصیات میزبانی انسان، موقعیت جغرافیایی و همچنین نوع سویه باکتریایی بر عواقب عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* به صورت گسترده‌ای در حال بررسی است. گزارش‌های مختلف نشان داده‌اند که تنوع ژنتیکی قابل توجهی در

جمعیت *هلیکوباکتر پیلوری* در نقاط مختلف دنیا وجود دارد. این تنوع ژنتیکی منجر به گوناگونی در خصوصیات بیماری‌زایی باکتری مثل مقاومت به آنتی‌بیوتیک، ویژگی چسبیدن به سلول‌های اپیتلیال و حتی تولید توکسین می‌گردد. به نظر می‌رسد زمانی که *هلیکوباکتر پیلوری* از یک میزبان انسانی به میزبان دیگری انتقال می‌یابد برای سازگاری با شرایط جدید ناگزیر دچار تغییرات و در نتیجه تنوع می‌شود. دلیل تنوع زیاد *هلیکوباکتر پیلوری* را مربوط به پدیده نوترکیبی می‌دانند که به طور مکرر در ساختار ژنوم باکتری صورت می‌گیرد. هم‌چنین وجود عفونت‌های مخلوط (وجود بیش از یک سویه در یک میزبان انسانی)، امکان تبادل ژنتیکی را بین سویه‌های مختلف فراهم می‌کند.

به دلیل میزان بالای تغییرات ژنتیکی در بین سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری*، روش‌های مولکولی متعددی برای تمایز سویه‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این روش‌ها شامل RFLP، Ribotyping، REP-PCR، PFGE و RAPD-PCR می‌باشند. در این مطالعه تنوع ژنتیکی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به بیماری‌های گوارشی با روش RAPD-PCR مورد بررسی قرار گرفته است. روش RAPD-PCR یکی از روش‌های

حساس و کارآمد مولکولی است که برای تعیین تنوع ژنتیکی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* در جوامع مختلف استفاده می‌شود. هم‌چنین این روش در مطالعات اپیدمیولوژیک از جمله بررسی امکان انتقال *هلیکوباکتر پیلوری* بین زوجها یا از طریق آشامیدن آب چاه، تشخیص آلوده بودن یک فرد با بیش از یک سویه باکتریایی و طراحی درخت فیلوژنی (دندروگرام) برای نمایش میزان قرابت ژنتیکی سویه‌های متفاوت یک گونه به کار می‌رود. در این روش از یک تک پرایمر چند نوکلئوتیدی (اغلب ۱۰ نوکلئوتیدی) استفاده می‌شود که ترادف‌های خاصی (ترادف‌های تکراری معکوس) را در ژنوم باکتری شناسایی و تکثیر می‌کند. با داشتن اطلاعات مربوط به محصولات PCR می‌توان الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی یک باکتری را به دست آورد. با تجزیه و تحلیل الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های به دست آمده از بیماران مختلف، می‌توان درخت فیلوژنی را رسم و سویه‌های باکتریایی را در دسته‌های معین تقسیم‌بندی کرد. در این مطالعه بر اساس اطلاعات به دست آمده از درخت فیلوژنی، امکان ارتباط بین سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* با الگوی انگشت‌نگاری خاص و ایجاد بیماری گوارشی معین، بررسی گردید (۱۲).

در سال‌های اخیر *هلیکوباکتر پیلوری* به عنوان یک عامل مهم در ایجاد بیماری‌های گوارشی از جمله زخم و سرطان معده مطرح شده است. بنابراین یکی از اقدامات اساسی در جهت پیشگیری از عواقب شدید عفونت این باکتری، شناسایی سویه‌های بیماری‌زا و تمایز آن‌ها از سویه‌های غیر بیماری‌زا و پی‌آمد آن به کارگیری فرمول‌های درمانی مناسب است. بررسی خصوصیات فنوتیپیک سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* مثل فعالیت اوره‌آز اطلاعات مفیدی در مورد طبیعت و شدت بیماری‌زایی آن‌ها در اختیار قرار نمی‌دهد، به همین دلیل دانشمندان هنوز با موشکافی‌های ظریف‌تر در جست و جوی شاخص‌هایی اختصاصی‌تر و دقیق‌تر هستند. الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی یک موجود مانند باکتری، حاوی اطلاعاتی است که الزاما به صورت صفات فنوتیپیک خاصی ظاهر نمی‌شود، ولی می‌تواند به عنوان یک شاخص ژنتیکی برای تمایز دقیق سویه‌های مورد استفاده قرار گیرد. RAPD-PCR یکی از روش‌هایی است که توسط آن می‌توان الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های باکتریایی را مشخص کرد. این روش امروزه کاربرد مهمی در تقسیم‌بندی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از بیماران مختلف پیدا کرده است.

Smith و همکاران قدرت تمایز روشهای RFLP، RAPD و آنالیز ساترن بلات وجود ژن *ureA* یا *ueCD* را روی ۳۳ سویه هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از افراد نیجری بررسی کردند و نتیجه گرفتند که قدرت تمایز و دسته‌بندی کردن^۴ و سادگی RAPD نسبت به دیگر روش‌ها بیشتر است. (۸).

در این مطالعه تعداد ۴۰ سویه هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران طبیعی و مبتلا به زخم و سرطان با روش RAPD-PCR از بیماران طبیعی و مبتلا به زخم و سرطان با روش RAPD-PCR مورد تجزیه و تحلیل مولکولی قرار گرفتند و الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی آن‌ها تعیین شد. در این بررسی با به کارگیری یک تک پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی، باندهای مخصوص به سویه تا ۱۳ قطعه مشاهده شد.

Akopyanz و همکاران در سال ۱۹۹۲ با به کارگیری تک پرایمرهای ۱۰ نوکلئوتیدی از جمله تک پرایمر ۱۲۸۱ نشان دادند که باندهای مخصوص به سویه تا ۱۵ قطعه بارز را تشکیل می‌دادند.

نتایج این مطالعه بر روی ۴۰ سویه هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران ایرانی نشان داد که هر یک از سویه‌ها الگوی مختص خودشان را دارند. Akopyanz و همکاران نیز با

استفاده از روش RAPD توانستند سویه‌های جدا شده از ۵۳ بیمار طبیعی، دو بیمار مبتلا به زخم معده و یک بیمار مبتلا به متاپلازی روده‌ای را از هم متمایز سازند. نتایج مطالعه مذکور نیز نشان داد که هر کدام از سویه‌ها الگوی مختص خودشان را دارند. نتایج این مطالعات میزان بالای تنوع ترادف‌های خاص DNA را در بین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری نشان می‌دهد.

در این بررسی بر اساس نتایج به دست آمده، سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری در ۹ گروه شامل دو گروه مربوط به سویه-های جدا شده از بیماران طبیعی و دو گروه مربوط به سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم قرار گرفتند. به دلیل این که باندهای مشابه در هر دو گروه سرطانی و طبیعی دیده نشد، گروه سویه‌های جدا شده از بیماران سرطانی شاخه جداگانه‌ای را در دندروگرام اشغال کردند. به دلیل وجود باند مشترک در بین سویه‌های مربوط به هر دو گروه بیماران طبیعی و دارای زخم بعضی از سویه‌های طبیعی هم در بین سویه‌های بیماران مبتلا به زخم قرار گرفتند.

با مطالعاتی که در آفریقای جنوبی روی ۱۶ سویه جدا شده از بیماران طبیعی، ۲۶ سویه از موارد زخم گوارشی و ۱۵ سویه از موارد سرطان معده با روش RAPD-PCR انجام گرفت، نشان داده شد که الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های

^۴ -Typeability

هلیکوباکتر پیلوری از ۷-۱ باند مجزا به اندازه ۴۶۰۰-۱۰۰ جفت باز متغیر است. تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنی در مطالعه مذکور نشان داد که تنوع ژنتیکی در بین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد و سویه‌ها با ضریب شباهت $43 \pm 64/2\%$ در دو گروه مجزا قرار می‌گیرند (۱۳).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر و مطالعات مشابه نشان می‌دهند که روش RAPD-PCR یک روش مناسب برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی در بین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری است. نتایج این مطالعه نشان داد که تنوع ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری آن قدر گسترده است که نمی‌توان سویه‌های مربوط به بیماران طبیعی، دارای زخم و سرطان را در گروه‌های معین و جداگانه قرار داد. در عین حال این نتیجه‌گیری زمانی قابل استناد است که تعداد گزارش‌ها افزایش یابد و تعداد سویه‌های بیشتری از هلیکوباکتر پیلوری و با پرایمرهای بیشتری در هر مطالعه بررسی شوند. اعضای گونه هلیکوباکتر پیلوری به دلیل قرار گرفتن در میزبان‌های انسانی متفاوت و مواجهه با شرایط محیطی مختلف ممکن است دستخوش تغییراتی شوند که نتیجه سازگاری مطلوب با میزبان و ظهور زیرگونه‌های جدید است. تعیین این زیرگونه‌ها از نظر اپیدمیولوژی و تعیین منشأ آلودگی و راه انتقال مهم است.

مراجع

1. Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP, Tham KT, Camorlinga M, Blaser MJ, Falkow S, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. J Clin Invest 2001; 107: 611-620
2. Yakoob J, Hu GL, Fan XG, Yang HX, Liu SH, Tan DM, Li TG, Zhang Z. Diversity of *Helicobacter pylori* among Chinese persons with *H pylori* infection. APMIS 2000; 108: 482-486.
3. Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. Roc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 14625-14630.
4. Jafari F, Shokrzadeh L, Dabiri H, Baghaei K, Yamaoka Y, Zojaji H, Molaei M, Zali MR. *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* in relationship to *cagA* status and clinical outcomes. Jpn J Infect Dis. 61(7): 2008; 290-293
5. Mohammadi M, Oghalaei A, Mohajerani N, Masserat S, Nasiri M, Colding H, Anderson LP. Prevalance of *Helicobacter pylori* vaculating cytotoxin and its allelic musaism as a predictive marker for Iranian dyspeptic patients. Bull Soc Pathol Exot. 2003; 96 (1): 31-38.
6. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: areview. Helicobacter. 2004; 9 (7):115-23.
7. Konno M, Fujii N, Yokota S, Sato K, Takahashi M, Sato K et al. Five-year follow up study of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by a random amplified polymorphic DNA fingerprinting method. J Clin Microbiol. 2005; 43(5)2246-2250
8. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. Nucleic Acids Res. 1992; 20: 5137-42
9. Mansour-Ghanaei F, Yousefi M, Joukar F. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among children in Rasht, Northern Iran. Mid East j dig dis. 2009;1(2): 84-88.
10. Govorun VM, Lokhov PG, Moshkovskii SA, Momynaliev KT, Selesnyova OV, Kudryavtseva LV et al. Comparative analysis of different typing methods for *Helicobacter pylori* clinical isolates. Biochemistry. 2004; 69(5):536-4111.
11. Zhou L, Sung JJ, Lin S. A five-year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after *H. pylori* eradication. Chin Med J. 2003; 116: 11-4.

12. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 1990; 24: 7213-7218.

13. Kidd M, Atherton JC, Lastovica AJ et al. Clustering of South African *Helicobacter pylori*

isolates from peptic ulcer disease patients is demonstrated by repetitive extragenic palindromic-PCR. J Clin Microbiol. 2001; 39: 1833-1839.

Genotyping of *Helicobacter pylori* strains isolated from biopsy samples in Shahrekord city by RAPD-PCR

Hossein Aghajani^{*1}, Hossein Khodabandeh¹

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

* Corresponding author: bardiyaaghajanidezaki@gmail.com

Absteract:

Helicobacter pylori is an important cause of gastrointestinal diseases. Since genetic diversity within the *Helicobacter pylori* population occurs in large quantities, methods such as RAPD-PCR were used to determine the possible relationship between specific *Helicobacter pylori* genotypes and various gastric diseases. In this study, the genetic pattern of *Helicobacter pylori* strains isolated from different patients with dyspepsia was investigated by RAPD-PCR.

During this study, biopsy samples from 40 patients, including 20 normal patients, 16 ulcer patients, and 4 cancer patients, were extracted using a DNA extraction kit manufactured by Cinagene Company, and the strains were identified in the presence of *16srRNA* primers.

In this study, after performing the determined in the presence of specific primers and the strains were genotyping was performed by RAPD-PCR. PCR test for the definitive diagnosis of *Helicobacter pylori*, all samples were detected positive with a band of 109 base pairs. The *vacA* gene was detected in 30 samples (70%) and the *cagA* gene in 2 samples. In the dendrogram obtained in the RAPD-PCR test in 40 *Helicobacter pylori* strains examined in biopsy samples, a general affinity between 54 and 98% among the isolates is evident. All isolates were distinguished from each other in 9 main clusters. At a similarity coefficient of 80%, a total of 30 profiles including 9 clusters and 21 separate points were identified.

In the examination of electrophoretic DNA fragments, the following patterns were observed, indicating that the results obtained are genetically diverse and heterogeneous. The results obtained on 20 strains isolated from normal patients showed that each of the strains has its own genetic fingerprint pattern.

Keywords: Biopsy, Genotyping, *Helicobacter pylori*, RAPD-PCR



رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۲ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۳

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



در سویه‌های *استافیلوکوکوس ica* تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی فراوانی ژن‌های اوپرون ساپروفیتیکوس جدا شده از موارد کلینیکی شهرستان شهرکرد

فروغ صدیقی^۱، حسین آقاجانی^۱، حسین خداپنده^۱، فاطمه نعمت الهی^۱، الهه تاج بخش^{۱*}

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخچه مقاله:</p> <p>دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۷</p> <p>پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۹</p> <p>چاپ: ۱۴۰۴/۰۴/۱۵</p> <p>DOI:</p> <p>کلمات کلیدی: <i>استافیلوکوکوس ica</i>، ساپروفیتیکوس، اوپرون عفونت ادراری، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی</p> <p>* نویسنده مسئول: Email: ee_tajbakhsh@yahoo.com</p>	<p><i>استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس</i> یکی از عوامل عفونت مجاری ادراری می‌باشد. با توجه به گسترده‌گی سویه‌ها و وجود عوامل بیماری‌زا هزینه‌های بالایی جهت جداسازی، تشخیص و درمان این باکتری صورت می‌گیرد. این مطالعه به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی-بیوتیکی و فراوانی ژن‌های اوپرون <i>ica</i> در ایزوله‌های <i>استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس</i> جدا شده از مواد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد انجام گرفت. این تحقیق بر روی ۳۴ ایزوله <i>استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس</i> جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد صورت گرفت. بعد از انجام تست‌های بیوشیمیایی به منظور تشخیص باکتری، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش کربی بائر بررسی گردید. جهت بررسی فراوانی ژن‌های <i>tetK</i>، <i>ant(4)</i>، <i>ermA</i>، <i>vanA</i>، <i>icaA/C/D/B/R</i> و <i>ica</i> آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از زوج پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۹۱/۲ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به وانکومايسين (۵/۹ درصد) گزارش شد. فراوانی ژن <i>tetK</i> ۶۴/۷ درصد، <i>ermA</i> ۵۵/۸۸ درصد، <i>ant(4)-Ia</i> ۲۰/۵۸ درصد و <i>vanA</i> صفر درصد گزارش گردید. در ۲۵ ایزوله ژن <i>icaA</i> (۷۳/۵۲ درصد)، در ۲۲ ایزوله <i>icaD</i> (۶۴/۷۰ درصد) در ۷ ایزوله <i>icaC</i> (۲۰/۵۸ درصد)، در ۵ ایزوله <i>icaB</i> (۱۴/۷ درصد) و در ۵ ایزوله <i>icaR</i> (۱۴/۷ درصد) گزارش گردید.</p> <p>نتایج نشان می‌دهد <i>استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس</i> نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی درمان عفونت‌ها مقاومت دارد. عدم وجود ارتباط آماری معنی‌دار بین مقاومت با دیسک و مقاومت به روش مولکولی نشان دهنده انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌ها از طریق عوامل دیگری نظیر اینتگرون‌ها و ترانسپوزون‌ها می‌باشد</p>

مقدمه

بیش از دو دهه از پیدایش / استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی به عنوان پاتوژن فرصت طلب می گذرد. این باکتری ها دارای گستردگی وسیعی در طبیعت بوده و جزء باکتری های بیماری زا فرصت طلب محسوب می گردند (۱). سه گونه حائز اهمیت بالینی جنس / استافیلوکوکوس عبارتند از / استافیلوکوکوس ارئوس، / استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و / استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس. خصوصیت مشترک این باکتری ها در کروی شکل بودن، گرم مثبت بودن، عدم وجود اندوسپور و دارا بودن فعالیت کاتالازی می باشد (۳-۱). استافیلوکوک های کوآگولاز منفی یکی از مهم ترین عوامل عفونت های بیمارستانی مربوط به نوزادان خصوصا در نوزادان نارس و کم وزن می باشند و یکی از مهم ترین آلاینده های کشت محسوب می شوند (۴،۵). خصوصیات برجسته این میکروارگانیسم ها توانایی در چسبیدن و رشد بر روی سوندها و دیگر ابزار پزشکی می باشد. پس از تماس اولیه و اتصال به سطح سلول های باکتریایی، بیوفیلم که یک فاکتور ویروانس مهم می باشد تولید می گردد. بیوفیلم شامل فاکتور چسبندگی بین سلولی پلی ساکارییدی که به وسیله اوپرون *ica* کد می شوند. این اوپرون شامل ژن های *icaADBC* و ژن تنظیم کننده *ica*

R می باشد که از رونویسی اوپرون *ica* جلوگیری می کند (۶،۷). نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده روی مراحل تشکیل بیوفیلم نشان می دهد که تجمع سلولی و سنتز کپسول پلی ساکارییدی به واسطه اوپرون *ica* انجام می شود. / استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس یک پاتوژن ادراری معروف، بدون ارتباط با سوندهای جایگزین شده می باشد. این یافته نشان می دهد که باکتری دارای توانایی احتمالی چسبیدن و رشد مستمر در مجاری ادراری را دارا می باشد (۸-۱۳). مقاومت به عوامل ضد میکروبی یک مسئله در حال افزایش جهانی، مخصوصا در بین الگوهای بیمارستانی است. / استافیلوکوکوس یکی از شایع ترین عوامل عفونت های بیمارستانی است. مقاومت به چند دارو در استافیلوکوکوس یک مشکل مهم برای سلامت انسان خواهد بود. افزایش مقاومت دارویی سویه های مقاوم به متی سیلین مشکل جدی در درمان و کنترل عفونت های / استافیلوکوکی است. مهم ترین مکانیسم های مقاومت در مورد پنی سیلین تولید بتالاکتام هایی است که پنی سیلین را از طریق هیدرولیز حلقه ی بتالاکتام آن غیرفعال می کنند (۱۴،۱۵). با توجه به این که در شهرستان شهرکرد تاکنون تحقیقی در مورد تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی فراوانی ژن های اوپرون *ica* در ایزوله های / استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس

جدا شده از موارد عفونت ادراری صورت نگرفته در این تحقیق بر آن شدیم تا به بررسی این فاکتورها بپردازیم.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۳۴ ایزوله *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ردیابی ژن های *icaA/C/D/B/R* مورد بررسی قرار گرفتند.

الف) نمونه گیری و جداسازی *استافیلوکوکوس*

ساپروفیتیکوس

به منظور جداسازی باکتری نمونه های ادرار مورد بررسی در محیط بلاد آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری از نظر رنگ آمیزی گرم، تست های کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر قندهای گزیلوز، ساکارز، ترهالوز، مالتوز، مانیتول، همولایزین و حساسیت نسبت به نوبیوسین مورد بررسی قرار گرفتند (۱۶، ۱۷). در این تحقیق از سویه استاندارد *Staphylococcus saprophyticus* PTCC 1440 تهیه شده از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی به عنوان سویه استاندارد استفاده گردید

ب) تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* از روش کربی بائر (انتشار دیسک) طبق دستورالعمل CLSI استفاده شد. دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده شامل پنی سیلین (۱۰ واحد)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اگزاسیلین (۱ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم)، ریفامپین (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، گلوکزاسیلین (۵ میکروگرم)، وانکومایسین (۳۰ میکروگرم)، آموکسی کلاو (۳۰ میکروگرم)، سفالکسین (۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) استفاده گردید. در این روش سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل ۵ درصد مک فارلند بر روی محیط مولر هیتون آگار تلقیح گردید. پس از گذاشتن دیسک ها در محیط کشت و ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد برای هر آنتی بیوتیک با دستورالعمل مربوطه به عنوان حساس و مقاوم ثبت گردید (۱۸).

ج) آزمایشات مولکولی

به منظور فراوانی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی و ژن های *ica* در ایزوله های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* ابتدا DNA ژنومی ایزوله های جدا شده با استفاده از کیت استخراج DNA (فرمنتاز، لیتوانی) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده

ردیابی ژنهای *ermA*، *vanA*، *ant(4)-Ia*، *tetK* و ژنهای
ica در جدول (۱) نشان داده شده است.

