طب‌نظامی
پاییز ۱۳۸۵، شماره ۸ (۳)
صفحات: ۱۹۱-۱۹۶

بررسی مولکولی مقاومت به نالیدیکسیک اسید در E.coli ایزوله شده در بیماران با عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان بقیه ا...(عج)

خانعلی نقوی[۱] M.Sc.، نعمت ا... جنیدی جعفری*[۱] M.D.، علی کرمی[۲] Ph.D.، رحیم سروری[۳] Ph.D.،
اکبر خلیل پور[۲] M.Sc.، زهرا سفیری[۱] M.Sc، منیژه مجیدفرد[۱] B.Sc، رضا دلیلی[۱] B.Sc.

*آدرس مکاتبه: *دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج»- مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، تهران_ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۶/۲۸ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۸۵/۱۱/۱۵ تاریخ اعلام قبولی: ۸۵/۱۱/۱۷

خلاصه

مقدمه: خانواده انتروباکتریاسه گروه بزرگی از باکتری‌ها را شامل می‌شوند که به طور وسیع در طبیعت پراکنده هستند. این باکتری‌ها به دلیل کلونیزاسیون در روده به عنوان باکتری‌های انتریک یا روده‌ای معروفند. E.Coli شایع‌ترین علت ایجاد کننده عفونت‌های ادراری می‌باشد. هدف این مقاله بررسی وضعیت مقاومت دارویی به نالیدیکسیک اسید در E.coli های ایزوله شده در خصوص عفونت‌های ادراری می‌باشد.

مواد و روش کار: در این تحقیق نمونه ادرار بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بالینی بیمارستان بقیه‌ا...(عج) طی ۵ ماه (بهمن ۱۳۸۳ تا خرداد ۱۳۸۴) کشت داده شد و آزمایشات افتراقی جهت تشخیص E.coli صورت گرفت. جهت بررسی مقاومت دارویی بر روی نمونه‌های مثبت E.coli اعم از حساس و غیرحساس واکنش PCR طی ۴ مرحله صورت گرفت. سپس MIC انجام شد و در نهایت عمل سکانسینگ صورت گرفت.

نتایج: در این مطالعه ۱۲۱ نمونه E.Coli جدا گردید. با استفاده از دیسک آنتی‌بیوگرام نالیدیکسیک اسید، تعداد ۵۵ نمونه (۴۵/۵ درصد) حساس، تعداد ۶۳ نمونه (۵۲ درصد) مقاوم و ۳ نمونه (۲/۵ درصد) مقاومت متوسط (Intermediate) داشتند. بر روی این ۱۲۱ نمونه PCR انجام گردید که بر این اساس تعداد ۵۵ نمونه (۴۵/۵ درصد) حساس، تعداد ۶۳ نمونه (۵۲ درصد) مقاوم و ۳ نمونه (۲/۵ درصد) مقاومت متوسط (Intermediate) داشتند. این نتایج با نتایج دیسک آنتی‌بیوگرام مشابهت داشت. در روش MIC (minimum inhibitory concentration) نیز نتایج، با دو روش قبل مطابقت داشت.

بحث: توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات، نشان دهنده روند فزاینده مقاومت باکتری E.Coli به داروهای رایج می‌باشد. لذا توصیه می‌شود ضمن کنترل مصرف بی‌رویه و غیرضروری آنتی‌بیوتیک‌ها، قبل از شروع درمان، آنتی‌بیوگرام و در صورت امکان MIC و PCR جهت تعیین حساسیت میکروبی انجام گردد تا آنتی بیوتیک مناسب برای درمان بیماران انتخاب گردد.

واژگان کلیدی: اشرشیا کلی، عفونت مجاری ادراری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، نالیدیکسیک اسید، PCR، آنتی‌بیوگرام، MIC.

۱- دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، مرکز تحقیقات بهداشت نظامی
۲- دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی
۳- دانشگاه امام حسین (ع)، پژوهشکده علوم‌پایه، گروه علوم زیستی

مقدمه

باکتری E.coli یکی از اعضای مهم خانواده انتروباکتریاسه‌ها محسوب می‌شود. این باکتری شایعترین علت بعضی از عفونت‌های شایع باکتریایی مانند عفونت‌های سیستم ادراری، باکتریمی و اسهال باکتریایی مسافران می‌باشد. در حالی که مکان اصلی کلونیزاسیون طبیعی انتروباکتریاسه‌ها در دستگاه گوارش است، شایعترین محل ایجاد عفونت توسط آنها در سیستم ادراری می‌باشد. با توجه به این که سیستم ادراری به طور طبیعی استریل و فاقد هر گونه باکتری است، ورود باکتری E.coli از طریق مجرای ادرار به قسمت‌های فوقانی سیستم ادراری (کلیه‌ها) غیرطبیعی بوده، موجب عفونت در سیستم ادراری می‌شود [۱].

