

بررسی تأثیرات Sub-MIC سیپروفلوکساسین بر روی باکتری شیگلا دیسانتری کامیار متواضع^۱، زهرا بزم زاده^۲، شیما مرادی کل بلندی^۲

^۱ استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

^۲ 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 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 شیگلاهایی که ویرولان هستند، دارای پلاسمید ۱۴۰-۱۲۰ مگا دالتونی بوده که برای تهاجم لازم

می‌باشد و چنانچه این پلاسמיד را از دست بدهند، به صورت غیر ویرولان می‌شوند (۲).

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

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

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 آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت به قبل کمتر موثرند، زیرا در سویه‌هایی از میکروارگانسیم‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی بوجود آمده است. در نتیجه برای جلوگیری از پیدایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها در حد Sub-MIC بر روی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تأثیر Sub-MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین که آنتی‌بیوتیک 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.

آنتی‌بیوتیک 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 آنتی‌بیوتیک از روش تهیه رقت در لوله (Broth dilution test) یا میکروداپلوشن (Microdilution)

استفاده شد. در این روش از ۱۳ لوله استفاده شد که هر یک حاوی ۱ میلی‌لیتر 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 آنتی‌بیوتیک بود و از آن رقت آنتی‌بیوتیکی تهیه نشد و لوله شماره ۱ دیگر حاوی محیط MHB و آنتی‌بیوتیک بود که از آن رقت تهیه شد و سپس سوسپانسیون میکروبی به آن اضافه گردید.

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

سپس به تمامی لوله‌ها به غیر از لوله شاهد منفی، ۰/۱ میلی‌لیتر 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 سانتی‌گراد قرار داده شدند. نتایج بعد از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند.

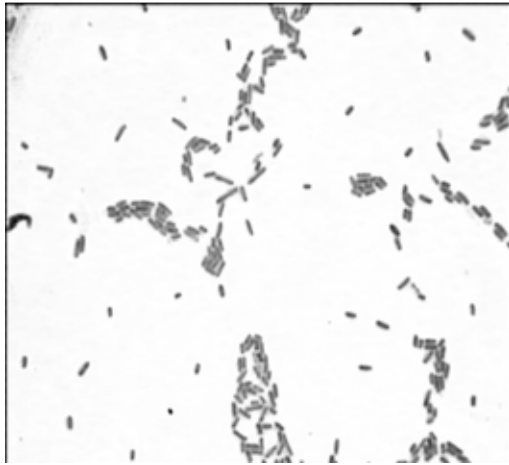
در این پژوهش برای تعیین دقیق MIC از اسپکتروفوتومتر استفاده شد. به این صورت که پس از ۲۴ ساعت جذب همه لوله‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد و لوله‌ای که جذبش برابر با جذب لوله شاهد منفی بود به عنوان MIC تعیین گردید.

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 سانتی‌گراد قرار داده شدند، نتایج مورد بررسی قرار گرفتند.

به دنبال تعیین غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک 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 آنتی‌بیوتیک از فرمول زیر استفاده شد:

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

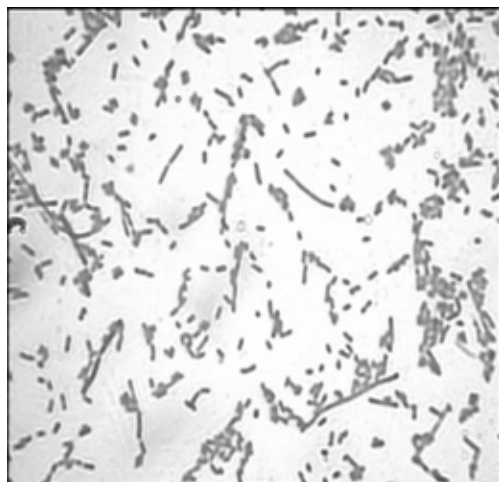
که در آن C معرف غلظت نهایی محلول Sub-MIC (میکروگرم در میلی‌لیتر) ($1/2$ MIC، $1/4$ MIC و $1/8$ MIC)، P بیانگر پتانسیل دارو (میکروگرم در میلی‌لیتر)، V معرف حجم مورد



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.

