

## بررسی تأثیرات Sub-MIC سیپروفلوکساسین بر روی باکتری شیگلا دیسانتری کامیار متواضع<sup>۱</sup>، زهرا بزم زاده<sup>۲</sup>، شیما مرادی کل بلندی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال  
<sup>۲</sup> دانشجوی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

### چکیده

**سابقه و هدف:** باکتری *Shigella dysenteriae* یکی از خطرناک‌ترین و حادترین انواع اسهال را ایجاد می‌کند که می‌تواند به حالت مزمن در آمده و دوره‌های متناوبی از عود عفونت را نیز به وجود آورد. با وجود اینکه مصرف دوزهای مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها در اغلب موارد باعث سرکوب یا از بین رفتن عفونت میکروبی می‌شود، اما در مواردی نیز می‌توان با غلظت‌های کمتر از حد مجاز (Sub-MIC) این عفونت‌ها را کنترل کرد.

**روش بررسی:** در این مطالعه بنیادی نمونه استاندارد *Shigella dysenteriae* (PTCC:1188) تهیه گردید و تست‌های تأییدی بر روی آن انجام گرفت. به دنبال آن MIC آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش تهیه غلظت در لوله یا Microdilution در محیط مولر هینتون برات تعیین شد. سپس MBC آنتی‌بیوتیک در محیط مولر هینتون آگار مشخص گردید. به دنبال آن، غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین محاسبه و تهیه شد. سپس تأثیر آنها بر روی خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و بیوشیمیایی باکتری مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصله نشان داد که اگر چه غلظت‌های Sub-MIC این آنتی‌بیوتیک توانایی کشتن باکتری را ندارند، اما باعث تغییرات شکلی محرز می‌شوند؛ به طوری که در غلظت MIC 1/2 کشیدگی سلولها بیشتر بوده و این تغییر شکل در غلظت‌های MIC 1/4 و MIC 1/8 کمتر می‌شود. ضمن اینکه شکل کلنی‌ها در محیط کشت نیز، در غلظت‌های بالاتر Sub-MIC تغییر محسوس داشتند. همچنین برخی خصوصیات بیوشیمیایی باکتری تحت تأثیر قرار گرفته و تغییر کردند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌های این پژوهش، با دوزهای پایین‌تری از سیپروفلوکساسین نیز درمان عفونت‌های شیگلایی امکان‌پذیر خواهد بود.

**واژگان کلیدی:** شیگلا دیسانتری، سیپروفلوکساسین، Sub-MIC.

### مقدمه

انتروباکتریاسه‌ها گروه بزرگی از باسیل‌های گرم منفی و بدون اسپور بوده که در حالت طبیعی در روده انسان و حیوان زندگی می‌کنند. از جمله آنها می‌توان به جنس شیگلا اشاره کرد که باسیل گرم منفی باریکی بوده که در کشت جوان گاهی به صورت کوکوباسیل دیده می‌شود (۱). چهارگونه

از شیگلاها را براساس آنتی‌ژن‌های سوماتیک O سطحی والگوی تخمیری کربوهیدرات‌ها تعریف کرده‌اند که عبارتند از: شیگلا دیسانتری (*S. dysenteriae*)، شیگلا فلکسنری (*S. flexneri*)، شیگلا بویدی (*S. boydii*) و شیگلا سونئی (*S. sonnei*). این گونه اکثراً لاکتوز منفی بوده (شیگلا سونئی تخمیر کننده تاخیری لاکتوز است) و تولید اسید بدون گاز از گلوکز می‌نماید. از جمله شیگلاها می‌توان به شیگلا دیسانتری اشاره کرد که در روده بزرگ انسان تکثیر یافته و اسهال باسیلی به وجود می‌آورد. تمام شیگلایی که ویرولان هستند، دارای پلاسمید ۱۴۰-۱۲۰ مگا دالتونی بوده که برای تهاجم لازم

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال  
(email: Zahra\_bamzadeh @ yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۱/۲۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۴/۸

استفاده شد. در این روش از ۱۳ لوله استفاده شد که هر یک حاوی ۱ میلی لیتر محیط مولر هینتون برات (MHB) استریل بودند. از لوله شماره ۱ دو سری وجود داشت که از اولی به عنوان شاهد منفی استفاده شد که حاوی محیط MHB و آنتی بیوتیک بود و از آن رقت آنتی بیوتیکی تهیه نشد و لوله شماره ۱ دیگر حاوی محیط MHB و آنتی بیوتیک بود که از آن رقت تهیه شد و سپس سوسپانسیون میکروبی به آن اضافه گردید.