مقاومت دارویی میکروب‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک از مشکلات جاری بیماری‌های عفونی در جهان محسوب می‌شود. در دهه ۱۹۷۰ و اوایل دهه۱۹۸۰ باسیل‌های گرم منفی با مقاومت چندگانه، بزرگترین مشکل کنترل عفونت محسوب می‌شدند [۲]. مطالعات همه‌گیر شناختی نشان داده‌اند که شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در هر دهه، انعکاس فزایندهٔ عواقب استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دههٔ قبل است [۳].

اکثر عفونت‌های سیستم ادراری توسط باسیل‌های گرم منفی هوازی به ویژه اشرشیا کلی ایجاد می‌شوند که هم به عنوان پاتوژن واقعی و هم به عنوان فرصت طلب در عفونت‌های روده‌ای عمل می‌کند. البته بعضی از کوکسی‌های گرم مثبت (مانند انتروکوک‌ها) نیز گاهی اوقات می‌توانند عفونت‌های ادراری ایجاد کنند [۶-۴].

آگاهی از الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی در E.coli به عنوان مهمترین پاتوژن عفونت‌های دستگاه ادراری، اهمیت ویژه‌ای به خصوص در انتخاب درمان تجربی آنتی بیوتیکی دارد [۷]. کینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیفی هستند که برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده قرار می‌گیرند. متأسفانه مقاومت به این داروها رو به فزونی است. مهمترین مکانیسمی که منجر به بروز مقاومت به کینولون‌ها می‌شود، وجود موتاسیون‌های متعدد در ژن‌های کد کننده هدف کینولون‌ها می‌باشد که مهمترین آنها موتاسیون در کدون ۸۳ است. موتاسیون کدون ۸۳ شایع‌ترین موتاسیونی است که در ایزوله‌های بالینی E.coli وجود داشته، منجر بروز مقاومت به نالیدیکسیک اسید می‌شود [۸].

مطالعه ساختار ژنتیکی E.coli می‌تواند راهگشای اصلی در جهت درمان عفونتهای ناشی از این باکتریها باشد. به طوری که PCR روش بسیار مؤثر، سریع و اختصاصی جهت شناسایی بسیاری از عوامل بیماری‌زا و از جمله مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها محسوب می‌شود. تاکنون تحقیقات بسیاری در رابطه با استفاده از این تکنیک در شناسایی ژن‌های عامل مقاومت بر علیه اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها صورت گرفته است که در برخی از تحقیقات تنها ژن gyrA و در برخی دیگر علاوه بر این ژن، ژن‌های gyrB و parC مورد بررسی قرار گرفته است. هدف این مقاله بررسی وضعیت مقاومت دارویی به نالیدیکسیک اسید در E.coliهای ایزوله شده از عفونت‌های ادراری می‌باشد.

مواد و روش کار

در این تحقیق کروم آگار از شرکت Microbiology Chrome Agar تهیه شد. Simmons Citrate Agar، MRVP، TSI، UREA، LIA و Blood Agar از شرکت Merck تهیه گردید. دیسک نالیدیکسیک اسید از شرکت پادتن و پودر آن از شرکت البرز دارو (قزوین) تهیه شد. کلیه مواد مورد استفاده در فرآیند PCR نیز از شرکت Fermentas تهیه شد. همچنین مواد مورد استفاده در تخلیص DNA ژنومیک و الکتروفورز از شرکت Roche تهیه گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده ادرار (ادرار میانه و صبحگاهی) پس از مخلوط کردن و با استفاده از لوپ دو میکرولیتری استاندارد (استریل) یا سمپلر بیست میکرولیتری، به صورت خطی در پلیت‌های حاوی محیط کروم آگار کشت داده و به مدت یک شبانه روز در شرایط هوازی ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت و وجود 10^5 باکتری یا بیشتر در هر میلی لیتر از ادرار به عنوان عفونت ادراری مثبت در نظر گرفته شد. برای تشخیص باکتری E.coli از روش‌های

