

مقایسه محیط کلریمتریک با محیط های Quicolor و استاندارد مولر هینتون آگار جهت سنجش سریع حساسیت آنتی بیوتیکی در خانواده Enterobacteriaceae

شهلا سیامکی^{۱*}، سیاوش سلمانزاده اهرابی^۲، تروسکه صوفی زاده^۳، طاهره فلسفی^۴، مهوش سیفعلی^۵، جمشید فولادی^۶

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۳۱

تاریخ تصویب: ۹۵/۷/۵

چکیده

در این مطالعه، محیط کلریمتریک آنتی بیوگرام که در دانشگاه الزهرا طراحی گردیده است با محیط Quicolor شرکت سالوبریس آمریکا و محیط مولر هینتون آگار مقایسه گردید. الگوی حساسیت ضد میکروبی ۱۰۰ جدایه انتروباکتریاسه با ۶ آنتی بیوتیک مختلف، با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (انتشار دیسک) تعیین گردید. توافق هر سه روش با آنالیز کاپا بررسی گردید. با ده بار تکرار تست حساسیت آنتی بیوتیکی^۲ سوش استاندارد^۲ جدایه بالینی از خانواده انتروباکتریاسه، در هر سه محیط مقادیر *coefficient of variation* (ضریب تغییرات) محاسبه گردید. مقادیر کاپا در همه موارد بالای ۰/۵ و نشان دهنده توافق خوب و یا عالی هر سه محیط بودند. مقادیر CV در اغلب موارد زیر ۰/۰۵ و نشان دهنده تکرار پذیری مناسب آزمایشها بودند. بر اساس یافته های این مطالعه می توان از محیط کلریمتریک آنتی بیوگرام

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)

(نویسنده مسئول: sh.siyamaki380@gmail.com)

۲- دانشیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)

۴- استاد دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)

۵- استادیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)

۶- استادیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)

**برای تعیین سریع الگوی حساسیت ضد میکروبی در خانواده
انتروباکتریاسه استفاده کرد. از نظر کاربردی این محیط مشابه
نمونه های خارجی و استاندارد می باشد.**

**واژه های کلیدی: روش های کلریمتریکی، روش سنتی انتشار دیسک،
سنجش سریع حساسیت ضد میکروبی، انتروباکتریاسه**

مقدمه

تعیین اولیه و سریع حساسیت ضد میکروبی باکتری های جدا شده از عفونت های مختلف نسبت به آنتی بیوتیک های متداول یک اصل اساسی در ایجاد رژیم درمانی مناسب و کارآمد می باشد. امروزه به دلیل استفاده فراوان و نادرست از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف که منجر به پیدایش MDRGNS (گرم منفی های مقاوم چند گانه) شده و همچنین تغییر الگوی حساسیت باکتری ها به آنتی بیوتیک های مختلف، مشکلات متعددی در رابطه با مقاومت های دارویی ایجاد شده است (Tamma Schwalb et al., 2007). بنابراین تجویز درمان آنتی بیوتیکی مناسب باید براساس اطلاعات به دست آمده از الگوی آنتی بیوگرام باشد. بدین منظور ایجاد یک روش تعیین حساسیت سریع ضد میکروبی که از طرفی باعث افزایش موفقیت درمانی، کاهش هزینه های بیمارستانی، کاهش استفاده های نامناسب از عوامل ضد میکروبی و کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی و اثرات جانبی نامطلوب آن شود (Canton et al., 2003) و از طرف دیگر همراستا با شرایط اقتصادی کشور باشد، از اهداف اصلی این پژوهش می باشد. بدین منظور محیط کلریمتریکی ساخته شده در دانشگاه الزهرا (بلند قامت پور و همکاران)، با محیط (Quicolor) (Salmanzadeh-Ahrabi & Kocagoz., 2013; Kocagoz et al., 2007; Ercis et al., 2007) و روش استاندارد رایج (CLSI) با استفاده از محیط مولر هینتون آگار مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. در ساخت محیط کلریمتریکی از عواملی مثل گلوکز، آگار، فنل رد و... با نسبت های معین استفاده شده است. اساس هر دو محیط کلریمتریکی و Quicolor، تغییر رنگ معرف به کار رفته در آن در اثر فعالیت های متابولیکی ناشی از رشد سریع باکتریها می باشد. در اطراف دیسک ها در اثر انتشار آنتی بیوتیک به محیط، باکتری رشد نکرده و یک هاله عدم رشد رنگی شکل می گیرد که قطر هاله ها با خط کش

