

مقایسه دو روش E.test و دیسک دیفیوژن آگار در تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های اشرشیا کلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی تهران

یوسف عرفانی*، دکتر رضا صفدری**، دکتر حمید چوپینه*، دکتر اکبر میرصالحیان***، آرزو راستی****
دکتر ناهید عین اللهی*، سید محمد میرافشار***، حجت یزدان بد*****، محمد حمیدیان***
علیرضا سلطانپان*****

دریافت: ۸۶/۷/۱۰، پذیرش: ۸۷/۴/۱۳

چکیده:

مقدمه و هدف: عفونت ادراری یکی از شایعترین عفونت های باکتریایی است و اشرشیاکلی بعنوان یکی از مهمترین عوامل عفونت ادراری شناخته شده است. به دلیل افزایش مقاومت باکتریها به آنتی بیوتیکها روش های قابل اطمینان برای تعیین مقاومت باکتریها در درمان و ارزیابی عفونت ادراری اهمیت ویژه ای دارند. هدف از مطالعه حاضر مقایسه و ارزیابی دو روش دیسک دیفیوژن آگار (بادیسکهای ایرانی و ایتالیایی) و روش E.test (سوندی) برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی باکتریهای اشرشیاکلی جدا شده از موارد عفونت ادراری می باشد.

روش کار: این مطالعه بر روی ۲۵۰ نمونه اشرشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۴ انجام گرفت. حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن آگار با دیسکهای ایرانی و ایتالیایی برای آنتی بیوتیکهای باکتریم، جنتامایسین، فورودانتین، سفتازیدیم و سپیروفلو کسازین انجام گرفت. حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری (MIC) به روش E.test بر روی همان آنتی بیوتیکها صورت پذیرفت و کلیه تست ها در محیط مولر هینتون آگار انجام گرفت. نتایج: در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن آگار با دیسکهای ایرانی اختلاف قابل ملاحظه ای در تطابق آنتی بیوتیکها (حداکثر ۳۷/۸٪) نشان داد بطوریکه در مورد آنتی بیوتیکهای سفتازیدیم و جنتامایسین در مقایسه روش ایرانی و E.test به ترتیب ۶۲/۲٪ و ۷۶/۸٪ تطابق وجود داشت. در حالی که E.test در مقایسه با دیسک دیفیوژن آگار با دیسکهای ایتالیایی اختلاف کمتری را نشان داد (حداکثر ۱۱/۲٪).

نتیجه نهایی: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که روش دیسک دیفیوژن آگار ایرانی می تواند به عنوان یک روش غربال اولیه برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی E.coli بکار رود و از روش دیسک دیفیوژن آگار ایتالیایی و به مراتب از E.test حساسیت کمتری دارد. پس از مقایسه هر سه روش، E.test حساسترین روش بوده و دوز موثر آنتی بیوتیک را برای درمان و جلوگیری از بروز مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص می نماید.

کلید واژه ها: آنتی بیوگرام / اشرشیا کلی / تست اسپیلومتر / دیسک دیفیوژن آگار / عفونت ادراری

* عضو هیأت علمی گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

** استادیار گروه مدارک پزشکی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** عضو هیأت علمی گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

**** مربی گروه داخلی جراحی دانشکده پرستاری و مامایی دانشگاه علوم پزشکی تهران (arasti@tums.ac.ir)

***** کارشناس ارشد میکروبیولوژی بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران

***** مربی گروه آمار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی همدان

مقدمه :

شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتریهای جدا شده از عفونت های بیمارستانی و بیماران رو به افزایش است و این موضوع برای جلوگیری از ظهور و گسترش گونه های مقاوم بسیار مهم می باشد. باکتریهای گرم منفی عوامل اتیولوژیک عفونت هایی مثل عفونت های ادراری، داخل شکمی، باکتری می و عفونت های دیگر می باشند، اکثراً گونه های جدا شده شامل: اشرشیاکلی (E.coli)، کلبسیلا، پروتئوس، انتروباکتر و ... می باشند (۱). در درمان عفونت های جدی مثل سپتی سمی و اندوکاردیت از ترکیبات مختلف آنتی بیوتیک به منظور دستیابی به اثرات وسیع الطیف برای افزایش اثر آنتی بیوتیک ها در بدن استفاده می شود که منجر به افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها می گردد (۲). یکی از عفونت های مهم که شیوع بالایی در جامعه دارد عفونت ادراری (UTI) می باشد که به عنوان یک عامل پر هزینه در علوم پزشکی محسوب می گردد و شایعترین علت عفونت ادراری اشرشیاکلی (E.coli) است (۳،۴). از آنجا که روش دیسک دیفیوژن آگار برای بررسی حساسیت میکروبی یک روش مناسب جهت غربال اولیه می باشد لذا لازم است میکروارگانیسم های مقاوم توسط یک روش MIC مشخص شوند (۵) E.test (Epsilon test) یک روش جدیدی برای این منظور است (۶).

