الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی در اشریشیا کلی جدا شده از آب

شهرزاد توانانیا[۱]، رضا رنجبر*[۲]، آذر سبکبار[۳]

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کرج، ایران.
۲. استاد میکروب شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
۳. دانشیار میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کرج، ایران.

***نشانی برای مکاتبه:** مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیۀ ا.، تلفن: ۸۸۰۳۹۸۸۳- ۰۲۱، ranjbarre@gmail.com
دریافت مقاله: اردیبهشت نود و چهار پذیرش برای چاپ: مرداد نود و چهار

چکیده

سابقه و هدف: *میزان مقاومت آنتی بیوتیکی به خصوص مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید در باکتری اشریشیا کلی به سرعت رو به افزایش است. باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک مانند اشریشیا کلی که از انسان و حیوانات به داخل منابع آبی منتشر شده اند، ممکن است به عنوان یک دهنده ژن مقاومت آنتی بیوتیکی برای دیگر باکتری های اشریشیا کلی بیماریزا عمل کنند و بدین ترتیب شمار زیادی از این باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم خواهند شد. هدف از این مطالعه، تعیین شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید در ایزوله های باکتری اشریشیا کلی جدا شده از منابع آب استان البرز است.*

روش کار: *سویه های باکتریایی جدا شده از منابع مختلف آب های سطحی استان البرز در سال ۱۳۹۳ با استفاده از تست های استاندارد میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی جدا و تشخیص داده شدند. تست حساسیت (آنتی بیوگرام) براساس روش کربی باوئر انجام شد. الگوی حساسیت ایزوله ها نسبت به لینکومایسین، ریفامپین، استرپتومایسین، جنتامایسین، توبرامایسین، کانامایسین، کلیندامایسین، آمیکاسین و آزیترومایسین ، مشخص گردید.*

یافته ها: *در این مطالعه، ۱۰۰ سویه اشریشیا کلی از منابع آب جدا و بررسی شد. میزان ۹۵/۷٪ از نمونه ها به کلیندامایسین، ۹۴/۷٪ به لینکومایسین،۹۳/۷٪ به ریفامپین، ۲۸/۱٪ به استرپتومایسین، ۲۷/۱٪ به جنتامایسین، ۱۰/۴٪ به توبرامایسین، ۷/۴٪ به کانامایسین، ۶/۶٪ به آمیکاسین و ۴/۱٪ به آزیترومایسین مقاوم بودند.*

نتیجه گیری: *این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای سویه های اشریشیا کلی مقاوم به آمینوگلیکوزیدها است که در منابع آبی در گردش است که می تواند بعنوان یک نگرانی اساسی از جهت انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری های موجود در آب تلقی شود.*

واژگان کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی، اشریشیا کلی، آمینوگلیکوزیدها، منابع آب

مقدمه

با وجودی که بیماری های عفونی و درمان آن ها در دهه های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته و در این راستا تلاش های بسیاری برای مقابله و ریشه کنی عوامل بیماری زا صورت گرفته است، اما تغییر رفتار میکرو ارگانیسم ها از جنبه های مختلف باعث شده که ریشه کنی بسیاری از این عوامل میکروبی با موفقیت کافی هم راه نباشد و حتی با ظهور و شیوع سویه های جدید، دامنه این بیماری ها افزایش یابد(۱). با وجود این که اقدامات فراوانی جهت تولید مواد ضد میکروبی وسیع الطیف انجام گرفته است، اما کماکان بروز و شیوع مقاومت های آنتی بیوتیکی بخصوص، مقاومت در باکتری های گرم منفی از موانع اساسی برای درمان قطعی بیماری ها و جز مباحث روز می باشد(۲).

امروزه یکی از مشکلات اساسی، عفونت های منتقله از آب و مواد غذایی می باشد که در این بین *اشریشیا کلی* نقش موثری دارد. *اشریشیا کلی* یکی از علل ایجاد عفونت های مشترک از جمله عفونت های دستگاه ادراری است که آب می تواند یک منبع بزرگ برای انتقال این باکتری باشد. باکتری مقاوم در برابر آنتی بیوتیک از جمله *اشریشیا کلی* از انسان و حیوانات به

منابع آبی آزاد شده و ممکن است به عنوان یک اهدا کنندهٔ ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی برای سایر *اشریشیا کلی* ها عمل کند(۳،۴). به این ترتیب سویه های در گردش در محیط های آبی، به عنوان یک عامل کمک کننده مهم در گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی محسوب می شوند.