جدول ۱. مقایسه نتایج PCR در چهار جفت پرایمر با نتایج MIC و آنتی‌بیوگرام

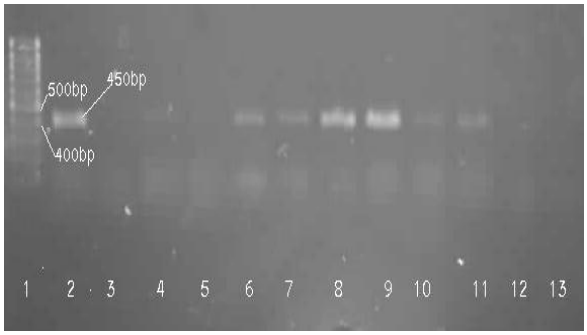
حساسیت به دیسک آنتی‌بیوگرام نالیدیکسیک اسید	نتایج MIC (غلظت ۲۵ تا ۸۰۰) µgr/ ml	نتایج PCR				تعداد نمونه
		P2& P1	P 3 & P1	P1 & P4	P1 & P5	
S	۲۵	+	–	–	–	۴۳
R	۲۰۰	+	+	+	–	۳۳
S	۲۵	-	–	-	–	۱۱
R	۲۰۰	-	+	-	+	۷
R	۲۰۰	-	–	-	+	۳
R	۲۰۰	-	+	+	–	۱۲
I	۵۰	+	+	+	–	۳
R	۲۰۰	+	–	-	+	٤
R	۲۰۰	+	+	_	+	۳
R	۲۰۰	_	–	+	–	۱
R	۲۰	+	+	–	–	۱
	جمع					۱۲۱

استاندارد استفاده گردید، بدین ترتیب کـه بـا اسـتفاده از آزمـایش TSI، هیدرولیز اوره، حرکت، تولید اندول، تجزیـه سـیترات، لیـزین دکربوکسیلاز، ذوب ژلاتین، تولید H_2S، تخمیر قندهای مختلـف و جلای فلزی در سطح محیط کشت باکتری مورد تأیید قرار گرفت. سپس با استفاده از دیسک‌هـای آنتـی‌بیـوگرام نمونـه‌هـای مثبـت E.coli اعم از حساس و مقاوم مشخص شدند.

جدول ۲: موتاسیون‌های موجود در نمونه E.coli مقاوم به نالیدیکسیک

تغییر اسید آمینه	کدون
TAT →TTT	۸۱
TTG→TCG	۸۵
GCA→ GTA	۸۷
ATA→ACA	۹۷
CTA→ CCA	۱۰۷

در مرحله بعد واکنش PCR برای هر یک از نمونه‌ها انجام گردیـد. واکنش PCR بر روی ۱۲۱ نمونه و طی چهـار مرحلـه بـرای هـر



شکل ۱: بررسی محصولات PCR– A: پرایمرهای P1 بـه عنـوان Forward و P2 به عنوان Reverse
چاهک شماره۱: نشانگر اندازه، ۱۰۰bp. چاهک شـماره۲ تـا ۱۳؛ نمونه های ۲٦ تا ۳۷ با پرایمر های p1,2. نمونـه هـای ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳٦ و۳۷، منفی و بقیه موارد مثبت بود (باندی حدود ٤٥۰bp).

نمونه با جفت پرایمرهای: $P_{1,2}$ ، $P_{1,3}$ ، $P_{1,4}$ و $P_{1,5}$ انجـام گرفـت که با توجه به این کـه پرایمرهـای P_3 ، P_4 و P_5 بـه روش Arms طراحی شده بود، نتیجه مثبت PCR با هر یک از پرایمرهای $P_{1,3}$، $P_{1,4}$ و $P_{1,5}$ دلیل بر وجـود مقاومـت در نظـر گرفتـه شـد. پـس از واکنش PCR بر روی نمونه‌ها عمل سکانـسینگ صـورت گرفـت؛

بـرای ایـن کـار محـصول PCR شـماره یـک (P1-2) جهـت سکانسینگ برای بررسی موتاسیون‌ها به شرکت سـیناژن سـفارش داده شد.

جهت انجام MIC، ۶ رقت متوالی از آنتـی بیوتیـک نالیدیکـسیک اسید به غلظت‌های ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، ۴۰۰ میکروگـرم در میلی لیتر، ۲۰۰ میکروگـرم در میلـی لیتـر، ۱۰۰ میکروگـرم در میلی لیتر، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. در مرحلـه بعـد بـه هـر کـدام از غلظـت‌هـای فـوق،۲۰ میکرولیتر از کشت مایع نمونه‌ها که یک شب گرمخانه‌گذاری شده بود، اضافه گردید. سپس نمونه‌ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد. برای به دست آوردن نتیجه دقیق‌تر برای بعضی از نمونه‌ها، از غلظت‌های ۷۰۰، ۶۰۰ و۵۰۰ در ۶ سری لوله، رقت تهیه شد. نتایج به شکل رشدیا عـدم رشـد بررسـی گردیـد و عدم رشد در غلظت ۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر یا کمتر با عنـوان حساس در نظر گرفته شد.