از آنجا که عفونت های ادراری در اثر باکتریهای گرم منفی بسیار شایع بوده و درصد بالایی از عفونت های ادراری در اثر E.coli می باشد و با توجه به اینکه اخیراً درصد مقاومت های گزارش شده به دیسک های آنتی بیوتیک رو به افزایش است لذا اهمیت انتخاب داروی مؤثر و مناسب پس از تشخیص صحیح آشکار می گردد (۷،۸).

روش رایج در اندازه گیری حساسیت ضد میکروبی بر دو پایه استوار است: (۱) رقیق سازی (۲) انتشار. اساس E.test مرکب از دو روش رقیق سازی و انتشار می باشد. E.test مانند روش MIC (Minimum Inhibitory concentration) بطور مستقیم حساسیت ضد میکروبی را به صورت کمی برای ما مشخص می نماید و از آنجا که MIC به روش E.test از پیش تعریف شده و شیب آنتی بیوتیکی به صورت مداوم و پیوسته وجود دارد می تواند به صورت دقیق تر از روش MIC باشد.

روش دیسک دیفیوژن آگار که بر اساس انتشار است

فقط حساس بودن یا نبودن به آنتی بیوتیک را مشخص می نماید در حالیکه در روش E.test علاوه بر مشخص شدن حساسیت یا مقاومت آنتی بیوتیکی به دلیل استفاده از شیب مصنوعی غلظت آنتی بیوتیک بر سطح نوار، میزان مؤثر آنتی بیوتیک را می توان بدست آورد.

از آنجا که E.test روش دقیق، حساس و کمی به ویژه در نمونه های مقاوم به دیسک های آنتی بیوتیک می باشد (۹). لذا در این مطالعه جهت تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری های E.coli جدا شده از عفونت های ادراری بیماران بیمارستان شریعتی تهران به مقایسه و بررسی دو روش دیسک دیفیوژن آگار و E.test پرداختیم.

روش کار:

این مطالعه از نوع بررسی روش ها بوده که در طول سال ۱۳۸۴ در مرکز تحقیقات میکروبیشناسی دانشکده پزشکی تهران انجام گرفت. جمعیت مورد مطالعه ۲۵۰ نفر از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بودند که آزمایش کشت ادرار داده و نتیجه آزمایش از نظر عفونت ادراری با باکتری E.coli مثبت بود. برای این بیماران با استفاده از آنتی بیوتیک های باکتریم، جنتامایسین، فورودانتین، سیپروفلوکساسین و سفنازیدیم (به ترتیب با غلظت های ۲۵، ۱۰، ۳۰۰، ۵، ۳۰ میکرو گرم) آنتی بیوگرام به روش اول یعنی دیسک دیفیوژن آگار (ایرانی و ایتالیایی) انجام شد. در این روش که روش معمولی و رایج است باکتری مورد نظر را انتخاب و پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی به روش نیم مک فارلند آن را بر روی پلیت مولر هینتون آگار منتقل نموده و سپس دیسک های آنتی بیوتیک ایرانی (پادتن طب) و ایتالیایی (Liofilchem S.R.L.) را به ترتیب بوسیله پنس استریل بر سطح پلیت قرار داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه مقاومت یا حساسیت را بر اساس اندازه گیری منطقه عدم رشد بررسی نمودیم. روش دوم انجام آزمایش به روش E.test با آنتی بیوتیکهای مذکور بود، در این روش پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی به روش نیم مک فارلند آن را روی پلیت مولر هینتون آگار منتقل نموده و سپس نوارهای E.test را که هر کدام معرف یک نوع آنتی بیوتیک بود بر روی آگار قرار داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه منطقه عدم رشدی بصورت مثلثی شکل ایجاد شد (شکل ۱) و سپس با مراجعه به جدول ارائه شده توسط شرکت سازنده نوارهای E.test (AB.BioDisk, Solna Sweden)

