مقایسه محیط کلریمتریک با محیط های Quicolor واستانداردمولر هینتون آگار جهت سنجش سریع حساسیت آنتی بیوتیکی درخانواده Enterobacteriaceae

شهلا سیامکی[1*]، سیاوش سلمانزاده اهرابی[2]، تروسکه صوفی زاده[3]، طاهره فلسفی[4]، مهوش سیفعلی[5]، جمشید فولادی[6]

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 انترو باکتریاسه با ۶ آنتی بیوتیک مختلف، با استفاده از روش دیسک دیفیوژن(انتشار دیسک)تعیین گردید. توافق هر سه روش با آنالیزکاپابررسی گردید. با ده بار تکرار تست حساسیت آنتی بیو تیکی۲ سوش استانداردو۲ 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 تکرارپذیری 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)
٤-استاد دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا(س)
٥-استادیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا(س)
٦-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 کلریمتریک،روش سنتی انتشار دیسک، سنجش سریع حساسیت ضد میکروبی، انتروباکتریاسه

مقدمه

تعیین اولیه و سریع حساسیت ضدمیکروبی باکتری ها ی 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 واثرات جانبی نامطلوب آن شود(Canton et al., 2003)و از طرف دیگرهمراستا با شرایط اقتصادی کشور باشد،از اهداف اصلی این پژوهش می باشد.بدین منظور محیط کلریمتریک 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 وارزیابی قرارگرفت. در ساخت محیط کلریمتریک از عواملی مثل گلوکز، آگار، فنل رد و... با نسبت های معین استفاده شده است. اساس هردومحیط کلریمتریک و Quicolor، تغییر رنگ معرف به کار رفته در آن در اثرفعالیت 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 باشنداسیدیته هر محیط در هنگام ساخت محیط مورد نظر باتوجه 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=63)*Klebsiella*، (n=27)*Shigella*، (n=7)*Enterobacter*، (n=2)*Proteus*، (n=1)*Escherichia coli* می باشد. در کلیه موارد برای کنترل کیفی دیسک ها و محیط ها از ۲ سوش استاندارد*Klebsiella pneumonia* 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)،ایمی 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 در۳ میلی لیتر محلول نمکی(۰/۸۵ cc 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 ESQuicolor کشت چمنی داده شد.دیسک های کاغذی به فاصله ۲۲ mm ازهم و mm ۱۶ 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 در جه 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

مقـاوم تفسیرشـده ونتایـج ثبـت گردیدنـد.

تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از محیط مولرهینتون آگار:

از سوسپانسـیون باکتریایـی تهیـه شـده بـرای محیـط ESQuicolor اسـتفاده شـد. بـا اسـتفاده از سـواپ اسـتریل در سـه جهـت روی محیـط مولرهینتـون آگار کشـت چمنـی داده شـدو دیسـک هـای کاغـذی اسـتفاده شـده در محیـط قبلـی بـا فاصلـه هـای ذکـر شـده در بـالا روی محیـط قرارگرفتنـد. سـپس پلیـت هـا بـه مـدت ۱۸-۱۶ سـاعت در ۳۵ درجـه گرماگـذاری شـدند.پس از سـپری شـدن ایـن مـدت زمـان، قطـر ناحیـه مهـاری بـا خـط کـش انـدازه گیـری و مطابـق بـا جـدول اسـتاندارد CLSI(M100-S23.,2013) تفسـیر شـدند.

تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از محیط کلریمتریک:

مشابه روش Quicolor انجام گرفت.

محاسبه ضریب تغییرات(CV):

داده هـای بـه دسـت آمـده حاصـل از ۱۰ بـار تکـرار بـرای هرآنتـی بیوتیـک،در ۳ محیـط کلریمتریـک، مولرهینتـون و Quicolor ، بـرای ۲ سـویه اسـتاندارد*E. coli* ATCC 29522) و *Klebsiella pneumonia* ATCC 70063) و ۲ سـویه از جدایـه هـای بالینـی شـامل (یـک E.Coli و یـک .Klebsiella spp)، مطابـق اسـتاندارد هـای بیـن المللـی(CLSI M100-S23) مـورد محاسـبه قـرار گرفتنـد(لازم بـه ذکـر اسـت کـه CV از تقسـیم انحـراف معیـار بـر میانگیـن بـه دسـت آمـد و ایـن محاسـبات بـدون اسـتفاده مسـتقیم از معـادلات آمـاری و تمامـا بـا اسـتفاده از نـرم افزارهـای آمـاری انجـام شـده اسـت).