اندازه گیری می شود. حضور معرف مناسب و مواد غنی کننده (supplement) در محیط و تنظیم اسیدیته آن ضروری می باشد (با توجه به اینکه باکتری ها در pH معینی قادر به رشد می باشند اسیدیته هر محیط در هنگام ساخت محیط مورد نظر با توجه به دستور العمل تنظیم می گردد).

مواد و روش ها

جدایه های باکتری

در این پژوهش به منظور بررسی حساسیت ضد میکروبی در ۳ محیط، Quicolor، کلریمتریک و مولر هینتون آگار ۱۰۰ جدایه از خانواده Enterobacteriaceae که از تحقیقات قبلی به صورت فریز شده نگهداری شده بود، مورد استفاده قرار گرفت که شامل (n=1) *Proteus*، (n=2) *Enterobacter*، (n=7) *Shigella*، (n=27) *Klebsiella*، (n=63) *Escherichia coli* می باشد. در کلیه موارد برای کنترل کیفی دیسک ها و محیط ها از ۲ سوش استاندارد *Klebsiella pneumoniae* ATCC70063 و *E. coli* ATCC 29522 استفاده گردید.

دیسکهای آنتی بیوتیکی

دیسک های آنتی بیوتیکی به کار رفته در این پژوهش شامل جنتامیسین (10 µg)، کوتریموکسازول (25µg)، ایمپی پنم (10µg)، سفتازیدیم (30µg)، سیپروفلوکساسین (5 µg) و سفتیزوکسیم (30µg) می باشند که همگی از شرکت پادتن طب خریداری گردیدند.

تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از محیط ES Quicolor (Salubris Co, USA) :

این روش بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام داده شد. در ابتدا سوسپانسیون باکتریایی از کشت شبانه نمونه های بالینی فریز شده تهیه شد. برای این منظور با استفاده از لوپ مقداری تک کولونی برداشته و در ۳ میلی لیتر محلول نمکی (CC ۸۵/۰ سدیم کلراید در ۱۰۰ CC آب مقطر) تهیه و کدورت آن با لوله ۰/۵ مک فارلند استاندارد مورد سنجش قرار گرفت. سپس با استفاده از سواپ استریل در سه جهت روی محیط ES Quicolor کشت چمنی داده شد. دیسک های کاغذی به فاصله ۲۲ mm از هم و ۱۶ mm از جداره های پلیت در روی محیط قرار گرفتند (دیسک های کاغذی یک ساعت قبل از انجام کار در محیط بیرون از یخچال قرار گیرند). پلیت ها به مدت ۵ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از گذشت زمان لازم از گرماگذاری، قطر هاله های عدم رشد رنگی با خط کش اندازه گیری و قطر نواحی تغییر رنگ مطابق با جدول استاندارد شرکت سالوبریس (Salubris Co, USA) به صورت حساس، نیمه حساس و

مقاوم تفسیر شده و نتایج ثبت گردیدند.

تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از محیط مولر هینتون آگار:

از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده برای محیط ESQuicolor استفاده شد. با استفاده از سواب استریل در سه جهت روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شد و دیسک های کاغذی استفاده شده در محیط قبلی با فاصله های ذکر شده در بالا روی محیط قرار گرفتند. سپس پلیت ها به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در ۳۵ درجه گرماگذاری شدند. پس از سپری شدن این مدت زمان، قطر ناحیه مهارى با خط کش اندازه گیری و مطابق با جدول استاندارد CLSI (M100-S23, 2013) تفسیر شدند.

تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از محیط کلریمتریک:

مشابه روش Quicolor انجام گرفت.

محاسبه ضریب تغییرات (CV):

داده های به دست آمده حاصل از ۱۰ بار تکرار برای هر آنتی بیوتیک، در ۳ محیط کلریمتریک، مولر هینتون و Quicolor، برای ۲ سویه استاندارد (*E. coli* ATCC 29522) و (*Klebsiella pneumonia* ATCC 70063) و ۲ سویه از جدایه های بالینی شامل (یک *E. coli* و یک *Klebsiella spp.*)، مطابق استاندارد های بین المللی (CLSI M100-S23) مورد محاسبه قرار گرفتند (لازم به ذکر است که CV از تقسیم انحراف معیار بر میانگین به دست آمد و این محاسبات بدون استفاده مستقیم از معادلات آماری و تماماً با استفاده از نرم افزارهای آماری انجام شده است).

نتایج

نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی به صورت حساس (sensitive)، مقاوم (resistant) و حد واسط (intermediate resistant) تفسیر گردید. بدین صورت که یکسانی نتایج حاصل از هر ۲ تست به صورت توافق (agreement) و عدم یکسانی به صورت (discrepancy) تعریف شد (Kocagoz et al., 2007). در این بررسی برای تجزیه و تحلیل داده ها به منظور کسب نتایج حاصل از ارزیابی CV و kappa از نرم افزار spss20 و stata13 استفاده شده است. محیط ها ۲ به دو برای هر ۶ آنتی بیوتیک ارزیابی و مقایسه شده اند و نتایج به صورت مقدار های kappa در جدول شماره (۱) ذکر گردیده اند. این آماره بین ۱- تا ۱+ گزارش می شود. ۰ تا ۰/۲۵ نشان دهنده توافق ضعیف، ۰/۲۵ تا ۰/۵ توافق متوسط، ۰/۷۵ تا ۰/۷۵ توافق خوب و ۰/۷۵ تا ۱ توافق عالی را نشان می دهد. نتایج مربوط به CV نیز در جدول شماره (۲) آورده شده است. مقادیر CV کوچکتر

یا مساوی ۵% مورد پذیرش قرار می گیرد. به بیان دیگر هر قدر که مقدار CV کمتر باشد، حاکی از آن است که تکرار پذیری آزمون بالاتر است.

جدول شماره ۱: نتایج مربوط به اندازه گیری kappa

آنتی بیوتیک محیط	جنتامیسین	کوتریموکسازول	ایمی پنم	سفتازیدیم	سیپروفلوکساسین	سفتیزوکسیم
colorimetric -Quicolor	۰/۶۸	۰/۹۵	۰/۹۴	۰/۸۴	۰/۸۹	۰/۵۴
Colorimetr ic-MHA	۰/۷۶	۰/۹۲	۰/۹۴	۰/۸۱	۰/۹۳	۰/۶۴
Quicolor- MHA	۰/۹۲	۰/۹۴	۰/۹۳	۰/۸۴	۰/۹۵	۰/۷۴

در این آمار نتایج بین ۱- تا ۱+ گزارش می شود. ۰/۵ تا ۰/۷۵ توافق خوب و ۰/۷۵ تا ۱ توافق عالی را نشان می دهد. در این جدول تمام موارد حاکی از توافق خوب یا عالی در مقایسه بین محیط ها و برای ۶ نوع دیسک آنتی بیوتیکی می باشد.