استخراج و بسته به اندازه قطعات ژنی آزمایش PCR روی
DNA انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت

ژن	توالی پرایمر	دمای	اندازه		بررسی شماره
			انلیتگ	محصول	
<i>ant(4)-Ia</i>	F: AATCGGTAGAAGCCCAA R: GCACCTGCCATTGCTA	۵۰	۱۳۵		CP029663.1
<i>van A</i>	F: ATGAATAGAATAAAAGTTGC R: TCACCCCTTTACGCTAATA	۵۰	۴۷۴		AE017171.1
<i>tet K</i>	F: GTAGCGACAATAGGTAATAGT R: GTAGTGACAATAAACCTCCTA	۵۶	۳۶۰		NG_055987.1
<i>erm A</i>	F: GCGGTAAACCCCTCTGAG R: GCCTGTGCGGAATTGG	۵۶	۴۳۴		KX638975.1
<i>ica A</i>	F: ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA R: GGA AAT GCC ATA ATG ACA AC	۵۴	۱۰۳		AF500267.1
<i>ica B</i>	F: CTG ATC AAG AAT TTA AAT CAC AAA R: AAA GTC CCA TAA GCC TGT TT	۵۴	۳۰۲		U43366.1
<i>ica R</i>	F: TAA TCC CGA ATT TTT GTG AA R: AAC GCA ATA ACC TTA TTT TCC	۵۴	۴۶۹		U43366.1

<i>ica C</i>	F: TAACTT TAG GCG CAT ATG TTT RTTC CAG TTA GGC TGG TAT TG3	۵۴	۴۰۰	U43366.1
<i>ica D</i>	F: ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG R: CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	۵۴	۱۹۸	U43366.1

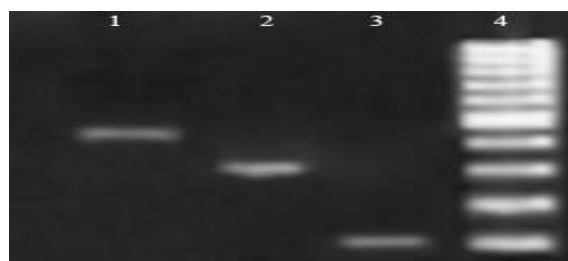
ermA، *vanA*، *ant(4)-Ia*، *tetK* جدول (۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده و برنامه دمایی جهت ردیابی ژن های

منبع	برنامه دمایی PCR	(۲۵ میکرولیتر) PCR حجم	ژن
۲۱،۲۲	1 cycle: 94 °C ----- 5 min. 30 cycle: 94 °C ----- 60 s 50 °C ----- 60 s 72 °C ----- 60 s 1 cycle: 72 °C ----- 5 min	۲/۵ PCR میکرولیتر بافر ۲/۵ میلی مول کلرید منیزیم (فرمنتاس) (فرمنتاس) Mix dNTP ۱۰۰ میکرومول پلی مراز (فرمنتاس) DNA واحد آنزیم پلی مراز مربوط به هر نمونه DNA ۲ میکرولیتر	<i>Ant (4)-Ia, Van A</i>
۱۹،۲۰	1 cycle: 94 °C ----- 5 min. 30 cycle: 94 °C ----- 60 s 54 °C ----- 60 s 72 °C ----- 60 s 1 cycle: 72 °C ----- 5 min	۲/۵ PCR میکرولیتر بافر ۲/۵ میلی مول کلرید منیزیم (فرمنتاس) (فرمنتاس) Mix dNTP ۱۰۰ میکرومول پلی مراز (فرمنتاس) DNA واحد آنزیم پلی مراز مربوط به هر نمونه DNA ۲ میکرولیتر	<i>tet K, erm A</i>
۲۳	1 cycle: 94 °C ----- 5 min. 30 cycle: 94 °C ----- 45 s 54 °C ----- 60 s	۲/۵ PCR میکرولیتر بافر ۲/۵ میلی مول کلرید منیزیم (فرمنتاس) (فرمنتاس) Mix dNTP ۱۰۰ میکرومول	<i>ica A, ica B, ica R</i>

پلی مرز (فرمنتاس) DNA واحد آنزیم پلی مرز		60 s ----- 72 °C	
مربوط به هر نمونه DNA ۲ میکرولیتر		1 cycle:	
		5 min ----- 72 °C	
<i>ica C, ica D</i>	PCR ۲/۵ میکرولیتر بافر	1 cycle:	۲۳
۲/۵ میلی مول کلرید منیزیم (فرمنتاس)		5 min. ----- 95 °C	
30 cycle:			
100 Mix dNTP (فرمنتاس) میکرومول		45 s ----- 95 °C	
پلی مرز (فرمنتاس) DNA واحد آنزیم پلی مرز		60 s ----- 54 °C	
مربوط به هر نمونه DNA ۲ میکرولیتر		60 s ----- 72 °C	
		1 cycle:	
		5 min ----- 72 °C	

ترهالوز، مانیتول، ساکاروز و مالتوز می باشد. از ۳۴ نمونه مورد بررسی ۲۴ ایزوله (۷۰/۵۸٪) از نمونه ادرار، ۶ ایزوله (۱۷/۶۴ درصد) از نمونه زخم و ۴ ایزوله (۱۱/۷۶ درصد) از کیسه های دیالیز جدا شده بودند.

پس از انجام آزمون PCR در ۲۵ ایزوله ژن *icaA* (۷۳/۵۲ درصد)، در ۲۲ ایزوله *icaD* (۶۴/۷۰ درصد) در ۷ ایزوله *icaC* (۲۰/۵۸ درصد) در ۵ ایزوله *icaB* (۱۴/۷ درصد) و در ۵ ایزوله *icaR* (۱۴/۷ درصد) گزارش گردید.



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR ژن های *icaB*, *icaR*

و *icaA*. ستون ۴: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتاز، ستون ۱: باند ۴۶۹

به منظور ردیابی قطعه ژنی تکثیر یافته در PCR، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۲ درصد آگاروز واجد محلول رنگی DNA Safe Stain (سیناژن-ایران) در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمتاز، لیتوانی) صورت گرفت. و پس از مشاهده ژل به دست آمده با دستگاه تراس لومیناتور (انگلستان، Uviteck) تصویر به دست آمده روی کاغذ حرارتی ثبت شد.

یافته ها:

استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس کاتالاز و کوآگولاز و همولیز منفی می باشد و نسبت به نوویوسین نیز مقاوم می باشد کلونی های این باکتری در محیط بلاد آگار واکنش همولایزین منفی و مقاومت نسبت به نوویوسین نشان دادند. استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس قادر به تخمیر قندهای گزیلوز،

جفت بازی مربوط به ژن *icaR* ستون ۲: باند ۳۰۲ جفت بازی

مربوط به ژن *icaB* ستون ۳: باند ۱۰۳ جفت بازی مربوط به ژن

icaA



شکل ۴-۲. الکتروفورز محصولات PCR ژنهای *icaC*, *icaD*

ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، ستون ۲: کنترل منفی،

ستونهای ۳ و ۴: باند ۱۹۸ جفت بازی مربوط به ژن *icaD* ستون

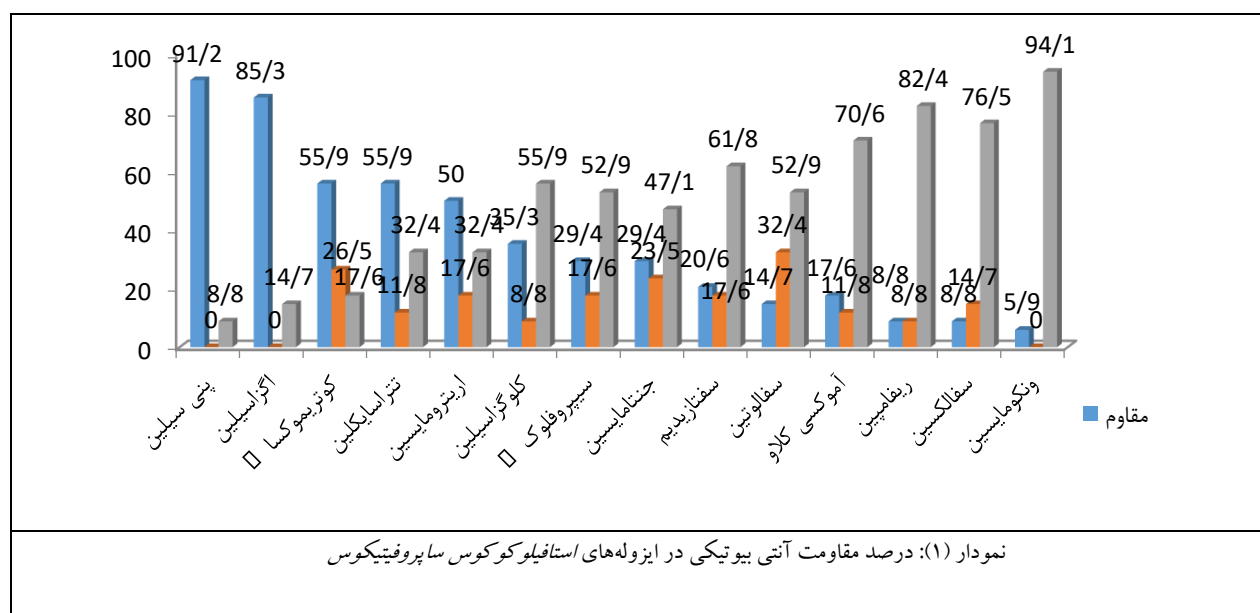
۵ و ۶: باند ۴۰۰ جفت بازی مربوط به ژن *icaC*

پس انجام تست آنتی بیوگرام با استفاده از روش دیسک

دیفیوژن، بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک پنی سیلین (۹۱/۲٪) و

کمترین مقاومت نسبت به وانکومایسین (۵/۹٪) گزارش گردید.

نتایج در نمودار (۱) نشان داده شده است.



در قسمت ردیابی ژنهای کد کننده مقاومت آنتی-

ارتباط آماری معنی دار ($pvalue > 0/05$) مشاهده نگردید

بیوتیکی فراوانی ژن *tetK* ۶۴/۷ درصد، ژن *ermA* ۵۵/۸

درصد، ژن *ant(4)-Ia* در ۷۰٪ و ژن *vanA* در هیچ کدام از

ایزوله ها گزارش نگردید. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون

مربع کای بین مقاومت با آنتی بیوتیک و ژنهای مورد بررسی

(جدول ۲).

جدول (۲): فراوانی ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس

نوع ژن	آنتی بیوتیک	مقاومت با دیسک	مقاومت به روش تشخیص مولکولی
<i>tet K</i>	تتراسایکلین	۱۹ ٪ ۵۵/۸۸	۲۲ ٪ ۶۴/۷
<i>ant(4)-Ia</i>	جنتامایسین	۱۰ ٪ ۲۹/۴۱	۷ ٪ ۲۰/۵۸
<i>vanA</i>	ونکومایسین	۲ ٪ ۵/۸۸	۰ ٪ ۰
<i>ermA</i>	اریترومایسین	۱۷ ٪ ۵۰	۱۹ ٪ ۵۵/۸۸

۴۹ تقسیم شدند. بیشترین میزان آلودگی در گروه سنی بالای

۴۹ سال مشاهده گردید. نتایج مربوط به جنسیت و گروه سنی

به تفکیک در جدول نشان داده شده است.

از ۳۴ نمونه مورد بررسی ۳۰ نمونه مربوط به جنسیت زن و ۴

نمونه مربوط به جنسیت مرد بودند. از نظر گروه سنی نمونه های

مورد بررسی به ۵ گروه ۱۹-۱، ۲۹-۲۰، ۳۹-۳۰، ۴۹-۴۰ و بالای

گروه سنی	جنسیت			
	مرد	٪	زن	٪
۱-۱۹	۰	٪ ۱۰/۱۳۴	۷	٪ ۱۳/۷۲
۲۰-۲۹	۲	٪ ۱۳/۷۹	۱۱	٪ ۲۱/۵۶
۳۰-۳۹	۱	٪ ۲۰/۶۸	۹	٪ ۱۷/۶۴
۴۰-۴۹	۱	٪ ۲۰/۶۸	۶	٪ ۱۱/۷۶
>۴۹	۰	٪ ۳۴/۴۸	۱۸	٪ ۳۵/۲۹
جمع	۴	٪ ۱۰۰	۳۰	٪ ۱۰۰

انسان، ۱۵ ایزوله (۸۳٪) تشکیل بیوفیلم دادند. در این مطالعه تمامی جدایه‌هایی که از نظر فتوتیپی قادر به تشکیل بیوفیلم بودند، ژن‌های *icaA* در آن‌ها نیز مثبت گزارش گردید و ایزوله‌هایی که از لحاظ فتوتیپی منفی بودند فاقد ژن‌های *ica* بودند (۲۶). Zhou و همکارانش در ۲۰۱۳ طی مطالعات خود بر روی ۸۲ ایزوله /استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس نشان دادند که همه ایزوله‌های /استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس تولید کننده لایه اسلایم از لحاظ وجود ژن‌های *icaA* نیز مثبت هستند و ارتباط زیادی بین فراوانی دو ژن *icaA* و *icaD* تولید کننده لایه اسلایم وجود دارد (۲۷).

در تحقیق ما ژن *icaA* با فراوانی ۷۳/۵۲٪ و ژن *icaD* با فراوانی ۶۴/۷۰٪ از بالاترین فراوانی و ژن‌های *icaB* و *icaC* و *icaR* با فراوانی ۲۰/۵۸ درصد، ۱۴/۷۰ درصد، ۱۴/۷۰ درصد گزارش گردیدند که نسبت به تحقیق Arcioha و همکارانش که بر روی ۱۰۱ ایزوله بالینی /استافیلوکوکوس/ساپروفیتیکوس و /استافیلوکوکوس/آرئوس صورت گرفت، ژن‌های *icaA* و *icaD* نسبت به تحقیق ما از میزان کمتری برخوردار بود در این تحقیق ۴۹٪ از ایزوله‌های /استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس که از نظر تولید لایه اسلایم مثبت تشخیص داده شده بودند، ژن‌های *icaA* و *icaD* را نیز دارا بودند (۲۸). در مطالعه‌ای که توسط Chaieb و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در ایزوله‌های

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوک‌ها در طبیعت بسیار گسترده می باشند و می توانند به صورت همزیست در پوست، غشای مخاطی و سایر بخش‌ها در انسان و حیوان تشخیص داده شوند این باکتری دارای ادھسین (پروتئین چسبنده) از نوع لاکتوز آمین است که موجب اتصال باکتری به سلول‌های ادراری می‌شود. در این باکتری مهم‌ترین فاکتور ویروالانس در ایجاد عفونت‌های ادراری توانایی چسبیدن به سلول‌های اپی تلیال دستگاه ادراری می‌باشد (۵،۴). در بعضی از مطالعات ژن‌های *icaD*, *icaC*, و *icaA* به عنوان عوامل تولید بیوفیلم معرفی شده اند، به طوری که در مطالعه‌ی انجام شده توسط Ziebuhr و همکارانش در سال ۱۹۹۹ به اثبات حضور ژن *ica* در بیماری‌زایی و تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های /استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس در بیماران دارای عفونت مرتبط با ابزار پزشکی مشخص گردید (۲۴). هم-چنین در مطالعه‌ای Cafiso و همکارانش در سال ۲۰۰۴ همبستگی قوی بین درصد حضور ژن‌های *icaA* و *icaD* و تولید لایه چسبنده اسلایم در ایزوله‌های استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی مشخص گردید (۲۵). در مطالعه Gad و همکارانش که در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت نشان داده شد که از ۱۸ ایزوله /استافیلوکوکوس/اورئوس جدا شده از سوندهای ادراری

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از بیماران کلیوی انجام شد، فراوانی ژنهای *icaA* / *icaD* ۷۱/۹ درصد گزارش گردید که با نتایج حاصل از تحقیق ما مشابه می باشد (۲۹). Oliveira و همکارانش در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ بر روی *استافیلوکوکوس کوآگولاز* منفی در مورد فراوانی ژنهای *icaA* و *icaC* و *icaD* انجام دادند نتایج این آزمایش نشان داد که ژنهای *icaA* و *icaD* در ۴۰٪ ایزوله‌ها و ژن *icaC* در ۴۲٪ ایزوله‌ها وجود دارد که نسبت به تحقیق ما از فراوانی کمتری برخوردار می باشد (۳۰). Wojtyczka و همکارانش در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ بر روی ۳۲ گونه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* انجام دادند وجود ژنهای *icaADBC* را در ۱۵ ایزوله (۴۶/۸۸٪) نشان دادند. در این تحقیق فراوانی ژنهای *icaA* و *icaD* به ترتیب در ۳۴/۳۸ درصد و ۲۸/۱۳ درصد و ژن *icaC* در ۳۷/۵ درصد گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از فراوانی کمتری برخوردار بود (۳۱).

مطالعات بعضی از محققان نشان می دهد که ارتباطی بین تولید بیوفیلم و ژنهای *ica* وجود ندارد و عوامل دیگری نظیر حضور گلوکز، pH، شرایط بافت‌های بدن و تولید بیوفیلم از طریق مکانیسم‌های مستقل از PIA در تولید بیوفیلم موثر می باشد، به طوری که Alcaraz و همکارانش در سال ۲۰۰۳ تولید بیوفیلم در *استافیلوکوکوس* های گوآگولاز منفی در نمونه‌های

بالینی و محیطی را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق مشخص گردید که تولید بیوفیلم در هر گروه محیطی و بالینی مشابه بود و مشخص شد در تولید بیوفیلم به غیر از ژن *ica* شرایط محیطی نیز دخالت دارد (۳۲). هم‌چنین در مطالعه‌ی Eftekhar و همکاران در سال ۲۰۰۹ که بر روی ۵۰ نمونه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از بیماران دارای علامت و ۵۰ نمونه جدا شده از پوست افراد سالم انجام شد، نشان داده شد که تفاوت معنی داری بین دو گروه مطالعه شده در تشکیل بیوفیلم وجود ندارد و از طرفی در حدود ۳۰ درصد از نمونه‌های جدا شده از بیماران و ۸ درصد نمونه‌های جدا شده از پوست، حامل ژن *ica* بودند و نتیجه گرفته شد که عوامل محیطی تحریک کننده دیگری به غیر از ژن *ica* در تولید بیوفیلم در شرایط محیطی دخیل است (۳۳).

امروزه بیشترین تمرکز در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی باکتری‌هایی است که از نمونه‌های بالینی (پزشکی و دامپزشکی) جدا می شوند. تحقیقات نشان می دهد که باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ژنهای مقاومت آنتی-بیوتیکی در همه جای طبیعت وجود دارند. به طوری که شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در فاضلاب‌های مراکز پزشکی، صنعتی و مراکز پرورش حیوانات گزارش شده است. در این محیط‌ها انتقال افقی ژنهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی به راحتی

صورت می گیرد (۳۶-۳۴). در تحقیق حاضر بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین و اگزاسیلین (۹۱/۱۷ درصد، ۸۵/۲۹ درصد) و پس از آن مقاومت نسبت به کوتریموکسازول، تتراسایکلین، اریترومایسین (۵۵/۸۸ درصد، ۵۵/۸۸ درصد، ۵۰ درصد، گزارش گردید. کمترین مقاومت نسبت به ونکومایسین (۵/۹ درصد) مشاهده شد. که در تحقیق Rahimi و همکاران نیز بیشترین مقاومت نسبت به پنی سیلین (۸۰ درصد) گزارش گردید در صورتی که مقاومت نسبت به ونکومایسین گزارش نشد (۳۷). در تحقیق Kolkas و همکاران مقاومت نسبت به جنتامایسین، اریترومایسین، کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و ونکومایسین به ترتیب: ۱۷درصد، ۳۷ درصد، ۳۸ درصد، ۲۳ درصد، ۴۵ درصد و صفر درصد گزارش گردید. که در تحقیق ما مقاومت بیشتری نسبت به این آنتی بیوتیک ها گزارش شده است (۳۸). Islami و همکاران از مجموع ۱۰۰ ارگانیزم جدا شده از ضایعات پستی بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در *استافیلوکوک های* کوآگولاز منفی را نسبت به پنی سیلین (۹۳ درصد)، آموکسی سیلین (۸۷/۳ درصد) و اگزاسیلین (۸۰/۴ درصد) را گزارش نمودند که با نتایج حاصل از تحقیق ما مشابه می باشد (۳۹). مقاومت در برابر چندین آنتی بیوتیک یکی از خصوصیات اصلی *استافیلوکوک های* کوآگولاز منفی است.

الگوی واحدی برای بروز مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها وجود ندارد. مقاومت چندگانه به آنتی بیوتیک نه تنها سبب مشکلاتی در درمان سپتی سمی ها می گردد، بلکه احتمال انتقال ژن های مقاوم به *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز وجود دارد. در برخی از بیمارستان ها *استافیلوکوک های* کوآگولاز منفی به کوتریموکسازول و جنتامایسین مقاومت زیادی دارد اما در مناطق دیگر حساس هستند. به طوری که در تحقیق ما مقاومت نسبت به کوتریموکسازول ۵۵/۸۸ درصد و مقاومت نسبت به جنتامایسین ۲۹/۴۱ درصد گزارش گردید. امروزه به علت مصرف بی رویه و خودسرانه آنتی بیوتیک کوتریموکسازول (ترکیب تری متوپریم و سولفونامید) در موارد عفونت های انسانی و انتقال ژن مقاومتی به باکتری های دیگر باشد به طوری- که موفقیت درمان با این آنتی بیوتیک در بیماران (مبتلا به عفونت های مجاری ادراری) رو به کاهش است. به این ترتیب انتقال ژن های مقاومت به باکتری های موجود در محیط می تواند باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* می گردد (۴۰).

از جمله آنتی بیوتیک هایی که در این تحقیق در بین ایزوله های *استافیلوکوکوس ساپروفیتییکوس* مقاومت بالایی نسبت به آن مشاهده شد تتراسایکلین می باشد این آنتی بیوتیک به دلیل قیمت پایین و کم بودن اثرات جانبی آن کاربرد وسیعی

در درمان عفونت‌های دامی و انسانی دارد. در صنعت دام‌داری از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به‌عنوان پروموتور رشد آنتی-بیوتیکی استفاده فراوانی می‌گردد، که یکی از این پروموتورهای رشد، تتراسیکلین می‌باشد. استفاده بیش از حد و کنترل نشده از این آنتی‌بیوتیک در دام‌ها باعث افزایش سویه‌های باکتریایی مقاوم به آن شده است. مقاومت به تتراسیکلین، مربوط به ژن‌های *tet* می‌باشد. پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها از عوامل اصلی گسترش سریع ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین در میان سویه‌های باکتریایی می‌باشد (۴۱).

در تحقیق حاضر بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های مقاومتی مورد بررسی رابطه آماری معنی دار مشاهده نگردید که نشان دهنده این است که عوامل دیگری نظیر اینتگرون‌ها و ترانسپوزون‌ها به غیر از ژن‌های مذکور می‌توانند در انتقال مقاومت نقش داشته باشند. شیل و همکاران در سال ۱۹۹۱ گزارش کردند که سپی‌سمی‌های ناشی از *استافیلوکوک‌های* کواگولاز منفی از سال ۱۹۸۵ تا ۱۹۸۹ به میزان ۳۹٪ افزایش یافته است. مقاومت چندگانه به این باکتری نیز هر ساله افزایش پیدا می‌کند. در سال ۱۹۸۹ در نروژ ۴۸/۸ درصد *استافیلوکوک‌های* کواگولاز منفی به چندین دارو مقاوم بودند. این محققان مقاومت به متی‌سیلین، کلرامفنیکل و پنی‌سیلین را ۲۱/۲۶ درصد، ۷۲/۹ درصد، ۲۱/۷ درصد گزارش کردند (۴۲).