نتایج

نتایـج آزمـون حساسـیت آنتـی بیوتیکـی بـه صـورت حسـاس(sensitive)، مقـاوم (resistant) و حـد واسـط(intermediate resistant) تفسـیر گردیـد. بدیـن صـورت کـه یکسـانی نتایـج حاصـل از هـر ۲ تسـت بـه صـورت توافـق (agreement) و عـدم یکسـانی بـه صـورت (discrepancy) تعریـف شـد (Kocagoz et al.,2007). در ایـن بررسـی بـرای تجزیـه و تحلیـل داده هـا بـه منظـور کسـب نتایـج حاصـل از ارزیابـی CVو kappa از نـرم افـزار spss20 و stata13 اسـتفاده شـده اسـت. محیـط هـا۲ بـه دو بـرای هـر ٦ آنتـی بیوتیـک ارزیابـی و مقایسـه شـده انـد و نتایـج بـه صـورت مقـدار هـای kappa در جـدول شـماره (۱)ذکـر گردیـده اند.ایـن آمـاره بیـن ۱- تـا ۱+ گـزارش مـی شـود. ۰تـا ۰/۲۵ نشـان دهنـده توافـق ضعیـف، ۰/۲۵تـا ۰/۵توافـق متوسـط، ۰/۵تـا ۰/۷۵توافـق خـوب و ۰/۷۵ تـا ۱ توافـق عالـی را نشـان مـی دهـد. نتایـج مربـوط بـه CV نیـز در جـدول شـماره (۲) آورده شـده اسـت.مقادیر CV کوچکتـر

یـا مسـاوی ۵% مـورد پذیـرش قـرار مـی گیـرد. بـه بیـان دیگـر هـر قـدر کـه مقـدار CV کمتـر باشـد، حاکـی از آن اسـت کـه تکـرار پذیـری آزمـون بالاتـر اسـت.

جدول شماره۱: نتایج مربوط به اندازه گیری *kappa*

آنتی بیوتیک / محیط	جنتامیسین	کوتریموکسازول	ایمی پنم	سفتازیدیم	سیپروفلوکساسین	سفتیزوکسیم
colorimetric -Quicolor	۰/٦٨	۰/۹۵	۰/۹٤	۰/۸٤	۰/۸۹	۰/۵٤
Colorimetric-MHA	۰/۷٦	۰/۹۲	۰/۹٤	۰/۸۱	۰/۹۳	۰/٦٤
Quicolor-MHA	۰/۹۲	۰/۹٤	۰/۹۳	۰/۸٤	۰/۹۵	۰/۷٤

در ایـن آمـار نتایـج بیـن ۱- تـا ۱+ گـزارش مـی شـود. ۰/۵تـا ۰/۷۵ توافـق خـوب و ۰/۷۵ تـا ۱ توافـق عالـی را نشـان مـی دهـد. در ایـن جـدول تمـام مـوارد حاکـی از توافـق خـوب یـا عالـی در مقایسـه بیـن محیـط هـا و بـرای ٦ نـوع دیسـک آنتـی بیوتیکـی مـی باشـد.

بعـد از انجـام تسـت هـای حساسـیت ضدمیکروبـی بـه طـور جداگانـه روی ۳ محیـط کلریمتریک،مولرهینتـون،Quicolor و گذشـت مـدت زمـان مـورد نیـاز بـرای هـر محیـط واندازه گیـری قطـر هالـه هـای عـدم رشـد تشـکیل شـده وتفسـیر داده هـا، نتایـج بدسـت آمده براسـاس آمـاره kappa بـه منظـور بررسـی نحـوه عملکـرد ۳ محیـط نـام بـرده، مـورد ارزیابـی قـرار گرفتنـد.در مـورد دو آنتـی بیوتیـک جنتامیسـین و سـفتی زوکسـیم توافـق خـوب و بـرای ٤ آنتـی بیوتیـک باقـی مانـده توافـق عالـی بیـن دومحیـط کلریمتریـک- Quicolor بـه دسـت آمـد. توافـق بیـن دومحیـط کلریمتریـک - مولرهینتـون در ۵ مـورد عالـی بـود. توافـق بیـن دومحیـط مولرهینتـون-Quicolor در همـه مـوارد عالـی بـود.در مـورد نتایـج مربـوط بـه انـدازه گیـری CV در محیـط کلریمتریـک ۲۰مـورد کوچکتـراز۵% ، در محیـط Quicolor23 مـورد کوچکتـراز ۵% ودر محیـط مولرهینتـون آگار۱۸مـورد کوچکتـراز ۵% بـه دسـت آمـد. ایـن نتایـج نشـان دهنـده تکرارپذیـری رضایـت بخـش در هـر ۳ محیـط مجـزا مـی باشـدو حاکـی از آن اسـت کـه قطـر هالـه هـای عـدم رشـد و یـا تغییـر رنـگ ناشـی از ایـن آنتـی بیوتیـک هـا از یـک آزمایـش

بـه آزمایـش دیگـر و در محیـط هـای مختلـف تغییـر قابـل توجهـی نشـان نمـی دهـد.در واقـع خطـای انـدازه گیـری ناچیـز و قابلیـت تکرارپذیـری محیـط کلریمتریـک مشـابه، بلکـه بهتـر از نمونـه هـای اسـتاندارد مـی باشـد.خلاصه نتایـج در جـدول شـماره (۲) قابـل مشـاهده مـی باشـد.