کمترین حساسیت به ترتیب در سه روش مذکور عبارتند از: ۴۰٪، ۴۰٪ و ۳۹/۱٪. بیشترین مقاومت در هر سه روش مربوط به آنتی بیوتیک باکتریم می باشد که به ترتیب در روش E.test، و دیسک دیفیوژن آگار ایتالیایی و ایرانی عبارت بودند از: ۵۶/۶٪، ۶۰٪ و ۶۰/۱٪.

لذا با توجه به اختلاف قابل ملاحظه حساسیت ها در دیسک های ایرانی و روش های خارجی درصد توافقی (Overall agreement) در مورد دیسک های ایرانی و خارجی محاسبه گردید که نتایج به شرح زیر بود:

- در مورد دیسک باکتریم بین روش های خارجی مطابقت بیشتری وجود دارد و اختلاف بدست آمده ۶٪ می باشد. در صورتی که اختلاف بدست آمده در روش ایرانی به ترتیب با روش ایتالیایی و سوئدی ۹/۶٪ و ۱۲/۴٪ می باشد.

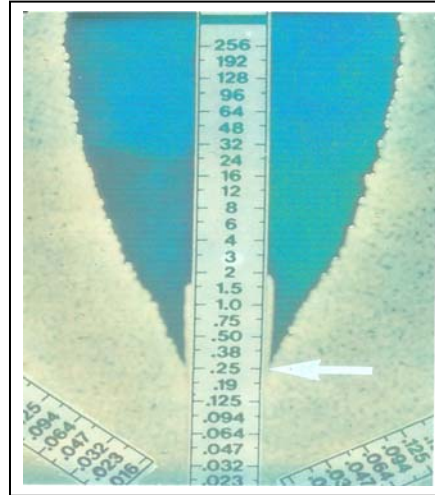
- در مورد دیسک جنتامایسین بین روش های خارجی ۷٪ اختلاف مشاهده می شود در حالی که دیسک جنتامایسین ایرانی به ترتیب با روش های ایتالیایی و سوئدی ۳۱/۶٪ و ۳۷/۸٪ اختلاف داشت.

- در مورد دیسک فورودانتین بین روش های خارجی ۶٪ اختلاف مشاهده شد در صورتی که دیسک فورودانتین ایرانی به ترتیب با روش های ایتالیایی و سوئدی E.test ۲۹/۲٪ و ۳۲/۶٪ اختلاف داشت.

- در مورد دیسک سیپروفلوکساسین اختلاف مشاهده شده در روش های خارجی ۴/۸٪ می باشد. در صورتی که دیسک سیپروفلوکساسین ایرانی با روش های ایتالیایی و سوئدی (E.test) ۸۵/۸٪ و ۱۱/۶٪ اختلاف داشت.

- در مورد دیسک سفنازیدیم اختلاف مشاهده شده در روش های خارجی ۱۱/۲٪ بوده در صورتی که دیسک سفنازیدیم ایرانی به ترتیب با روش های ایتالیایی و سوئدی (E.test) ۱۷/۲٪ و ۲۳/۲٪ اختلاف نشان داد.

حساسیت باکتریهای E.coli به آنتی بیوتیک های مذکور تعیین گردید. در هر روش وضعیت حساسیت، مقاومت و حد واسط باکتریهای E.coli نسبت به آنتی بیوتیکهای مذکور مشخص گردید و نتایج حاصله با هم مقایسه شدند.



شکل ۱: ایجاد منطقه عدم رشد مثلثی شکل به علت افزایش غلظت آنتی بیوتیک اطراف نوار E.test

نتایج:

بر اساس هدف مورد نظر ابتدا فراوانی حساسیت به آنتی بیوتیک ها محاسبه و مقایسه گردید (جدول ۱ تا ۳) (لازم به ذکر است که MIC آنتی بیوتیک های باکتریم، جنتامایسین، فورودانتین، سیپروفلوکساسین و سفنازیدیم در روش E.test به ترتیب عبارت است از ۰/۰۰۲-۳۲، ۰/۰۱۶-۲۵۶، ۰/۰۰۲-۳۲، ۰/۰۳۲-۵۱۲، ۰/۰۱۶-۲۵۶ میکرو گرم در میلی لیتر می باشد).