در مطالعه‌ی انجام شده توسط Zmantar و همکارانش در سال ۲۰۱۱ که بر روی ۱۷۱ ایزوله *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی صورت گرفت، فراوانی ژن‌های مقاوم به اریترومايسين به-صورت ۹/۴ درصد ژن *ermA*، ۱۱/۱ درصد ژن *ermB*، ۴ درصد *ermC* و ۴۱ درصد ژن *msrA* گزارش گردید. (۴۳).

در مطالعه‌ی انجام شده توسط Ullah و همکارانش در سال ۲۰۱۲ که بر روی حدود ۱۳۰ ایزوله *استافیلوکوکوس* صورت گرفت از ۱۳۰ ایزوله‌ی مورد بررسی ۶۰ نمونه (۴۶ درصد) *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* مقاوم به متی‌سیلین، ۷۰ نمونه (۵۴ درصد) *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* حساس به متی‌سیلین، ۷۴ نمونه (۵۶/۹ درصد) مقاوم به تتراسیکلین، ۳۰ نمونه (۲۳/۱۰ درصد) مقاوم به مینوسایکلین، ۲۳ نمونه (۱۷/۷ درصد) مقاوم به دگزا سايكلين می‌باشند. در این تحقیق ژن *tetK* در ۵۸ ایزوله و ژن *tetL* در ۱ ایزوله گزارش گردید (۴۴). در این تحقیق مشخص گردید *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* نسبت به وانکومايسين، سفالکسين، ريفامپين و آموکسی کلاو حساس می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مقاومت چندگانه در بین *استافیلوکوک‌ها* رژیم دارویی بایستی براساس آنتی‌بیوگرام انجام شود. روش‌های تعیین تیپ مولکولی و روش‌های تعیین بیوتیپ برای مطالعه بیشتر توصیه می‌شود. با توجه به نتایج آزمون حساسیت

و مقاومت دارویی به صورت آزمایشگاهی می توان گفت که وانکومایسین داروی انتخابی بوده و می توان آنرا به تنهایی یا به همراه آنتی بیوتیک های دیگر مورد استفاده قرار داد. اما با توجه به پیدایش مقاومت به وانکومایسین در این منطقه از این دارو نباید بیش از حد و به عنوان داروی پیشگیری استفاده کرد.

تشکر و قدردانی:

باتشکر و قدردانی از معاونت محترم پژوهشی و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد که در این تحقیق ما را یاری نمودند.

مراجع

1. Gotz F, Bannerman T, Schleifer KH. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. prokaryotes. 2006; 4 (1): 5-75.
2. Fowler VG Jr, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME. The intercellular adhesion locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. Med Microbiol Immunol. 2001; 189 (3):127-131.
- 3 Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Staphylococcus*, In: Medical Microbiology, 4th ed, Washington, and Mosby. 2002; 202-216.
4. Nash C, Chn A, Allexander K, Hageman J. Coagulase negative *Staphylococci* in the neonatal intensive care unit: Are we any smarter? Infect Dis. 2013; 14(6): 284-293.
5. Gould D, Chamberlaine A. *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. J Clin Nurs. 1995; 4: 5-12.
6. Cunha Mde L, Rugolo LM, lopes CA. Study of virulence Factors in coagulase negative *Staphylococci* isolated from newborns. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2006; 101 (6): 661-668.
7. Otto M. Virulence factors of the coagulase negative *Staphylococci*. Front Bio Sci. 2004; 1(9): 841-863.
- 8 Mardh PA, Colleen S, Hovelius B. Attachment of bacteria to exfoliated cells from urogenital tract. Investigative Urology. 2006; 16(5): 322-326.
9. Kuroda M, Yamashita A, Hirakawa H, Kumano M, Morikawa K, Higashide M, Maruyama A, Inose Y, Matoba K, Toh H, Kuhara S, Hattori M, Ohta T. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2005; 102 (37): 13272-13277.
10. Arber N, Militianu A, Ben-Yehuda Arie, Pinkhas J, et al. Native valve *Staphylococcus epidermidis* Endocarditis: report of seven cases and review of the literature. Am J Med. 1991; 90 (6):758-762
11. Eiffcv, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infection due to coagulase negative *Staphylococci*. Lancet Infect Dis. 2002; 2 (11): 677-685.
12. Turkyilmaz S, Kaya O. *Determination of some virulence factors in Staphylococcus spp. isolated from various clinical samples*. Turk J Vet Animal Sci. 2006; 30 (1): 127-132.
13. Klineneggberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsem G, Flaegstad T. Coagulase negative *Staphylococcal* sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. Ped Infect Dis J. 2005; 24 (9): 817-822.
14. Widerström M, Wiström J, Sjöstedt A, Monsen T. *Coagulase negative Staphylococci: update on the molecular epidemiology and*

clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. [Europ J Clin Microb Infect Dis](#). 2012; 31 (1): 7-20.

15. [Duran N](#), [Ozer B](#), [Duran GG](#), [Onlen Y](#), [Demir C](#). Antibiotic resistance genes and susceptibility patterns in *Staphylococci*. *Ind J Medl Res*. 2012;135 (3): 389–396.

16. [Cunha ML](#), [Sinzato YK](#), [Silveira LV](#). Comparison of Methods for the identification of coagulase negative *Staphylococci*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004; 99(8): 855-860.

17. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin infect Dis*. 2009; 49(11):1749-55.

18. Wayne PA. CLSI document M100-S21 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty first informational supplements. Clin Lab Standards Institute. 2011.

19. Yadegar A, Sattari M, Amir Mozafari N, Goudarzi GR. Prevalence of the genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Microb Drug Resist*. 2009; 15 (2): 109-113.

20. Werckenthin C, Schwarz S. Molecular analysis of the translational attenuator of a constitutively expressed *ermA* gene from *Staphylococcus intermedius*. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 45 (5): 785–788.

21. Chakraborty SP, Kar Mahapatra S, Bal M, Roy S. Isolation and Identification of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*

from Postoperative pus sample. *Al Ameen J Med Sci*. 2011; 4 (3): 152 -168.

22. Rohde H, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D. Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesion synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype independent factors. *Med Microbiol Immunol*. 2001; 190 (3):105-112.

23. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, Montanaro L. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. [J Biomed Materials Res](#). 2005; 75 (2): 408-413.

24. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Löbner I, Götz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*. Evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesion synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol*. 1999; 32 (2): 345-356.

25. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosant G. presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10(12): 1081-1088.

26. Gad GF, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RM. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by

Staphylococcus aureus and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. J Infecti Develop Count. 2009; 3 (5): 342-351

27. Zhou sh, chao X, Fei M, Dai Y, Liu B. Analysis of *S. epidermidis icaA* and *icaD* genes by polymerase chain reaction and Slime production. a case control Study. BMC Infecti Dis. 2013; 13 (3): 242

28. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of *Staphylococcus* strains from catheter associated infections. J Cli Microbiol. 2001; 39 (6): 2151-2156.

29. Chaieb K, Zmantar T, Chehab O, Bouchami O, Ben Hasen A, Mahdouani K, Bakhrouf A. Antibiotic resistance genes detected by multiplex PCR assays in *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from dialysis fluid and needles in a dialysis service. Japan J Infect Dis. 2007; 60 (4): 183-187.

30. Oliveira A, Cunha ML. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase negative *Staphylococci*. BMC Rese Notes. 2010; 3 (5): 260-269.

31. Wojtyczka R, orlewska K, Kepa M, Idzik D, Dziekzic A, Mularz T, Krawczyk M, Miklasinska M, Wasik T. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strain from a Hospital Environment. Intern J Environ Res. 2014; 11 (5): 4619-4633.

32. Alcaraz LE, Satorres SE, Lucero RM, centorbio ONP. Species identification slime production and oxacillin Suseeptibility in

coagulase-negative *Staphylococci* isolated from nosocomial specimens. Brazi J Microbiol. 2003; 34 (1): 45-57.

33. Eftekhar F, Mirmohamadi Z. Evaluation of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from nosocomial infections and skin of healthy volunteers. Intern J Med Sci. 2009; 1 (10): 438-441.

34. Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Kay P, Boxall ABA, Hawkey PM, Wellington EMH. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manure agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53 (2): 696-702.

35. Kümmerer K. Resistance in the environment. J Antimicrob Chemother. 2004; 54 (2): 311-320.

36. Kausar J, Afia Z, Rumina H. Frequency and sensitivity pattern of extended spectrum beta lactamases producing isolates in a tertiary care hospital laboratory of Pakistan. J Pak Med Associat. 2005; 55 (10):436-439.

37. Rahimi F, Arabestani M, Karimi SH. Antibiotic resistance pattern *Staphylococcus epidermidis* strains of methicillin resistant isolates from clinical samples in Tehran. Jundi J Microbiol. 2013; 6 (2): 144-149.

38. Koksa F, Yasar H, Samasti M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative *Staphylococcus* strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. Microbiol Res. 2009; 164 (4): 404-410.

39. Islami G, Taheri S, Nalchi F, Baseri N, Samadi R. Investigation of bacteria that cause skin infections and antibiotic resistance pattern referred to Shohada and Loghman in 1389-1390. Pajohandeh. 2012; 35 (4): 205-210
40. Alborzi A, Pourabbas B, Salehi H, Oboodi B, Panjeshin MR. Prevalence and pattern of antibiotic sensitivity of methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Shiraz Iran. Iranian J Med Sci. 2000; 25 (5): 1-8
41. Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes ingenetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. Appl Environment Microb. 2004; 70 (4): 2503-7250.
42. Scheel O, Iversen G. Resistant strains isolated from bacteremia patients in Northern Norway. [Scand J Infect Dis.](#) 1991; 23 (5): 599-605.
43. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci*. BMC Res Notes. 2011; 4: 453-459.
44. Ullah F, Malik S A, Ahmed J, Ullah F, Shah M, Ayaz M, et al. Investigation of the genetic basis of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* from Pakistan. Trop J Pharmaceut Res. 2012; 11 (6): 925-931.

Determination of antibiotic resistant pattern and detection of *ica* operon genes in *Staphylococcus Saprophyticus* isolated from clinical samples in Shahrekord, Iran

Forough Sedighi¹, Hossein Aghajani¹, Hossein Khodabandeh¹, Fatemeh Nematolahi¹, Elahe Tajbakhsh¹

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding Author: ee_tajbakhsh@yahoo.com

Abstract

Staphylococcus saprophyticus is one of the causes of urinary tract infections in humans. Due to the wide range of strains and the presence of pathogens, high costs are incurred for the isolation, diagnosis and treatment of this bacterium. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance pattern and prevalence of *ica* operon genes in the *Staphylococcus saprophyticus* strains isolated from clinical samples in Shahrekord. This study was conducted on 34 strains of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from urinary tract infection samples in Shahrekord city. After bacterial identification using biochemical tests, antibiotic resistance pattern was determined by Kirby-Bauer method. Then polymerase chain reaction (PCR) test was performed using specific primers to detect *tetK*, *ant(4)-Ia*, *vanA*, *ermA* and *icaA/C/D/B/R* genes. Of 34 strains of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from infectious samples, the most commonly detected antibiotic resistance was against penicillin (91.2%) and the most sensitivity was achieved against vancomycin (5.9%). The distribution of *tet K*, *erm A*, *ant(4)Ia* and *van A*, *ica A*, *ica D*, *ica C*, *ica B* and *ica R* were reported 20.58%, 55.88%, 20.58%, 0%, 73.52%, 64.70%, 20.58%, 14.7% and 14.7% respectively. The results that show *Staphylococcus saprophyticus* is resistance to selected antibiotics. The lack of significant statistical relationship

between disc resistance and molecular resistance is indicated that the transfer of antibiotic resistance among isolates through other factors such as introns and transposons.

Keywords: Antibiotic resistance genes, *Staphylococcus saprophyticus*, *ica* operon, Urinary Tract Infection



رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۲ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۳

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



شیوع اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ در جدایه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک از بیماران دیابتی در کرمانشاه، ایران

رسول پژوهش^۱، فاطمه خداوردی پور، حسین آقاجانی^۱

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده	اطلاعات مقاله
<p>زمینه و هدف: اشریشیا کلی یکی از پاتوژن‌های غالب است که باعث ۸۰ تا ۹۰ درصد عفونت‌های ادراری اکتسابی از جامعه و ۳۰ تا ۵۰ درصد عفونت‌های ادراری اکتسابی از بیمارستان می‌شود. جدایه‌های مقاوم به چند دارو که توسط ژن‌های مقاومت مرتبط کدگذاری می‌شوند، روی اینتگرون‌ها قرار دارند.</p> <p>مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، تعداد کل ۹۰ جدایه اشریشیا کلی از نمونه‌های ادرار بیماران دیابتی در کرمانشاه، ایران، طی یک دوره شش ماهه (مهر تا اسفند ۱۳۹۴) به دست آمد. نمونه‌های ادرار با روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی آزمایش شدند و آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای همه جدایه‌ها با روش انتشار دیسک در آگار کربی بائر انجام شد. تشخیص اینتگرون‌های کلاس ۱ و کلاس ۲ با روش PCR در جدایه‌های MDR انجام شد.</p> <p>یافته‌ها: شایع‌ترین فنوتیپ‌های مقاوم به ترتیب سفالوتین (۸۸،۸۸٪)، نالیدیکسیک اسید (۸۳،۳۳٪)، کوتریموکسازول (۷۰٪)، سیپروفلوکساسین (۵۸،۸۸٪)، تتراسایکلین (۵۶،۶۶٪)، نورفلوکساسین (۵۵،۵۵٪)، سفتازیدیم (۴۰٪)، جنتامایسین (۳۲،۲۳٪)، کلرامفنیکل (۲۶،۶۶٪)، نیتروفورانیسیون (۲۱،۱۱٪)، آمیکاسین (۱۷،۷۷٪) و ایمپنم (۲،۲۲٪) بودند. در این مطالعه، در مجموع ۹۰ جدایه در ۷۶ نمونه، MDR گزارش شدند. اینتگرون کلاس I در ۱۶ جدایه (۲۱،۰۵٪) و اینتگرون کلاس ۲ در ۸ جدایه (۱۰،۵۲٪) یافت شد. هیچ سویه‌ای حاوی هر دو اینتگرون کلاس ۱ و ۲ یافت نشد. در این مطالعه، نتیجه‌گیری: بین وجود ژن <i>intI1</i> و مقاومت به نورفلوکساسین و سفالوتین رابطه معنی‌داری وجود داشت. این نشان می‌دهد که ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در داخل اینتگرون قرار دارند.</p>	<p>تاریخچه مقاله: دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۲ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۰ چاپ: ۱۴۰۴/۰۴/۱۵</p> <p>DOI:</p> <p>کلمات کلیدی: اشریشیا کلی، اینتگرون‌ها، مقاومت چند دارویی، عفونت ادراری.</p> <p>* نویسنده مسئول: Email: pajohesh@yahoo.com</p>

Introduction:

Urinary Tract Infections (UTIs) represent one of the most common diseases encountered in the medical practice today, accounting for 150 million UTIs per annum worldwide (1). Indicated that 40%-50% of women had UTIs throughout their lives. Also, a previous report of WHO showed that the UTIs were the common causes of febrile illness in 3–8% of girls and 1% of boys. *Escherichia coli* is the primary etiological agent, accounting for 75–90% cases of UTI (2). Although it is one of the most easily treatable diseases, it has been reported to be the most common hospital-acquired infection, affecting mainly women, children and the elderly (3). The gram negative bacteria are the most common pathogens and among them, *E coli* is responsible of for the acute UTI. The other gram negative bacteria (*Proteus*, *Pseudomonas* and *Klebsiella*) are probably related to chronic infections (4). Urinary tract infections comprise a wide

range of disorders including pyelonephritis (infection of the kidney) and cystitis (infection of the bladder), which are defined by the presence of microorganisms in the urinary tract (5). Antimicrobial resistance and, in particular, multidrug resistance (MDR) are turning in to a big problem worldwide. MDR encoded by linked resistance genes occurs on integrons, which are potentially mobile genetic elements involved in the transfer of MDR (6). Integrons are genetic units containing elements for site specific recombination, capture and mobilization of gene cassettes. To date, five distinct integron classes have been found. More than 60 different antibiotic resistance genes have been identified within gene cassettes, alone or in combination (7). Integrons were first described by Hall and Collis. They are genetic elements that contain the specific determinants of the component of a site-specific recombination system that recognizes and captures mobile gene

cassettes (8,9). Integron system is a dynamic force in the evolution of multidrug resistance (MDR) and helps bacteria to acquire novel combinations of resistance genes. Integrons are horizontally transferable genetic elements which play an important role in dissemination and accumulation of resistance genes in bacteria (10). Most integrons encoding antibiotic resistance have been found in gram-negative bacteria (e.g., *Pseudomonas* species, *Acinetobacter* species, *Vibrio* species, and various enterobacteriaceae species including *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae*). However, integrons coding for antibiotic resistance have also been described in *Corynebacterium* species, *mycobacteria*, and *Enterococcus faecalis* (7). There are four different classes of integrons in bacteria carrying genes for antimicrobial resistance, each with a distinct integrase gene. Nearly all known gene cassettes from class 1, 2 and 3 integrons encode resistance to antibiotics or

disinfectants. Class 1 integrons are the most prevalent and well characterized. Class 4 is a distinctive class of integrons located in the *Vibrio cholera* genome and not known to be associated with antibiotic resistance (11-13). Several studies have examined integron distributions in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains around the world (14). However, no publicized information is available on the detection of integrons in MDR *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Kermanshah, Iran. The aim of this study was to determine the prevalence of multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Kermanshah Iran and investigate the associations between multi-drug resistance and the existence of integrons.

Material and Methods:

Bacteria isolation

A total number of 90 *Escherichia coli* isolates were obtained from urine samples of patients at Medical diagnostic laboratories in

Kermanshah, Iran during a six-month period (October to March, 2015). The bacterial isolates were identified according to the cultural and biochemical properties. Urine samples were inoculated on blood and MacConkey agar plates and incubated at 37°C for 18-24h. *Escherichia coli* isolates were distinguished by post growth on solid medium. It produced a large, smooth, pink (lactose fermented) on MacConkey. Furthermore, the biochemical tests were performed for the identification of *Escherichia coli* isolates from other isolates. These tests included Indole test, Methyl red test, Voges proskaur test, Simmon`s citrate test, triple sugar iron test, urease test, and Motility test (15).

Antimicrobial Susceptibility Testing:

Antibioticsusceptibility tests were done for all isolates by Kirby-Bauer agar disk diffusion method as recommended by CLSI on Muler-Hinton agar medium (Merck,Germany). The antibiotic disks used

in this study were: Gentamicin (GM 10µg), Amikacin (AN 30µg), Nalidixic Acid (NA 30µg), Ceftazidim (CAZ 30 µg), Norfloxacin (NOR), Choloramphenicol (C 30µg), Cephalotin (CF 30 µg), Imipenem (IPM 10 µg), Ciprofloxacin (CP 5 µg), Co-trimoxazole (SXT 25 µg), Tetracycline (TE 30 µg) and Nitrofurantoin (FM 30 µg) (16,17).

DNA extraction and PCR amplification

Template DNA for PCR was prepared by the boiling method. Briefly, bacteria were harvested from 1.5 ml of an overnight Luria Bertani broth culture (Merck, Germany). It was suspended in sterile distilled water and incubated at 95°C for 10 min. Following the centrifugation of the lysate, the supernatant was stored at -20°Cand used as the template DNA stock.

PCR Amplification:

Detection of class 1 and class 2 integrons was performed by PCR. The primers used for

the detection of *int1* and *int2* genes by PCR method are presented in Table (1) (18).

PCR amplification was carried out in a 25 μ l reaction mixture containing 2 μ l of DNA template, 50 pm of each oligonucleotide primer, 0.2 mM of deoxynucleoside triphosphates sets, 1.5 mM of MgCl₂, 2.5 μ l of 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH

8.3 and 500 mM KCl) and 2.5 U of Taq polymerase. It was performed as follows: the initial denaturation at 94°C for 12 min was followed by 30 cycles consisting of 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 30 sec, elongation at 72 for 2 minutes, and the final extension was conducted at 72°C for 10 min (18).

Table 1: Oligonucleotide primers used in the PCR assay

Primer	Oligonucleotide sequence (5' - 3')
<i>Int 1-F</i>	GGTCAAGGATCTGGATTTCG
<i>Int 1-R</i>	ACATGCGTGTAATCATCGTC
<i>Int 2-F</i>	CACGGATATGCGACAAAAGGT
<i>Int 2-R</i>	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG

Results:

Of the total collected samples, 90 *Escherichia coli* strains were detected based on culture characterization, biochemical and morphological features. In this study, 75% (n = 60) were female and 25% (n = 20) were male. The rate of resistance to 12 antibiotics was Nalidixic acid (83.33%), Tetracycline

(56.66%), Norfloxacin (55.55%), Ciprofloxacin (58.55%), Cephalothin (88.88%), Ceftazidim (40%), Chloramphenicol (26.26%), Co-trimoxazole (70%), Gentamicin (32.22%) Amikacin (17.77%), Nitrofurantoin (21.11%) and Imipenem (2.22%) (Table2). The highest and lowest levels of resistance were to

Cephalothin and Imipenem, respectively. Resistance to 3 antibiotics was shown in 15 isolates (19.73%), 4 antibiotics in 15 isolates (19.73%), 5 antibiotics in 15 isolates (19.73%), 6 antibiotics in 8 isolates (10.52%), 7 antibiotics in 8 isolates (10.52%) and 9 antibiotics in 7 isolates (9.21%).

In this study, a total of 76 MDR isolates in 24 samples (31.57%) integrons were

found. The results that show in figure 1. Class I integron was found in 16 isolates (21.05%) and class 2 integron was in 8 isolates (10.52%). No strain was found to contain both class 1 and 2 integrons. The association of resistance to antibiotics and integrons is show in Table 2 and Table 3.

