دراسة نسق المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية في عزلات بكتريا *E.coli* المعزولة من المرضى و مياه المجاري والكشف عن الجين bla_{IMP-1} بأستخدام تقنية PCR

م. د. محمد فرج المرجاني

م. م. حيدر جاسم الخفاجي

م. م. حيدر يوسف أحمد

الجامعة المستنصرية– كلية العلوم

الخلاصة:

درس نسق المقاومه المتعدده للمضادات الحيويه شائعه الاستعمال لعزلات بكتريا *E. coli* المعزوله خلال 4 اشهر من مستشفى مدينه الطب /بغداد , وقورن مع نسق المقاومه لعزلات بكتريا *E. coli* المعزوله من مياه المجاري لنفس المستشفى وللفتره الزمنيه نفسها.

أظهرت النتائج أن نسق المقاومه CX – CRO-CE –AMC- TR هو السائد في العزلات المرضيه وكان النسق CX- CRO- CE- AMC هو السائد في عزلات مياه المجاري للمستشفى.

أختبرت قابليه العزلات المقاومه لمضادات السيفوتكسيم والسفتازديم والامبنيم على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المعدنيه Metallo ß -lactamases (MßIs) ,وقد أظهرت عشر عزلات مرضيه وخمس عزلات من مياه المجاري قابليتها على انتاج هذه الانزيمات ،وقد أنتخبت هذه العزلات للكشف عن الجين bla_{IMP-1} المشفر لانزيمات MßIs بأستعمال تقنيه التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR) واعتماد البادئ :

(F) 5- ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC – 3

(R) 5-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC _ 3

وبعد ترحيل الناتج على هلام الأكاروز بتركيز 1.2 % لوحظ ظهور حزمة ناتجة عن عملية التضاعف في عزلتين ، في أشارة الى أرتباط البادئ مع التسلسل المكمل له في دنا القالب.

أجريت تجارب ألأقتران البكتيري بين العزلات المرضيه المنتجه لأنزيمات MßIs وعزلات مياه المجاري لاختبار أنتقال صفه هذه الانزيمات بالأقتران البكتيري ، وقد اظهرت النتائج عدم انتقال هذه الصفه الى الخلايا الاقترانيه.

Study of Multiple resistance Pattern to antibiotic of clinical and Swege *E. coli* isolates and detection of bla_{IMP-1} gene by using PCR.

Mohammed F. AL- Marjani[1] ;Haider J. Al-Khafaji [2] and Haider Y. Ahmed[3]
1) Lecturer 2,3) Asst. Lecturer
Department of Biology – College of Science - AL- Mustansiriya University, Baghdad- Iraq

Abstract:

During a 4 months period a dominated pattern of multiple resistance to antibiotic of clinical *E. coli* isolates which isolated from Central Medicine City hospital / Baghdad ,were analyzed and compared with the multiple resistance pattern of sweges isolates .the results revealed that the multiple resistance pattern of clinical isolates was : CX - CRO – CE- AMC - TR and the pattern of sweages was : CX – CRO- CE- AMC.

The isolates which resistant to Cefotaxime , Ceftazidime and Imipenem were selected to detect the ability to Metallo ß -lactamases production (MßLs) .Ten clinical isolates and five swege isolates were able to produce MßLs ,and these isolates were tested to bla_{IMP-1} by using polymerase chain reaction(PCR) and using Primer :

(F) 5- ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC – 3

(R) 5-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC _ 3

Two isolate appeared to carry bla_{IMP-1} gene after electrophoresis of the results on 1.2% agarose.

The results of Bacterial Conjugation experiment between Clinical and Swege isolates showed that the Metallo β-Lactamases were unable to transferred in this process.