بعد از انجام تست های حساسیت ضد میکروبی به طور جداگانه روی ۳ محیط کلریمتریک، مولر هینتون، Quicolor و گذشت مدت زمان مورد نیاز برای هر محیط و اندازه گیری قطر هاله های عدم رشد تشکیل شده و تفسیر داده ها، نتایج بدست آمده براساس آماره kappa به منظور بررسی نحوه عملکرد ۳ محیط نام برده، مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مورد دو آنتی بیوتیک جنتامیسین و سفتی زوکسیم توافق خوب و برای ۴ آنتی بیوتیک باقی مانده توافق عالی بین دو محیط کلریمتریک - Quicolor به دست آمد. توافق بین دو محیط کلریمتریک - مولر هینتون در ۵ مورد عالی بود. توافق بین دو محیط مولر هینتون - Quicolor در همه موارد عالی بود. در مورد نتایج مربوط به اندازه گیری CV در محیط کلریمتریک ۲۰ مورد کوچکتر از ۵%، در محیط Quicolor 23 مورد کوچکتر از ۵% و در محیط مولر هینتون اگر ۱۸ مورد کوچکتر از ۵% به دست آمد. این نتایج نشان دهنده تکرار پذیری رضایت بخش در هر ۳ محیط مجزا می باشد و حاکی از آن است که قطر هاله های عدم رشد و یا تغییر رنگ ناشی از این آنتی بیوتیک ها از یک آزمایش

به آزمایش دیگر و در محیط های مختلف تغییر قابل توجهی نشان نمی دهد. در واقع خطای اندازه گیری ناچیز و قابلیت تکرارپذیری محیط کلریمتریک مشابه، بلکه بهتر از نمونه های استاندارد می باشد. خلاصه نتایج در جدول شماره (۲) قابل مشاهده می باشد.

جدول شماره ۲: نتایج مربوط به اندازه گیری C.V

محیط	باکتری	جنتامیسین	کوتریموکسازول	ایمی پنم	سفتازیدیم	سیپروفلوکساسین	سفتیزوکسیم
کلریمتریک	<i>E. coli</i> ATCC ۲۹۵۲۲	۰,۰۴	۰,۰۴	۰,۰۵	۰,۰۴	۰,۰۳	۰,۰۳
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ae ATCC ۷۰۰۶۳	.	۰,۰۵	۰,۰۲	۰,۱۲	۰,۰۵	۰,۰۴
	<i>E. coli</i>	۰,۰۳	.	۰,۰۳	۰,۰۴	۰,۰۴	۰,۰۲
	<i>Klebsiella spp.</i>	.	.	۰,۰۶	۰,۰۶	۰,۰۴	۰,۰۸
Quicolor	<i>E. coli</i> ATCC ۲۹۵۲۲	۰,۰۴	۰,۰۵	۰,۰۴	۰,۰۵	۰,۰۴	۰,۰۴
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ae ATCC ۷۰۰۶۳	۰,۰۳	۰,۰۳	۰,۰۲	۰,۰۴	۰,۰۳	۰,۰۳
	<i>E. coli</i>	۰,۰۳	.	۰,۰۳	۰,۰۴	۰,۰۳	.
	<i>Klebsiella spp.</i>	۰,۰۳	.	۰,۰۴	۰,۰۵	۰,۰۴	۰,۰۸
مولر هینتون	<i>E. coli</i> ATCC ۲۹۵۲۲	۰,۰۳	۰,۰۵	۰,۰۳	۰,۰۴	۰,۰۶	۰,۰۶
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ae ATCC ۷۰۰۶۳	۰,۰۲	.	۰,۰۴	۰,۰۴	۰,۰۵	۰,۰۲
	<i>E. coli</i>	۰,۰۵	.	۰,۰۴	۰,۰۴	۰,۰۶	۰,۰۵
	<i>Klebsiella spp.</i>	۰,۱۱	.	۰,۰۵	۰,۰۷	۰,۰۴	۰,۱۹

مقادیر CV کوچکتر یا مساوی ۵% مورد پذیرش قرار می گیرد. در محیط کلریمتریک ۲۰ مورد کوچکتر از ۵%، در محیط Quicolor ۲۳ مورد کوچکتر از ۵% و در محیط مولر هیتون آگار ۱۸ مورد کوچکتر از ۵% به دست آمد. این نتایج نشان دهنده تکرارپذیری رضایت بخش در هر ۳ محیط مجزا می باشد و حاکی از آن است که خطای اندازه گیری ناچیز می باشد.

