مجله علوم آزمایشگاهی، دوره پنجم(شماره1) بهار و تابستان 1390

تحقیقی

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتریهای جدا شده از سنگ های کلیوی و ادرار در بیماران تحت عمل نفرولیتوتومی

زهرا شاهنده
عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل

فرحناز صدیقیان
عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل

حمید شافی
عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل

عارفه ابراهیم نژاد
کارشناس پرستاری ، بیمارستان شهید بهشتی بابل

نویسنده مسئول: فرحناز صدیقیان
تلفن : 0911-118-3149
پست الکترونیک: f.sadigh@gmail.com
آدرس : بابل، خیابان گنج افروز، دانشگاه علوم پزشکی بابل،دانشکده پیراپزشکی،گروه علوم آزمایشگاهی

وصول مقاله: 90/5/23
اصلاح نهایی: 90/9/26
پذیرش مقاله:90/10/10

چکیده

زمینه و هدف *: سنگهای عفونی، نتیجه مستقیم حضور یا عود مجدد عفونتها به وسیله باکتریهای تولیدکننده اوره آز می باشند، اما با توقف یا انسداد ادرار تشکیل آنها تشدید میگردد. تحقیق حاضر به منظور آگاهی از مقاومت آنتی بیوتیکی باکتریهای جدا شده از سنگهای کلیوی و عفونت مجاری ادراری انجام شده است.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی، طی 18 ماه ، از اول دی 1386 تا پایان خرداد 1388، سنگ های کلیوی از 45 بیمار تحت عمل نفرولیتوتومی در بیمارستان شهید بهشتی بابل جمع آوری گردید، ادرار این بیماران همزمان و همراه با اخذ رضایت نامه کتبی تهیه شد. نمونه های سنگ در شرایط استریل در سرم فیزیولوژی استریل به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل و بعد از خردن کردن بر روی محیطهای Blood agar و EMB کشت شد، نمونه های ادراری نیز در محیطهای فوق کشت شد. کشتهای مثبت از نظر کیفی بررسی و ضمن تعیین هویت، به روش کربی بائر از نظر مقاومت به آنتی بیوتیکها ارزیابی شدند.*

یافته‌ها*: در این مطالعه، 10 نمونه سنگ و 8 نمونه ادرار از نظر وجود باکتری مثبت بوده اند و در یک نمونه سنگ و دو نمونه ادرار بیش از یک باکتری ایزوله گردید. فراوانترین باکتری جدا شده در هر دو نمونه، اشریشیا کلی بود(5 مورد سنگ و 4 مورد ادرار)، در 6 بیمار نوع باکتری جدا شده از ادرار و سنگ یکی بود. در این مطالعه 2 مورد استافیلوکوکوس کوهنی و یک مورد کپرا از کشت سنگ جدا گردید. مقاومت باکتریها جدا شده از سنگ نسبت به اوفلوکساسین (80%) بیش از سایر آنتی بیوتیکها بود، اشرشیا کلی به نیتروفورانتوئین و سفتازیدیم (یک مورد)کمترین مقاومت را نشان دادند.*

نتیجه گیری *: در این مطالعه از22% سنگها ی کلیوی باکتری جدا شد که در 60% موارد مشابه باکتری جدا شده از ادرار است و به همین دلیل کشت ادرار میتواند به تشخیص آن کمک نماید. نتایج ما نشان داد که بین نوع سنگ و نوع باکتری ارتباط خاصی وجود ندارد. مطالعات وسیعتر روی تعداد بیشتری از نمونه های سنگ برای درک این ارتباط ضروری به نظر می رسد.*

واژه های کلیدی*: سنگ کلیه، آنتی بیوگرام، E.coli ، سنگ عفونی*

آدرس مقاله:
شاهنده ز، صدیقیان ف، شافی ح ابراهیم نژادع. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتریهای جدا شده از سنگ های کلیوی و ادرار در بیماران تحت عمل نفرولیتوتومی. مجله علوم آزمایشگاهی، 1390دوره پنجم(شماره1) : 50-45

مقدمه

سنگ کلیه و مجاری ادراری یکی از مشکلات شایع محسوب میشود(1). بیش از 5% از بزرگسالان در ایالات متحده به سنگهای کلیوی مبتلا بوده و شیوع آن در حال افزایش است(2).