برای تهیه سری رقت آنتی بیوتیکی ۱ میلی لیتر از محلول Stock آنتی بیوتیکی با غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر تحت شرایط استریل به لوله شماره ۱ منتقل شد. مرحله بعد، پس از تکان دادن لوله ۱ میلی لیتر از آن برداشته شد و به لوله دوم منتقل گردید. در اثر این انتقال غلظت محلول آنتی بیوتیکی در لوله ۲ برابر با ۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر شد. این عمل تا لوله ۱۲ ادامه یافت و از لوله ۱۲، یک میلی لیتر دور ریخته شد. لازم به ذکر است که در اثر هر بار انتقال غلظت محلول آنتی بیوتیکی نصف گردید.

سپس به تمامی لوله‌ها به غیر از لوله شاهد منفی، ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورت  $10^5 \times 1/5$  cfu/ml تحت شرایط استریل اضافه گردید. پس از این مدت لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. نتایج بعد از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند.

در این پژوهش برای تعیین دقیق MIC از اسپکتروفتومتر استفاده شد. به این صورت که پس از ۲۴ ساعت جذب همه لوله‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد و لوله‌ای که جذبش برابر با جذب لوله شاهد منفی بود به عنوان MIC تعیین گردید.

برای تعیین MBC، از لوله‌های قبل و بعد از لوله MIC توسط سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر نمونه برداشته شد و بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار (MHA) کشت صورت گرفت. بعد از ۲۴ ساعت که پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند، نتایج مورد بررسی قرار گرفتند.

به دنبال تعیین غلظت‌های Sub-MIC آنتی بیوتیک یعنی  $1/2$  MIC،  $1/4$  MIC و  $1/8$  MIC، تأثیر این غلظت‌ها بر روی خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و صفات بیوشیمیایی باکتری مذکور مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین غلظت‌های Sub-MIC آنتی بیوتیک از فرمول زیر استفاده شد:

$$W = \frac{V \times C}{P}$$

که در آن C معرف غلظت نهایی محلول Sub-MIC (میکروگرم در میلی لیتر) ( $1/2$  MIC،  $1/4$  MIC و  $1/8$  MIC)، P بیانگر پتانسیل دارو (میکروگرم در میلی لیتر)، V معرف حجم مورد

می‌باشد و چنان چه این پلاسمید را از دست بدهند، به صورت غیر ویرولان می‌شوند (۲).

آنتی بیوتیک‌ها مواد شیمیایی هستند که توسط ارگانسیم‌های زنده تولید می‌شوند و در بدن علیه پاتوژن‌ها به کار می‌روند. آنتی بیوتیک‌هایی که در بدن علیه پاتوژن‌ها به کار می‌روند، معمولاً در ۴ گروه قرار می‌گیرند:

۱- آنتی بیوتیک‌هایی که مانع سنتز اسید نوکلئیک می‌شوند مانند کینولون‌ها؛ ۲- آنتی بیوتیک‌هایی که مانع سنتز پروتئین می‌شوند مانند تتراسایکلین؛ ۳- آنتی بیوتیک‌هایی که سنتز پپتیدوگلیکان را متوقف می‌کنند مانند سیکلوسرین و ۴- آنتی بیوتیک‌هایی که بر روی غشاء سیتوپلاسمی اثر می‌کنند مانند پلی میگزین‌ها.