نتایج

بر روی ۱۲۱ نمونه مثبت E.coli که از طریق محیط کشت کـروم آگار و بعضاً آزمایشات افتراقی ثابت شده بود، آنتی‌بیوگرام نسبت به نالیدیکسیک اسید (در محیط کشت مولر هینتون) انجام گرفت کـه از این تعداد ۵۵ مورد (۴۵/۵ درصد) حساس، ۶۳ مورد (۵۲ درصـد) مقاوم و ۳ مورد (۲/۵ درصد) Intermediate بود. همچنـین نتـایج به دست آمـده بـه روش PCR بـا نتـایج حاصـل از آنتـی‌بیـوگرام یکسان و مشابه بود. به طوری که تعـداد ۵۵ مـورد (۴۵/۵ درصـد) حـساس، ۶۳ مـورد (۵۲ درصـد) مقـاوم و ۳ مـورد (۲/۵ درصـد) Intermediate بود.

همچنین نتایج حاصل از روش MIC در مقایسه با دو روش قبلـی مشابه بود. به نحوی که تعداد ۵۵ مورد (۴۵/۵ درصد) حـساس، ۶۳ مورد (۵۲ درصد) مقاوم و ۳ مورد (۲/۵ درصد) Intermediate بود. در جدول یک نتایج دیسک آنتی‌بیوگرام و MIC و نتایج PCR بـا یکدیگر مقایسه شده است. نتایج سکانسینگ همان طور که انتظـار می‌رفت یکی از نمونه‌ها را به عنوان نمونه حساس بدون موتاسیون معرفی کرد ولی در مورد نمونه مقاوم پنج مورد موتاسیون در کدون های ۸۵، ۸۱، ۱۰۷، ۹۷، ۸۷ مشاهده شد که یکی از موتاسـیون‌هـا (۸۷) جزء موتاسیون‌های اصـلی مقاومـت بـه نالیدیکـسیک اسـید می‌باشد. این نتایج در جدول ۲ آمده است.

بحث

مقاومت دارویی میکروب‌ها نـسبت بـه آنتـی‌بیوتیـک از مـشکلات جـاری بیمـاران عفـونی در جهـان محـسوب مـی‌شـود کـه رونـد فزاینـده‌ای دارد. در ایـن میـان افـزایش رو بـه رشـد مقاومـت آنتی‌بیوتیکی در بین عوامل باکتریایی ایجـاد کننـده عفونـت‌هـای ادراری به لحاظ شیوع قابـل توجـه ایـن عفونـت‌هـا در جامعـه، از اهمیت ویژه‌ای برخـوردار اسـت. از ایـن رو مطالعـات متعـددی در زمینه تعیین مقاومت دارویی میکـروب‌هـا در عفونـت‌هـای ادراری انجام شده است. در مطالعه‌ای کـه در سـال ۱۳۸۱ در گرگـان بـه منظور تعیین فراوانـی نـسبی عوامـل مولـد عفونـت ادراری و نیـز الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیک آنها بر روی ۲۰۰ بیمـار انجـام شـده است مشخص گردید کـه فراوانـی نـسبی مولـد عفونـت در زنـان (۸۰/۵٪) بیشتر از مردان (۱۹/۵٪) و بیشترین سـن ابـتلا ۳۰-۱۵ سالگی است. شایع‌ترین میکروارگانیسم ایزوله شده، اشرشـیا کلـی (۸۳/۵٪) بـود و کلبـسیلا (۵/۵٪)، پروتئـوس و اسـتافیلوکوک ساپروفیتیکوس (هر کدام حدود ۳٪) هم از گونه‌های شـایع بودنـد. در این تحقیق حـساسیت اشرشـیا کلـی نـسبت بـه جنتامایـسین، نالیدیسیک اسید و سفتی زوکسیم به ترتیـب ۹۸/۶٪، ۹۸٪ و ۹۴٪ بود ولی حساسیت آن به آمپی‌سیلین و کوتریموکسازول فقط ۲۷/۵ و ۴۴ درصد به دست آمد. نتیجهٔ کشت و آنتی‌بیوگرام دلالت بر آن داشـت کـه نالیدیکـسیک اسـید حـساسیت بـالایی نـسبت بـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای دیگـر دارد. بـرعکس کوتریموکـسازول و آمپی‌سیلین مقاومت شدیدی در in vitro نشان مـی‌دهنـد [۹]. در مطالعه‌ای که در فرانسه در مورد میزان فعالیت نالیدیکـسیک اسـید بر روی E.coli جدا شده از عفونت‌هـای ادراری، انجـام شـده بـود ۹۴/۶٪ ایزوله‌های E.coli نسبت به نالیدیکـسیک اسـید حـساس بودند [۱۰]. این نتایج در مقایسه با مطالعه ما نـشان مـی‌دهـد کـه میزان مقاومت بـه نالیدیکـسیک اسـید در ایزولـه‌هـای E.coli در بیماران ما به میزان قابل توجهی بالاتر از مطالعـه‌ای اسـت کـه در