عفونت های دستگاه ادراری یکی از مهم ترین بیماری های عفونی شایع در سراسر جهان هستند(۵). عفونت دستگاه ادراری از علل شایع تب و یکی از شایع ترین عفونت های اکتسابی جامعه در کودکان است. تخمین زده می شود که حدود ۸٪ از دختران و ۲٪ از پسران حداقل یک بار در دوران کودکی به عفونت دستگاه ادراری دچار شده اند. عفونت دستگاه ادراری اغلب در کلیه (پیلونفریت) و اختلالات مثانه ای (cyctitis) تشخیص داده می شود ، و حدود ۸۰-۹۰٪ از موارد آن توسط سویه های اشرشیاکلی ایجاد می شود(۸-۵).

مدیریت بالینی عفونت ادراری، به علت افزایش عفونت ناشی از سویه های اشریشیاکلی که به عوامل ضد میکروبی که به طورعادی استفاده می شوند، مقاوم هستند، پیچیده است. افزایش نرخ مقاومت در میان یوروپاتوژن ها باعث نگرانی رو به رشد است. با این حال، الگوهای مقاومت در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت است. شناخت این الگوها در جوامع مختلف برای تشخیص الگوهای غیر معمول و یا جدید بسیار حیاتی است. از سوی دیگر توجه خاص به تشخیص زودرس و درمان عفونت ادراری در کودکان به منظور کاهش آسیب مزمن کلیه و عواقب بالینی آن الزامی است(۸).

آمینوگلیکوزیدها یک دسته مهم از آنتی بیوتیک های رایج علیه باکتری های *اشریشیاکلی* هستند که وسیع الطیف می باشند و بیش ترین کاربرد را در درمان عفونت های ناشی از باسیل های گرم منفی هوازی و بی هوازی اختیاری از جمله *اشریشیا کلی* دارند. این آنتی بیوتیک ها ریبوزوم باکتری را هدف قرار داده و در مرحله ترجمه پروتئین ها اختلال ایجاد می کنند. اغلب آمینوگلیکوزیدها باکتری کش هستندو بخشی از فعالیت کشندگی آنها به دلیل ایجاد اختلال در خواندن نسخه mRNA است که منجر به تولید پروتئین های ناقص می شود(۱۱-۹).

امروزه بروز و ظهور مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها تأثیر عمیقی در کاربردهای بالینی داشته است. به طور کلی مقاومت به آمینوگلیکوزید ها به سه روش، ۱- تغییر در هدف دارو ۲- تغییر در نقل و انتقال دارو ۳- غیر فعال سازی آنزیماتیک به وسیله تولید آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ها (Aminoglycoside Modifying Enzymes=AMEs) ، ایجاد می شود(۱۵-۱۲).

پدیده مقاومت آنتی بیوتیکی آنقدر حائز اهمیت است که در سال ۲۰۱۱ میلادی سازمان بهداشت جهانی روز جهانی بهداشت را روز مقابله با مقاومت دارویی نام گذاری کرد(۱۶). در صورتی که پاتوژن ها حداقل به سه کلاس از آنتی بیوتیک ها مقاوم باشند آن ها را مقاوم به چند دارو [Multi Drug Resistant (MDR)]می نامند(۱۸،۱۷).

هدف از این مطالعه، تعیین الگوی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و تعیین فراوانی مقاومت به این آنتی بیوتیک در بین ایزوله های اشریشیا کلی جدا شده از از منابع مختلف آب بود.

روش کار

نمونه های مورد بررسی در این تحقیق از منابع مختلف آب سطحی استان البرز بوده است که در طی حدود ۱ سال (از مهر ماه سال۹۱ تا مهر ماه سال ۹۲) جمع آوری شده اند. نمونه برداری مطابق با روش استاندارد ملی ۱۲۰۸(۱) در بطری های استریل انجام شد. بعد از انجام نمونه برداری، نمونه های آب در داخل فلاکس مخصوص حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال یافت .

جمع آوری نمونه های محیطی مطابق با روش های شماره A-۹۲۲۱ (تعیین *کلی فرم* ها به روش چند لوله ای) وD-۹۲۲۱ تعیین *کلی فرم* ها به روش (Presence-Absence (P-A انجام گرفته شده است که این روش ها دارای سه مرحله احتمالی، تائیدی و تکمیلی می باشند.