Table 2: prevalence of antibiotic resistant in MDR *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections and associations between multi-drug resistance and the existence of integrons

Antibiotic	Total resistance (%)
Nalidixic acid (NA)	75 (83.33%)
Ciprofloxacin (CP)	53 (58.88%)
Ceftazidim (CAZ)	36(40%)
Norfloxacin (NOR)	50 (55.55%)
Co-trimoxazole (SXT)	63(70%)
Gentamicin (GM)	29 (32.23%)
Cephalothin (CF)	80 (88.88%)
Amikacin (AN)	16 (17.77%)
Nitrofurantoin (FM)	19 (21.11%)
Chloramphenicol (C)	24 (26.66%)
Imipenem (IPM)	2 (2.22%)
Tetracycline (TE)	51(56.66%)

Table 3: Prevalence of *Int 1* and *Int 2* in MDR *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections

Resistance	Number of Isolates (%)	No. of <i>int1</i> isolates	No. of <i>int2</i> isolates
Three Anti microbial	8 (10.52)		
NA/ CF/TE		0	0
NA/CF/SXT		1	0
NA/CF/ FM		0	0
NA/CF/SXT		0	0
NA/CF/GM		0	0
NA/CF/SXT		0	0
NA/CF/ CAZ		0	0
NA/CF/SXT		0	0
Four Anti microbial	15(19.73%)		
NA/CF/ SXT /TE		0	0
CF/SXT/ CP / NOR		0	0
NA/CF/ SXT /C		0	0
NA/CF/ SXT / TE		1	0
NA/CF/ SXT / FM		0	0
CF/SXT/ CP / NOR		0	0
NA/CF/ NOR / CP		0	0
NA/CF/ SXT / C		0	0
SXT/ TE/ CAZ/C		0	1
NOR/ TE/ SXT /C		0	0
NA/CF/SXT/ CP		0	0
NA/CF/ SXT / CP		0	0
NA/CF/ SXT/ TE		0	0
NA/CF/SXT/ CP		0	0
NA/ CF/ SXT/ CP		0	0

Five Anti microbial	12 (15.78%)		
NA/CF/SXT/CP/NOR	0	0	
NA/CF/SXT/NOR/CP	0	0	
NA/CF/SXT/NOR/ TE	1	0	
NA/CF/SXT/CP/NOR	0	0	
NA/CF/SXT/CAZ/ TE	0	1	
NA/CF / SXT/CAZ/ TE	0	0	
NA/CF/ SXT/CP/ TE	0	0	
NA/CF/SXT/CAZ/ TE	0	0	
NA /CF /SXT/CP/ TE	0	0	
NA/CF/SXT/CAZ/ TE	0	0	
NA/CF/SXT/CP/ TE	1	0	
NA/CF/SXT/ TE/ NOR	0	0	

Six Anti microbial	8 (10.52%)		
NA/CF/ CP/SXT/ NOR/ TE	0	0	
NA/CF/CP/SXT/NOR/ CAZ	1	0	
NA/ CF/ NOR/ CP/ SXT/ TE	0	0	
NA / CF/ SXT / NOR/ CP/ CAZ	0	0	
NA/ CF/ CP / NOR/ SXT/ TE	0	1	
NA/CF/SXT/NOR/CP/ TE	0	0	
NA/ CF/SXT/NOR/CP/CAZ	0	0	
NA /CF /SXT/ NOR/CP/ TE	0	0	

Seven Anti microbial NA/CF/ NOR/ CP/SXT/ TE/ CAZ NA /CF /SXT/ NOR/CP/ GM/ SXT NA/CF/ NOR/ CP/SXT/ TE/ CAZ NA /CF /SXT/ NOR/CP/ GM/ SXT	4 (5.26%) 1	0 0 1 0	0 0 0 1
Eight Anti microbial NA/CF/ CP/NOR/ SXT/ GM / TE/ C NA/CP/ CP/NOR/SXT/ TE/ CAZ/ FM NA/CP / CP/NOR/SXT/TE/ GM/ C NA / NOR/CP/SXT/ TE/ FM/ GM / C NA/ CF/ CP/NOR/ SXT/ TE/ CAZ/ C NA/CF / NOR/CP/SXT/ TE/ CAZ/GM NA/CF/ NOR/SXT/CP/ CAZ/GM/ C NA /CF /NOR/SXT/ CP/ TE/ GM/ C NA/CF/ SXT /NOR/CAZ/TE/GM/ C	9 (11.82%) 	0 0 1 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0
Nine Anti microbial NA/CF/ SXT/NOR/CP/CAZ TE/GM/ FM NA/ CF/ SXT /NOR/CP/ CAZ/GM/ TE/ C NA/ CF/ SXT /NOR/CP/CAZ/ TE/GM/ C NA/ CF/SXT/ CP/ TE/CAZ/NOR/GM/ FM	4 (5.26%) 	0 0 1 0	0 1 0 0

Ten Anti microbial	8 (10.52%)		
NA /CF /SXT/ NOR /CP/TE/ AN/ CAZ/GM/ C	1	0	
NA/CF/ SXT/NOR/CP /CAZ/TE/ FM/ AN/GM	0	0	
NA/CF/SXT/NOR/CP /CAZ/ TE/ C/ AN/GM	0	0	
NA/CF/SXT/NOR/CP/CAZ/TE/ FM/ AN/GM	0	0	
NA/CF /SXT/ NOR/CP/FM/C/ TE/CAZ/AN	1	0	
NA/CF/SXT/NOR /CP /FM/TE/CAZ/ AN/GM	0	1	
NA/CF/SXT/NOR/ CP/GM/ AN/TE/ CAZ/ FM	0	0	
NA/CF/ SXT/NOR/CP/CAZ/AN/FM/TE/GM	0	0	
Eleven Anti microbial	6 (7.89%)		
NA/CF/SXT/NOR/CP/C/ AN/ TE/ CAZ/ FM/GM	1	0	
NA/CF/SXT/NOR / CP/AN/FM/ TE/ CAZ/GM/ C	0	0	
NA/CF/ SXT/NOR/ CP/GM/ AN/TE/ CAZ/ FM/C	0	1	
NA/CF/ SXT/NOR/CP /CAZ/AN/FM/TE/GM/C	0	0	
NA/CF/ SXT/NOR/ CP/GM/ AN/TE/ CAZ/ FM/C	1	0	
NA/CF/ SXT/NOR/CP /CAZ/AN/FM/TE/GM/C	0	0	
Tewlve	2 (2.63%)		
NA/ CF/ SXT/ NOR/ CP /GM/ AN/TE/ CAZ/IPM/	1		
FM/ C	1		
NA / CF/ SXT/NOR/CP/ CAZ /AN/ FM/TE/IPM/			
GM/C			

NA: NalidixicAcid, NOR: Norfloxacin, TE:Tetracycline, CF:Cephtazidim, SXT: Cotrimoxazole, CRO: Ciprofloxacin, GM: Gentamycine, CP: Ciprofloxacin, AM: Amikaycine, C: Choloramphenicol, FM: Nitroforanteine, IMP: Imipenem.

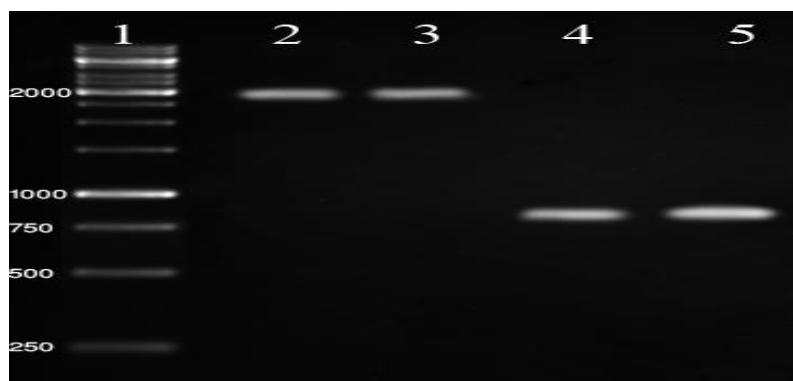


Fig 1: Gel electrophoresis of *Int 1* and *int 2* genes; Lane 1: 1 kb Ferments marker, Lanes 2 and 3: 1900 fragment base pair of *int 1* gene, Lanes 4 and 5: 789 fragment base pair of *int 2* gene

Discussion:

Multi drug resistant bacteria are now a problem in patients hospitalized throughout the world. The prevalence of MDR among clinical isolates varies greatly worldwide and in geographic areas, and rapidly changes over time (18,19). Knowledge of antibiotic susceptibility, prevalence of MDR, and the presence of integrons in clinical isolates can facilitate the selection of appropriate treatment agents and also help control nosocomial infections. In the present study, we investigated the antimicrobial susceptibility patterns and the presence of class 1 and class 2 integrons in the clinical isolates of *Escherichia coli* from

Kermanshah, Iran. Integrons are genetic elements located on the bacterial chromosome or a plasmid that often carry genetic determinants for antimicrobial drug resistance (20, 21). The results of the present study showed a high level of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates. A total of 90 *Escherichia coli* isolates were analyzed in this study, up to 50% of resistance was observed against different antimicrobial agents, including Nitrofurantoin, Co-trimoxazole, Ceftazidime, Cephalothin, Gentamicin, Tetracycline, Nalidixic acid, Chloramphenicol, and Amikacin. This study revealed that a major prevalence of resistant

Escherichia coli isolates UTI samples. *Escherichia coli* isolate showed a high degree of resistance to Cephalothin (88.88%), Nalidixic acid (83.33%), Co-trimoxazole (70%), Ciprofloxacin (55.55%), Tetracycline (53.33%) and ceftazidime (32.89%). In other parts of the world, several studies have identified entrobacteriaceae family isolates, showing high rates of resistance (up to 50%) to different antimicrobial agents, including Ceftazidime, Amikacin, Gentamicin, Co-trimoxazole and Ciprofloxacin. In our study, 76 (84.44%) isolates showed MDR. The rate of occurrence of MDR *Escherichia coli* isolates observed in our study was similar to that reported by this study (22-24). In this study, MDR *Escherichia coli* isolates with resistance to three or more different antibiotics were common. Seventy-Six samples (84.44%) had MDR, similar to the rate of multi-drug resistance reported in *E. coli* isolates by Ahangarzadeh Rezaee *et al.*, 2011 (14).

Escherichia coli isolates in our study were extremely resistant (88.88%) to Cephalothin, similar to Ahangarzadeh Rezaee *et al* (84%) in *K. pneumoniae* from Northwest Iran (21). A high level of antimicrobial resistance (83.33%) against Nalidixic Acid was also observed in this study as compared to Muhammad *et al* (84.16%), *E. coli* from Punjab in Pakistan (10) and Ahangarzadeh Rezaee *et al* (81.3%) in *K. pneumoniae* in Northwest of Iran. In this study, resistance rate to quinolones (Nalidixic Acid, Ciprofloxacin and Norfloxacin) were 83.33%, 84.1% and 55.55%, respectively. Ahangarzadeh Rezaee *et al.* conducted a similar study in Northwest of Iran and reported 60.7%, 43.3% and 59.7% resistance rate to these antibiotics. In another study in Tabriz, Ahangarzadeh Rezaee *et al* compared the prevalence of multi-drug resistant *Klebsiella pneumonia* in paediatric and adult patients with UTI in the educational health centers of Tabriz. The resistance rate

to Nalidixic Acid and Ciprofloxacin was 58.33% and 63.05% respectively, comparable with the results of this study (25). A low level resistance rate to Imipenem was found in this study (2.22%), similar to Soltan Dalal (2%) in Emam Khomeini hospital and Ahangarzadeh Rezaee *et al* (0.8%) in multi drug resistance *E. coli* isolates in Northern west of Iran (14, 26).

Mobilized integrons are substantial contributors to the spread of antibiotic resistance genes. The three classes of integron mostly contributing to the problem of multidrug resistance are classes 1, 2, and 3 (27-29), where they are determined based on sequence differences in the respective *IntI* proteins (30). Of the three, class 1 integrons are the most abundant and found in a diverse range of other mobile elements (31,32), such as transposons and plasmids. The antimicrobial resistant gene located on an integron-like structure is being increasingly reported worldwide (18,33).

The prevalence rate of integrons in Europe and Asia from clinical *E. coli* isolates has been reported to be 22% to 59% (17). In the 76 MDR isolates, the class 1 integrase gene (*intI1*) showed a dominant presence. A positive test result for integrons was found in 24 (31.57%) of 76 MDR isolates screened, including 16 isolates (21.05%) of class 1 and 8 isolates (10.52%) of class 2. No strain was found to contain both class 1 and 2 integrons. In the present study, class 1 integron was more prevalent than class 2, similar to Aarati *et al* (2006), Rao *et al* (2006), Ahangarzadeh Rezaee *et al.* (2012) (20-22). Falakian *et al* (20011) reported the high prevalence of class1 integron (49.1%) among *Escherichia coli* isolates of patients with urinary tract infection in Shahrekord. Reports from Asian countries have also noted a high prevalence of class I integrons in gram-negative clinical isolates (33). Hak Sun *et a* (2004) reported 54% and 5% for *intI* and *int2* respectively

among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea (34). Reports from different countries have described a high prevalence of class 1 and class 2 integrons in gram-negative clinical isolates. These data suggest that integrons are relatively common, especially in enterobacteriaceae, and they contribute to the spread of antimicrobial drug resistance in healthcare settings (14).

In this study, we observed a significant relationship between the presence of an integron and the phenotypic resistance to some antimicrobial agents tested. All data were analyzed using SPSS software, version 19.0. The significance of differences between the resistance patterns of the isolates was determined using the chisquare test and Fisher exact test. There was a positive association between the presence of the *intI1* gene and resistance to Norfloxacin (P-value= 0.039) and Cephalotin (P-value=0.002). This indicated that the antibiotic resistance genes

were located within the integron. Low prevalence of integron in this study indicated that the resistance gene cassettes were located in different elements such as transposons and prophage.

Islami *et al.*, 2010 found a significant correlation between integron and resistance to Cephalothin, Gentamicin, Norfloxacin and Nalidixic acid (36). In another study by Ahangarzadeh Rezaee *et al* (2012), were found a positive association between the presence of the *intI1* gene and resistance to Gentamicin, Tetracycline, Ceftazidime, Cephalothin, Chloramphenicol, and Nalidixic Acid has been reported. In this study, a positive association was also observed between the presence of the *intI2* gene and resistance to tetracycline (21).

In a study conducted by Falakian *et al*, the prevalence of class 1 integron was reported to be 49.01%. This study found a significant correlation between class 1 integrons and resistance to Gentamicin, Ceftriaxon,

Aztreonam, Ciprofloxacin and Co-trimoxazole, comparable with similar studies in south and northern west of Iran (17).

Most *E. coli* isolates were sensitive to imipenem, but only 2.2% were resistant to imipenem. Franklin *et al* (2002) reported that imipenem was the most active agent against Gram-negative isolates, there by confirming the results of this study (33).

Salem *et al.*, 2003 reported that there was a correlation between UTIs with gender. In this study, 75% (n = 60) were female and 25% (n = 20) were male. It has been previously found that UTIs is always a very common phenomenon among the women (35). Women are mostly at the risk of developing UTIs and half of them develop a UTI during their lifetime (37). Men and women of elderly group have been found to be very much prone to UTI. In conclusion, the differential association of class 1 and class 2 integrons with resistance in *E. coli* isolates suggested that integrons could

facilitate the spread of antimicrobial resistance. This is the first report on the association of multidrug resistance in the presence of class 1 and class 2 integrons in *E. coli* isolates from urinary tract infection in Kermanshah, Iran.

ACKNOWLEDGMENTS

The present paper has been developed under the corporation and financial supports of Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran. I would like to thank for the sincere help in performing technical parts of the project.

References:

- 1- Aarati N, Rao M, Barlow L.A, Boring J.R, Tenover FC, McGowan JE. Class 1 integrons in resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., US Hospitals. Emerg. Infect Dis. 2006; 12 (6):1011-1014.
- 2- Ahangarzadeh Rezaee M, Sheikhalizadeh V, Hasani A. Detection of Integrons among Multi-drug resistant (MDR) *Escherichia coli* strains isolated from clinical specimens in Northren West of Iran. Braz. J Microbiol. 2011; 42: 1308-1313.
- 3- Ahangarzadeh Rezaee M, Langarizadeh N, Aghazadeh M. First report of class 1 and class 2 integrons in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Northwest Iran. Jpn. J Infect Dis. 2012; 65: 256-259.
- 4- Arakawa YM, Murakami K, Suzuki H, Ito R, Wacharotayankun S, Ohsuka N, Ohta M. A novel integrons like element carrying the metallobetalactamase gene bla IMP. Antimicrob Agents Chemothe. 1995; 39: 1612-1615.
- 5- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum a-lactamases: The CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemothe. 2004; 48:1-14.
- 6- Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends Microbiol. 2007; 15: 301-309.
- 7- Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, CLSI document M100-S15, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA, 15th International supplement. 2005.
- 8- Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. J Bacteriol. 2002; 184: 3017-3026.
- 9- Daoud Z, Afif C. *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections of Lebanese Patients between 2000 and 2009: Epidemiology and Profiles of Resistance. Chemother Res Practice. 2011; 1-6.
- 10- Dromigny JA, Nabeth P, Juergens-Behr A, Perrier-Gros-Claude JD. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections in Dakar, Senegal. J Antimicrob Chemothe. 2005; 56: 236-239.
- 11- Falakian Z, Nikokar I, Nafisi M, Karimi A, Validi M. Frequency of Class 1 Integrons among *Escherichia coli* Isolates of Patients with Urinary Tract Infection. Iran. J Clin Infect Dis. 2011; 6 (4): 157-160.
- 12- Franklin GA, Moore KB, Snyder JW, Polk JC, Cheadle WG. Emergence of resistant microbes in critical care units in transient, despite an unrestricted formulary and multiple antibiotic trials. Surge Infect. 2002; 3(2): 135-144.

- 13- Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon.* 2003; 49(2):53–70.
- 14- Gündoğdu A, Long YB, Vollmerhausen TL, Katouli M. Antimicrobial resistance and distribution of sul genes and integron-associated intI genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia. *J. Med. Microbiol.*, 2011; 60: 1633–1642.
- 15- Hak SunYu, Lee JC, Young Kang H, Ro DW, Young Chung J, Sook Jeong Y, Tae SH, Choi CH, Lee EY. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J Clin Microbiol.* 2004; 41(12): 5429-5433.
- 16- Hall RM, Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann NY. Acad Sci.* 1999; 870: 68-80.
- 17- Hall RM, Stokes HW. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica.* 1993; 90:115-32.
- 18- Hamada TA, Mahmood AR, Ahmed IA. Antibiotic resistance in pathogenic bacteria isolated from UTIs in Tikrit province. *Tikrit Med J.* 2008; 14(1):203-10.
- 19- Hansson K, Sundstrom L, Pelletier A, Roy PH. *IntI2* integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* 2002; 184: 1712-21.
- 20- Ho P, King-Sun Y, Kin-Hung C, Janice YC, Tak-Lun Q, Kwok-yung Y. Antimicrobial resistance among uropathogens that cause acute uncomplicated cystitis in women in Hong Kong: a prospective multicenter study in 2006 to 2008. *Diag. Microbiol Inf Dis.* 2010;66: 87-93. [In Persian]
- 21- Islami G, Seyed Javadi S, Gudarzi H, Falah F, Gudarzi F. Prevalence of integron in multidrug resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolated from children with urinary tract infection . 2010; 34 (1): 61-65.
- 22- Khadri HC, Surekha S, Lakshmi S, Narasimha, G. Multi drug resistance and b-lactamase production by *Klebsiella pneumoniae*. *Afr J Biotechnol.* 2006; 12 (6):1791–93.
- 23- Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Gottberg AV, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL. Community-Acquired *Klebsiella pneumonia* bacteremia: Global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8 (2): 160-5.
- 24- Langari Zadeh N, Ahangarzade Rezaei M, Hassani A. Comparsion with the prevalence of multi-drug resistant *Klebsiella pneumonia* in children and adults with UTI referring to Tabriz health centers. *J Biologic Sci Univ Zanjan.* 2011; 4(1): 1-9. [In Persian]
- 25- Leverstein-van H, Paauw MA, Box A, Blok ATA, Verhoef HE. MM Fluit J. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multi-

- drug resistance in the hospital. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (8): 3038-3040.
- 26- Liebert, CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flagship of the floating *genome*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999; 63: 507-522.
 - 27- Livermore, D.M. Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1995; 8: 557-584.
 - 28- Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J, Jones ME. Many classes I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob Agents. Chemother.* 1999; 43 (3): 686-89.
 - 29- Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *ACMA.* 2013; 12: 8.
 - 30- Muhammad I, Uzma M, Yasmin B, Mehmood Q, Habib B. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Integrons in *Escherichia coli* from Punjab, Pakistan. *Braz J .Microbiol.* 2011; 42: 462-466.
 - 31- Ragnar Norrby S. Integrons: Adding Another Threat to the Use of Antibiotic Therapy. *Clin Infect Dis.* 2005; 41 (1): 10-11.
 - 32- Rao AN, Barlow M, Ann Clark L, Boring JR, Tenover FC, McGowan JE. Class 1 Integrons in Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiellaspp.*, US Hospitals. *Emerging. Infect Dis.* 2006; 12 (6): 1011-16.
 - 33- Salem MM, Muharram M, Ibrahim M. Alhosiny Distribution of Classes 1 and 2 Integrons among Multi Drug Resistant *E. coli* Isolated from Hospitalized Patients with Urinary Tract Infection in Cairo, Egypt. *Aust J Basic Applied Sci.* 2010; 4(3): 398-407.
 - 34- Saraylu, J, Mehrabadi JF, ImaniFooladi AA, Sabbaghi A, MollaAghamirzaei H, Hasankhani M. Prevalence and evaluation of toxin genes among uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates by duplex PCR. *J Med Bacteriol.* 2012; 1 (1): 17-22.
 - 35- Schroll, C., Barken, K.B., Krogfel, K.A., Struve, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumonia* biofilm formation. *BMC Microbiol.* 2010; 10(79): 1-10.
 - 36- Soltan Dalal MM, Miretemadi A, Sharif Yazdi MK, Rastegar Lari AA. Determine the antibiotic resistance of *Klebsiella* species isolated from patients hospitalized in Imam Khomeini Hospital. *J Tehran Univ Med. Sci.* 2011; 8 (4): 275-281.
 - 37- Taslima TL, Sabita RR, Donald JG. Multiple antibiotic resistance mediated by plasmids and integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Bangl. J Microbiol.* 2007; 24: 19–23.
 - 38- Van Essen-Zandbergen A, Smith, H., Veldman, K., Mevius D. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*,

Salmonella and *Campylobacter* spp.
in the Netherlands. J Antimicrob
Chemother. 2007; 59 (4): 746-750.