بیشترین حساسیت مربوط به آنتی بیوتیک فورودانتین بود که به ترتیب در روش E.test، دیسک دیفیوژن آگار ایتالیایی و ایرانی عبارتند از: ۹۱/۶٪، ۹۲٪ و ۶۸/۳٪ و

جدول ۱: مقایسه روش دیسک دیفیوژن آگار با دیسک های ایتالیایی و E.test سوئدی و محاسبه درصد توافقی

آنتی بیوتیک	دیسک دیفیوژن آگار با دیسک های ایتالیایی			E.test سوئدی			درصد توافق
	S	R	I	S	R	I	
SXT	۱۰۰ (۴۰)	۱۵۰ (۶۰)	-	۱۰۰ (۴۰)	۱۴۹ (۵۶/۶)	۱ (۰/۴)	۹۴
GM	۱۸۵ (۷۴)	۵۷ (۲۲/۸)	۸ (۳/۲)	۱۸۰ (۷۲)	۵۱ (۲۰/۴)	۱۹ (۷/۶)	۹۳/۲
FM	۲۳۰ (۹۲)	۱۶ (۶/۴)	۴ (۱/۶)	۲۲۹ (۹۱/۶)	۱۰ (۴)	۱۱ (۴/۴)	۹۴
Cip	۱۳۷ (۵۴/۸)	۱۰۹ (۴۳/۶)	۴ (۱/۶)	۱۳۸ (۵۵/۴)	۱۰۹ (۴۳/۸)	۲ (۰/۸)	۹۵/۲
CAZ	۱۶۵ (۶۶)	۸۳ (۳۳/۲)	۲ (۰/۸)	۱۶۷ (۶۶/۸)	۱۸ (۲۸/۴)	۱۲ (۴/۸)	۸۸/۸

S: حساس R: مقاوم I: حد واسط (مقادیر ذکر شده در ستون های S, R, I به ترتیب از چپ به راست تعداد و درصد می باشد) SXT: باکتریم، GM: جنتامایسین، FM: فورودانتین، Cip: سیپروفلوکساسین، CAZ: سفنازیدیم - اعداد داخل پرانتز درصد می باشند

جدول ۲: مقایسه روش دیسک دیفیوژن آگار با دیسک های ایرانی و ایتالیایی و محاسبه درصد توافقی

درصد توافق	دیسک دیفیوژن آگار با دیسک های ایرانی			دیسک دیفیوژن آگار با دیسک های ایتالیایی		
	S	R	I	S	R	I
۹۰/۴	۹۷ (۳۹/۱)	۱۵۱ (۶۰/۱)	-	۱۰۰ (۴۰)	۱۵۰ (۶۰)	-
۶۸/۴	۱۲۱ (۴۸/۳)	۸۱ (۳۲/۵)	۴۸ (۱۹/۳)	۱۸۵ (۷۴)	۵۷ (۲۲/۸)	۸ (۳/۲)
۷۰/۸	۱۷۱ (۶۸/۳)	۴۱ (۱۶/۵)	۳۸ (۱۵/۲)	۲۳۰ (۹۲)	۱۶ (۶/۴)	۴ (۱/۶)
۹۱/۲	۱۳۰ (۵۱/۸)	۱۱۴ (۴۵/۸)	۶ (۲/۴)	۱۳۷ (۵۴/۸)	۱۰۹ (۴۳/۶)	۴ (۱/۶)
۸۲/۸	۱۴۶ (۵۸/۵)	۹۲ (۳۶/۷)	۱۲ (۴/۸)	۱۶۵ (۶۶)	۸۳ (۳۳/۲)	۲ (۰/۸)

جدول ۳: مقایسه روش دیسک دیفیوژن آگار با دیسک های ایرانی و E.test سوئدی و محاسبه درصد توافقی