المقدمة:

تعد مقاومه البكتريا للمضادات الحيويه من المشاكل الشائعه عالميا من الناحيتين الصحيه و الاقتصاديه نتيجه الاستعمال الواسع للمضادات الحيويه في علاج الامراض البكتيريه(1و2) . هنالك اربع ميكانيكيات أساسيه لمقاومه المضادات الحيويه ، تقع جميعها تحت سيطره جينات معينه وتتضمن:أمتلاك حاجز للنفاذيه وتغير موقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد وامتلاك مضخات الدفق (efflux pump) وأنتاج الأنزيمات المثبطه للمضادات مثل أنزيمات البيتالاكتاميز التي يعد أنتاجها بحد ذاته مشكله كبيره في علاج الاصابات المتسببه بالبكتريا التي لها القابليه على انتاج هذه الأنزيمات (3).

أزدادت خطوره أنزيمات البيتالاكتاميز بعد حصول طفرات وراثيه في الجينات التركيبيه المشفره لأنزيمات البيتالاكتاميز الاساسيه من عائله TEM وSHV ، مما ادى الى ظهور أصناف جديده وأكثر خطوره من هذه الانزيمات مثل انزيمات البيتالاكتاميز واسعه الطيف Extended –Spectrum ß -Lactamases (ESßLs) وأنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo ß -lactamases (MßLs) التي لها القابليه على تحطيم مضادات البيتالاكتام واسعة الطيف مثل Imipenem و Meropenem أضافه الى المضادات الاخرى (4 و 5).

هناك اربع انواع من أنزيمات MßLs هي : SPM,VIM,IMP,GIM ، وقد جرى دراسة انزيم IMP لاول مرة في اليابان سنة 1990 ، وهو يعد واسع الانتشار بين البكتريا السالبة لصبغة كرام (6)، و يمكن الكشف عن الجين bla_{IMP-1} المشفر لأنزيم IMP1 باستعمال تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) وهو فحص سريع ودقيق(7).

تكتسب البكتريا جينات مقاومة المضادات الحيويه عن طريق عناصر متحركة مثل البلازميدات والجينات القافزه (Transposons) والانتكرون (Integron) (8) ، ويعد الاقتران البكتيري من اكثر الطرق شيوعا لانتقال بلازميدات المقاومه والضراوه وبصورة سريعه في المجموعات البكتيريه(9) ، وهو يحصل بتكرارعال بين نفس البكتريا من نفس النوع او الانواع القريبه مقارنه مع الانواع الاخرى الابعد وراثيا ، وهو يحصل بين الخلايا المانحه والمستلمه من مختلف العوائل ويحصل بين البكتريا في مياه البحار أو المياه العذبه وفي التربه وفي المضائف مثل الانسان والحيوان، وقد اشار Rasool وجماعته (10) الى ان بكتريا *E.coli* تكتسب البلازميدات من بكتريا اخرى متواجده معها في الامعاء ، وقد عزلت بكتريا *E.coli*

المقاومة للمضادات الحياتية من فضلات الانسان والحيوان ومياه الانهـر والبحيـرات ومياه الشرب (11).

أزداد الأهتمام بدراسة نسق المقاومة المتعدده للمضادات الحيويـه فـي سـلالات بكتريـا *E.coli* المعزوله من الانسان والحيوان وألاعلاف (12)، ويمكن ان يستعمل نسـق المقاومـه المتعدده في تمييز وتوصيف سلالات *E. coli* من مصادر مختلفه ، وهي طريقه سهله وملائمه عند الدراسات الوبائية ، وتعتمد حاليا لتمييز مصدر التلوث البرازي للمياه (13،14، 15) .

تهدف دراستنا الحاليه الى دراسة نسق المقاومه المتعددة للمضادات الحيوية لعزلات بكتريا *E.coli* المعزولة من المستشفى و من مياه المجاري لـنفس المستشـفى ، ودراسـه انتاجهـا لانزيمات MßLs التي أكتسبت اهميه كبيرة في البحوث الحديثة في مختلف دول العالم ، لكنها لم تحظى بدراسات وافيه في مستشفياتنا المحليه. وقد ركزت دراستنا على أنزيمـات MßLs والكشف عن الجين bla_{IMP-1} المشفر لواحد من اهم هذه الانزيمات وهو IMP1 بأسـتخدام تقنيه PCR .