از نظر منشآ تشکیل، سنگها به دو دسته عفونی و متابولیک تقسیم می شوند. چگونگی تشکیل سنگهای عفونی با دو مکانیسم توضیح داده شده است. طی مکانیسم اول، باکتریهای اوره آز مثبت با تجزیه اوره، آمونیاک و کربنات تولید نموده، pH ادرار را قلیایی کرده و در نهایت منجر به تشکیل این نوع سنگ می گردند. مکانیسم دیگر تشکیل سنگ با حضور باکتریهایی مثل اشریشیا کلی بوده که با تغییر فعالیت اوره کیناز و سیالیداز عمل می کنند(1). طبق مشاهدات مک کارتنی(3) و کی یف (4)، باکتریهای گرم منفی اوره آز مثبت از خانواده انتروباکتریاسه عامل مهم سنگهای عفونی می باشند. البته، اگر وجود این نوع سنگها همراه با توقف یا انسداد ادرار باشد، تشکیل آن تشدید می گردد. بنظر می رسد آمونیوم تولید شده در نتیجه تجزیه ادرار چسبندگی لایه ترانزیشنال سلولهای مثانه را نسبت به باکتریها، بطور فاحشی افزایش می دهد(1)، بطوریکه نآس طی مطالعه ای اعلام نمود، در بیش از 50% از بیماران مبتلا به سنگ در مجاری ادراری(Urolithiasis)، می توان ارگانیسم های عامل تشکیل سنگ را از کشت ادرار جدا کرد(5). در مطالعات Oka و Margel باکتریهای مشابهی بطور همزمان از سنگ و ادرار جدا شده است(6و7). طی یک بررسی 4 ساله توسط صدیقیان و همکارانش در بیمارستان شهید یحیی نژاد بابل، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری اشریشیا کلی جدا شده از نمونه ادرار، نسبت به کوتریموکسازول(55%) و کمترین مقاومت آنها نسبت به آمیکاسین(17/9%) بوده است(8). از آنجائیکه باکتری در هسته سنگ وجود دارد، دوز معمول آنتی بیوتیکهای مصرفی در عفونتهای ادراری، برای نفوذ در سنگ و از بین بردن باکتریها مناسب نمی باشد(2). از طرف دیگر ثابت گردیده است که، باکتری می تواند بعنوان عامل سنگ عفونی، در فردی که کشت ادرار منفی دارد نیز، وجود داشته باشد(1)، به طوریکه در مطالعه ماریا پان و همکارانش بر روی54 بیمار مبتلا به سنگ، کشت ادرار در11/1%، در حالیکه کشت سنگ در 35/2% از آنان مثبت بوده است(9).

با توجه به مطالب فوق و عدم انجام کشت و آنتی بیوگرام سنگهای کلیوی در آزمایشگاههای بالینی بطور روتین، عملاً دسترسی به باکتری و از بین بردن آنها در نمونه های سنگ کلیه امکان پذیر نمی باشد. همچنین انباشت بعضی از داروها مانند سیپروفلوکساسین دربدن، می تواند مجاری ادراری- کلیوی را مستعد تشکیل سنگهای متابولیکی نماید(1)، که بدلیل عدم آگاهی از نوع آنتی بیوتیک موثر، استفاده بی رویه از این داروها معمول می باشد و شانس ابتلاء فرد به تشکیل سنگ تشدید می گردد. به دلایل فوق، مطالعه ای جهت مشخص نمودن مقاومت آنتی بیوتیکی باکتریهای عامل عفونت در سنگ های کلیوی و مجاری ادراری دربیماران نفرولیتیازیس ضروری بنظر می رسید .

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی، طی 18 ماه (از اول دی 1386 تا پایان خرداد 1388)، سنگ کلیه 45 بیمار در بیمارستان شهید بهشتی بابل، که طی عمل جراحی از کلیه آنان خارج گردید، مورد بررسی قرار گرفت. سن بیماران از 16-73 سال متغیر بود و 22(49%) نفر مرد و 23(51%) نفر زن بودند. نمونه ها در سرم فیزیولوژی استریل، با رعایت شرایط استریل، بلافاصله به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پیراپزشکی ارسال گردیدند(10). همچنین ادرار هر بیمار از ناحیه سوپراپوبیک، با سرنگ استریل در اتاق عمل برداشت شده و بعد از اخذ رضایت نامه کتبی ، بلافاصله در ظرف نمونه برداری استریل به آزمایشگاه انتقال داده شد.