الف) مرحله احتمالی: در این مرحله کلیه نمونه های آب در روش A-۹۲۲۱، به محیط کشت لوریل سولفات براث و در روش D-۹۲۲۱، به محیط کشت PA براث تلقیح و در دمای ۰/۵ ± ۳۵درجه سانتی گراد، به مدت ۴۸-۲۴ ساعت، گرم خانه گذاری شدند. بعد از این مدت وجود گاز در لوله های دورهام و ایجاد pH اسیدی، دال بر حضور کلی فرم ها در نمونه است. در این محیط کشت منبع کربن قند لاکتوز و مهارکننده رشد باکتری های گرم مثبت سدیم لوریل سولفات براث است. بعد از تلقیح نمونه های آب به محیط کشت واجد قند لاکتوز (مرحله احتمالی)، کلیه نمونه هایی که در مرحله احتمالی مثبت بودند برای انجام آزمون های تائیدی و تکمیلی شناسایی

باکتری *اشریشیا کلی* متحمل مراحل مختلف غربال گری شدند.

ب) مرحله تائیدی (کل *کلی فرم* ها):نمونه های مثبت در مرحله احتمالی (تولید اسید ، گاز و کدورت) برای تائید حضور کل *کلی فرم* ها به فاز تائیدی انتقال داده شدند. دراین مرحله در محیط برلیانت گرین براث کشت داده و در دمای ۰/۵ ± ۳۵درجه سانتی گراد، به مدت ۴۸-۲۴ ساعت ، گرم خانه گذاری شدند. بعد از این مدت وجود گاز در لوله های دورهام و ایجاد pH اسیدی، دال بر حضور کل *کلی فرم ها* در نمونه است.

ج) مرحله تکمیلی (*کلی فرم* های گرماپای):نمونه های مثبت در مرحله احتمالی (تولید اسید، گاز و کدورت) برای تائید حضور *کلی فرم* های گرماپای به فاز تکمیلی انتقال و در محیط کشت EC براث کشت داده شدند و در دمای ۰/۲ ± ۴۴/۵ درجه سانتی گراد، به مدت ۲۴ ساعت، در حمام آب گرم گرم خانه گذاری شدند. بعد از این مدت وجود گاز در لوله های دورهام و ایجاد pH اسیدی، دال بر حضور *کلی فرم های* گرماپای درنمونه است.

در مرحله بعد، کلیه نمونه های لاکتوز مثبت (مرحله تکمیلی مثبت) بر روی محیط کشت انتخابی EMB agar (روش شماره D-۹۲۲۵) کشت داده شده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۰/۵ ± ۳۵درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. حضور کلنی های دارای جلای سبز فلزی ، بیانگر حضور *اشریشیا کلی* است.

کلیه کلنی های واجد جلای فلزی به عنوان *اشریشیا کلی* احتمالی مورد آزمون IMV*IC* قرار گرفت و در صورتی که نتایج به صورت --++ بوده اند به عنوان سویه *اشریشیا کلی* جداسازی شده و نگه داری شده اند.