Prevalence of class 1 and 2 integrons in *uropathogenic Escherishia coli* isolates from diabetic patients in Kermanshah, Iran

Rasul Pajohesh¹, Fatemeh Khodaverdi pour, Hossein Aghajani¹

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Corresponding author: pajohesh@yahoo.com

Abstract:

Background and Objective: *Escherichia coli* is one of the most predominant pathogens causing 80-90% of community acquired UTIs and 30-50% of nosocomial acquired UTIs. Multi drug resistance isolates encoded by linked resistance genes occurs on integrons.

Materials & Methods: In this cross sectional study, a total number of 90 *E. coli* isolates were obtained from urine samples of diabetic patients in Kermanshah, Iran, during a six-month period (October to March, 2015). Urine samples were tested by standard bacteriological methods and antibiotic susceptibility tests were done for all isolates by Kirby Bauer agar disk diffusion. Detection of class 1 and class 2 integrons were performed by PCR in MDR isolates.

Findings: The most common resistant phenotypes were found to be Cefalothin (88.88%), Nalidixic acid (83.33%), Co-trimoxazole (70%), Ciprofloxacin (58.88%), tetracycline (56.66%), Norfloxacin (55.55%), Ceftazidim (40%), Gentamycine (32.23%), Choloramphenicol (26.66%), Nitrofurantion (21.11%), Amikacin (17.77%) and Imipenem (2.22%). In this study, a total of 90 isolates in 76 samples were reported MDR. Class I integron was found in 16 isolates (21.05%) and class 2 integron was found in 8 isolates (10.52%). No strain was found to contain both class 1 and 2 integrons. In this study,

Conclusion: There was a significant relationship between the presence of the *intI1* gene and resistance to Norfloxacin and Cephalotin. This indicated that the antibiotic resistance genes were located within the integron.

Key Words: *Escherishia coli*, Integrons, Multi Drug Resistance, Urinary Tract Infectio



رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۲ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۳

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



بررسی مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از زخم و ادرار در کرمانشاه، ایران.

زینب احمدی^{۱*}، حسین آقاجانی^۱، حسین خدابنده^۱

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۷

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۵

چاپ: ۱۴۰۴/۰۴/۱۵

DOI:

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس،

الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، -multiplex

PCR، RFLP-PCR، ژن کوآگولاز

* نویسنده مسئول: Email

zeinab_ahmadi1362@yahoo.com

چکیده

انسان منبع اصلی استافیلوکوکوس اورئوس در طبیعت است. این باکتری یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی است. بنابراین، مطالعه بررسی مولکولی این باکتری از اهمیت بالایی برخوردار است. پس از شناسایی و تأیید ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های زخم و ادرار در کرمانشاه با روش‌های استاندارد میکروبیولوژی، آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام شد و ژن‌های مقاومت (ermA، msrA، tet M، tet K، aacA-D، mecA) جدایه‌ها با روش Multiplex-PCR بررسی و ژنوتیپ ژن کوآگولاز جدایه‌ها با روش RFLP-PCR بررسی شد. در آزمایش حساسیت، بیشترین مقاومت به پنی‌سیلین (۹۰٪) و کمترین مقاومت به نیتروفورانتوئین (۸٪) گزارش شد. در روش Multiplex-PCR، (۴۹٪) از جدایه‌ها حامل ژن aacA-D، mecA (24٪)، (89٪) tetM، tetK (14٪)، ermA (40٪) و msrA (۳۶٪) بودند. در تشخیص پلی‌مورفیسم ژن کوآگولاز از ۶۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ادرار، پلی‌مورفیسم ژن کوآگولاز در ۵۳ مورد مشاهده شد که ژنوتیپ (۶۱،۵۳٪/I) و ژنوتیپ (۱۲،۳٪/VIII) و ژنوتیپ (۷،۶۹٪/IX) بودند. پلی‌مورفیسم ژن کوآگولاز سویه‌های جدا شده از زخم در ۲۲ نمونه مشاهده شد. ژنوتیپ (۴۲،۸۵٪/I) و ژنوتیپ (۲۰٪/VIII) گزارش شد. تشخیص و توصیف مولکولی ایزوله‌ها در پیشگیری و کنترل عفونت بسیار مؤثر و کارآمد است.

Introduction

Staphylococcus aureus is a major cause of hospital acquired infections, causing high morbidity and mortality throughout the world (1). Rates of *S. aureus* infection have increased during the past 2 decades (2). Antimicrobial resistance has increased drastically in recent years in both developed and developing countries and it has rapidly become a leading public health concern (3). The introduction of penicillin in the early 1940s dramatically improved the prognosis of patients with staphylococcal infection. However, as early as 1942, penicillin-resistant *Staphylococci* were recognized, first in hospitals and subsequently in the community. Methicillin, introduced in 1961, was the first of the semisynthetic penicillinase resistant penicillin's. Its introduction was rapidly followed by reports of methicillin-resistant isolates (4). The emergence of antibiotic-resistant strains, particularly MRSA is recognized as very serious health problem because of difficulties in combating these strains (5). Initially, MRSA was limited to hospitals, however it is now increasingly recovered from nursing homes and the community (6). Since the emergence of methicillin-resistant *S. aureus*, the glycopeptide vancomycin has been the only uniformly effective treatment for

staphylococcal infections (7,8). In 1997, the first clinical isolate of *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin was reported from Japan (9). One of the class of antibiotics playing an important role in the therapy of serious staphylococcal infections are aminoglycosides despite reports of increased resistance to these drug in many countries in Europe (10). Coagulase is produced by all strains of *Staphylococcus aureus*. The 3'coding region of the coagulase (*coa*) gene contains varying numbers of 81 bp tandem repeats (11). Molecular typing method PCR is an effective method for control of nosocomial infections, this method can reduce and prevent of epidemic situation nosocomial infections and help in tracing the source of infection. Therefore, the aim of this study was to detect antibiotic-resistant pattern *S. aureus* strains obtained from Imam Reza hospital in Kermanshah by two methods antimicrobial susceptibility test and rapid multiplex PCR and the isolates were typed the *coa* gene by PCR- RFLP. we using one restriction enzyme *AluI* for their typing.

Materials and Methods

Bacterial isolates

Totally 100 strains of *Staphylococcus aureus*, 65 samples from urine infections and 35 samples of wound infections, were collected from patients of Imam Reza

Hospital in krmanshah in 2012. The samples were inoculated onto 5 percent sheep blood agar plates and incubated at 37°C for 48 h. Standard microbiological methods and biochemical tests for identification of *S. aureus* included gram staining, catalase, coagulase, oxidase, hypersensitivity to novobiocin resistance, phosphatase, deoxyribonuclease (DNase) test, carbohydrate (xylose, sucrose, terhalose and maltose, fructose, lactose, mannose) fermentation tests (12).

Antimicrobial agents and susceptibility testing.

Antimicrobial susceptibility testing was performed by using disk diffusion method on Mueller-Hinton agar (Merck, Germany) plates that were inoculated with 0.5 McFarland. Antibiotic discs were placed on Mueller-Hinton agar plates, incubated at 37°C for 24 h, and the diameter of each growth zone was measured in millimeters. The antibacterial agents tested were: gentamicin (10µg), neomycin (30µg), penicillin (10µg), erythromycin (15µg), tetracycline (30µg), amoxicillin-clavulanic acid (30 µg), clindamycin (2µg), vancomycin (30µg), trimethoprim sulfamethoxazole (25µg), vancomycin (5µg), ciprofloxacin (5µg), and ceftriaxone (30 µg), tetracycline

(30µg), azithromycin (15µg), norfloxacin (10µg), nalidixic acid (30µg), nitrofurantoin (50 µg) and methicillin (5µg). CLSI guidelines for susceptibility testing and qualitative interpretation were used throughout (13). Standard strains of *S. aureus* ATCC 25923 as a negative control and ATCC 33591 as a positive control for *mec A* gene (14).

Antibiotic sensitivity of the isolates initially demonstrating resistance to methicillin was confirmed using BD phoenix TM (System, Becton, Dickinson Company, Shannon, Ireland) according to the recommendations given by the national reference center in Saudi Arabia. To confirm methicillin resistance using BD phoenix TM (System, Becton, Dickinson Company, Shannon, Ireland) according to the recommendations given by the national reference center in Saudi Arabia (15).

Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC)

MIC values of antibiotics were determined by the broth microdilution test. All isolates were subcultured on blood agar and incubated for 24 h at 37 °C. Then, two-fold serial dilutions of each antibiotic were made in Mueller-Hinton broth to achieve a concentration range from 0 to 256 µg/ml. After incubation at 37° for 24 h, the MIC was defined as the lowest concentration of

antibiotics that produced no growth. The broth microdilution tests were performed according to the CLSI guidelines (16)

DNA extraction

Strains were cultured on blood agar. One colony was suspended in 1 ml LB broth (Merck, Germany) for 24 h at 37°C. Genomic DNA as a template for PCR assay was extracted by DNA extraction kit DNA (DNP™ - Iran) and according to the manufacturer's instructions.

Multiplex PCR for detection of antibiotic resistance genes

The antibiotic resistance determinants investigated were the *aac-aphD* (aminoglycoside resistance) *mecA* (methicillin resistance) *ermA*, *msrA* (erythromycin resistance) and *tetK*, *tetM* (tetracycline resistance) Genes. PCR was

performed in a PCR thermocycler (Eppendorf Mastercycler, Germany). The PCR primers used to detect the different loci in a multiplex PCR approach are listed in Table 1. Multiplex PCR assays were performed in 25µL PCR mixtures 1 and 2. The mixture 1 contained 1 U of Taq DNA polymerase (Fermentas, Germany), 2.5µL PCR buffer (10×), 1µM each forward and reverse primers of *mecA*, *tet K* and *tet M* gene, 150 µmol/L of each dNTP and DNA template (50 ng). Using thermal cycling, the target genes were amplified (94°C 5 min, 30 cycles of 1 min at 95°C for the denaturation step and 1 min at 55°C for the annealing-extension step and 90 s at 72°C for the extension step). In mixture 2, the forward and reverse primers of the genes *aacA-D*, *msrA* and *ermA* (2.5µM) were used. Amplification products were analyzed on a 1/5% agarose gel for 30 min (17).

Table1. Oligonucleotide primers for amplification of antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. (Zmantar et al., 2008)

Primer	Nucleotide sequence (5-3)	Product Size (bp)
<i>mecA</i>	F: AAAATCGATGGTAAAGGTTGG R : AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	532
<i>aac-aphD</i>	F: TAATCCAAGAGCAATAAGGGC R: GCCACACTATCATAACCACTA	227
<i>tetK</i>	F: GTAGCGACAATAGGTAATAGT R: GTAGTGACAATAAACCTCCTA	360

<i>tetM</i>	F: AGTGGAGCGATTACAGAA R: CATATGTCCTGGCGTGTCTA	158
<i>msrA</i>	F: GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG R: AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCT	940
<i>ermA</i>	F: AAGCGGTAAACCCCTCTG R: TTCGCAAATCCCTTCTCAAC	190
<i>16s-</i>	F: GTAGGTGGCAAGCGTTACC	228
<i>rDNA</i>	R: CGCACATCAGCGTCAG	

Statistical analysis

The data were analyzed using SPSS ver. 16.0 statistical software and a Chi-square test analysis was performed. Also, differences were considered significant at values of $p < 0.05$.

Restriction fragment length polymorphism

PCR was performed in a 25 μ l reaction mixture containing 1 μ l of template DNA, 12.5 μ l of masterkit, 10 μ l of H₂O, and 0.5 μ l of each primer COAG2: CGA GAC CAA GAT TCA ACA AG, COAG3: AAA GAA AAC CAC TCA CAT CA. The PCR conditions were as follows: Initial denaturation at 95°C for 2 minutes followed by 30 cycles of amplification with 94°C for 30 seconds, annealing at 58°C for 2 minutes, extension at 72°C for 4 minutes and final extension at 72°C for 7 minutes. So for RFLP reaction mixture containing 12.5 μ l of PCR products, 2.5 μ l of enzyme, 3 μ l of H₂O and 2 μ l restriction buffer, and so incubated at

37°C overnight (14). The PCR products were analyzed on a 1.5% agarose gel five micro liters of the PCR products were loaded into 1.5% agarose and electrophoresis was performed in .5x TBE buffer at 90 V for 75 min. The gels were subsequently stained with 1 μ g/ml ethidium bromide for 30 min, visualized under UV and photographed (15).

Results

Antibiotic susceptibility test results

Antibiotic resistance patterns of 100 strains of *S. aureus* isolated from urine infections and wound infections are shown in Table 2. The rate of antibiotic resistant strains of *S. aureus* following nitrofurantoin (92%), vancomycin (86%) , gentamicin (80%), neomycin (80%), ciprofloxacin (79%), rifampin (72%), clindamycin (64%), azithromycin (53%), ciprofloxacin, norfloxacin and trimethoprim sulfamethoxazole (52%), cefixime and nalidixic acid (50%), erythromycin (48%),

ampicillin (45%), methicillin (36%), tetracycline (24%) and penicillin (10%). Most antibiotic resistance was observed in penicillin (90%), tetracycline (76%) and the least resistance innitrofurantoin (8%) and vancomycin (14%). In this method, antibiotic resistance were reported 44/6% in isolated from wound and 42.7% from urine. In *S. aureus* strains isolated from two different sources of wound infection and urine infection between the rate of resistance to penicillin antibiotic with ((P=0.045, ceftriaxone (P=0.003), nalidixic acid ((P<0.000, trimethoprim sulfamethoxazole (P=0.049), ampicillin (P=0.01),

nitrofurantoin (P<0.000), ciprofloxacin (P=0.001), neomycin (P=0.03), clindamycin (P=0.01, gentamicin ((P=<0.000, Cefixime (P=0.012), rifampin (P=0.048), erythromycin (P=0/023), tetracycline ((P=0.038 azithromycin P=<0.000)) and the source of infection there is significant association. But there is no Significant association between resistant antibiotics norfloxacin with (P=0.098), methicillin (P=0/064) and vancomycin (P=0.31) and the source of infection.

Table 2. Antibiotic resistance pattern in *Staphylococcus aureus* strains isolated from urine and wound

S amples		Antibiotic															P-value
		F RO	C /A	T OR	N XT	S M	F M	C P	C	M	E	FM	A	E	ZM		
S	W	0	2	4	5	2	1	1	1	0	2	1	1	1	1		
	ound	0	2	1	2	8	7	2	5	8	6	7	1	1	4		
	u	2	5	3	3	3	1	0	1	0	1	1	9				
	rine	8				2	1	1	7	9	2	1	9		2		
	Total	8	7	9	2	8	0	8	3	2	7	0	8	8	0	8	3
	Percent	8	0	9	2	8	0	8	3	2	7	0	8	8	0	8	3
S	W	6	7	7	4	7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	ound	6	7	7	2	1	2	3	1	7	2	7	1	1	6		
	U	8	3	6	6	5	5	1	3	2	1	4	1	4	8		
	rine						8	1	6			4	5		4		

Total	7	2	2	3	2	3	1	7	2	3	6	2	8	2	0	8	0
Percent	7	2	2	3	2	3	1	7	2	3	6	2	8	2	0	8	0
W	1	1	2	2	0	1	0	1	2	0	1	1	1	2	1	1	1
ound	5	9	0	4	2	8	8	1	1	2	0	1	1	1	0	3	1
U	1	1	1	2	2	1	6	8	0	0	0	0	1	1	1	4	9
rine	5	9	0	4	6	7	1	5	4	9	2	3	1	1	1	1	1
Total	1	4	1	4	4	8	1	0	6	0	4	0	4	8	2	6	7
Percent	1	4	1	4	4	8	1	0	6	0	4	0	4	8	2	6	7
p-value	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	.45	.003	.000	.98	.049	.01	.001	.001	.03	.01	.000	.064	.012	.31	.048	.023	.038

Multiplex PCR antibiotic resistance genes

Amplification of *16s-rDNA* confirmed all the 100 staphylococcal isolates as *S. aureus*. The distribution of methicillin resistance gene (*mecA*) were in 58% strains, that 29 samples (82.9%) from wound infections and 29 samples (42%) from urine infections. The prevalence aminoglycoside resistance genes (*aacA-D*) Was just in 24% of isolates in urine infections. This resistance gene was not found in strains isolated from wound infections. The distribution of tetracycline resistance gene (*tetK*) was detected in 13% of strains, 9 strains (7.25%) isolates of wound,

and 8 strains (3.12% isolates of urine. *tet M* were known in 89% of the isolates, 54 isolates (84%) from urine and 35 isolates (100%) of wounds. Macrolide resistance genes (*ermA* and *msrA*) were detected, respectively 40% and 36% of the isolates. Results of molecular detection of antibiotic resistance genes is presented in table 3. There is statistically significant association between the rate of resistance to aminoglycoside, macrolides, tetracycline and sources infections. But there is no significant association between *mecA* with $P=0.141$ between the source of infection.

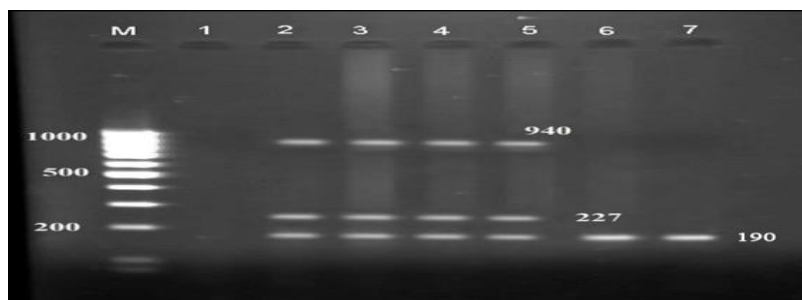


Figure (1): Multiplex PCR amplifications of *S. aureus* strains isolated from

wounds. Lane M: 100 bp marker. Lane 1: negative control. Lanes 2-7: 227 bp fragment of *aacA-D*, 940 bp fragment *msrA* and 190 bp fragment of *ermA*.

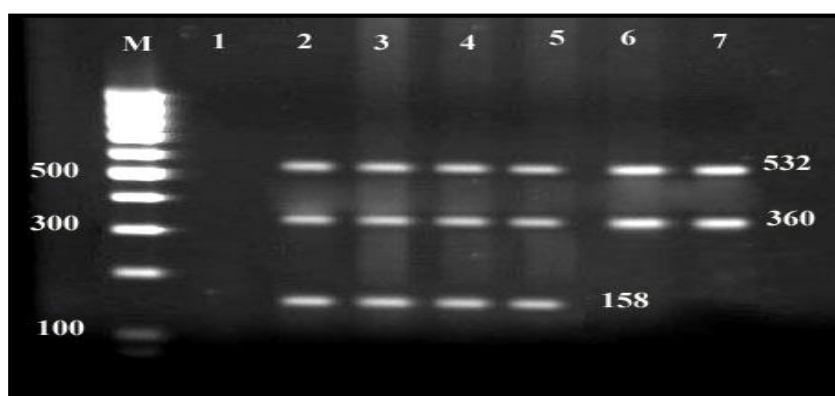


Figure (1): Multiplex PCR amplifications on *S. aureus* strains isolated from wounds and urine. Lane M: 100 bp marker. Lane 1: negative control with distilled water, Lanes 2-7: 532 bp fragment of *mecA*, 360 bp fragments indicated *tet K* and 158 bp fragment of *tet M*.

Table 3. Distribution of genes encoding the antibiotic resistance of *S. aureus* strains isolated from urine and wound

Gene	Wound	Urine	Total	Percent	P-value
<i>mecA</i>	29	29	58	58%	0.141
<i>aacA-D</i>	•	24	24	24%	0<000
<i>tetK</i>	9	4	13	13%	0.004
<i>tetM</i>	35	54	89	89%	0.001
<i>msrA</i>	16	20	36	36%	0.038
<i>ermA</i>	15	25	40	40%	0.0001

Table 4. Comparison of antibiotic resistance of *S. aureus* strains by disk diffusion and multiplex PCR

antibiotic resistance by multiplex PCR method	antibiotic resistance by disk diffusion method	antibiotic
<i>Tetk</i> 13%	76%	tetracycline
<i>tetM</i> 89%		
	Neomycin 20%	aminoglycoside
<i>aacA-D</i> 24%	Gentamicin 20%	
<i>ermA</i> 40%	Erythromycin	macrolides
<i>msrA</i> 36%	52%	
	Azithromycin	
	47%	
<i>mecA</i> 58%	64%	methicillin

Coagulase gene RFLP results:

In the polymorphism of coagulase gene, PCR products were analyzed by using enzyme Alu1. By using this enzyme based on the size of the band, 9 genotypes of coagulase was observed. The band sizes in genotypes 1-9 are as follows: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, and IX, 970, 810, 810, 810, 890, 810-1050, 890, 730, and 730 bp. Coagulase gene was found in all of the samples. In this study, from

65 *S. aureus* strains isolated from urine infections, polymorphism of coagulase gene was observed in 53 samples, The genotype in 40 isolates (53/61%) (25 samples isolated from male and 15 samples from women) and genotype VIII in 8 isolates (3/12%) (5 samples from male and 3 samples from women) and genotype IX in 5 isolates (6/7%) (3 samples isolated from male and 2 samples from women) were observed. In the

strains isolated from wound infections, polymorphism of coagulase gene was observed in 22 samples. The genotype in 15 isolates (85.42%) (8 samples isolated from male and 7 samples from women) and genotype VIII in 7 isolates (20%) (5 samples

isolated from male and 2 samples from women) was observed. The results in tables 5 and 6 are shown. There was no association significant between genotype and sex in the statistical analysis software SPSS 16.

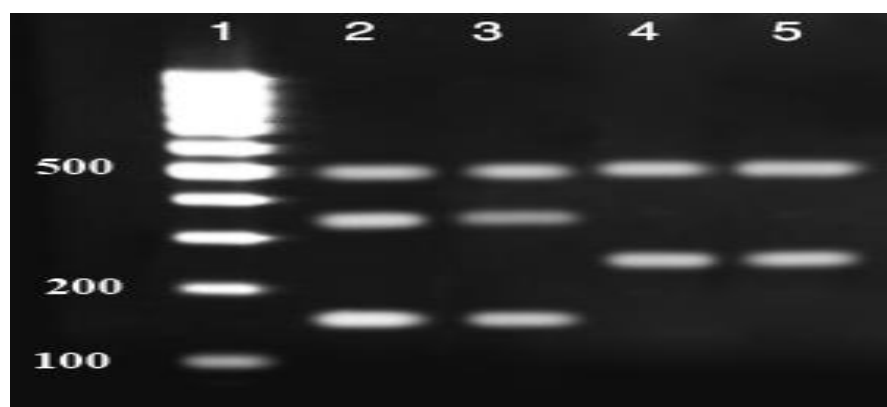


Figure 3. RFLP Patterns of the *coa* amplicon after digestion with endonuclease *Alu*. Lane M: 100 bp marker. Lanes 1–4: approximately 490-320-160-240bp *S. aureus* PCR product.