سپس هر سنگ را با سرم فیزیولوژی استریل 5 نوبت شستشو داده و متعاقب آن در هاون استریل کاملاً پودر و با cc 5 سرم فیزیولوژی استریل بصورت سوسپانسیونی یکنواخت آماده گردید. در شرایط استریل 0,001 میلی لیتر از سوسپانسیون سنگ و نیز نمونه ادرار بیمار با لوپ استاندارد بر روی محیط های بلاد آگار (BA) و ائوزین متیلن بلو آگار(EMB) کشت داده و در 35 درجه سیلیسیوس به مدت 24 تا 48 ساعت انکوبه گردید. بعد از گرمخانه گذاری، کشت های مثبت، جهت شناسایی نوع

باکتریها ، مورد ارزیابی قرار گرفتند(12و11و10). جهت تعیین نوع باکتری، پس از تهیه لام و رنگ آمیزی گرم، مورفولوژی باکتری تعیین شده و سپس آزمایشات برمبنای آن ادامه یافت. جهت شناسایی باسیل های گرم منفی، از محیط های افتراقی شامل KIA ، Citrate ،SIM ، MR-VP broth ، Urea test و در صورت نیاز از آنتی سرم، استفاده شد. همچنین برای کوکسی های گرم مثبت، در ابتدا از تست کاتالاز استفاده گردید و در صورت مثبت بودن تست، برای افتراق استافیلوکوک از میکروکوک از تست حساسیت به باسیتراسین و برای تعیین گونه های استافیلوکوک از تست های تخمیر مانیتول، کواگولاز، DNase، آلکالن فسفاتاز، اوره آز، نوبیوسین، اکسیداز، ONPG(β-Galactosidase) و D-تری هالوز استفاده گردید(13و11). سپس آنتی بیوگرام باکتریهای جدا شده از نمونه ها، به روش کربی بائر با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسکهای جنتامایسین(GM)، افلوکساسین(OFX)، سیپروفلوکساسین(CP)، کوتریموکسازول (SXT)، نالید یکسیک اسید(NA)، نیتروفورانتوین(FD) و سفتازیدیم(CAZ) برای گرم منفی ها و دیسکهای جنتامایسین (GM)، اوفلوکساسین(OFX)، سیپروفلوکساسین(CP)، سفتازیدیم(CAZ)،کوتریموکسازول(SXT)، پنی سیلین(P)، اگزاسیلین(OX)، وانکومایسین(VA) و سفالکسین(CN) برای گرم مثبت ها انجام گردید(14). نوع سنگها از نظر شیمیایی با استفاده از کیت آزمایشگاهی پارس آزمون آنالیز گردید.

نتایج

در کشت ادرار و سنگ 45 بیمار (90 نمونه ادرار و سنگ)، کشت سنگ10 بیمار(22/2%) و کشت ادرار8 بیمار(17/8%)، از نظر وجود باکتری، مثبت بود. در6 بیمارنوع باکتری جدا شده از سنگ و ادرار یکسان بود که در 3 مورد باکتری جدا شده اشریشیا کلی بود، یک مورد استافیلوکوکوس ارئوس، یک مورد انتروباکتر آئروژنز و یک مورد استافیلوکوکوس کپرا بوده است. در یک مورد از کشت سنگ و 2 مورد کشت ادرار بیش از یک باکتری جدا شد ، بطوریکه از بین نمونه سنگهای کشت مثبت، 7 باکتری گرم منفی (63/6٪) و 4 باکتری گرم مثبت (36/4٪) جدا شد و از موارد مثبت کشت ادرار، 6 باکتری (66/7٪)گرم منفی و 3 باکتری (33/3٪)، گرم مثبت ایزوله شد. اشریشیا کلی در 4 مورد از کشت ادرار و 5 مورد کشت سنگ ایزوله شد و شایعترین باکتری جدا شده می باشد(جدول1).