بحث

برای تامین سلامت و بهداشت جامعه دو عامل اساسی را باید مد نظر داشت. نخست شناسایی عامل بیماریزا و دوم روش صحیح مبارزه با عامل ایجاد کننده بیماری. در بسیاری از مطالعات گذشته مزایای بالینی و فواید اقتصادی زیادی برای تعیین سریع حساسیت ضد میکروبی گزارش شده است (Granoto.,1993; Dren et al.,1999; Tunney et al., 2004; Knemitsu et al., 2005). به علاوه با توجه به اهمیت به کارگیری الگوی دارویی مناسب در درمان بیماریهای عفونی و به خصوص عفونت های ادراری که امروزه حجم وسیعی از بار کاری آزمایشگاه های بالینی را شامل می شود (Tansarli et al., 2013) و به منظور سرعت بخشیدن ارسال نتایج آزمایشگاهی به مراکز پزشکی و پزشکان، ابداعاتی در جهت سریعتر کردن روش های تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی صورت پذیرفته است، از جمله این ابداعات می توان به ساخت دستگاه های اتوماتیک و نیمه اتوماتیک و طراحی و ساخت محیط های کشت میکروبی اشاره کرد (Salmanzadeh-Ahrabi&Kocagoz., 2013). چند نوع از سیستم های رایج اتوماتیک برای تعیین سریع حساسیت ضد میکروبی شامل Phoenix, Vitek1 and 2 و MicroScan (Jorgensen et al., 2000; Ling et al., 2001) می باشد. در سال ۲۰۰۶ شرکت (Salubris Co, USA) محیط های رنگی تحت نام Quicolor را برای تعیین حساسیت سریع ضد میکروبی طراحی کرد، که نتایج را در ۵-۳ ساعت آماده می کند، اساس کار آن روش سنتی انتشار دیسک می باشد. از آنجا که این نمونه های خارجی هزینه بر و گران هستند و همچنین نمونه های استاندارد مثل محیط مولر هیتون آگار که به طور معمول در آزمایشگاه ها استفاده می شوند نتایج را در ۱۸-۱۶ ساعت آماده می کنند، نیاز مبرمی به وجود یک محیط کشت سریع داخلی احساس می شود که هم مقرون به صرفه باشد و هم اینکه از نظر کارایی با نمونه های خارجی و استاندارد برابری کند. بدین منظور در دانشگاه الزهرا اقدام به طراحی و ساخت یک محیط کشت کلریمتریک شد که بر اساس رشد سریع میکروارگانیسم ها و تغییرات رنگی در حضور

معرف مناسب استوار است و بر مبنای روش سنتی انتشار دیسک می باشد. در واقع هدف از مطالعه حاضر مقایسه محیط کلریمتریک ساخته شده در دانشگاه الزهرا با محیط های Quicolor و مولر هینتون و همچنین تایید کارایی آن به عنوان یک محیط کاربردی در تعیین سریع حساسیت ضد میکروبی در خانواده Enterobacteriaceae با هدف کوتاهتر شدن زمان گزارش الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی می باشد. از آنجا که زمان مورد نیاز برای تعیین حساسیت ضد میکروبی با استفاده از محیط کلریمتریک ۶-۴ ساعت (به طور میانگین نتایج در ۵ ساعت حاصل شد) می باشد، لذا می تواند به عنوان عاملی در سریعتر کردن زمان پاسخگویی و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی مناسب برای هر عفونت، کاهش عوارض جانبی، کاهش مصرف خود سرانه دارو و کاهش مقاومت های دارویی مطرح شود. موارد ذکر شده به نوبه خود باعث کوتاهتر شدن زمان بستری بیماران در بیمارستان و کاهش هزینه های درمانی هم برای بیمار و هم برای سیستم سلامت و بهداشت کشور می باشد. تعیین سریع و به موقع عامل عفونت در همان روزی که عامل بیماریزا جداسازی می شود و تجویز رژیم دارویی صحیح باعث کاهش مرگ و میر می شود، در واقع پزشک و بیمار را در راستای ارتقای سلامت عمومی یاری می دهد. از آنجایی که این محیط نتایج تست را در ۶-۴ ساعت و به طور میانگین در ۵ ساعت فراهم می کند و با توجه به این که از نظر تکنیکی علاوه بر استاندارد بودن، انجام این روش آسان است و نتایج قابل تکرار می باشند. مواد و تجهیزات و معرف ها ارزان می باشند. احتیاج به استفاده از تجهیزات گران قیمت و ابزار اختصاصی ندارد. نتایج طبقه بندی شده و قطعی به آسانی توسط پزشکان قابل تفسیر می باشد (Jenkins et al., 2012)، می تواند جایگزین مناسبی برای محیط های خارجی و گران قیمت باشد (ثبت این محیط در دست اقدام می باشد و پتنت مشابه خارجی آن موجود می باشد).