Table5: coagulase gene genotyping strains isolated from urine

Type code	PCR product (bp)	RFLP (bp)	N %
I	970	490-320-160	40 (61.53%)
II	810	410-240-160	-
III	810	490-240-80	-
IV	810	490-240-160	-
V	890	410-240-160-80	-
VI	810+1050	490-410-320-160	-
VII	890	490-410	-
VIII	730	490-240	8 (12.3%)
IX	730	410-320	5 (7.69%)

Table 6: coagulase gene genotyping strains isolated from wound

Type code	PCR product (bp)	RFLP (bp)	N %
I	970	490-320-160	15(42.85%)
II	810	410-240-160	-
III	810	490-240-80	-
IV	810	490-240-160	-
V	890	410-240-160-80	-
VI	810+1050	490-410-320-160	-
VII	890	490-410	-
VIII	730	490-240	7(20%)
IX	730	410-320	-

Discussion:

Molecular characterization 100 strains of *S. aureus* isolated from urine and wound were studied by using two methods Multiplex PCR and RFLP-PCR. Resistant gene *mecA*, *msrA*, *ermA*, *aacA-D*, *tetK* and *tetM* isolated were identified by Multiplex PCR method. In this study, 58% of isolated were carrying *mecA*. The presence of *mecA* gene complex which specifies the production of an abnormal penicillin binding protein PBP2a that has a decreased affinity for binding β -lactam antibiotics results in resistance to methicillin and also to all β -lactams including penicillins and cephalosporins (13). Aket et al., were observed, 40 % of the isolates carried the *mecA* gene in north India in 2012 (19). High antibiotic resistance rates in

wound infections is worrying. In this research, 89% of *S. aureus* strains isolated from wound were carrying *mecA*. Akapka et al., were reported that most cases of MRSA was in wound swab specimens (20). Nature of methicillin resistance in strains of *S. aureus* is heterogeneous. Identification of methicillin-resistant *S. aureus*, sometimes due to the heterogeneous expression of resistance is complex and influenced by variables such as pH, temperature and salt concentration (21). In this study, 24% of the isolates carried the *aacA-D* gene for resistant to aminoglycoside, that only were detected in the urine. Italy, France, Portugal and Spain have shown high levels of resistant to aminoglycoside. Level of resistance to aminoglycosides in *S. aureus* change from

country to country and year to year. High levels of resistance to aminoglycosides in *S. aureus* was reported 48% in Greece in 2012 (22). In our study 76% of strains were resistant to tetracycline by disk diffusion method but in the multiplex-PCR method, 89% of strains have *tetM* and 13% have *tetK* for resistance to tetracycline. This result confirms the high sensitivity of the multiplex-PCR method in compared to disk diffusion. All strains isolated from wound could carry *tetM* for resistance to tetracycline. In our study, *ermA* and *msrA* genes for erythromycin resistance were identified respectively of 40 % and 36 %. Duran et al. reported only 13 % of strains carrying *msrA* in the hospitals in Turkey and Hatary in 2012 (23). We did report a high level of resistance to vancomycin and rifampin, that is worrying. Classified the *S. aureus* on the basis of coagulase gene by molecular typing method is simple and accurate. This method can study epidemiological of *S. aureus* isolated. Scientists have demonstrated that special genotypes of coagulase gene is dominant in each region that is resistant to the action of neutrophil phagocytosis (24). The results of this research shows 55% of all cases of wound and urine have genotype I. This result shows that the type I can be responsible for

infections in many parts of the body. This type is able to adapt to the host tissue that is responsible for virulence in skin and urinary tract infections. Most strains were isolated from urine and wound have similar pattern. Most strains were isolated from urine and wound similar pattern existence of genotype XI in 69/7% of the strains isolated from urine is indicating different type's indifferent locations. There are several virulence factors such as adhesion and antimicrobial peptides and fatty acids suggest increasing stability of this type in the urinary tract, and skin (25). Montesinos et al., observed polymorphism of coagulase gene in four patterns. pattern Coa1 (89%) was the most common pattern that cause all of epidemic cases and other patterns were observed sporadic (26). With regard that the prevention and control of Staphylococcal infection depends on the identification of risk factors for infection, more studies on these bacteria should be done so as to obtain information about the prevalence of *S. aureus* infections in hospitals.

Our study showed that *S. aureus* is increasingly resistant to various antibiotics, which is a serious warning for the treatment of infections caused by *S. aureus* in the region. In principle, the results of antibiograms in different geographical areas differ from each other, because this is

influenced by factors such as how antibiotics are used in hospitals and in the community. To prevent the increase in resistance to other antibiotics, avoid the unnecessary and unnecessary prescription of available antibiotics. Also, avoid prescribing antibiotics that are highly resistant to this bacteria.

References:

1. Bhateja , .Mathur, T, .Pandya M, Fatma T,. Rattan A. Detection of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*: A comparative study of three different phenotypic screening methods. Indian J Med Microbio. 2005; 23 (1):52-55.
2. McIver CJ, White PA, Jones LA, Karagiannis T, Harkness J, Marriott D, Rawlinson WD. Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype carrying integrons. J Clin Microbiol. 2002; 40(4):1538-1540.
3. Vila J Pal T. Update on Antibacterial Resistance in Low-Income Countries: Factors Favoring the Emergence of Resistance. Infect Dis J 2010; 4: 38-54
4. Lowy F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 2003; 111(9): 1265-1273
5. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram positive bacteria. Am J Med. 2003; 119: S11–S19; discussion; 2006; 62–70.
6. Mainous AG, Hueston WJ, Everett CJ, Diaz VA. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in the United States 2001—2002. Ann Fam Med. 2006; 4 (1):132—137.
7. Edmond MB, Wenzel RP, Pasculle AW. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*: perspectives on measures needed for control. Ann Intern Med. 1996; 124: 329-334.
8. Aubert G, Passot S, Lucht F, Dorche G. Selection of vancomycin- and teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* during teicoplanin treatment of *S. epidermidis* infection. J Antimicrob Chemother. 1990; 25:491-493.
9. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 1997;40: 135 – 136
10. Schmitz FJ, Fluit AC, Gondolf M. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. J Antimicrob Chemother. 2000; 43:253-259.

11. Kim YK, Kim JS, Kim HS, Song W, Cho HC, Lee KM. [Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from blood on the basis of coagulase gene polymorphism and toxin genes. Korean J Lab Med. 2008; 28 (4):286-2892.
12. Kumar R, Yadav BR, Singh RS. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitis crossbred cattle. Curr Microbiol. 2010; 60: 379-386.
13. Ugwu MC, Odimegwu DC, Ibezim EC, and Esimone CO. Antibiotic Resistance Patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from Nostrils of Healthy Human Subjects in a Southeastern Nigeria Locality. Macedonian Journal of Medical Sciences. 2009; 15; 2(4):294-300.
14. Tuncer I, Kalem F, Çosar M, Arslan U. Antibiotic susceptibility of *staphylococcus aureus* strains isolated from blood stream infections. Turk Microbiol Cem Drug. 2009; 39 (1-2): 22-26.
15. Al-Ruaily. Khalil OM. . Detection of (*mecA*) gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at Prince A/Rhman. Sidery Hospital, Al-Jouf, Saudi Arabia. J Med Genetics and Genomics. 2011; 3 (3) 41 – 45.
16. Duran, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic restance genes and suscceptibilitypatteyns in staphylococci. Indian J Med Res. 2010; 135: 389-396.
17. Zmantar T, Chaieb K, Ben Abdallah F, Ben Kahla-Nakbi A, Ben Hassen A, Mahdouani K, Bakhrouf A. Multiplex PCR detection of the antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from auricular infections. Folia Microbiol. 2008; 53: 357-362.
18. M Salehi V, Razavilar H, Mirzaei A, Javadi SM. Use of restriction fragment length polymorphism to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy products. Biology and Medicine. 2012; 4 (3): 117–120.
19. AK SK, Shetty PJ, Chidambaram A, Ranganathan R. Detection of *mecA* genes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction. Int J Health Rehabil Sci. 2012; 1(2): 64-68

20. Akpaka PE, Kissoon S, Swanston WH, Monteil M. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Trinidad and Tobago. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006; 3: 5: 16-24.
21. De Carvalho MJ, Pimenta F, Hayashida M, Gir E, da Silva AM, Barbosa CP, Canini SR, Santiago S. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin susceptible *S. aureus* in the saliva of health professionals. Clinics (Sao Paulo). 2009; 64(4): 295-302.
22. Liakopoulos A, Foka A, Vourli S, Zerva L, Tsiapara F, Protonotariou E, Dailiana Z, Economou M, Papoutsidou E, Koutsia-Carouzou C, Anastassiou ED, Diza E, Zintzaras E, Spiliopoulou I, Petinaki E. Aminoglycoside-resistant staphylococci in Greece: prevalence and resistance mechanisms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30 (5):701-705.
23. Kanevsky SU, Jayarao BM, Sordill LM. Phylogenic relationship of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis based on coagulase gene polymorphism. Vet Microbiol. 1999. 71:53-58
24. Georgel P, Crozat K, Lauth X, Makrantonaki E, Seltmann H, Sovath S, Hoebe K, et al. A toll-like receptor 2-responsive lipid effector pathway protects mammals against skin infections with gram-positive bacteria. Infect Immun. 2005; 73 (8):4512-4521.
25. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. Epidemiology Genotyping of (MRSA) by (PFGE) at a university Hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol. 2005; 40(6):2119-2125.

Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from wound and urine in Kermanshah, Iran.

Zeinab Ahmadi^{1*}, Hossein Aghajani¹, Hossein Khodabandeh¹

2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding Author: zeinab_ahmadi1362@yahoo.com

Abstract:

Human is the main source of *Staphylococcus aureus* in the nature. This bacterium is one of the important agents of nosocomial infections. Therefore, is study molecular characterization of this bacteria of high important. After identification and confirmation of 100 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from wounds and urine samples in Kermanshah with microbiology standard methods, the antibiotic susceptibility testing was done and resistance genes (*mecA*, *aacA-D*, *tet K*, *tet M*, *msrA*, *ermA*) of isolates were studied with multiplex-PCR method and genotyping of coagulase gene of isolates was studied by RFLP-PCR method. In susceptibility testing were reported greatest resistance to penicillin (90%) and lowest resistance nitrofurantoin (8%). In multiplex-PCR method, (49%) of the isolates carry *mecA* gene, (24%) *aacA-D*, (89%) *tetM*, (14%) *tetK*, (40%) *ermA* and (36%) *msrA*. In the detection polymorphism of coagulase gene from 65 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urine, coagulase gene polymorphism was observed in 53 cases, genotype I (61.53%) and genotype VIII (12.3%) and genotype IX (7.69%). The coagulase gene polymorphism of strains isolated from wound were observed in 22 samples. Genotype I was reported (42.85%) and genotype VIII (20%) was observed. Detection molecular characterization of isolates is very effective and efficient in prevention and control infection.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance patterns, multiplex-PCR, RFLP-PCR, coagulase gene



رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۲ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۳

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



Review on Suspension & Nanosuspension

Chetan Borase , Amol Jagdale, Monika Sonawane , Shubham Kothawade ,Roshan Landge ,Akshay Katkale ,

*Department of pharmaceutical Quality Assurance , NDMVP College of Pharmacy ,Nashik ,
Shivaji Nagar, Gangapur road, Nashik-422002

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخچه مقاله: دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۰۳ پذیرش: ۱۴۰۴/۲/۱۰ چاپ: ۱۴۰۴/۰۴/۱۵</p> <p>DOI:</p> <p>کلمات کلیدی: سوسپانسیون ها، عوامل تعلیق ساز، پایداری، انحلال، نانوسوسپانسیون</p> <p>* نویسنده مسئول: Email: chetanborase2000@gmail.com</p>	<p>سوسپانسیون دارویی، پراکندگی درشتی از ذرات جامد نامحلول در یک محیط مایع است. قطر ذرات سوسپانسیون معمولاً بیشتر از ۵،۰ میکرومتر است. با این حال، ایجاد مرزهای دقیق بین سوسپانسیون ها و پراکندگی ها با ذرات ریزتر دشوار و غیرعملی است. سوسپانسیون ها دسته مهمی از اشکال دارویی هستند. مزایای فرمولاسیون های سوسپانسیون شامل تجویز مؤثر داروهای آبریز؛ عدم استفاده از حلال های کمکی؛ و پوشاندن طعم ناخوشایند برخی از ترکیبات است. تضمین مقاومت در برابر تخریب داروها به دلیل هیدرولیز، اکسیداسیون یا فعالیت میکروبی؛ به راحتی توسط بیماران جوان و مسن بلعیده می شود. درمان مؤثر دپوی عضلانی. علاوه بر این، غلظت های دارویی نسبتاً بالاتری ممکن است در محصولات سوسپانسیون در مقایسه با فرمولاسیون های محلول گنجانده شود. این بررسی مروری بر جنبه های مختلف سوسپانسیون ها، مانند طبقه بندی سوسپانسیون ها، نظریه سوسپانسیون، عوامل مختلف سوسپانسیون ساز، جنبه های فرمولاسیون سوسپانسیون، بسته بندی سوسپانسیون ها، ارزیابی سوسپانسیون ها، پایداری سوسپانسیون ها و تحقیقات اخیر در حال انجام، ارائه می دهد. آویز. حلالیت یک عامل تعیین کننده در اثربخشی یک دارو صرف نظر از مسیر مصرف است. اکثر داروهای اخیراً کشف شده در آب نامحلول هستند و فراهمی زیستی کمی دارند، بنابراین توسعه آنها با شکست مواجه شده است. این نامزدهای به اصطلاح "بریکلیا" اکنون می توانند به صورت نانوسوسپانسیون فرموله و عرضه شوند. فناوری نانوسوسپانسیون مشکل داروهای را که در آب محلول ضعیفی دارند و فراهمی زیستی کمی دارند، حل می کند. از فناوری نانوسوسپانسیون می توان برای بهبود پایداری و فراهمی زیستی دارو استفاده کرد. تهیه نانوسوسپانسیون ساده و برای همه داروهای نامحلول در آب قابل استفاده است. نانوسوسپانسیون ها با استفاده از آسیاب های مرطوب، همگن سازهای فشار بالا، امولسیون و تبخیر حلال، امولسیون سازی مذاب و روش های سیال فوق بحرانی تهیه می شوند. نانوسوسپانسیون ها را می توان با استفاده از پایدارکننده ها، حلال های آلی و سایر افزودنی ها مانند بافرها، نمک ها، پلی ال ها، عوامل اسمز و مواد محافظ در برابر سرما تهیه کرد.</p>

Introduction:

Vehicle suspension main task is to separate passenger and vehicular body interactions from oscillations generated by road abnormalities whilst still maintaining continuous wheel-road contact. Currently, there are three types of automotive suspensions commonly used namely passive, semi-active, and active. All said systems are based by either pneumatic or hydraulic operation. It was asserted that some of these suspension systems cannot fully solve automobile oscillations problem because they are very costly and lend towards vehicle energy consumption increment (1).

Active vehicle suspension systems had been in wide investigation for more than 20 years due to their promising characteristics. These systems poses potentiality of responding considerably good towards upward and downward changes caused by road inputs irregularities since the dampers as well as springs are mediated by an actuator force. Actuator in an active suspension functions to spread energy away from system and it can be operated through various kinds of controllers determined by proposed design. With correct managing techniques which could induce more beneficial compromise between driving comfort and road handling stability, an active system as a whole would be the superior suspension design (2).

Definitions

Pharmaceutical suspensions are coarse dispersions in which the inner phase is uniformly dispersed throughout the outer phase. An internal phase composed of insoluble solid particles having a defined size range that is maintained uniformly throughout the suspending carrier by one or a combination of suspending agents. The external phase (suspension medium) is, in some cases, generally aqueous and may be an organic or oily liquid for parenteral administration.

Category

1. Based on general classification

- 1] Oral suspension
- 2] External preparation
- 3] Parenteral suspension

2. Based on solid content ratio

- 1] Dilute suspension (2~10% w/v solids)
- 2] Concentrated suspension (50% w/v. solids)

3]. Based on electrokinetic properties of solid

- 4] Particles
- 5] Agglomerated Suspension
- 6] Agglomerated Suspension

4. Based on Solid Particle Size

- 1] Colloidal Suspension (<1 micron)
- 2] Coarse Suspension (> 1 micron)

3] Nano Suspension (10 ng)

Advantages

1] Drug suspensions can improve the chemical stability of certain drugs. For example, procaine penicillin G.

2] The drug in suspension has a higher level of bioavailability than other formulations. Bioavailability is listed in the following order:

Solution > Suspension > Capsule > Compressed Tablet > Coated Tablet

3] The duration and onset of action can be controlled. For example, protamine zinc insulin suspension.

.Disadvantages

1] Physical stability, sedimentation, and compression can cause problems.

2] It is bulky and must be handled and transported with care.

3] is difficult to formulate.

4] An exact single dose cannot be obtained unless the suspension is packaged in unit dosage form.

Addendum

1] Suspensions are generally used for insoluble or poorly soluble drugs. For example. Prednisolone Suspension.

2] Prevents drug degradation or increases drug stability.

for example. Oxytetracycline Suspension.

3] To mask the bitter or unpleasant taste of medicine.

for example. Chloramphenicol Palmitate Suspension.

4] Suspensions of the drug may be prepared for topical use, for example for sunburn.

5] Suspensions may be formulated for parents to control the rate of absorption of the drug

Pharmaceutical Suspension Theory

1. Sedimentation Behavior

Sedimentation refers to the sedimentation of particles or masses by gravity in a liquid formulation.

2. Sedimentation theory

Settling velocity expressed by the Stokes equation:

$$V_{Sed} = \frac{d^2 (\rho_s - \rho_o) g}{18\eta_o}$$

$$= \frac{2r^2(\rho_s - \rho_o) g}{9\eta_o}$$

where

v = sedimentation velocity (cm⁴) particle diameter

r = particle Radius

ρ_s = Density of dispersed phase

ρ_o = Density of dispersion medium

g = Acceleration of gravity

η_o = Viscosity of dispersion medium at equilibrium

Stokes equations in different forms

$$V' = v_s \cdot \epsilon \cdot n$$

V' = fall velocity at the interface in cm/sec.

V = sedimentation rate according to the minimum Stokes value.

ϵ = indicates the initial porosity of the system, which is the initial volume fraction of a uniformly mixed suspension and varies by one unit.

n = measure of system "obstacles" and constants for each system

Stokes Equation Constraints

Stokes equation applies only to:

☐ Spherical particles in a very dilute suspension (0.5-2 g per 100 ml).

☐ Particles that settle freely without interfering with each other (no collisions).

☐ Particles that have no physical or chemical attraction or affinity for the dispersion medium

3. Deposition Parameters

Three important parameters are considered.

1. Sedimentation volume (F) or height (H) for flocculated suspensions:

$$F = V_u / V_o \text{ (A)}$$

Where, V_u = final or ultimate volume of sediment

V_o = original volume of suspension before settling

$$F = H_u / H_o$$

Where, H_u = final or ultimate height of sediment

H_o = original height of suspension before settling Sedimentation volume can have values ranging from less than 1 to greater than 1; F is normally less than 1. F=1, such product is said to be in flocculation equilibrium.

And show no clear Supernatant on standing Sedimentation volume (F) for deflocculated suspension

$$F_{\infty} = V_{\infty} / V_o$$

Where, F_{∞} = sedimentation volume of deflocculated suspension

V_{∞} = sediment volume of completely deflocculated suspension.

(Sediment volume ultimate relatively small)

V_o = Original volume of suspension

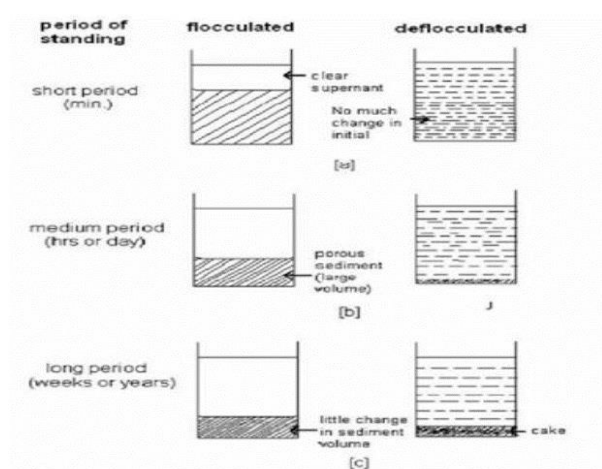
3. Sedimentation Velocity

The velocity dx / dt of a particle in a unit centrifugal force can be expressed in terms of the Svedberg coefficient 'S' Under centrifugal force, particle passes from position x at time t to position x at time t . Settling behavior of flocculated and deagglomerated suspensions

Flocculated Slurry

Floc (loose agglomerates) generated from flocculated slurries increase the settling rate due to the increase in the size of the settling particles. As a result, the flocculated suspension settles faster. Here the deposition depends not only on the size of the flakes, but also on the porosity of the flakes. The loose structure of flocs, which quickly settling in flocculated slurries, tends to persist in sediments containing significant amounts of entrained liquid. Therefore, the volume of the final sludge is relatively large and it is easy to redisperse by stirring.

Fig 1. Sedimentation Behaviour of Flocculated and Deflocculated Suspensions



Deflocculated Suspensions

Deflocculated Suspensions In Deflocculated Slurry, individual particles are settling and the settling rate is low, which prevents entrapment of the liquid medium, making it difficult to redisperse during stirring. This phenomenon is

also called "cracking" or "clay". In a deflocculated suspension, large particles settle quickly while small particles remain in the supernatant, so the supernatant becomes cloudy and even the smallest particles in the flocculated suspension appear, making the supernatant invisible.