طرائق العمل :

1- العزلات البكتيريه:-

عزلت بكتريا *E.coli* من أصابات مختلفه من مرضى مراجعين لمدينه الطب للفتره مـن 10/1 /2007 لغايه 2008/2/1 ، فيما استحصلت عزلات مياه المجاري خلال الفتره الزمنيـه نفسها ومن المياه الثقيله للمستشفى نفسه ، اذ اخذت عينات المياه بوساطه قناني معقمـة سـعة 100 مليليتر، و زرعت على الاوساط الزرعيه المناسبه وشخصت بكتريا *E.coli* اعتمادا على الفحوصات المظهريه والبايوكيميائية بأستعمال عدة التشخيص Api 20E وحسب ما ورد فـي (16).

2-فحص الحساسية للمضادات الحيوية:-

أختبرت حساسية العزلات المرضيه وعزلات مياه المجـاري للمضـادات الحياتيـة الأتيـة بأستعمال طريقة الاقراص على وسط مولر هنتون الصلب:

Trimethoprime (Tr , 5 ℳg /disc) , Cloxacillin (Cx , 30 ℳg / disc)
Nalidix acid (NA , 30 ℳg /disc) , Augmentin (AMC , 30 ℳg / disc)
Cefotaxime (Ce , 30 ℳg / disc) , Cefazidime (CAZ , 30 ℳg / disc)
Gentamicin (G , 10 ℳg /disc) , Imipenem (IMP , 10 ℳg / disc)

Ciprofloxacin (Cf , 5 ℳg / disc)

3- الكشف عن انتاج انزيمات البيتا لاكتاميز المعدنيه:-

أجري هذا الفحص للعزلات المقاومة لمضادات السيفوتاكسيم والسفتازديم والامبنيم حسب طريقة (17) ،أذ حضر عالق بكتيري (10^6 خلية/مل) لكل عزلة قيد الاختبار، ثم زرع على وسط مولرهنتون الصلب ونشر بالناشر ، بعدها وضع قرصين لمضاد الامبنيم (10مايكروغرام/قرص) على سطح الاكار .وبعد تحضير 0.5 مولر EDTA ، نقل (10) مايكروليتر من محلول EDTA لأحد القرصين المذكورين أعلاه (قرصي مضاد الأمبنيم) ، وبعد الحضن بـ 37 °م لمدة 18 ساعة، أجريت مقارنة لمناطق التثبيط حول قرص الامبنيم لوحده و الامبنيم مع EDTA.

4- دراسه المحتوى البلازميدي :

درس المحتوى البلازميدي للعزلات المنتجه لانزيمات البيتالاكتاميز المعدنيه حسب طريقه (18).

5- أستعمال التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا(PCR) للكشف عن الجين bla_{IMP-1} : -

أختيرت العزلات التي أظهرت مقاومة لمضادات الامبينم والسيفوتاكسيم والسفتازديم والتي أتصفت بقابليتها على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية لغرض الكشف عن وجود الجين bla_{IMP-1} باستعمال تفاعل PCR وحسب طريقة (19) باستعمال البوادئ :