فرانسه انجام شده است. همچنین در مطالعه دیگری که در روسیه انجام گردید میزان مقاومت ایزوله‌های E.coli در نمونه‌های ادراری نسبت به نالیدیکسیک اسید ۶/۹ درصد بود که به طور مشخص، میزان مقاومت بسیار کمتر از مطالعه ما بود [۱۱]. به نظر می‌رسد یکی از علل اساسی در افزایش مقاومت به نالیدیکسیک اسید در بیماران ما، روند رو به رشد استفاده بی‌رویه از این آنتی‌بیوتیک باشد.

در مطالعهٔ دیگری که بر روی عفونت‌های ناشی از استفاده از سوندهای ادراری در سال ۱۳۸۳ در همدان صورت گرفته است E.coli با ۱۷ سویه (۳۴٪) بیشترین و استاف اورئوس و کلبسیلا کمترین درصد (۲٪) میزان ایزوله‌ها را به خود اختصاص داده‌اند. اشرشیا کلی و کلبسیلا بالاترین میزان مقاومت را نسبت به نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین و نیترو فورانتوئین نشان داده‌اند [۱۲]. علاوه بر این در تحقیقی دیگر که در سال ۱۳۸۱ در دانشگاه علوم پزشکی ایران صورت گرفته است، در آنتی‌بیوگرام انجام شده مؤثرترین آنتی‌بیوتیک تزریقی آمیکاسین (۹۱/۶٪) و مؤثرترین آنتی‌بیوتیک خوراکی نالیدیکسیک اسید (۷۶/۹٪) گزارش شده است. کم‌اثرترین آنتی‌بیوتیک در این گزارش آمپی‌سیلین (۸۷/۵٪) بوده است [۱۳]؛ در حالی که در مطالعه ما فقط ۴۵/۵ درصد از نمونه‌ها به نالیدیکسیک اسید حساس بودند، این تفاوت نشان دهنده میزان بالای مقاومتE.coli به نالیدیکسیک اسید در مطالعه ما نسبت به مطالعات قبلی می‌باشد.

علاوه بر این مطالعات که همگی بر مبنای آنتی‌بیوگرام انجام شده‌اند، مطالعات دیگری نیز به روش‌های مختلف مانند تعیین MIC و روش‌های مولکولی برای تشخیص مقاومت انجام گرفته است. در یک بررسی ۸۰ مورد از گونه‌های E.coli مقاوم به نالیدیکسیک اسید با میزان MIC >256mg/L تشخیص داده شد که در گونهٔ ۶۱ از E.coli جدا شده مقاوم به نالیدیکسک اسید، یک تغییر اسیدآمینه در پروتئین gyrA در کدون‌های ۸۳ و ۸۷ مشاهده می‌شد [۱۴،۶]. در مطالعه حاضر نیز یکی از موتاسیون‌های موجود در نمونه E.coli مقاوم به نالیدیکسیک، موتاسیون در کدون شماره ۸۷ بود. در مطالعه دیگری موتاسیون در ژن‌های gyrA و gyrB و parC که باعث مقاومت به نالیدیکسیک اسید در گونه‌های E.coli جدا شده از محصولات غذایی، حیوانی و انسانی می‌شد مورد آنالیز قرار گرفت. در ۱۳ مورد نمونهٔ حساس به نالیدیکسیک اسید هیچ تغییر اسیدآمینه‌ای در پروتئین‌های ParC و gyrA مشاهده نگردید در حالی که در همهٔ گونه‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید حداقل یک مورد تغییر اسیدآمینه در پروتئین gyrA در کدونهای ۸۷ یا ۸۳ دیده شد [۱۵] که با نتایج حاصل از مطالعه ما مبنی بر وجود حداقل یک موتاسیون در کدون‌های ۸۷ یا ۸۳ مطابقت داشت.