Brownian motion (Drunk Walk)

Brownian motion keeps the dispersed material in random motion to prevent settling. Brownian motion depends on the density of the dispersed phase and the density and viscosity of the dispersed medium. If the size of the particle is less than the critical radius (r), the kinetic impact of the particle with molecules in the suspending medium keeps the particle in suspension. Brownian motion can be observed when the particle size is 2-5 mm when the density of the particles and the viscosity of the medium are good. When particles (about 2 microns in diameter or less) are observed under a microscope or when light scattered by colloidal particles is observed under an ultramicroscope, the observed random motion is called Brownian motion.

The displacement or displacement distance (D_i) due to Brownian motion is given by Equation

$$D_i^2 = RTt$$

$$N3\pi\eta r$$

where R = gas constant

T = temperature. Kelvin in degrees

N = Avogadro's number

η = Viscosity of the medium

t = Time

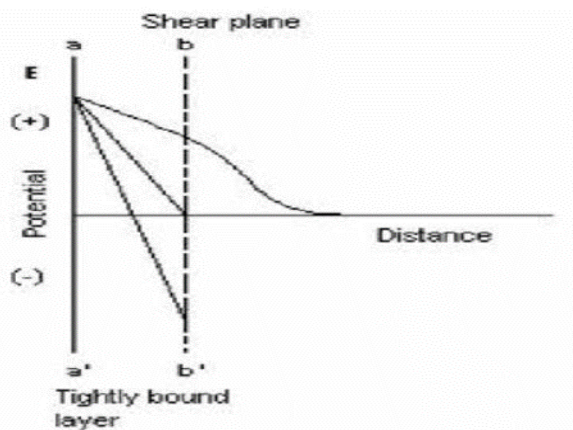
r = Particle radius

Electro kinetic properties

1. Zeta potential

Zeta potential is defined as the potential difference between closely adjacent bonding surfaces. An electrically neutral region of a layer (shear surface) and solution. As shown in Figure 1.2, the dislocation drops sharply at first and then gradually decreases as it moves away from the surface. This is because counter ions located close to the surface act as a shield to reduce the electrostatic attraction between the charged surfaces and counter ions farther from the surface.

Fig: 1.2 Zeta potential



Zeta potential has practical applications for the stability of systems containing dispersed particles. Because this potential, not the Nernst dislocation, determines the degree of repulsion between neighboring and evenly charged dispersed particles. When the zeta potential decreases below a certain value (depending on the specific system used), the attractive force exceeds the repulsive force and the particles bind. This phenomenon is called agglomeration

2. Flocculent

Flocculent reduces the zeta potential of suspended charged particles, causing agglomeration (flocculation) of the particles.

Examples of flocculants:

- Neutral electrolytes such as KCl, NaCl.
- Calcium salt
- Alum

3. Agglomeration System

In this system, the dispersed phase is in the form of large loose masses in which individual particles are weakly bound to each other. As the size of the settler increases, the rate of sedimentation increases due to agglomeration. The rate of sedimentation depends on the size and porosity of the floc. The formation of particle swarms reduces the free surface energy between the particles and the liquid medium, resulting in thermodynamic stability. Formulation of the

Flocculant Suspension System Formulating a flocculent suspension requires two critical steps.

- Particle wetting
- Controlled agglomeration

Various Methods to Increase Viscosity of Suspensions

1. Viscosity improvers

Using some natural gums (gum arabic, tragacanth), polymers, cellulose derivatives (sodium CMC, methylcellulose), clays (bentonite) and sugars (glucose, fructose) to increase the viscosity. Viscosity of the dispersion medium. These are known as suspending agents

2. Solvent

Certain solvents that are highly viscous on their own are used as cosolvents to increase the viscosity of the dispersion medium. Thus increasing the physical stability ... The clinical effect of a nitrofurantoin suspension increases as the viscosity of the suspension increases.

Suspension Syringe Capability

Parenteral Suspensions are generally non-agglomerated suspensions and are often supplied as dry suspensions. If the parenteral suspension is flocculated, less syringes will be injected. This means that it will be more difficult for the doctor or nurse to administer and the patient will suffer from greater cohesion. Suspensions for parenteral administration are generally administered intramuscularly. Suspensions for intravenous administration with a particle size of less than 1

micron, called nanosuspensions, are also currently available. The viscosity of the suspension should be on the table so that it can be easily injected with a syringe and is less painful for the patient.

Colloidal Properties

Colloids in suspension form compounds such as ions in solution. Therefore, the suspension properties of colloids are generally ignored. In general, colloids are maintained in suspension form by a very low electronegativity charge on the surface of each particle. This charge is called the zeta potential. This small charge, called the zeta potential, is the main function that determines the ability of the liquid to transport the substance in the suspension. As this charge (electronegativity) increases, more material is transported through the liquid in the suspension. As the charge decreases, the particles move closer to each other and the liquid reduces its ability to move substances in the suspension. There is a point where the particles go beyond their ability to carry the material in suspension and begin to aggregate with the heavier particulate matter that falls out of the liquid and solidifies. The colloids in the suspension determine the ability of all liquids, especially water-based liquids, to carry the fabric. This also applies to semi-solid and solid materials.

Formulation of Pharmaceutical Suspensions Structured Carrier

The term "structured carrier" is of paramount importance for formulation and stability criteria when stable suspensions are required. A major drawback of suspension formulations that limit their use in everyday life is their stability during long-term storage. To overcome these problems or to reduce them to some extent, the term 'structured car' is meaningful. Structured carriers are carriers in which the viscosity of the formulation approaches infinity during storage under static conditions of very low shear. The vehicle behaves like a "false body" that can keep particles suspended, which is rather stable.

The concept of "structured carrier" applies only to agglomerated suspensions that form a solid precipitate due to precipitation of solid particles and must be readily and uniformly redispersed during administration. The concept of a structured vehicle is not applicable to agglomerated slurries as the precipitated mass is easily redispersed by shaking. In general, the concept of structured carriers does not apply to parenteral suspensions as their high viscosity can cause syringe problems.

The density of structured filler may be increased as

- Polyvinyl pyrrolidone
- Polyethylene glycol
- Glycerin

List of suspending agents used in suspension production

- Alginate
- Methyl cellulose

Hydroxyethyl cellulose 4 methyl carboxymethyl • Carboxymethyl cellulose 44 44 • Carboxymethyl cellulose 44 44 • Carboxymethyl Cellulose 44 44 • Carboxymethyl Cellulose 44 44 • Carboxymethyl Cellulose 44 44 • 4 Carboxymethyl Cellulose 44 44 • 44 Carboxymethyl 4 Cellulose Alginate has almost the same suspending effect as tragacanth. There is. Alginate solutions lose their viscosity when heated above 600 °C. due to depolymerization. Fresh solutions have the highest viscosity, after which the viscosity gradually decreases and acquires a constant value after 24 hours. The maximum viscosity is observed in the pH 59 range. It is also used as a laxative in the food industry. Due to its significant thickening effect, alginate is used in lower concentrations to avoid viscosity issues. High viscosity slurries are not easy to pour. A 1% solution of low viscosity alginate has a viscosity of 410 mPa·s at 200°C. Alginate is a polymer composed of monomers of mannuronic acid and glucuronic acid by chemical composition. The ratio of mannuronic acid to glucuronic acid determines the rafting properties. High percentages (eg 70% glucuronic acid) form the strongest rafts

2. Methylcellulose

Methylcellulose is available in several viscosity grades. The difference in viscosity is due to differences in methylation and polymer chain length. Methylcellulose is more soluble in

cold water than in hot water. Addition of methylcellulose to hot water and cooling with constant stirring produces a clear or milky white viscous solution. Methylcellulose is stable in the pH range of 3-11. Methylcellulose is nonionic and therefore compatible with many ionic aids

3. Hydroxyethylcellulose

It is another excellent suspending agent with properties somewhat similar to methylcellulose. In HEC, the hydroxyethyl group is attached to the cellulose chain. Unlike methylcellulose, HEC dissolves in both hot and cold water and does not gel when heated.

Sodium Carboxymethylcellulose (NaCMC) (53,54).

Various viscosities are available. The difference in viscosity depends on the degree of polymerization. Dissolve both in hot and cold water. It is stable in the pH 5-10 range. Because it is anionic, it is not compatible with polyvalent cations. Sterilizing rubber powder will lower its viscosity. Used in concentrations up to 1%.

Acacia [54]

Most widely used in the preparation of suspensions for immediate administration. Acacia is not a good thickener. For a dense powder, acacia itself cannot provide a suspending effect, so we mix tragacanth, starch and sucrose, commonly known as BP complex tragacanth powder.

Surfactant

Surfactant reduces the interfacial tension between the drug particle and the liquid, allowing the liquid to penetrate into the pores of the drug particle, displacing air, providing wetting. The optimum concentration of surfactant helps to disperse the particles. We usually use nonionic surfactants, but ionic surfactants can also be used under certain conditions. The downside of surfactants is that they tend to foam. It also tastes bitter. Some surfactants, such as polysorbate 80, interact with preservatives such as methylparaben, reducing their antimicrobial activity.

Polysorbate 80 is the most popular because of its advantages:

- 1 Since it is non-ionic, the pH of the medium does not change.
- 2 No toxicity. Safe for internal use.
- 3 It does not foam well, but it should be used at a concentration of less than 0.5%.
- 4 Compatible with most supplements.

Solvent

The most commonly used solvents are alcohol, glycerin, polyethylene glycol and polypropylene glycol. The mechanism that provides wettability is that it is mixed with water to reduce the interfacial tension between the liquid and air. The liquid penetrates the individual particles and aids in wetting. To avoid stability issues, all liquid formulations should be formulated at an optimum pH. Rheology,

viscosity, and other properties depend on the pH of the system. Most liquid systems are stable in the pH 4-10 range. This is most important when the API consists of ionizable acidic or basic groups. If the API consists of neutral molecules with no surface charge, this is not a problem. Steroids, phenacetin, but pH control is strictly required as a quality control tool.

Process Quality Control (Ipqc) for Slurries

Process Quality Control is the process of monitoring critical manufacturing process parameters to ensure the quality of the final product and achieve results. Instructions required when discrepancies are found. In a continuous process, production management is established and documented by quality control and production personnel to ensure that the predictable values of each production run are within acceptable standards.

For in-process quality control to function properly, it must be determined:

Which processes should be monitored and at what stage?

How many samples were taken for analysis and how often?

The purpose of the IPQC test, such as the amount of each sample, acceptable variability, etc.

1 Minimize party and within-party variability.

2 To ensure the quality of the final product.

3 Ensures continuous monitoring of process variables that can affect product quality.

4 Ensuring the introduction of GMP in production.

5 Indicates that a functional quality assurance system is in place (55,56).

IPQC occurrence of phases

This test is performed for dispersed phase and dispersion medium. To prepare the dispersed phase for the suspension, purified water and syrup are often used. Particle size distribution, syrup clarity, gum dispersion viscosity, monitored water quality to monitor product quality

Dispersed phase particle size

Optimal particle size The drug in the dispersed phase is essential for the stability of the final suspension. So this test is done to analyze under the microscope and find out the drug particle size range, then compare with the required optimal particle size. In the event of discrepancies, stricter control of the microbiological step should be ensured

pH test

The pH of the suspensions also contributes to the stability and properties of the formulation. Therefore, the pH of the different media, suspension phase, pre-mix and post-mix are all monitored and recorded over time to ensure optimum pH environment is maintained

Feasibility

Experimental This is done on suspensions after mixing to ensure that the end result, the product is pourable and will not cause any problems during patient loading and handling

Check final product

To obtain an accurate dose of the dosage form, the active ingredient should be evenly distributed throughout the dosage form. Therefore, samples removed from the dispersed phase after microbiology and, after mixing with the dispersion medium, were tested to determine the degree of homogeneity. If a deviation is found, it is corrected appropriately by monitoring the mixing step to ensure a reliable formulation.

Measure zeta potential

The value of zeta potential reflects future stability of the suspension, so it tracks over time to ensure optimal zeta potential. The zeta potential is measured with a zetameter or by micro electrophoresis (57).

Appearance

1. Colour, odour and taste
2. Physical properties such as particle size determination and microscopic imaging for crystal growth
3. Sedimentation rate and zeta potential measurement
4. Body sedimentation volume

5. Centrifugation and redispersity test

6. Flow measurement

7. Test resistance

8. pH

9. FreezeThaw temperature cycle Container and cap liner compatibility

10Torque test

Centrifugal test

This test provides information on the physical stability of a suspension. Product is tested for uniform Color distribution, no air bubbles prior to packaging. Final quality check of suspension QC quiescent test.

Nanosuspension

Ddefinitions:

Pharmaceutical nanosuspensions are "very fine solid particles in an aqueous carrier stabilized with a surfactant for oral and topical administration or parenteral and pulmonary administration, resulting in an increased rate of dissolution due to a decrease in particle size and consequently, improved bioavailability (52). Dissolution rate and thus improved bioavailability (52). More than 40% of the new chemicals created in drug development programs are poorly soluble in water or lipophilic compounds. Creating water-insoluble drugs has always been a daunting challenge for pharmacists. Nanoparticle formulations can be applied to all medicinal compounds belonging to

Class II and IV of the Classification of Biologicals (BCS) to increase their solubility and thus allow separation from the gastrointestinal barrier. Undifferentiated is used for Class II drugs (BCS), i.e. drugs with good permeability and poor solubility. Traditional methods for increasing the solubility of poorly soluble drugs include micronization, solubilization using a cosolvent, salt form, dispersion of surfactant, precipitation method, and oily solution. Other methods [814] such as liposomes, emulsions, microemulsions, solid dispersions and complex inclusion formation using cyclodextrins (14). Give reasonable results but are not universally applicable to all drugs. This method does not apply to drugs that do not dissolve in aqueous and organic solvents. Nanotechnology can be used to solve problems associated with this traditional approach of increasing solubility and bioavailability. Nanosuspension is preferred for compounds that are insoluble in water (but soluble in oil) with high log P, high melting point and high capacity. Nanosuspensions can also be used for drugs that are insoluble in water and organic solvents. Hydrophobic drugs such as atorvastatin (15), famotidine (16), simvastatin (17), revaprazan (18) and aceclofenac (19) are formulated as nanosuspension

A nanosuspension is a colloidal dispersion of nanosized drug particles stabilized with a surfactant. They can also be defined as a two-phase system consisting of pure drug particles dispersed in an aqueous vehicle with suspended particles less than 1 micron in diameter.

Nanosuspensions can be lyophilized or spray dried, and nanoparticles of nanoparticles can also be incorporated into a solid matrix (20-25).

nano is the Greek word for dwarf. Nano means 1/109 or 1/billion. Some nan scale comparisons are provided.

Microns = 106 m = 104 cm = 103 mm 4.

For a long time, colloid mills or jet mills were used to favor the micronization of poorly soluble drugs. The overall particle size distribution ranges from approximately 25 microns to 0.1 microns to microns, with only a small fraction being less than 1 micron in the nanometer range.

When to use nano-suspensions Approach

1] Preparation of nano-suspensions is preferred for compounds that are insoluble in water (but soluble in oil) with high log P.

2]. In general, drugs that are insoluble in water but soluble in oil are formulated as liposomes, emulsion systems, but this lipid formulation approach does not apply to all drugs. In these cases, nano-sized suspensions are preferred.

3] For drugs that are insoluble in both water and organic media, nanosuspensions are used instead of using lipid systems as formulations.

4] The nanosuspension approach is best for compounds with high log P, high melting points, and high doses.

Potential benefits of nanosuspension technology for poorly soluble drugs

1] Reduced particle size, increased drug dissolution rate, increased absorption rate and absorption rate, increased drug bioavailability, plasma area over time curve, time onset, maximum drug level, variability Reduced, reduced lactation/fasting effects.

Nanosuspension can be used for compounds that are insoluble in water but soluble in oil. On the other hand, nanosuspensions can be used in contrast to lipid systems, successfully generating compounds that are insoluble in water and oil.

2] nanoparticles can attach to the gastrointestinal mucosa to prolong the contact time of the drug, thereby increasing the absorption of the drug.

3] An obvious advantage of nanosuspensions is that they can be administered in a variety of ways, including oral, parenteral, pulmonary, dermal, and ocular.

4] Nanosuspension of nanoparticles (NPs) offers a number of advantages over conventional dosage forms for the eye, including reduced dosage, sustained drug release for a long period of time, reduced systemic drug toxicity, and improved drug absorption due to prolonged residence. Nanoparticles can be advantageous drug carriers for ophthalmic applications because of the length of time nanoparticles are present on the corneal surface, higher drug concentrations in infected tissue, compatibility for poorly water-

soluble drugs, and smaller particles are better tolerated by patients than larger particles.

5] Nanosuspension has a low incidence of side effects of excipients.

6]. Nanosuspension eliminates compound delivery problems by eliminating the need for dissolution and keeping the drug in its desirable crystalline state small enough to be pharmaceutically acceptable.

Methods for preparing nanosuspension

Basically, there are two methods for preparing Nanosuspension. The traditional precipitation method (hydrosol) is called bottom-up technique. The top-down technique is the preferred decomposition method over the sedimentation method. Top-down techniques include intermediate milling (nanocrystals), high pressure homogenization in water (dissociation), high pressure homogenization in non-aqueous media (Nano-refining), and a combination of precipitation and high pressure homogenization (Nanoedge) (26-32).

Advantage

- 1) Use simple and inexpensive equipment.
- 2) Higher solubility upon saturation favors precipitation compared to other methods of preparing nanosuspensions.

Disadvantages

- 1) The drug must be dissolved in one or more solvents (except for all new drugs that are poorly

soluble simultaneously in aqueous and organic media).

2) The solvent must be mixed with at least one non-solvent.

3) Residual solvent must be removed, which increases production cost.

4) It is slightly difficult to maintain particle properties (ie size, especially the amorphous part). A second sequential process, spray drying or freeze drying, is generally recommended for particle preservation (33, 34).

TopDown Technology

a) Medium Milling

b) High Pressure Homogenization

Medium Milling

Nanosuspensions are produced using high shear mills or pearl mills. The grinder consists of a grinding chamber, a milling shaft and a recirculation chamber. The aqueous drug slurry is then fed into a grinder containing fine grinding balls/pearls. Because this ball rotates at a very high shear rate at a controlled temperature, it passes through the inside of the grinding ball and collides with the sample on the opposite wall of the grinding ball. Combining friction and impact forces significantly reduces particle size. The grinding media or balls are made of ceramic sintered alumina or zirconium oxide

or highly crosslinked polystyrene resin with high wear resistance. Planetary ball mills (PM100

and PM200; Retsch GmbH and Co., KG, Haan, Germany) are an example of equipment that can be used to achieve sub-0.1 micron fineness. Zninsulin nanosuspensions with an average particle size of 150 nm were prepared using a wet milling technique. The main disadvantages of this technique are the erosion of beads/pearls that can leave a contaminating residue in the final product, the degradation of thermally labile drugs due to the heat generated during the process, and the relatively high proportion of particles larger than 5 μm in size (35, 37).

Advantages

1] Simple technology

2] Low cost of self-polishing

3] To some extent large-scale production is possible (batch process).

Disadvantages

1] There is a possibility of erosion of the crushed material, resulting in product contamination.

2] The process duration is not very favorable for production.

3] Prolonged grinding may result in the growth of microorganisms in water.

4] Time and costs associated with procedures for separating milled material from suspensions of pharmaceutical nanoparticles, particularly in the production of sterile parenteral products (35, 38).

High-pressure homogenization

Dissocubes homogenization involves pumping the slurry under pressure through a narrow orifice UY.

Dissocubes

It was developed by Muller et al. In this case, the drug suspension is passed through a small hole and the static pressure drops below the boiling pressure of the water, causing the water to boil and bubbles to form. When the suspension leaves the gap and reaches normal atmospheric pressure again, the bubble bursts and the peripheral part containing the drug particles rushes towards the center and the particle size decreases during the colloidal process. In most cases, several passes or cycles of the homogenizer are required depending on the hardness of the drug, the desired average particle size and the required uniformity. This principle is used in the APV Gaulin Micron LAB 40 homogenizer (APV homogenizer, Lübeck, Germany) and the NS 1001LPanda 2K high pressure homogenizer (Nirosuavi. S.P.A., Parma, Italy). The main advantage of high pressure homogenization over medium grinding is that it can be used for both dilute and concentrated suspensions and can also be used for aseptic production (39,40).

Nanopure

Nanopure is a homogenized suspension in anhydrous medium or aqueous mixture. In Dissocubes technology, cavitation is the defining

element of the process. However, unlike water, oils and fatty acids have very low vapor pressures and high boiling points. As a result, the drop in static pressure is not sufficient for cavitation to occur. Patents dealing with the disintegration of polymer materials by high pressure homogenization promotes disintegration at high temperatures of about 800°C, so it is mentioned that it cannot be used for heat-labile compounds. In nanoparticle technology, a suspension of drug in a non-aqueous medium is homogenized at 0 °C or even below freezing, called "deep freeze" homogenization. The results obtained are similar to dissocube, allowing effective use for heat-labile substances under milder conditions (41,42).

The basic principle of the Nanoedge™

Nanoedge is the same as sedimentation and homogenization. The combination of these methods results in a smaller particle size and better stability in a shorter time. The major drawbacks of the deposition method, such as crystal growth and long-term stability, can be addressed with Nanoedge technology. In this method, the precipitated suspension is further homogenized. This reduces the grain size and prevents crystal growth. Precipitation is performed in water using water-miscible solvents such as methanol, ethanol and isopropanol. Although these solvents may be acceptable to some degree in the formulation, it is desirable to remove them completely. For efficient production of nanosuspensions using Nanoedge

technology, the modified starting material can be obtained without solvent, including an evaporation step, and then homogenized at high pressure (43).

Emulsion Diffusion Method

In addition to using an emulsion as a carrier for drug delivery, it can also be used as a template for preparing nanosuspensions. Using an emulsion as a template is applicable to drugs that are soluble in volatile organic solvents or partially water-miscible solvents. These solvents can be used as the dispersed phase of the emulsion. The organic solvent or solvent mixture containing the drug is dispersed in an aqueous phase containing a suitable surfactant with stirring to form an emulsion. The resulting emulsion was further homogenized by high pressure homogenization. After the homogenization cycle, the emulsion was diluted with water and homogenized in a homogenizer to diffuse the organic solvent and convert the droplets into solid particles. Because one particle is formed in each droplet of the emulsion, it is possible to control the size of the emulsion, optimize the surfactant formulation, and increase the absorption of the organic phase, ultimately controlling the particle size of the nanosuspension. Drugs in emulsions. Initially, methanol, ethanol, ethyl acetate, and chloroform were used as organic solvents (42-46).