جدول شماره۲: نتایج مربوط به اندازه گیریC.V

محیط	باکتری	جنتامیسین	کوتریموکسازول	ایمی پنم	سفتازیدیم	سیپروفلوکساسین	سفتیزوکسیم
کلریمتریک	*E. coli ATCC۲۹۵ ۲۲*	۰,۰۴	۰,۰۴	۰,۰۵	۰,۰۴	۰,۰۳	۰,۰۳
	Klebsiella. pneumoniae ATCC۷۰۰ ۶۳	۰	۰,۰۵	۰,۰۲	۰,۱۲	۰,۰۵	۰,۰۴
	E. coli	۰,۰۳	۰	۰,۰۳	۰,۰۴	۰,۰۴	۰,۰۲
	Klebsiella spp.	۰	۰	۰,۰۶	۰,۰۶	۰,۰۴	۰,۰۸
Quicolor	*E. coli ATCC۲۹۵ ۲۲*	۰,۰۴	۰,۰۵	۰,۰۴	۰,۰۵	۰,۰۴	۰,۰۴
	Klebsiella pneumoniae ATCC۷۰۰ ۶۳	۰,۰۳	۰,۰۳	۰,۰۲	۰,۰۴	۰,۰۳	۰,۰۳
	E.coli	۰,۰۳	۰	۰,۰۳	۰,۰۴	۰,۰۳	۰
	Klebsiella spp.	۰,۰۳	۰	۰,۰۴	۰,۰۵	۰,۰۴	۰,۰۸
مولر هینتون	*E. coli ATCC۲۹۵ ۲۲*	۰,۰۳	۰,۰۵	۰,۰۳	۰,۰۴	۰,۰۶	۰,۰۶
	Klebsiella pneumoniae ATCC۷۰۰ ۶۳	۰,۰۲	۰	۰,۰۴	۰,۰۴	۰,۰۵	۰,۰۲
	E. coli	۰,۰۵	۰	۰,۰۴	۰,۰۴	۰,۰۶	۰,۰۵
	Klebsiella spp.	۰,۱۱	۰	۰,۰۵	۰,۰۷	۰,۰۴	۰,۱۹

مقادیر CV کوچکتر یا مساوی ۵% مورد پذیرش قرار می گیرد. در محیط کلریمتریک ۲۰ مورد کوچکتراز۵% ، در محیط Quicolor ۲۳ مورد کوچکتراز ۵% و در محیط مولرهینتون آگار۱۸ مورد کوچکتراز 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 علاوهبا توجه به اهمیت به کارگیری الگوی دارویی مناسب در درمان بیماریهای عفونی وبه خصوص عفونت های ادراری که امروزه حجم وسیعی از بار کاری آزمایشگاه های بالینی را شامل می شود(Tansarli et al., 2013)وبه 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).چندنوع از سیستم های رایج اتوماتیک برای تعیین سریع حساسیت ضد میکروبی شامل Phoenix, Vitek1and 2و MicroScan (Jorgensen etal., 2000; Ling et al., 2001) می باشد. در سال ۲۰۰۶ شرکت(Salubris Co, USAمحیطهای رنگی تحت نام Quicolor را برای تعیین حساسیت سریع ضد میکروبی طراحی کرد، که نتایج را در۵- ۳/۵ 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 هینتون 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 ومولرهینتون وهمچنین 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.ازآنجا که زمان مورد نیاز برای تعیین حساسیت ضد میکروبی با استفاده از محیط کلریمتریک ٦-٤ ساعت (به طور میانگین نتایج در ٥ 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 ٦-٤ ساعت و به طور میانگین در ٥ 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 وارزیابی محیط های کلریمتریک جهت سنجش سریع حساسیت آنتی بیوتیکی در خانواده انتروباکتریاسه و باکتری های غیر تخمیری، مجله زیست شناسی کاربردی الزهراء: دوره ٦٢، شماره ٥، ٨-١ .

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) Anovel 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-fase 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 aeroginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chemother., 48: 1879-1881.