اخیراً کینولون‌های فلورودار نظیر نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین پیشرفت‌های درمانی مهمی را حاصل نموده‌اند، زیرا این گروه دارای طیف فعالیت ضد میکروبی وسیعی بوده و تجویز خوراکی آنها در درمان طیف وسیعی از بیماری‌های عفونی موثر می‌باشد. فلوروکینولون‌ها عوارض جانبی کمی ایجاد نموده و مقاومت باکتریایی نسبت به آنها سریع تولید نمی‌شود (۳).

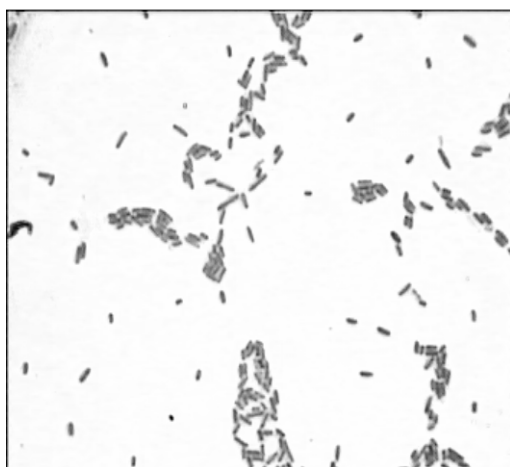
امروزه تعدادی از آنتی بیوتیک‌ها نسبت به قبل کمتر موثرند، زیرا در سویه‌هایی از میکروارگانسیم‌ها مقاومت آنتی بیوتیکی بوجود آمده است. در نتیجه برای جلوگیری از پیدایش مقاومت آنتی بیوتیکی، تأثیر آنتی بیوتیک‌ها در حد Sub-MIC بر روی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تأثیر Sub-MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین که آنتی بیوتیک انتخابی در درمان عفونت‌های شیگلایی است، بر روی باکتری شیگلا دیسانتری مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روشها

سویه مورد استفاده در این مطالعه بنیادی، *Shigella* 1188 dysenteriae PTCC بود که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، مرکز کلکسیون فارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران تهیه شد.

آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به صورت پودر از شرکت داروسازی رازک تهیه گردید. این پودر پس از تهیه در جای خنک، دور از نور و در مجاورت جاذب رطوبت سیلیکاژل نگهداری شد.

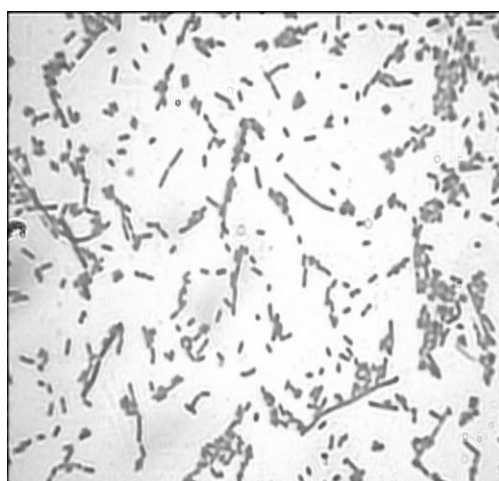
برای تعیین MIC این آنتی بیوتیک از روش تهیه رقت در لوله (Broth dilution test) یا میکروداپلوشن (Microdilution)



شاهد



1/2 MIC



1/4 MIC



1/8 MIC

شکل ۱- تغییرات میکروسکوپی شیگلا دیسانتری با غلظت های مختلف Sub-MIC سیپروفلوکساسین

جمله می‌توان به آزمون کاتالاز، اکسیداز، تخمیر قندها، حرکت، تولید  $H_2S$  و اندول، MRVP، سیترات، TSI، اوره آز، فنیل آلانین دامیناز، لیزین دکربوکسیلاز و هیدرولیز ژلاتین اشاره کرد. برای انجام هر یک از این آزمون‌ها هم محیط‌های شاهد فاقد آنتی‌بیوتیک و هم محیط‌های حاوی غلظت‌های  $1/2 MIC$ ،  $1/4 MIC$  و  $1/8 MIC$  آنتی‌بیوتیک تهیه شد و سپس تلقیح سوسپانسیون میکروبی بر روی آنها صورت گرفت و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نتایج مورد بررسی قرار گرفتند.