Advantages

- 1] No special equipment is required.

2] The particle size can be easily controlled by controlling the droplet size of the emulsion.

3] Can be easily extended with correct recipe optimization.

Disadvantages

1] Poorly soluble formulations in aqueous and organic media cannot be prepared using this method.

2] Safety concerns due to the use of hazardous solvents in the process.

3] Ultrafiltration is required to purify the drug nanosuspension, which can make the process expensive.

4] A large amount of surfactant/stabilizer is required compared to the preparation method described above.

Micro emulsion Template

This method uses an organic solvent or solvent mixture loaded with a drug dispersed in an aqueous phase containing a suitable surfactant to form an emulsion. The organic phase is then evaporated under reduced pressure to form a nanosuspension in which drug particles are instantaneously precipitated and stabilized by a surfactant. Another method uses a partially water-miscible solvent such as butyl lactate, benzyl alcohol and triacetin as the dispersed phase instead of the hazardous solvent. (44-48).

Advantages

- 1] No special equipment is required.

2] The particle size can be easily controlled by controlling the droplet size of the emulsion.

3] can be easily extended with correct recipe optimization.

Disadvantages

1] Poorly soluble formulations in aqueous and organic media cannot be prepared using this method.

2] Ultrafiltration is required to purify the drug nanosuspension, which can make the process expensive.

3] A large amount of surfactant/stabilizer is required compared to the preparation method described above.

Dry CoGrinding

Recently, nanosuspensions can be obtained by dry grinding. Successful work on the preparation of stable nanosuspensions by dry grinding poorly soluble drugs into soluble polymers and copolymers after dispersion in a liquid medium has been reported. Many soluble polymers and copolymers have been used, such as PVP, polyethylene glycol (PEG), hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and cyclodextrin derivatives. and preventing Ostwald aging and agglomeration of the nanosuspension to obtain a physically stable composition by providing a steric or ionic barrier. The type and amount of the stabilizer significantly affects the physical stability and behavior of the nanosuspension in vivo. Stabilizers used so far

are poloxomers, polysorbates, cellulose, povidone and lecithin. Lecithin is the preferred stabilizer when developing parent-friendly and autoclavable nanosuspensions ([49).

Organic Solvent

When an emulsion or microemulsion is used as the matrix, an organic solvent is used as part of the nanosuspension. Pharmaceutically acceptable less hazardous water-miscible solvents such as methanol, ethanol, chloroform, isopropanol, and partially water-miscible solvents such as ethyl acetate, ethyl formate, butyl lactate, triacetin, propylene carbonate, and benzyl alcohol are more common than hazardous solvents. It is desirable in the formulation. Solvents such as dichloromethane (49.50)

Cosurfactant The choice of cosurfactant is important when using microemulsions to make nanosuspensions. Since cosurfactants can have a strong influence on the phase behavior, the effect of cosurfactants on the internal phase absorption and drug loading of the selected microemulsion composition should be investigated. Although the literature describes the use of bile salts and dipotassium glycerol chisinate as co-surfactants, various solubilizers such as transcutool, glycofurol, ethanol and isopropanol can be safely used as co-surfactants in microemulsions (51).

Characterization of Nanosuspensions

Invitro

- 1] Colour, Odor, Taste
 - 2] Particle Size Distribution
 - 3] Particle Charge (Zeta Potential)
 - 4] Crystal Form
 - 5] Dissolution Rate and Saturation 4 6]
- Density

- 7] pH value
- 8] Droplet size
- 9] Viscosity measurement
- 10] Stability of nanosuspension

Biological properties In-vivo

Evaluation of surface modified nanosuspension

- 1] Surface hydrophilicity 2] Interaction with nano protein

Invitro Ratings

1] Colour, Odor, Taste

These properties are particularly important for oral administration. Changes in taste, particularly changes in active ingredients, can be explained by changes in particle size, crystal shape and subsequent particle dissolution. Changes in Colour, odor and taste may also indicate chemical instability (52, 53).

2] Particle Size Distribution

Particle size distribution determines the physicochemical behavior of a composition, such

as saturated solubility, dissolution rate, physical stability, etc. Particle size distribution was determined by photon correlation spectroscopy (PCS), laser diffraction (LD) and multisize coulter counters. The PCS method measures particles from 3 nm to 3 μm , while the LD method has a measurement range of 0.0580 μm . The Coulter Counter Multilyzer shows the absolute number of particles as opposed to the LD method, which provides only a relative size distribution. For intravenous administration, the particles should be less than 5 microns, given that the minimum capillary size is 56 microns. Therefore, as the particle size increases, capillaries can become obstructed or embolized (54).

3] Zeta potential

Zeta potential indicates the stability of the suspension. A minimum zeta potential of ± 30 mV is required for a stable suspension that is stabilized only by electrostatic repulsion, but a zeta potential of ± 20 mV is sufficient when the electrostatic stabilizer and steric stabilizer are combined.

4] Crystal morphology

Techniques such as differential scanning calorimetry or X-ray diffraction analysis combined with differential thermal analysis can be used to characterize polymorphic changes due to the effects of high pressure homogenization in the crystal structure of the drug. Increase. Due to high pressure homogenization, the

nanosuspension may experience a change in crystal structure, which may change to amorphous or other polymorphic morphology.

5] Dissolution rate and saturated solubility

The nanosuspension has significant advantages over other technologies in that it can increase both dissolution rate and saturated solubility. These two parameters need to be determined by different physiological solutions. Assessment of saturation solubility and dissolution rate helps determine the in vitro behavior of the pharmaceutical product. Bohm etc. We have reported an increase in dissolution pressure and dissolution rate with a decrease in particle size down to the nanometer range. There is. Reached to "minimize pH-drift" and ensure electrode surface coating with suspended solids. To stabilize the pH, do not add electrolytes to the outer phase of the formulation.

7] Droplet size

The droplet size distribution of the microemulsion vesicle can be determined either by light scattering technology or by electron microscopy. A dynamic light scattering spectrophotometer using a neon laser with a wavelength of 632 nm.

8] Viscosity measurement

Viscosity of lipid-based formulations of different compositions can be measured at different temperatures and at different shear rates using a Brookfield rotational viscometer. The

sample chamber of the device must be maintained at 37 ° C by a thermal bath and the sample must be immersed in the device for measurement (55).

Establishing In Vivo Biological Performance

In vitro / In vivo correlations and monitoring in vivo performance of drugs is an important part of the study, regardless of Route or the delivery system used. This is most important for intravenously injected nanosuspension. This is because the In vivo behaviour of the drug depends on the organ distribution, which depends on surface properties such as surface hydrophobicity and interaction with plasma proteins. The protein adsorption pattern observed after intravenous injection of nanoparticles is recognized as an essential factor in organ distribution. Therefore, appropriate techniques should be used to evaluate surface properties and protein interactions to understand in vivo behavior. Techniques such as hydrophobic interaction chromatography can be used to determine surface hydrophobicity, and 2D-PAGE is used to quantitatively and qualitatively protein adsorption after intravenous injection of drug nanosuspension into animals (55).

Nanosuspension applications

Oral

Oral administration of the drug is the most preferred route of drug delivery. However, some drugs have the problem that their poor solubility and absorbability limit their bioavailability and

ultimately reduce their effectiveness. In such cases, nanosuspensions can solve the problem by improving dissolution rate and absorption by increasing surface area and improving adhesion. Nanosuspensions can lead to increased mucosal adhesion, which can prolong gastrointestinal transit time and lead to increased bioavailability. Improved oral bioavailability may be due to increased surface area, saturated solubility, and adhesion of drug nanosuspensions. The taste masking of the particle system is also possible without any problem.

Eyepiece preparation

Nanosuspension may benefit drugs with low solubility in tears. Nanosuspensions are an ideal approach for the delivery of hydrophobic drugs to the eye due to their unique ability to improve the saturated solubility of the drug. Kasse metal. Development of Nanosuspension Delivery System for Specific Glucocorticoid Medication.

Lung

Nanosuspension may be beneficial for delivery of drugs with low solubility in lung secretions. Currently available approaches to pulmonary administration, such as aerosol or dry powder inhalers, have certain drawbacks such as limited diffusion at the desired site, reduced residence time, which can be overcome with nanosuspensions. Can be done. Fluticasone and budesonide have been successfully prescribed as nanosuspensions for pulmonary delivery.

Orally administered in the form of a Mucoadhesion

Suspension of nanoparticles, nanoparticles diffuse into the liquid medium and rapidly reach the mucosal surface. Particles are anchored to the intestinal surface by an adhesion mechanism called "bioadhesion". From this point on, the concentrated slurry acts as a reservoir for the particles and the adsorption process takes up sites very quickly. Direct contact of particles with intestinal cells via the bio adhesive step is the first step before particles are absorbed

Conclusion:

The suspension is stable as long as the system does not follow the zero order, but as soon as it enters the first order dynamics, the disintegration is faster. However, if the slurry is thickened, it will take longer for the system to go from 0th to 1st order. This is why concentrated slurries are often stable enough to be placed on the market, whereas diluted slurries are not. However, the thickened suspension affects the physical stability of the suspension. Therefore, pharmaceutical manufacturers must optimize both the physical and chemical parameters of the dispersed particles to achieve the desired suspension stability. Nanosuspension solves the problem of low bioavailability of hydrophobic drugs and drugs, which are poorly soluble in aqueous and organic solutions. Production technologies such as the Medium Grinding and High Pressure Homogenizer are used for large-scale production of nanosuspensions.

Nanosuspensions can be administered by oral, parenteral, pulmonary, ophthalmic and topical routes. Because nanotechnology is simple, there are fewer requirements for excipients, and has an increased rate of dissolution and solubility at saturation, so many drugs with low bioavailability are formulated in the form of nanosuspensions (51).

References:

1. Martins I, Esteves J, Silva FP da, Tomé A. Automobile Suspensions Using Electromagnetic Linear Actuators. IFAC Proceedings Volumes. 2000; 33 (26):203–208.
2. Bello MM, Akramin Shafie A, Khan R. Active Vehicle Suspension Control Using Full State-Feedback Controller. Advanced Materials Research. 2015; 1115 (17327):440–445.
3. Gao L, Zhang D, Chen M. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. J Nanoparticle Res. 2008; 22:10(5):845–62.
4. Mathew M, Krishnakumar K, Dineshkumar B, Nair SK. Antibiotics Nanosuspension: A REVIEW. J Drug Delivery and Therapeutics. 2017; 15: 7(2). 294-300.
5. Patel M, Shah T, Amin A. Therapeutic Opportunities in Colon-Specific Drug-Delivery Systems. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems. 2007;24(2):147–202.
6. Shah DP, Patel B, Shah C. Nanosuspension Technology: A Innovative slant for drug delivery system and permability enhancer for poorly water soluble drugs. J Drug Delivery and Therapeutics. 2015; 5(1): 100-109.
7. L N. Nanotechnology in development of drug delivery system. Open Access Journal of Pharmaceutical Research. 2017; 1(5): 95-100.
8. Ainurofiq A. A Review on Techniques Which Are Useful For Solubility Enhancement of Poorly Water Soluble Drugs. Int J Res Manag Pharmacy. 2012; 56–70.
9. Ismail S, El-Mahdy M, Al-Kubati S. Enhancement of solubility and dissolution of nimesulide using solubilization, solid dispersion and complexon techniques. Bulletin of Pharmaceutical Sci Assiut. 2009; 32(2):321–38.
10. Chaudhary A, Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review. J Advanced Pharmacy Education & Res. 2012; 2 (1): 32- 67.
11. Kapadiya N, Hydrotropy: A Promising Tool for Solubility Enhancement: A Review. Int J Drug Develop & Res. 2011; 3 (1): 26-33.
12. Thorat YS, Solubility Enhancement Techniques: A Review on Conventional and Novel Approaches, IJPSR. 2011; 2(10): 2501-2513.
13. Sharma D, Solubility Enhancement – Eminent Role in Poorly Soluble Drugs, “Research. J Pharm and Tech. 2009; 2(2): 220-224.
14. Jain S, Solubility Enhancement by Solvent Deposition Technique: An Overview, Asian Jf Pharmaceut And Clinical Res. 2012; 5(4):15-19.
15. Deecaraman NAM, Rani C, Mohanraj KP, Kumar KV. preparation and solid state characterization of atorvastatin nanosuspensions for enhanced solubility and dissolution, Int J Pharm Tech Research. 2009; 90-112.
16. Patel DJ, Patelj K, Pandya VM, 3rishad R. Jivani RR, Patel RD, Optimization of Formulation Parameters On Famotidine Nanosuspension Using Factorial Design And The Desirability Function. Int J Pharm Tech Resh. 2010; 155-161.
17. Patil MS, Preparation and Optimization of Simvastatin Nanoparticle For Solubility Enhancement And In- Vivo Study. Int J Pharma Res and Develop. 2011; 219-226.
18. Wei Li, Preparation and in vitro/in vivo evaluation of revaprazan hydrochloride nanosuspension. Int J Pharma Res and Develop. 2011; 157-162.
19. Jorvekar.P, Pathak AA, Chaudhari PD, Formulation Development of Acecl of enac Loaded Nanosuspension by Three Square (32) Factorial Design. Int J Pharma Sci and Nanotech. 2012; 1575-1582.

20. Banavath H, Sivarama RK, Tahir A, Sajid A, Pattnaik G, Nanosuspension: an attempt to enhance bioavailability of poorly soluble drugs. *Int J Pharma Res and Develop*. 2010; 1(9): 1-11.
21. Shegokar R, Müller RH, Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharma*. 2010; 399: 129-139.
22. Chingunpituk J, Nanosuspension Technology for Drug Delivery, Walailak. *J Sci & Tech*. 2007; 4(2): 139-153.
23. Patravale B, Abhijit AD, Kulkarni RM, Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. *J Pharmacy and Pharmacology*. 2004; (56): 827-840.
24. Prasanna L, Nanosuspension Technology: A Review. *Int J Pharmacy and Pharmaceutical Sci*. 2010; 2(4): 35-40.
25. Xiaohui P, Jin S, Mo L, Zhonggui H, Formulation of Nanosuspensions as a New Approach for the Delivery of Poorly Soluble Drugs, *Current Nanoscience*. 2009; (5): 417- 427.
26. Mohanty S, Role of Nanoparticles in Drug Delivery System. *Int J Res Pharmaceut and Biomed Sci*. 2010; 1 (2): 41-66.
27. Prabhakar C, Bala Krishna K. A Review On Nanosuspensions In Drug Delivery, *Int J Pharma and Bio Sci*. 2011; (2): 549-558.
28. Nagare SK, A review on Nanosuspension: An innovative acceptable approach in novel delivery system. *Universal J of Pharmacy*. 2012; 1 (1): 19-31.
29. Debjit B, Nanosuspension. A Novel Approaches In Drug Delivery System. *Pharma Innovation J*. 2012; 1(12): 50-63.
30. Kamble VA, Nanosuspension A Novel Drug Delivery System. *Int J of Pharma and Bio Sciences*, 1, 2010, 352-360.
31. Soni S, Nanosuspension: An Approach to Enhance Solubility of Drugs, *IJPI's Journal of Pharmaceutics and Cosmetology*. 201; 2(9): 50-63.
32. Patel M, Nanosuspension: A Novel Approach for Drug Delivery System. *JPSBR*. 2011; (1): 1-10.
33. Shelke PV, A Review On Formulation And Evaluation of Nanosuspension, *International Journal of Universal Pharmacy And Life Sciences*. 2012; 2(3): 516-524.
34. Venkatesh T, Nanosuspensions: Ideal Approach for the Drug Delivery of Poorly Water Soluble Drugs. *Der Pharmacia Lettre*. 2011; 3(2): 203-213.
35. Yadav GV, Nanosuspension: A Promising Drug Delivery System. *Pharmacophore*. 2012; 3 (5): 217-243.
36. Pandey S, Nanosuspension: Formulation, Characterization and Evaluation. *Int J Pharma and Bio Sci*. 2010; 1(2): 1-10.
37. Toshi C, A Review on Nanosuspensions promising Drug Delivery Strategy. *Current Pharma Res*. 2012; 3(1); 764-776.
38. Ezeddin K, Nanodispersions Platform for Solubility Improvement. *Int J Res in Pharmaceut and Biomed Sci*. 2013; 4 (2): 636- 643.
39. Kumar GP, Nanosuspensions: The Solution to Deliver Hydrophobic Drugs. *Int J Drug Delivery*. 2011; 3: 546-557.
40. Venkatesh T, Nanosuspensions: Ideal Approach for the Drug Delivery of Poorly Water Soluble Drugs. *Der Pharmacia Lettre*. 2011; 3(2); 2011: 203-213.
41. Paun JS, Nanosuspension: An Emerging Trend for Bioavailability Enhancement of Poorly Soluble Drugs. *Asian J Pharm Tech*. 2012; 2(4): 157-168.
42. Vaghela A, Nanosuspension Technology. *Int J of Universal Pharmacy and Life Sci*. 2012; 2(2): 306-317.

43. Bhargavi A. Technical Review of Nanosuspensions. *Int J Pharma & Technol*. 2011; 3(3); 1503-1511.
44. Verma KAK, Nanosuspensions: Advantages and Disadvantages. *Indian J Novel Drug Delivery*. 2012; 4(3): 179-188.
45. Vaghela A, Nanosuspension Technology. *Int J Universal Pharma and Life Sci*. 2012; 2(2): 306-317.
46. Srinivasa RK, an Overview of Statins as Hypolipidemic Drugs. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2011; 3(3): 178-183.
47. Nagaraju P, Nanosuspension: A Promising Drug Delivery System. *Int J Pharmaceut Sci and Nanotechnology*. 2010; 2(4): 679-684.
48. Koteshwara KB, Nanosuspension: A Novel Drug Delivery Approach. *IJRAP*. 2011; 2(1): 162-165.
49. Mudgil M, Gupta N, Nagpal M, Pawar P, Nanotechnology: A New Approach For Ocular Drug Delivery System. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. 2012; 4(2): 105-112.
50. Dhiman, S Dharmila and Thakur, GS. Nanosuspension: A recent approach for Nano drug delivery system. *Int J Curr Pharm Res*. 2012; 3 (4): 96-1015.
51. Aulton M.E. "Suspension. Pharmaceuticals-the Science of Dosage Form Design, Churchill Livingstone, Edinburgh Second Edition. 2002; 84-86.
52. Ansel C, Allen L.V, Popovich N.G. Disperse Systems Pharmaceutical Dosage Forms & Drug Delivery Systems. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Eighth Edition 2005; 387-389.
53. Banker G.S. Rhodes C.T. "Dispersed Systems" *Modern Pharmaceutics*. Marcel Dekker, Inc. New York. 1979; 72: 345-346.
54. Cooper & Gun, "Dispersed System" *Tutorial Pharmacy*, Sixth Edition, Page No. 75-78.
55. R. Santosh Kumar and T. Naga Satya Yagnesh, *World J Pharma and Phamaceut Sci*. 2012; 5 (12): 1471-1537.

Review on Suspension & Nanosuspension

Chetan Borase , Amol Jagdale, Monika Sonawane , Shubham Kothawade ,Roshan Landge ,Akshay Katkale ,

*Department of pharmaceutical Quality Assurance , NDMVP College of Pharmacy ,Nashik , Shivaji Nagar, Gangapur road, Nashik-422002

*Corresponding Author: chetanborase2000@gmail.com

ABSTRACT

Pharmaceutical Suspension is a coarse dispersion of insoluble solid particles in a liquid medium. The particle diameter of the suspension is usually greater than 0.5 μm . However, establishing sharp boundaries between suspensions and dispersions with finer particles is difficult and impractical. Suspensions are an important class of pharmaceutical dosage forms. Advantages of suspension formulations include effective administration of hydrophobic drugs; refusal to use co-solvents; It masks the unpleasant taste of some ingredients. Ensuring resistance to degradation of drugs due to hydrolysis, oxidation or microbial activity; it can be easily swallowed by young and elderly patients. Effective intramuscular depot therapy. In addition, relatively higher drug concentrations may be included in suspension products compared to solution formulations. This review provides an overview of various aspects of suspensions, such as classification of suspensions, suspension theory, various suspending agents, aspects of suspension formulations, packaging of suspensions, evaluation of suspensions, stability of suspensions, and recent research in progress. Solubility is a decisive factor in the effectiveness of a drug regardless of the route of administration. Most of the recently discovered drugs are insoluble in water and have low bioavailability, so development has failed. These so-called "Brickellia" candidates can now be formulated and delivered as nanosuspensions. Nanosuspension technology solves the problem of drugs that are poorly soluble in water and have low bioavailability. Nanosuspension technology can be used to improve drug stability and bioavailability. The preparation of nanosuspension is simple and applicable to all water-insoluble drugs. Nanosuspensions are prepared using wet mills, high pressure homogenizers, emulsion and solvent evaporation, melt emulsification, and supercritical fluid methods. Nanosuspensions can be prepared using stabilizers, organic solvents and other additives such as buffers, salts, polyols, osmagents and cryoprotectants.

Keywords: Suspensions, Suspending agents, Stability, Dissolution, Nanosuspension

Contents

Detection of Bacterial Vaginosis Associated with *Gardnerella vaginalis* Using Molecular Methods in Women Attending Healthcare Centers

Parisa Motamediyan, Kimia Golestanfar, Fatemeh Khodavardipour.....13

***enterocolitica* strains isolated from red meat in Shahrekord city Genotyping of *Helicobacter pylori* strains isolated from biopsy samples in Shahrekord city by RAPD PCR**

Hossein Aghajani, Hossein Khodabandeh.....27

Determination of antibiotic resistant pattern and detection of *ica* operon genes in *Staphylococcus Saprophyticus* isolated from clinical samples in Shahrekord, Iran

Forough Sedighi, Hossein Aghajani¹, Hossein Khodabandeh, Fatemeh Nematolahi, Elahe Tajbakhsh.....46

Prevalence of class 1 and 2 integrons in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from diabetic patients in Kermanshah, Iran

Rasul Pajohesh, Fatemeh Khodaverdi pour, Hossein Aghajani.....66

Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from wound and urine in Kermanshah, Iran.

Zeinab Ahmadi, Hossein Aghajani, Hossein Khodabandeh.....83

Review on Suspension & Nanosuspension

Chetan Borase , Amol Jagdale, Monika Sonawane , Shubham Kothawade ,Roshan Landge ,Akshay Katkale84