جدول1 : فراوانی باکتریهای جدا شده از کشت ادرار و سنگ بیماران تحت عمل نفرولیتوتومی در شهر بابل

نمونه مثبت / نوع باکتری	کشت ادرار		کشت سنگ		مجموع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
اشریشیا کلی	4	44/5	5	45/4	9	45
انتروباکترآئروژنز	1	11/1	1	9/1	2	10
انتروباکتر پیرینوس	0	0	1	9/1	1	5
سالمونلا تیفی	1	11/1	0	0	1	5
استافیلوکوکوس کپرا	1	11/1	2	18/2	3	15
استافیلوکوکوس کپیتس زیر گونه کپیتس	1	11/1	0	0	1	5
استافیلوکوکوس کوهنی زیر گونه اوره آلیتیکوم	0	0	1	9/1	1	5
استافیلوکوکوس ارئوس	1	11/1	1	9/1	2	10
مجموع	9	100	11	100	20	100

ترکیب شیمیایی 70% از سنگ های آنالیز شده از نوع کلسیم اگزالات و یا ترکیبی از آن با ترکیبات دیگر بود(جدول2).

جدول2: توزیع فراوانی انواع باکتریهای جدا شده از سنگهای کلیوی برحسب نوع سنگ

نوع باکتری(تعداد)	نوع سنگ		
	کلسیم اگزالات*	تریپل فسفات#	اسید اوریک$
اشریشیا کلی(5 ایزوله)	4	-	1
انتروباکتر آئروژنز(یک ایزوله)	1	-	-
انتروباکتر پیرینوس(یک ایزوله)	1	-	-
استافیلوکوکوس کپرا(دو ایزوله)	-	1	1
استافیلوکوکوس کوهنی زیر گونه اوره آلیتیکوم (یک ایزوله)	-	1	-
استافیلوکوکوس ارئوس (یک ایزوله)	1	-	-
مجموع	7	2	2

* این سنگها یا منحصرا از کلسیم اگزالات تشکیل شده یا از این ترکیب به همراه کلسیم هیدروژن فسفات، #این سنگها یا منحصرا از تریپل فسفات یا همراه منیزیم آمونیوم فسفات بودند، $ در این سنگها اسید اوریک به عنوان ترکیب اصلی وجود داشت ولی کلسیم اگزالات(یک مورد) یا کلسیم هیدروژن فسفات (یک مورد) همراه آن در سنگ دیده شد

در باکتریهای گرم منفی، کمترین مقاومت در نمونه های سنگ و ادرار به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیکهای سفتازیدیم و جنتامایسین بوده و بیشترین مقاومت در هر دو نمونه نسبت به نالیدیکسیک اسید و اوفلوکساسین می باشد(جدول3).

جدول3: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی باکتریهای گرم منفی جدا شده از سنگ کلیه و ادرار

نوع آنتی بیوتیک / نوع نمونه	جنتامیسین	اوفلوکساسین	سیپروفلوکساسین	کوتریموکسازول	سفتازیدیم	نیتروفورانتوئین	نالیدیکسیک اسید
سنگ	28/6	57/2	42/8	42/8	14/3	42/8	57/2
ادرار	33/3	66/7	66/7	50	66/7	50	66/7

در اشریشیا کلی که شایعترین باکتری جدا شده از نمونه ها بوده است، کمترین مقاومت در نمونه سنگ نسبت به سفتازیدیم (یک مورد از 5 مورد) و در ادرار نسبت به نیتروفورانتوئین(یک مورد از چهار مورد) و بیشترین مقاومت در نمونه سنگ، نسبت به اوفلوکساسین (4 مورد از 5 مورد)مشاهده گردید.

استافیلوکوک های جدا شده از سنگ نسبت به آنتی بیوتیکهای CP, GM, CN, VA و انواع جدا شده از ادرار نسبت به آنتی بیوتیکهای OFX, SXT, GM, CN، 100% حساس بوده، اما درهر دو نمونه این باکتریها نسبت به آنتی بیوتیکهای P, CAZ 100% مقاوم بوده اند.