### یافته‌ها

بعد از ۲۴ ساعت که جذب لوله‌ها توسط اسپکتروفتومتر در ۶۲۵ نانومتر خوانده شد، جذب لوله شماره ۴ با جذب لوله شاهد منفی یکسان گردید. در نتیجه لوله شماره ۴ با رقت ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان MIC تعیین گردید.

نیاز محلول (میلی‌لیتر) و W بیانگر وزن ماده ضد میکروبی (میلی‌گرم) قابل حل در حجم V است.

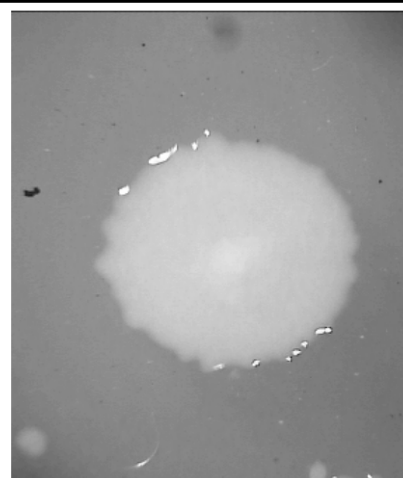
برای بررسی تأثیر این غلظت‌ها بر روی خصوصیات میکروسکوپی از کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط‌های نوترین آگار (NA) حاوی غلظت‌های  $1/2 MIC$ ،  $1/4 MIC$  و  $1/8 MIC$  و هم‌چنین از کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط شاهد فاقد آنتی‌بیوتیک لام تهیه گردید و پس از رنگ‌آمیزی تغییرات شکلی باکتری در هر یک از آنها مورد بررسی قرار گرفت.

برای بررسی تأثیر این غلظت‌ها بر روی خصوصیات ماکروسکوپی در این پژوهش از روش پورپلیت استفاده شد که در آن هم شکل کلنی‌ها و هم تعداد کلنی‌های باکتری در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف MIC و محیط شاهد فاقد آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت.

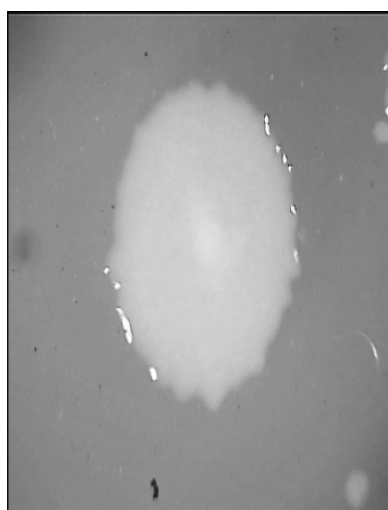
برای بررسی تأثیر این غلظت‌ها بر روی صفات بیوشیمیایی باکتری، تست‌های بیوشیمیایی مختلفی انجام شد که از آن



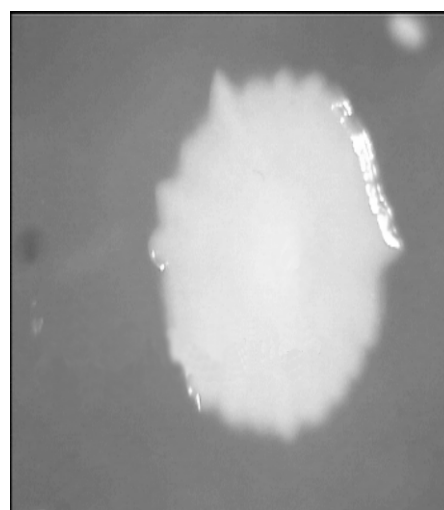
شاهد



1/2 MIC



1/4 MIC



1/8 MIC

شکل ۲- تغییرات ماکروسکوپی شیگلا دیسانتری با غلظت های مختلف سیپروفلوکساسین Sub-MIC