(F) 5- ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC – 3

(R) 5-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC _ 3

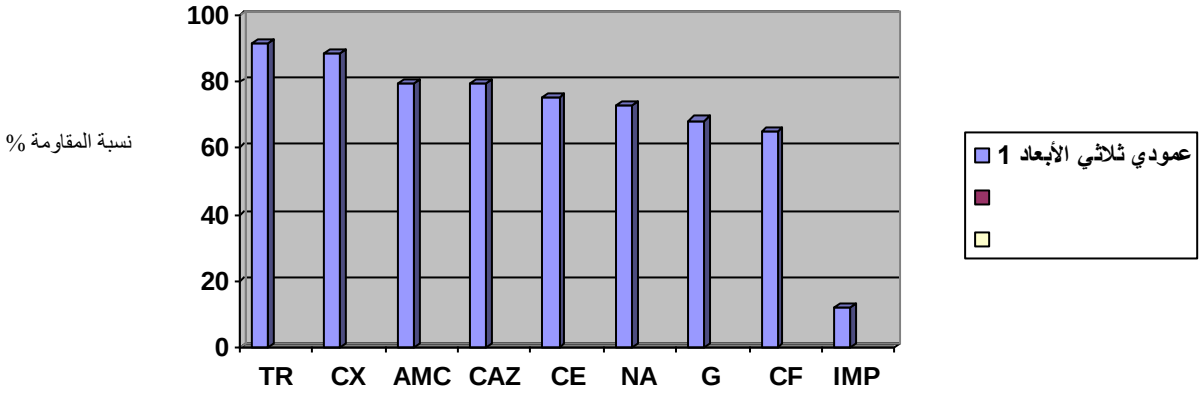
6- الأقتران البكتيري :

لدراسه أنتقال المحددات الوراثيه المسؤولة عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المعدنيه، أجريت تجربه الأقتران البكتيري بين العزلات المرضيه المنتجه لهذه الانزيمات كعزلات واهبه مع العزلات من مياه المجاري غير المنتجه لهذه الانزيمات كعزلات مستلمه ،وحسب طريقه (20).

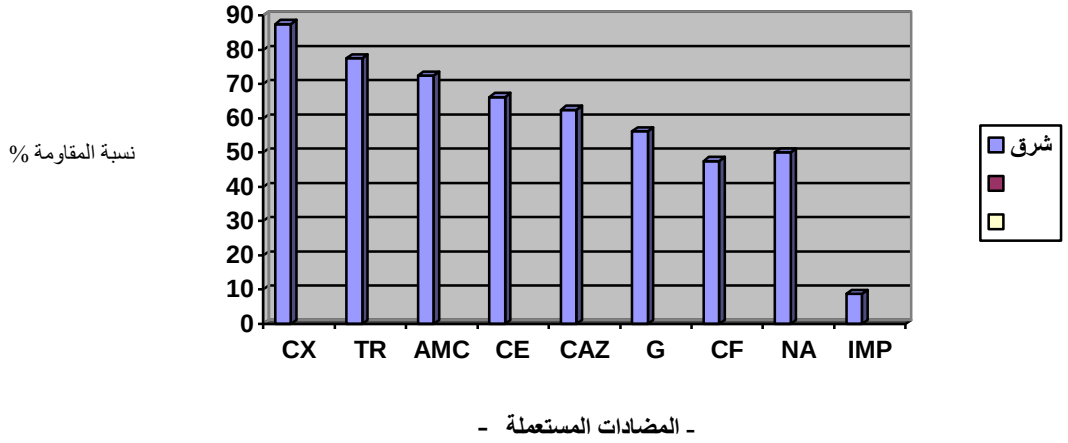
النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج دراستنا الحاليه ان هنالك تباينا في مقاومه عزلات بكتريا *E.coli* تجاه المضادات المستعمله ،أذ كانت المقاومه عاليه بين العزلات المرضيه وعزلات مياه المجاري لمضادات الترايميثبريم والكلوكساسلين، حيث بلغت نسبه المقاومه 91.6% و 88.3% على

التوالي بالنسبه للعزلات المرضيه و 77.5% و 87.5% على التوالي بالنسبه لعـزلات ميـاه المجاري (شكل رقم 1 و شكل رقم 2) ، فيما بلغت نسبه المقاومـه لمضـادات السـفتازديم و السيفوتاكسيم 79.1% و 75% على التوالي بالنسبه للعزلات المرضيه و 62.5% و 66.2% بالنسبه لعزلات مياه المجاري ، وكانت أقل نسبه مقاومه هي لمضاد الامبينيم وبلغـت 12.5% في العزلات المرضيه و 8.7% في عزلات مياه المجاري.