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا قدردانی می گردد.

منابع

- بلندقامت پور، ز.، سلمانزاده اهرابی، س.، عبدی، ع.، (۱۳۹۲) طراحی و ارزیابی محیط های کلریمتریک جهت سنجش سریع حساسیت آنتی بیوتیکی در خانواده انتروباکتریاسه و باکتری های غیر تخمیری، مجله زیست شناسی کاربردی الزهراء: دوره ۶۲، شماره ۵، ۱-۸.
- Canton R., Loza E., Del C. M., Baquero F., Martines M.L., Collaborative Group. (2003) Quality control for β -lactam susceptibility testing with a well-defined collection of Entrobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* strain in Spain Journal of Clinical Microbiology 41: 1912-8.
- Doern G., Vautour R., Gaudet M., Levy B. (1994) Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. Journal of Clinical Microbiology., 32:1757-1762.
- Ercis S., Sancak B. Kocagoz T., Kocagoz S., Hascelik G., Bolmstrom A. (2007) Rapid 4 to 6 hour detection of extended-spectrum beta-lactamases in a routine laboratory. Scandinavian Journal of Infectious Diseases., 36:781-785.
- Granato P. A. (1993) Impact of same day tests versus traditional overnight testing. Diagn. Scandinavian Journal of Infectious Diseases., 16:237-243.
- Jenkins S.G., Schuetz A.N. (2012) Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy. Mayo. Clinic Proceedings., 87(3): 290-308.
- Jorgensen J. H., Barry A. L., Traczewski M. M., Sahm D. F., Mcelmeel M. L., Crawford SH. A. (2000) Rapid automated antimicrobial susceptibility testing of streptococcus pneumonia by use of the bio Merieux VITEK2. Journal of Clinical Microbiology., 38:2814-2818.
- Kanemitsu K., Kunishima H., Inden K., Hatta M., Saga T., Ueno K., Harigae H., Ishizawa K., Kaku M. (2005) Assessment of RAISUS, a novel system for identification and antimicrobial susceptibility testing for enterococci. Diagn. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease., 53:23-27.
- Kocagoz T., Ercis S., Darka O., Salmanzadeh-Ahrabi S., Kocagoz S., Hasclik G. (2007) A novel system for rapid antibacterial susceptibility testing. Annals of Microbi-

- ology., 57(1):131-135.
- Ling T. K.W., Tam P.C., Lu Z. K., Cheng A. F.B. (2001) Evaluation of VITEK2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology.*, 39:2964-2966.
- Salmanzade-Ahrabi S., Kocagoz T. (2013) Evaluation of liquid-phase colorimetric method for rapid antibacterial susceptibility test. *Iranian Journal of Microbiology.*, 5:256-262.
- Tamma P.D., Cosgrove S.E., Maragakis L.L. (2012) Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews.*, 25(3): 450–470.
- Tansarli G. S., Athanasiou S., Fallagas M. E. (2013) Evaluation of antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae causing urinary tract infections in Africa. *Antimicrob. Agents. chemother.*, 57(8): 3628-3639.
- Traub W.H., Raymond E.A., Linehan J. (1970) Identification of Enterobacteriaceae in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Applied Microbiology.*, 20:303-308.
- Tunny M. M., Ramage G., Field T. R., Moriarty T.F., Storey D.G. (2004) Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48: 1879-1881.