تغییر شکل در غلظت‌های  $1/4$  MIC و  $1/8$  MIC کمتر می‌شود (شکل ۱). این غلظت‌ها بر روی شکل ماکروسکوپی کلنی‌ها نیز تأثیر گذاشت، به این صورت که در این غلظت‌ها حاشیه کلنی‌ها به صورت نامنظم مشاهده شدند. این بی‌نظمی در غلظت‌های  $1/2$  MIC و  $1/4$  MIC به مراتب بیشتر از غلظت  $1/8$  MIC بود (شکل ۲). هم‌چنین خصوصیات بیوشیمیایی باکتری نیز تحت تأثیر قرار گرفته و تغییر کرده بود، به‌طوری که آزمون کاتالاز، MR و تخمیر ۳ قند گلوکز، مانیتول و آرابینوز در ارتباط با نمونه شاهد به صورت مثبت گزارش گردید، ولی نتیجه حاصل از این آزمون‌ها زمانی که باکتری تحت تأثیر غلظت‌های  $1/2$  MIC،  $1/4$  MIC و  $1/8$  MIC آنتی بیوتیک بود، به صورت منفی گزارش شد.

### بحث

با توجه به اهمیت بررسی اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بر متابولیسم باکتری‌ها و ساختمان آنها و

بعد از ۲۴ ساعت پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به اینکه بر روی پلیت‌های مربوط به لوله‌های ما قبل لوله MIC و لوله MIC رشد کلنی مشاهده نگردید و با توجه به اینکه بر روی پلیت‌های مربوط به لوله‌های بعد از لوله MIC رشد کلنی مشاهده شده بود، لوله شماره ۴ با رقت ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان MBC تعیین گردید.

به دنبال تعیین MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، مقدار پودر لازم برای تهیه غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک نیز محاسبه شد که برای غلظت  $1/2$  MIC معادل  $0/008$  گرم، برای غلظت  $1/4$  MIC معادل  $0/004$  گرم و برای غلظت  $1/8$  MIC معادل  $0/002$  گرم در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های  $1/2$  MIC،  $1/4$  MIC و  $1/8$  MIC آنتی بیوتیک بر روی باکتری نشان می‌دهد که اگر چه غلظت‌های Sub-MIC این آنتی‌بیوتیک توانایی کشتن باکتری را ندارند، اما باعث تغییرات شکلی محرز می‌شوند، به طوری که در غلظت  $1/2$  MIC کشیدگی سلول‌ها بیشتر بوده و این

غلظت‌های پائین آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر روی صفات بیوشیمیایی باکتری‌ها نیز اثر می‌گذارد و سبب می‌گردند که همه یا برخی از صفات بیوشیمیایی باکتری‌ها تغییر یابند (۱۴). به طوری که شدت این تغییرات در باکتری‌هایی که تحت تأثیر غلظت‌های بالاتر آنتی‌بیوتیک ( $1/2$  MIC و  $1/4$  MIC) باشند، بیشتر از زمانی است که تحت تأثیر غلظت‌های پایین‌تر قرار می‌گیرند (۱۵). مطالعات مختلف نشان داده که پدیده‌هایی همانند حرکت، کوآگولاز، الاستاز، لستیناز، DNase، سوارمینگ، اوره‌آز، لپیز، پروتئاز، کلاژناز، آگزوانزیم S و آگزوتوکسین A تحت تأثیر غلظت‌های پائین آنتی‌بیوتیک دستخوش تغییر قرار می‌گیرند. از آنجایی که اکثریت پدیده‌های ذکر شده فاکتورهای مهم ویرولاس محسوب می‌گردند، لذا نتایج بدست آمده از تأثیر غلظت‌های پائین آنتی‌بیوتیک بر این پدیده‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند (۱۶-۱۸). در پژوهش حاضر نیز برخی از خصوصیات بیوشیمیایی تغییر یافته بود که با نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی سایر مطالعات همخوانی دارد. این تغییرات بیش از همه در مورد تخمیر قندها به چشم می‌خورد.