درصد توافق	E.test سوئدی			دیسک دیفیوژن آگار با دیسک های ایرانی		
	S	R	I	S	R	I
۸۷/۶	۱۰۰ (۴۰)	۱۴۹ (۵۶/۶)	۱ (۰/۴)	۹۷ (۳۹/۱)	۱۵۱ (۶۰/۱)	۲ (۰/۸)
۶۲/۲	۱۸۰ (۷۲)	۵۱ (۲۰/۴)	۱۹ (۷/۶)	۱۲۱ (۴۸/۳)	۸۱ (۳۲/۵)	۴۸ (۱۹/۳)
۶۸/۴	۲۲۹ (۹۱/۶)	۱۰ (۴)	۱۱ (۴/۴)	۱۷۱ (۶۸/۳)	۴۱ (۱۶/۵)	۳۸ (۱۵/۲)
۸۸/۴	۱۳۸ (۵۵/۴)	۱۰۹ (۴۳/۸)	۲ (۰/۸)	۱۳۰ (۵۱/۸)	۱۱۴ (۴۵/۸)	۶ (۲/۴)
۷۶/۸	۱۶۷ (۶۶/۸)	۷۱ (۲۸/۴)	۱۲ (۴/۸)	۱۴۶ (۵۸/۵)	۹۲ (۳۶/۷)	۱۲ (۴/۸)

بحث:

E.coli شایعترین باکتری عامل UTI محسوب می‌گردد که سایر مطالعات نیز تأیید کننده این مسئله می‌باشند (۵-۳). یافته‌های ما نشان داد که بیشترین حساسیت مربوط به آنتی بیوتیک فورودانتین است که در مطالعه ای که توسط نومیا و گلدریچ نیز انجام گرفته فورودانتین از بین آنتی بیوتیک های مورد استفاده علاوه بر حساسیت بیشتر، در درمان عفونت های ادراری تجویز شده است (۱۰). همچنین از بین آنتی بیوتیکهایی که در این مطالعه، در سه روش مورد استفاده قرار دادیم باکتریم مقاومترین آنتی بیوتیک بوده که با مطالعه انجام شده توسط مارکوس نیز مطابقت دارد (۱۱).

انتخاب روش E.test بعنوان روش حساس و دقیق در تعیین حساسیت باکتریها به آنتی بیوتیکها در مطالعات قبلی نیز مورد تأیید قرار گرفته است (۶، ۵).

در این مطالعه برای اولین بار مقایسه روش های E.test سوئدی و دیسک دیفیوژن آگار با دیسکهای ایتالیایی ایرانی انجام گرفت. با توجه به نتایج حاضر بیشترین مقاومت در هر سه روش مربوط به باکتریم بوده که درصد بدست آمده در روش E.test (۵۶/۶٪) کمتر از دو روش دیگر می‌باشد که این نشان دهنده حساسیت و دقت بیشتر E.test در تعیین مقاومت باکتریها به آنتی بیوتیک ها می‌باشد.

بیشترین حساسیت بدست آمده در هر سه روش مربوط به فورودانتین می‌باشد که به ترتیب در روش های E.test، ایتالیایی و ایرانی عبارتند از: ۹۱/۶٪، ۹۲٪ و

۶۸/۳٪. ملاحظه می‌شود که بین حساسیت روش های ایرانی و خارجی ۲۲ تا ۲۳ درصد اختلاف وجود دارد که نشانگر این می‌باشد که دیسک های فورودانتین ایرانی حساسیت روش های خارجی را ندارند.

با محاسبه میزان درصد توافقی در تمام آنتی بیوتیکها در سه روش ملاحظه می‌شود که با توجه به نتایج بدست آمده، بین روش دیسک دیفیوژن آگار ایرانی و E.test سوئدی عدم همخوانی وجود داشته و این اختلاف ها قابل توجه بوده و به ترتیب عبارتند از: باکتریم (۱۲/۴٪)، جنتامایسین (۳۷/۸٪)، فورودانتین (۳۱/۶٪)، سیپروفلوکساسین (۱۱/۶٪) و سفتازیدیم (۲۳/۲٪). در حالی که در مقایسه روش دیسک دیفیوژن آگار ایتالیایی و E.test همخوانی بیشتری دیده می‌شود و اختلاف بدست آمده در مورد آنتی بیوتیک ها عبارتند از: باکتریم (۶٪)، جنتامایسین (۶/۸٪)، فورودانتین (۶٪)، سیپروفلوکساسین (۴/۸٪) و سفتازیدیم (۱۱/۲٪) بنابراین با در نظر گرفتن غلظت یکسان دارویی در دیسکهای ایرانی و ایتالیایی و با توجه به همخوانی بیشتر نتایج بدست آمده در مقایسه دیسکهای ایتالیایی با E.test توصیه می‌گردد کیفیت دیسکهای ایرانی در تولید افزایش یابد.