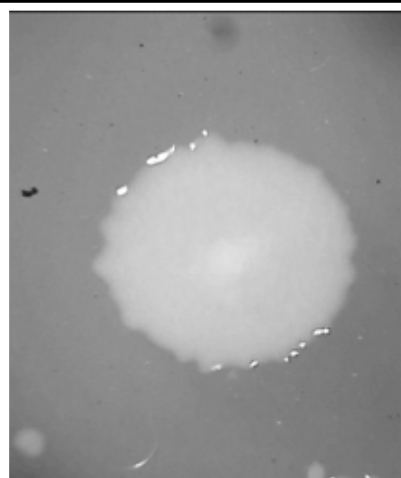
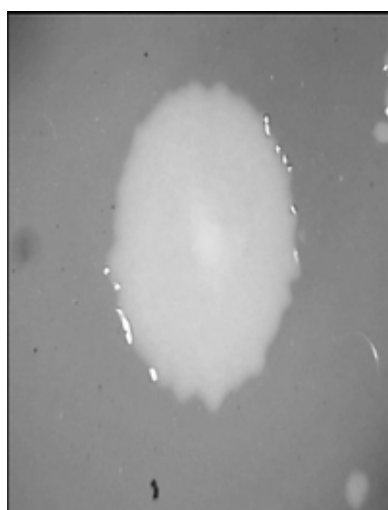
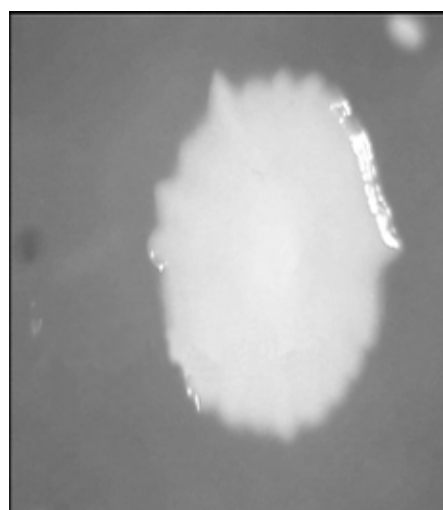
برای بررسی تأثیر این غلظت‌ها بر روی خصوصیات میکروسکوپی از کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط‌های نوترین آگار (NA) حاوی غلظت‌های $1/2 MIC$ ، $1/4 MIC$ و $1/8 MIC$ و هم‌چنین از کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط شاهد فاقد آنتی‌بیوتیک لام تهیه گردید و پس از رنگ‌آمیزی تغییرات شکلی باکتری در هر یک از آنها مورد بررسی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

 $\frac{1}{2}$ MIC $\frac{1}{4}$ MIC $\frac{1}{8}$ MIC

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

تغییر شکل در غلظت های $\frac{1}{4}$ MIC و $\frac{1}{8}$ MIC کمتر می شود (شکل ۱). این غلظت ها بر روی شکل میکروسکوپی کلی ها نیز تأثیر گذاشت، به این صورت که در این غلظت ها حاشیه کلی ها به صورت نامنظم مشاهده شدند. این بی نظمی در غلظت های $\frac{1}{2}$ MIC و $\frac{1}{4}$ MIC به مراتب بیشتر از غلظت MIC $\frac{1}{8}$ بود (شکل ۲). همچنین خصوصیات بیوشیمیایی باکتری نیز تحت تأثیر قرار گرفته و تغییر کرده بود، به طوری 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 آزمون ها زمانی که باکتری تحت تأثیر غلظت های $\frac{1}{2}$ MIC، $\frac{1}{4}$ MIC و $\frac{1}{8}$ MIC آنتی بیوتیک بود، به صورت منفی گزارش شد.

بحث

با توجه به اهمیت بررسی اثر غلظت های Sub-MIC آنتی بیوتیک ها بر متابولیسم باکتری ها و ساختمان آنها و

بعد از ۲۴ ساعت پلیت ها مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به اینکه بر روی پلیت های مربوط به لوله های ما قبل لوله MIC و لوله MIC رشد کلی مشاهده نگردید و با توجه به اینکه بر روی پلیت های مربوط به لوله های بعد از لوله MIC رشد کلی مشاهده شده بود، لوله شماره ۴ با رقت ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان MBC تعیین گردید.

به دنبال تعیین MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین، مقدار پودر لازم برای تهیه غلظت های Sub-MIC آنتی بیوتیک نیز محاسبه شد که برای غلظت $\frac{1}{2}$ MIC معادل ۰/۰۰۸ گرم، برای غلظت $\frac{1}{4}$ MIC معادل ۰/۰۰۴ گرم و برای غلظت $\frac{1}{8}$ MIC معادل ۰/۰۰۲ گرم در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از تأثیر غلظت های $\frac{1}{2}$ MIC، $\frac{1}{4}$ MIC و $\frac{1}{8}$ MIC آنتی بیوتیک بر روی باکتری نشان می دهد که اگر چه غلظت های Sub-MIC این آنتی بیوتیک توانایی کشتن باکتری را ندارند، اما باعث تغییرات شکلی محرز می شوند، به طوری که در غلظت $\frac{1}{2}$ MIC کشیدگی سلول ها 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، لیپاز، 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 ویروانس 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 ویروانس 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، سفنازیدیم، 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، سفناکسیم، سفودیزیم 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 سفودیزیم 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. 23rd 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. 16th 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 decastro 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.