در غلظت‌های پائین آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید در باکتری سودومونا آئروجینوزا و پروتئوس میرابیلیس، این دو باکتری تازه خود را از دست دادند و فاقد حرکت شدند (۱۹). در اثر غلظت‌های پائین اریترومایسین، آزیترومایسین، کلاریترومایسین و روکسیترومایسین بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، تولید فاکتورهای ویرولاس دستخوش تغییر قرار می‌گیرد (۲۰). غلظت‌های Sub-MIC سیپروفلوکساسین و اتوکساسین تولید کوآگولاز و پروتئین A این باکتری را کاهش می‌دهند (۲۱). در اثر غلظت‌های Sub-MIC سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم، جنتامیسین، آمپی‌سیلین و کوتریموکسازول بر روی اشرشیاکلی، مهار زیاد چسبندگی به سلول‌های اپی‌تلیال واژن در غلظت‌های  $1/2$  MIC مشاهده شده است (۲۲). در مایکوباکتریوم فرتونیتوم، غلظت  $1/2$  MIC سیپروفلوکساسین، افزایش جهش به میزان ۱۲۰-۷۲ برابر مشاهده شده است (۲۳).

در مجموع، تغییرات ایجاد شده در خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و بیوشیمیایی، نشان دهنده تأثیر *in vitro* غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بر روی باکتری شیگلا دیسانتری می‌باشد، اما برای حصول اطمینان از اثربخشی این غلظت‌ها در درمان عفونت‌های شیگلانی انجام تحقیقات *in vivo* ضروری است. در صورت همخوانی نتایج *in vitro* با *in vivo* می‌توان از غلظت‌های کمتر از تراکم بازدارنده سیپروفلوکساسین جهت درمان عفونت‌های شیگلایی

عوامل بیماری‌زایی باکتری‌ها به دنبال قرار گرفتن در معرض غلظت‌های پائین آنتی‌بیوتیک، در این پژوهش اثر Sub-MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بر روی خواص میکروسکوپی، ماکروسکوپی و صفات بیوشیمیایی باکتری شیگلا دیسانتری مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که این خصوصیات تحت تأثیر غلظت‌های پائین آنتی‌بیوتیک قرار می‌گیرند.

در پژوهشی استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی در مجاورت غلظت‌های یک دوم تا ۱ به  $1/28$  MIC آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، سفتاکسیم، سفودیژیم قرار گرفتند که تغییری در رشد باکتری‌ها مشاهده شد (۴). در اثر غلظت‌های پائین آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسین، اریترومایسین، اسپیرومایسین و میدکامایسین نیز بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت از جمله کلاستریدیدیوم‌ها و تعدادی از باکتری‌های گرم منفی از جمله کمپیلوباکتر ژوژونی، هلیکوباکتر پیلوری، لژیونلا پنوموفیلا، پاستورلا، اشرشیا کلی و سالمونلا کاهش سرعت رشد مشاهده شد (۵). آنتی‌بیوتیک‌ها همچنین در غلظت‌های پائین می‌توانند منجر به تغییرات شکلی بسیار آشکار در باکتری گردند (۶-۹). ایجاد شکل رشته‌ای، شایع‌ترین اثر Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۱۰). کارباپنم آنتی‌بیوتیکی است که غلظت‌های Sub-MIC آن، اشکال باکتری‌های گرم منفی که اکثراً باسیل یا کوکوباسیل هستند را به صورت اشکال کروی یا بیضی شکل تبدیل می‌کند (۱۱). هلیکوباکتر پیلوری نیز تحت تأثیر غلظت‌های پائین Rokitomycin دچار تغییرات مورفولوژیکی می‌گردد (۱۲). در استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی که تحت تأثیر غلظت‌های یک دوم تا ۱ به  $1/28$  MIC سفودیژیم قرار گرفتند تغییرات شکلی نیز مشاهده شد، به طوری که استافیلوکوکوس اورئوس به صورت سلول‌های بزرگ خوشه‌ای و اشرشیاکلی به صورت رشته‌ای شکل مشاهده گردید (۱۳). در پژوهش حاضر، باکتری شیگلا دیسانتری تحت اثر غلظت‌های پائین آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین دچار تغییرات مورفولوژیکی گردید، به طوری که این باکتری تحت تأثیر این غلظت‌ها شکل رشته‌ای پیدا کرد و سلول‌ها بلند و کشیده گردیدند که در این زمینه می‌توان عنوان کرد که نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج حاصل از پژوهش‌های دیگری که بر روی خصوصیات مورفولوژیکی باکتری انجام گرفته است، همخوانی دارد.