بحث

طی این مطالعه مشاهده گردید که از نمونه های سنگ بیش از ادرار، باکتری جدا شده است. به طوریکه درصد مثبت شدن سنگ و ادرار به ترتیب 22/5% و 17/8% بود، که با تحقیق MA و همکارانش در پکن که این نسبت بصورت 48/8% در مقابل 30/3% (15) و Margel D که 56% و 30/7% (7)بودند، قابل مقایسه می باشد.

همچنین در ادرار و سنگ 8(17/7%) بیمار، باکتری مشابه و در 2(4/4%) بیمار نیز با وجود استریل بودن ادرار، از نمونه سنگ، باکتری جدا شد. در مطالعه Margel D نیز در 17(24%) بیمار باکتری مشابه و 19(25%) بیمار نیز ادرار استریل و سنگ عفونی داشته اند(7).

از نکات برجسته در این تحقیق، پراکندگی و تعدد گونه های باکتریایی جدا شده از سنگ و ادرار است، به طوریکه، 20 باکتری جدا شده از سنگ و ادرار شامل 8 گونه باکتریایی جداگانه بوده که 3 گونه از آن شامل باکتریهای گرم مثبت نادری مانند استافیلوکوکهای کپرا، کوهنی و کپیتیس می باشند. اما باکتریهای گرم منفی بعنوان عوامل غالب در ایجاد عفونت در سنگ و ادرار بوده اند، که Ma K نیز در مشاهدات خود به همین نتیجه رسیده است(15).

در مطالعه حاضر بالاترین مقاومت باکتریهای گرم منفی جدا شده از سنگ نسبت به آنتی بیوتیکهای افلوکساسین و نالیدیکسیک اسید هرکدام 57/2% و در نمونه ادرار نسبت به همین دو آنتی بیوتیک هر کدام 66/7% بوده است. مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری غالب جدا شده از نمونه ها (E.coli) در ادرار نسبت به آنتی بیوتیکهای جنتامایسین، افلوکساسین، سیپروفلوکساسین، کوتریموکسازول، سفتازیدیم و نالیدیکسیک اسید هر کدام 50% بوده و بالاترین مقاومت را در سنگ نسبت به افلوکساسین(80%) داشته است. در مطالعات Mukhia(16) در نمونه ادرار و Ma K (15) در نمونه سنگ نیز فراوانترین باکتری بدست آمده، E.coli با فراوانی 62/5% و 30/9% به ترتیب بوده که طی مشاهدات Mukhia این باکتری بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی بیوتیکهای آمیکاسین، سفالوتین، نورفلوکساسین و نیتروفورانتوئین هر کدام 60% داشته است(16).

همچنین در تحقیق حاضر، فراوانترین باکتری گرم مثبت جدا شده از سنگ و ادرار استافیلوکوکوس کپرا بوده که نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، اگزاسیلین و پنی سیلین 100% مقاوم بوده است. در مطالعه Ma K فراوانترین باکتری بدست آمده از سنگ، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس(7/4%) بوده که بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به آمپی سیلین سولباکتام (88/7%) داشته است(15).

لازم به ذکر است که طی مشاهدات حاضر، در کل حساسیت آنتی بیوتیکی باکتریهای گرم منفی جدا شده از سنگ در مقایسه با ادرار، بیشتر بوده است. همچنین قابل توجه است که استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از نمونه سنگ و ادرار یک بیمار، مقاومت آنتی بیوتیکی متفاوتی در هر کدام از نمونه ها نشان داده است.

مشاهده تفاوت در مقاومت آنتی بیوتیکی بین نمونه های سنگ و ادرار در گروههای مختلف باکتریایی(گرم مثبت و گرم منفی) در تحقیق حاضر و مطالعات دیگری مانند تحقیق Naas (5)، می تواند بدلایل زیر باشد:

1- استفاده از آنتی بیوتیکهای رایج در درمان عفونتهای ادراری و به تبع آن سنگهای عفونی، بدون آگاهی از درصد مقاومت باکتریهای جدا شده از سنگ.

2- قدرت نفوذ آنتی بیوتیکها به داخل سنگ که در مطالعه Yoshida O با توجه به جنس سنگ متفاوت بود(17).

3- تفاوت در محل رشد باکتریها در سنگ(سطح یا هسته).