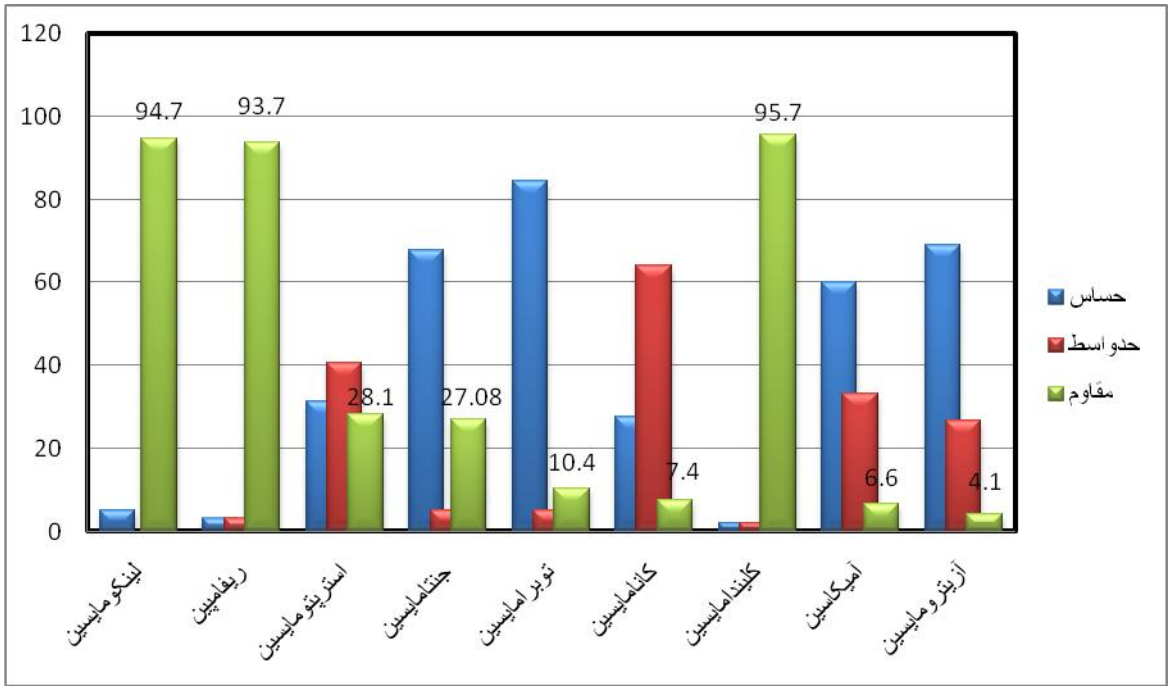
تا زمان نهایی انجام تحقیق، کلیه ایزوله ها در محیط کشت BHI واجد گلیسرول ۲۵٪ در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار در آگار (Kirby- baur) در محیط مولرهینتون آگار (Merck) مطابق دستورالعمل موسسه ی استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی Clinical and laboratory standards in (statute یا CLSI) انجام شد. دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده شامل: جنتامایسین (۱۰µg)، لینکومایسین (۱۵µg)، توبرامایسین (۲۵ µg)، استرپتومایسین (۱۰µg)، کانامایسین (۳۰µg)، ریفامپین (۳۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، کلینداماسین (۲µg)، آزیترومایسین (۱۵µg) بود.

محیط مورد استفاده در روش دیسکی، مولرهینتون بوده است که pH آن بین ۷/۴ -۷/۲ تنظیم شده بود. از محیط کشت براث کدورت نیم مک فارلند تهیه شده و آن را به محیط کشت مولر هینتون انتقال داده و به طور کامل به وسیله سواب، محیط کشت به صورت چمنی کشت داده شد. بعد از کشت، دیسک های آنتی بیوگرام که قبل از نیم ساعت از تست بیرون یخچال قرار داده شدند، انتخاب و بر روی محیط کشت انتقال داده شدند. نحوه قرار دادن دیسک ها در محیط کشت مولر هینتون، به صورت دایره ای و فاصله این دیسک ها از هم دیگر حدود ۱۲میلی متر بوده است و نیز از دیواره هم فاصله داشته اند. بعد از قرار دادن دیسک ها، در پلیت بسته و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، انکوبه شدند. بعد از دوره انکوباسیون پلیت ها زیر چراغ برسی شدند. سپس قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری شده و با توجه به جدول هم راه دیسک ها، گزارش تست آنتی بیوگرام برای هر یک از آنتی بیوتیک ها، به صورت حساس، مقاوم و یا نیمه حساس گزارش شد.

یافته ها

بیش ترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک کلینداماسین(۹۵/۷٪) و کم ترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک آزیترومایسین(۴/۱٪) بود. هم چنین بیش ترین فنوتیپ حد واسط نیز مربوط به کانامایسین (۶۴٪) و کم ترین آن مربوط به لینکومایسین (صفر) بود(نمودار۱). ۹۱٪ نمونه ها دارای مقاومت چند دارویی(Multi Drug Resistance یا MDR)بودند. تمام ایزوله ها حداقل نسبت به یکی از آمینوگلیکوزیدهای مورد آزمایش مقاوم بودند. در میان این ایزوله ها، هیچ ایزوله ای که به طور هم زمان مقاوم به۹ آمینوگلیکوزید (لینکومایسین، ریفامپین، استرپتومایسین، جنتامایسین، توبرامایسین، کانامایسین، کلینداماسین، آمیکاسین و آزیترومایسین) باشد، یافت نشد. ۸۳٪ ایزوله ها (مقاوم به۳ آمینوگلیکوزید لینکومایسین، ریفامپین و کلینداماسین) و در نهایت ۴ ایزوله فقط به یکی از آمینوگلیکوزیدهای مورد آزمایش مقاوم بودند.