پیش‌بینی اتفاقاتی که در آیندهٔ دنیای آنتی‌بیوتیک‌ها رخ می‌دهد، دشوار است. اما دانش ما دربارهٔ راههای معمول گسترش مقاومت‌های آنتی بیوتیکی و مشاهدات اخیر مربوط به انتقال مقاومت بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، احتمال بروز مقاومت‌های پیش‌بینی نشده را افزایش می‌دهد. هر چند این موضوع که ترکیبات ضدمیکروبی رایج امروزی برای چه مدت می‌توانند مفید واقع شوند، قابل پیش‌بینی نیست [۱۳].

بررسی و نتیجه به دست آمده در این تحقیق و مقایسه آن با تحقیقات خارجی و داخلی (حساسیت E.coli نسبت به نالیدیکسیک اسید) نشان دهنده روند فزاینده مقاومت باکتری E.Coli به داروهای رایج می‌باشد. لذا انجام آنتی‌بیوگرام و در صورت امکان MIC و PCR جهت تعیین حساسیت میکروبی قبل از تجویز دارو در جهت انتخاب آنتی بیوتیک مناسب می‌تواند در جلوگیری از مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها مفید واقع شود.

منابع

1- Donnenberg MS. Enterobacteriaceae. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R editor. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone 2005; 2567-2587.

2- Oram M, Fisher LM. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of Escherichia coli clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35(2): 387-9.

3- Qiang YZ, Qin T, Fu W, Cheng WP, Li YS, Yi G. Use of a rapid mismatch PCR method to detect gyrA and parC mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Escherichia coli. J Antimicrob Chemother 2002; 49(3): 549-52.

4- Mutation of gyrA and ParC. Journal of Antimicobial chemotherapy 2003; 1001-1005.

5- Academic Press Inc. (London) ltd. Cloning and sequencing of the E.coli gyrA…. Mol. Biol 1987; 1970: 729-736.

6- Cullen ME. Cloning and characterization of a DNA Gyrase A Gene. Antimicrobiol agent 1989; June: 886-894.

7- Chulain MN, Murray AM, Corbett-Feeney G, Cormican M. Antimicrobial resistance in E.coli associated with urinary tract infection in the west of Ireland. Ir J Med Sci 2005; 174(4): 6-9.

8- Ruiz J, Gomez J, Navia MM, Ribera A, Sierra JM, Marco F, Mensa J, Vila J. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of Escherichia coli and other Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 42(4): 257-61.

۹- پورشفیع م ر، ریحانی ف. عفونت دستگاه ادراری مجلهٔ علوم پزشکی ۱۳۸۱؛ ۶ (۴): ۳۹-۳۰.

10- Lecaillon E, Blosser-Middleton R, Sahm D, Jones M. Activity of nalidixic acid and fluoroquinolones on Escherichia coli strains isolated from non-complicated urinary infections. Med Mal Infect 2004; 34(10): 450-4.

11- Stratchounski LS, Rafalski VV. Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from adult patients with uncomplicated community-acquired urinary tract infections in the Russian Federation: two multicentre studies, UTIAP-1 and UTIAP-2. Int J Antimicrob Agents 2006; 28 (Suppl 1): S4-9.

۱۲- موسویان س م. بررسی عفونت‌های مجاری ادراری و مقاومت آنتی بیوتیکی. مجلهٔ علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان ۱۳۸۳؛۱۱ (۳۲).

۱۳- قاضی مقدم ب. مقاومت آنتی بیوتیکی در عوامل باکتریال جداشده از عفونت ادراری. مجلهٔ اورولوژی ایران ۱۳۸۱؛ ۹ (۳۵).

14- Okuda J, Hayakawa E, Nishibuchi M, Nishino T. Sequence analysis of the gyrA and parC homologues of a wild-type strain of Vibrio parahaemolyticus and its fluoroquinolone-resistant mutants. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(5): 1156-62.

15- ME CULLEN. Cloning and characterization of a DNA Gyrase A Gene. Antimicrobiol agent. June 1989; pp. 886-894.

16- Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in gyrA and parC genes in nalidixic acid-resistant Escherichia coli strains from food products, humans and animals. J Antimicrob Chemother 2003 Apr; 51(4): 1001-5.