استفاده نمود و احتمال پیدایش عوارض جانبی ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را به حداقل رساند.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله، از تمامی پرسنل آزمایشگاه محمودیه که در طی انجام این تحقیق ما را یاری کردند، سپاسگزاری می‌کنم.

### REFERENCES

1. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Brooks G, Butel J, Morse S, Editors. Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology. 23<sup>rd</sup> edition. Philadelphia: McGraw Hill; 2004.
2. Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Fauci AS, Editors. Harrison's principles of internal medicine. 16<sup>th</sup> edition. Philadelphia: McGraw Hill; 2005.
3. Malekzadeh F. Antimicrobial material and functional mechanism. Tehran: Omid Publication; 2006.
4. Brage PC. Cefodizime: effects of subinhibitory concentration on adhesiveness and bacterial morphology of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: comparison with cefotaxime and ceftriaxone. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:79 – 84.
5. Shryock TR, Mortensen JE. The effects of macrolides on the expression of bacterial virulence mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:505–12.
6. Lobue AM, Rossetti B. Antimicrobial interference of a subinhibitory concentration of azithromycin on fimbriae production of *Porphyromonas gingivalis*. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:653–57.
7. Brage PC, Sasso MD. Sub-MIC concentration of cefodizime interfere with various factors affecting bacteria virulence. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:15–25.
8. Tsang KWT, Rutman A. The effects of low concentration of antibiotics on epithelial damage caused by non-typable *Haemophilus influenzae* and bacterial morphology. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:545–49.
9. Dias de Castro AC. Alterations induced by penicillin in the protein profile and cell structure of group G *Streptococcus*. *Curr Microbiol* 1994;28:269-73.
10. Lorian V, Atkinson B. Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. *Am J Clin Pathol* 1975;64:678–88.
11. Horii T, Kobayashi M. In vitro study of carbapenem-induced morphological changes and endotoxin release in clinical isolated of gram negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:435–42.
12. Brage PC, Ricci D. Detection of rokitomycin-induced morphostructural alterations in *Helicobacter pylori*. *J Chemother* 2000;46:15–22.
13. Marchese A, Salerno A. In vitro activity of rifaximin, metronidazole and vancomycin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Chemother* 2000;46:253–66.
14. Turel I. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coordination Chemistry Reviews* 2002;232:27-47.
15. Kita E, Sawaki M, Oku D, Hamouro A, Mikasa K, Konishi M, et al. Suppression of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by erythromycin. *J Antimicrob Chemother* 1991;27:273–84.
16. Hiracata Y, Kaku M, Mizukane R, Lshida K, Furuya N, Matsumoto T, et al. Potential effects of erythromycin on host defense system and virulence of *Pseudomonas*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1922-27.
17. Molinari G, Paglia P, Scito GC. Inhibitory of *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* by subinhibitory concentration of azithromycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:469-71.
18. Chopra I, Linton A. The antibiotic effects of low concentration. *Advanc Microb Physiol* 1996;28:211–56.
19. Kawamura K. Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2869–72.

20. Moneib NA, Shibl AM, Said MA, Masry EM. Macrolides induced suppression of virulence factors produced by *Staphylococcus aureus*. *J Chemother* 1993;5:289-92.
21. Doss SA, Tillostson GS, Amyes SGB. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on the virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 1993;75:123-28.
22. Vidya KC, Mallya RS, Rao PS. Inhibition of bacterial adhesion by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Indian J Med Microbiol* 2005;23:102-105.
23. Gillespie SH, Basu S, Dickens AL, O'Sullivan DM, Mehugh TD. Effect of subinhibitory concentration of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:344-48.