به همین دلایل، با آگاهی از نوع باکتری و آنتی بیوگرام ادرار بیماران، نمی توان آنتی بیوتیک موثر در درمان سنگهای عفونی را پیش بینی نمود. و پیشنهاد می گردد برای کنترل این بیماری، علاوه بر آنالیز شیمیایی، کشت و آنتی بیوگرام سنگ نیز به همراه ادرار به طور روتین و یا حداقل برای بیمارانی که مبتلا به عود مجدد سنگ می باشند، انجام گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از محل بودجه طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی بابل با شماره 0231185 اجرا شده است.

References

1- Margaret S, Pearl MD, Yair L in: Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, Wein AJ, Campbell,s urology: Urinary Lithiasis: Ethiology, Epidemiology and Pathogenesis. 9thEd. Philadelphia: Saunders; 2007; pp: 1363, 1386, 1387.

2- Worcester E, Coe F. *Nephrolithiasis*. Primary Care: Clinics in Office Practice. Chicago. 2008; 35(2): 369-391.

3- MacCartney AC, Clark J, Lewi HJ. *Bacteriological study of renal calculi*. European journal of clinical microbiology. 1985; 4(6):553-5.

4- Keef WE, Smith MJ. *Intracellular crystalline deposits by bacteria grown in urine from a stone former*. Invest Urol. 1977; 14(5):344-6.

5- Naas T, Al-Agili S, Bashir O. *Urinary calculi: bacteriological and chemical association*. East Mediterr Health J. 2001; 7(4-5):763-70.

6- Oka T, Hara T, Miyake O, Hosomi M, Matsumiya K, Takaha M, et al. *A study on bacteria within stones in urolithiasis*. Hinyokika kiyo. 1989; 35(9): 1469-74.

7- Margel D, Ehrlich Y, Brown N, Lask D, Livne PM, Lishitz DA. *Clinical implication of routine stone culture inpercutaneus nephrolithotomy—a prospective study*. Urology. 2006; 67(1):26-9.

8- Sedighian F, Shahandeh Z, Alaouddoulee H, Rekabpoor KH. *The study on antibiotic resistance to E.coli and Enterobacter in urinary tract infection at Yahyanejad hospital , Babol, 2002-2005(4 years)*. Journal in Medical & laboratory Sciences. 2008; 6(32-33):
60-62.

9- Mariappan P, Smith G, Bariol SV, Tolley DA. *Stone and pelvic urine culture and sensitivity are better than bladder urine as predictors of urosepsis following percutaneous nephrolithotomy: a prospective clinical study*. J Urol. 2005; 173(5):1610-4.

10- Hemmatiy SH, Alle Yasin M. *Diagnostoc Microbiology, 1st Edition*. Tehran: Boshra; 2001:137,138,146.

11- Forbes BA, Daniel FS, Weissfeld AS. *Baily and scott,s diagnostic microbiology*. 12th Edition. Missouri: Mosby Elsevier; 2007: 848, 850-854, 260, 261, 528, 531.

12- Shahande Z, Sadighian F, Shafi H, Ebrahimnejd A, Rameji A. *The survey of bacteriological kidney stones from the patients under going nephrolithomy*. Physician & Laboratory journal. 2011; 10(47): 32-6.

13- Allen S, Janda W, Koneman E,Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Koneman,s color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6th Edition. Washington: Lippincott; 2006:213-277,627,628.

14-. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th infomational supplement. Clinical and laboratory standards institute (CLSI).2006.document M100-S16. Wayne, PA.

15- Ma K, Xu QQ, Huang XB, Wang XF, Li JX, Xiong LL, et al. *Analysis and clinical implication of upper urinary tract stone,s bacterial specterum*. Zhonghua Wai Ke Za Zhi. 2010 15; 48(4):293-5.

16- Mukhia R, Shrestha K, Dahal P, Sharma V K. *Study on chemical composition of urinary stones and its association with urinary tract infection.* Department of Surgery, National Academy of Medical Sciences, Bir Hospital. 2003.

17- Yoshida O, Kiriyama T, Okada K, Okada Y, Watanabe H, Mishina T, et al. *A bacteriological study on urinary calculi associated with infections*. Hinyokika Kiyo,1984; 30(2):191-8.