نمودار ۱ :الگوی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در بین۱۰۰ ایزوله اشریشیا کلی جداشده از منابع مختلف آب استان البرز

بحث

با وجود آنکه بیماری های عفونی ایجاد شده توسط باکتری *اشریشیا کلی* و درمان آن ها در دهه های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته و در این راستا تلاش های فراوانی برای مقابله با این باکتری بیماریزا صورت گرفته است، اما ایجاد مقاومت به آمینوگلیکوزیدها از طریق مکانیسم های مختلف ، باعث شده که درمان و مقابله با این عامل بیماری زا همواره با موفقیت کافی هم راه نباشد(۱۸،۱۷). امروزه بروز و شیوع مقاومت های آنتی بیوتیکی به خصوص مقاومت در باکتری های گرم منفی از جمله *اشریشیا کلی* تا حد زیادی در سراسر جهان افزایش یافته است به طوری که از موانع اساسی برای درمان قطعی بیماری ها محسوب می شود. تاکنون مطالعات بسیار اندکی در کشور در مورد وضعیت مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های در گردش این باکتری در آب های سطحی به انجام رسیده است و لذا ما برآن شدیم به بررسی شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید در ایزوله های باکتری *اشریشیا کلی* جدا شده از منابع آب استان البرز بپردازیم.

بیش ترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک کلینداماسین(۹۵/۷٪) و کم ترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک آزیترومایسین(۴/۱٪) بود. هم چنین بیشترین فنوتیپ حد واسط نیز مربوط به کانامایسین (۶۴٪) و کمترین مربوط به لینکومایسین (صفر) بود. ۹۱٪ دارای مقاومت چند دارویی(Multi Drug Resistance یا MDR)بودند. هرکدام از ایزوله های بررسی شده، حداقل نسبت به یکی از آمینوگلیکوزیدهای مورد آزمایش مقاوم بودند.

در راستای تعیین الگوی مقاومت ایزوله های *اشریشیا کلی* به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید، مطالعات وسیعی در مناطق مختلف جهان صورت گرفته است؛ طی تحقیقاتی که توسط Cernat و هم کاران در سال ۲۰۰۲ در کشور رومانی انجام شد، مشخص گردید که ۶۵٪ از سویه های *اشریشیا کلی* جدا شده از منابع آب به تمام ۸ آنتی بیوتیک مورد بررسی مقاوم بودند که ۲تا از آن ها آمینوگلیکوزید های جنتامایسین و کانامایسین بوده است. تمامی سویه ها چند مقاومتی بوده اند یعنی به طور هم زمان به چندین دارو مورد بررسی مقاومت نشان داده اند(۱۹). علاوه بر این، مطالعه دیگری در کشور رومانی در سال ۲۰۰۲ توسط Lazăr و هم کاران وی انجام

شد، مشخص گردید که ۸٪ از باکتری های *اشریشیا کلی* جدا شده از آب های آلوده به ۷ آنتی بیوتیک مختلف از جمله آمینوگلیکوزید های جنتامایسین و کانامایسین مقاومت دارند. در ضمن تمامی نمونه ها MDR بودند(۲۰). در صورتی که در مطالعه ی ما ۹۱٪ دارای مقاومت چند دارویی (MDR) بودند.

طی مطالعه مشابه دیگری که در کشور رومانی در سال ۲۰۰۲ توسط Cernat و هم کاران وی انجام شد، مشخص گردید که همه سویه های *E. coli* جدا شده از رودخانه و آب های آلوده، شیوع بالای فنوتیپ مقاومت چند آنتی بیوتیکی را نشان می دهند. ۱۶٪ از باکتری های *اشریشیا کلی* جدا شده از آب به ۷ آنتی بیوتیک مختلف از جمله آمینوگلیکوزید های جنتامایسین و کانامایسین مقاومت داشتند. در ضمن مقاومت حد واسط برای کانامایسین بیش از ۳۰٪ مشاهده شد(۲۱). در حالی که در مطالعه حاضر مقاومت حد واسط مربوط به کانامایسین ۶۴٪ گزارش شده است.