نتیجه نهایی:

از نتایج حاصل از این مطالعه چنین استنتاج می‌شود که از بین سه روش مذکور، E.test حساس ترین و دقیق ترین روش بوده و همچنین دوز مؤثر آنتی بیوتیک را برای درمان و جلوگیری از بروز مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص

5. Manoharan A, Pai R, Sankar V, Thomas K, Lalita MK. Comparison of disk diffusion & E. test methods with agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of haemophilus influenzae. *Indian J Med Res* 2003; 81-87.
6. Sanchez L, Londono D, Arango AI, Mattar S. In vitro activity of antimicrobial agents against mycobacterium tuberculosis Isolates from Bogota, DC (Colombia) evaluated by the E. test. *Diagn Microbial Infect Dis.* 1999; 35: 109-112.
7. Kocazeybek BS. Antimicrobial resistance surveillance of gram-negative bacteria isolated from intensive care units of four different hospitals in Turkey. *Chemotherapy.* 2001; 47: 396-408.
8. Hanberger H, Rodriguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. *JAMA.* 1999; 281: 67-71.
9. Hanberger H, Nilsson LE, Classon B, Karnell I, Larsson P, Rylander M, Svensson E, et al. New species – related MIC break points for early detection of development of resistance among gram-negative bacteria in Swedish intensive care units. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44, 5: 611-619.
10. Noemia P, Goldraich A. Febrile urinary tract infection: Escherichia coli susceptibility to oral antimicrobials. *Pediatr Nephrol* 2002; 17(3): 173-176.
11. Nir M, Shai A, Yaari A, Arnon Y, Zemira S, Gilat A. Non-Escherichia coli versus Escherichia coli community-acquired urinary tract infections in children hospitalized in a tertiary center: Relative frequency, risk factors, antimicrobial resistance and outcome. *Pediatr Infect Dis J* 2005 Jul; 24(7): 581-585.

می‌نماید و روش دیسک دیفیوژن آگار ایتالیایی حساس تر از روش ایرانی می‌باشد و توصیه می‌گردد که روش دیسک دیفیوژن آگار با دیسکهای انتی بیوتیکی موجود در ایران چون دارای حساسیت کافی برای نشان دادن باکتریهای مقاوم نیستند بعنوان یک روش غربال اولیه برای تعیین حساسیت انتی بیوتیکی E.coli بکار رود و همچنین به دلیل هزینه زیاد، روش E.test حداقل در مورد باکتری‌های مقاوم به انتی بیوتیکها بکار رود.

سپاسگزاری:

در پایان لازم است از زحمات کلیه کسانی که در انجام این طرح پژوهشی ما را یاری کردند، پرسنل گروه میکروبیشناسی دانشکده پزشکی و پرسنل آزمایشگاه میکروبیشناسی بیمارستان شریعتی خصوصاً خانم قلاوند کمال تشکر و قدردانی را نمائیم.

منابع:

1. Dargo L, Mobelli B, Vecchi ED, Tocalli L, Nardi G, Gismondo MR. Epidemiology of gram-negative antibiotic resistance in outpatients: a year of surveillance. *Int J Antimicrob Agent*. 2000; 16: 479-281.
2. Kocazeybek BS, Arbaci U, Erenturk S, Akdur H. Investigation of various antibiotic combinations using the E.test method in multiresistant pseudomonas aeruginosa strain. *Chemotherapy.* 2002; 48: 31-35.
3. Ejraes K. Urinary tract infection; study: Recurrent UTI caused by E.coli strain causing preceding UTI. *Womens Health Atlanta* 2004; 25: 166.
4. Mims C, Dockrell H, Goering R, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M. Urinary tract infection. In: *Medical microbiology.* 3rd ed. Mosby, 2004:241