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۲ در کشور هند توسط Sahoo و هم کارانش انجام گرفت، نمونه برداری از نمونه های آب های آشامیدنی مناطق مختلف ساحلی و غیر ساحلی Odisha هند انجام شد و پس از بررسی ها و انجام آزمون های آنتی بیوگرام (حساسیت آنتی بیوتیکی) مشخص نمودند که مقاومت حداقل به یک آنتی بیوتیک در ۹۰٪ از باکتری های *E. coli* جدا شده تشخیص داده شد و ۲۲٪ از ایزوله های *اشریشیا کلی* به آمینوگلیکوزیدها مقاومت نشان دادند(۲۲).

در مطالعه ی مشابه دیگری که در سال ۲۰۱۳ , توسط Holvoet در بلژیک صورت گرفت.از نمونه آب آبیاری، ۱۲۰گونه *اشریشیا کلی* جداسازی شد، که هیچ مقاومتی به آمیکاسین، جنتامایسین، کانامایسین مشاهده نشد(۲۳). در صورتی که در مطالعه ما ۶/۶٪، ۲۷/۰۸٪، ۷/۴٪ از ایزوله ها به ترتیب به آمیکاسین، جنتامایسین، کانامایسین مقاوم بودند.

تحقیق دیگری در جزیره Berlenga در پرتغال، توسط Moura و هم کارانش در سال ۲۰۱۱، بر روی آب های ساحلی انجام گرفت. ایزوله *اشریشیا کلی* جدا شده از نمونه های آب مورد بررسی قرار گرفتند، نتیجه حاصل از این تحقیق این گونه بود که ۸۹٪ از ایزوله ها دارای مقاومت چند آنتی بیوتیکی بودند. هم چنین ۷۹٪ از سویه ها به استرپتومایسین مقاومت نشان دادند(۲۴). در سال ۲۰۱۱، طی تحقیقاتی که توسط Amaya و هم کارانش در Leo´n در نیکاراگوئه روی ۳۴۹ باکتری *اشریشیا کلی* جدا شده از منابع مختلف محیط های آبی انجام شد، مشخص گردید که در ۱۹٪ از سویه ها مقاومت به جنتامایسین وجود دارد(۲۵). در حالی که در این مطالعه مقاومت به جنتامایسین ۲۷/۰۸٪ گزارش شده است.

نتیجه گیری

براساس بررسی های ما، این مطالعه برای اولین بار در کشور، وجود و شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید در ایزوله های *اشریشیا کلی* جدا شده از منابع آب های سطحی را گزارش می دهد. این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای سویه های *اشریشیا کلی* مقاوم به آمینوگلیکوزیدها است که در منابع آبی در گردش هستندکه می تواند بعنوان یک نگرانی اساسی از جهت انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری های *موجود در آب تلقی شود*. این یافته ها، این پیام را القا می کنند که کنترل انتشار و گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی، نیازمند استفاده محتاطانه از آنتی بیوتیک ها، نه تنها در انسان بلکه در حیوانات نیز می باشد. بنابراین این مشکل نیاز به تخصص و مدیریت دقیق و فراوانی دارد.

تشکر و قدردانی

از همه عزیزان شاغل در اداره آب و فاضلاب استان البرز به ویژه مهندس خیری که ما رادر انجام این پژوهش یاری نموده اند،کمال تشکر و قدر دانی را می نماییم.

REFERENCES

1. American Academy of Microbiology. Antimicrobial resistance: an ecological perspective. Washington: American Society for Microbiology; 1999; p. 1–14.
2. Grude N, Strand L, Mykland H,Nowrouzian FL, Nyhus J, Jenkins A, Kristiansen BE. Fluoroquinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* in Norway: Evidence of clonal spread. Clin Microbial Infect. 2008 May;14(5): p.498-500.
3. Boyd LB, Atmar RL, Randall GL, Hamill RJ, Steffen D, Zechiedrich L. Increased fluoroquinolone resistance with time in *Escherichia coli* from >17000 ptients at a large county hospital as a function of culture site,age,sex and location. BMC Infect Dis. 2008 Jan 15; p.8:4.
4. Guidelines for drinking–water quality, 3rd ed. Vol. 1. Recommendations. Geneva, World Health Organization, 2004 (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/GDWQ2004web.pdf, accessed 1 August 2009).
5. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpoor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. Uropathogenic Escherichia coli in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties.Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013 Apr 29;12:8. doi: 10.1186/1476-0711-12-8
6. Anvarinejad M, Farshad Sh, Ranjbar R, Giammanco GM, Alborzi A, Japoni A. Genotypic Analysis of E. coli Strains Isolated from Patients with Cystitis and Pyelonephritis. Iran Red Crescent Med J. 2012 Jul;14(7):408-16.
7. Farshad S, Ranjbar R, Japoni A, Hosseini M, Anvarinejad M, Mohammadzadegan R. Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic Escherichia coli strains isolated from children in Jahrom, Iran. Arch Iran Med. 2012 May;15(5):312-6.
8. Farshad, S., Anvarinejad, M., Tavana, A.M., (...), Zadegan, R.M., Alborzi, A. Molecular epidemiology of Escherichia coli strains isolated from children with community acquired urinary tract infections .African Journal of Microbiology Research; Volume 5, Issue 26, 16 November 2011, Pages 4476-4483.
9. Sutcliffe JA. Improving on nature: antibiotics that target the ribosome. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8(5): p.534-42.
10. Zembower TR, Noskin GA, Postelnick MJ, Nguyen C, Peterson LR. The utility of aminoglycoside in an era of emerging drug resistance. *Int J Antimicrob Agent* 1998; 10(2): p.95-105.
11. Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA. Aminoglycoside-resistance mechanisms in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Curr Microbiol* 2008; 56(6): p.558-62.
12. Brown NM, Reeves DS. Mechanisms and epidemiology of aminoglycoside resistance. J Med Microbiol 1992; 36: p.11-14.

13. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(3): 430-50.
14. Hooper DC. Target modification as a mechanism of antimicrobial resistance. In: Lewis K, Salyers AA, Taber HW, & Wax RG, ed. *Bacterial resistance to antimicrobials*. New York; Marcel Dekker. 2002; P.161–92.
15. Mingeot-Leclereq MP, Glupczynski Y, Tulkens P. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agent Chemother* 1999; 43(3): p.727-37.
16. Wachsmuth K. Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. Review of Infectious Diseases. 1986;8(5): p.682-92.
17. Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug resistant acinetobacter. Journal of global infectious diseases. 2010;2(3): p.291-298.
18. Mansouri S, Razavi M, Norouzi F, Najar SG. Prevalence of β-Lactamase Production and Antimicrobial Susceptibility of Multidrug Resistant Clinical Isolates of Non-Fermenting Gram Negative Bacteria From Hospitalized Patients in Kerman/Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2012; 5(2): p.405-410.Persian.
19. Cernat R, Lazăr V, Balotescu C, Cotar A, Coipan E, Cojocaru C. Distribution and diversity of conjugative plasmids among some multiple antibiotic resistant E.coli strains isolated from river waters. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol. 2002 Jul-Dec;47(3-4): p.147-53.
20. Lazăr V, Cernat R, Balotescu C, Cotar A, Coipan E, Cojocaru C. Correlation between multiple antibiotic resistance and heavy-metal tolerance among some E.coli strains isolated from polluted waters; Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol. 2002 Jul-Dec;47(3-4): p.155-60.
21. Cernat R, Lazăr V, Balotescu C, Cotar A, Coipan E, Cojocaru C. Clonal analysis of some multiple antibiotic resistant E. coli strains isolated from river and polluted waters, Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol. 2002 Jul-Dec;47(3-4): p.179-84.
22. Krushna Chandra Sahoo , Ashok J. Tamhankar, Soumyakanta Sahoo, Priyadarshi Soumyaranjan Sahu, Senia Rosales Klintz and Cecilia Stålsby Lundborg. Geographical Variation in Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Stool, Cow-Dung and Drinking Water. Int. J. Environ. Res. Public Health 2012, 9; p.746-759.
23. Kevin Holvoet, Imca Sampers, Benedicte Callens, Jeroen Dewulf, Mieke Uyttendaele. Moderate Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Lettuce, Irrigation Water and Soil; Applied and Environmental Microbiology; November 2013; 79 (21): p.6677–6683.
24. Alexandra Moura, Susana Araújo , Marta S. Alves , Isabel Henriques , Anabela Pereira and António C. M. Correia.The contribution of Escherichia coli from human and animal sources to the integron gene pool in coastal waters; August 2014; 15(419): p.1-15.
25. E. Amaya, D. Reyes, M. Paniagua, S. Calderón, M.U. Rashid, P. Colque, I. Kühn, R. Möllby, A. Weintraub and C. E. Nord. Antibiotic resistance patterns of Escherichia coli isolates from different aquatic environmental sources in Leo´ n, Nicaragua, Clinical Microbiology and Infection. September 2012; 18(9); p.347-354.