شكل (1) المقاومة للمضادات الحيوية بين عزلات بكتريا *E coli* المعزولة من الحالات المرضية .



شكل (2) المقاومة للمضادات الحيوية بين عزلات بكتريا *E coli* المعزولة من المياه الثقيلة .

Trimethoprime (Tr , 5 Mg /disc) , Cloxacillin (Cx , 30 Mg / disc) , Augmentin (AMC , 30 Mg / disc) Nalidix acid (NA , 30 Mg /disc) , Ciprofloxacin (Cf , 5 Mg / disc) , Imipenem (IMP , 10 Mg / disc) Cefotaxime (Ce , 30 Mg / disc) , Cefazidime (CAZ , 30 Mg / disc) Gentamicin (G , 10 Mg /disc)

لاحظ (21) ان عزلات بكتريا *E.coli* المعزوله من المياه تمتلك مقاومه عاليه للميثوبريم بلغت 74% ، و وجد (22) ان *E.coli* تنتج انزيم بيتالاكتاميز (AmpC) تقوم بتحليل مضادات السيفالوسبورينات واسعة الطيف مثل السفتازديم . ولاحظ (23) أزدياد في مقاومه بكتريا *E.coli* للمضادات الحيويه خلال السنوات ال 20 الماضيه وقد قاموا بدراسه 238 عزله من الانسان فوجدوا المقاومه عاليه خاصه لمضادات الامينوكلايكوسايد و التتراسايكلين ووجدوا ان اغلب هذه العزلات تحمل مقاومة متعدده للمضادات الميكروبيه.

في دراستنا الحاليه كانت جميع العزلات تحمل مقاومة متعدده للمضادات الحياتيه وهذا يتفق مع (12) الذين وجدوا أن بكتريا *E.coli* المعزوله من الأنسان والحيوان والبيئه تحمل مقاومه متعدده للمضادات الحياتيه خاصه للتراسايكلين و السيفالويثن و الستربتومايسين مما دعاهم للاستنتاج ان هذه المقاومه ناتجه عن تلوث المياه السطحيه بالمكروبات التي تحمل مقاومه متعدده للمضادات الحياتيه ، واكد(24) انه يمكن أعتماد الاختلاف في نسق (profile) المقاومه للمضادات الحيويه لتمييز مصادر التلوث البرازي للمياه ،وهذا يتماشى والدراسة الحالية.

كان نسق المقاومه السائد في عزلاتنا المحليه هو من النوع الخماسي (pentatype) وكان كالتالي: CX-CRO-CE-AMC-TR في بكتريا *E.coli* المعزوله من الحالات المرضيه وهو مشابه بشكل كبير لنسق المقاومه السائد في عزلات مياه المجاري وهو CX-CRO-CE-AMC وربما يفسر ذلك وجود علاقه وراثيه بين هذه العزلات تحدد نسق المقاومه السائد.

من جانب اخر أظهرت نتائج هذه الدراسه ان الأمبنيم هو افضل المضادات من حيث التأثير على عزلات *E.coli* أذ كانت نسبه المقاومه (12.5%) بين العزلات المرضيه و (8.7%) بين عزلات مياه المجاري ، ورغم ذلك فأن هذه النسبه تعد عاليه لكون هذا المضاد من المضادات الفعاله وإن ظهور سلالات مقاومه له يشير الى أمكانيه تطور سلالات صعبه العلاج بهذه الانواع من المضادات ،وهذا يتوافق مع (25) الذي أكد على انه في السنوات الأخيره اصبحت الأوبئه المرتبطه بالبكتريا المعويه المقاومه للامبنيم والمنتجه لأنزيمات البيتالاكتاميز من المشاكل المهمه .

كذلك أظهرت النتائج قابليه عشر عزلات مرضيه وخمس عزلات من مياه المجاري على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المعدنيه (MßLs) باستعمال مادة EDTA (بتركيز 750 مايكروغرام) كعوامل مخلبيه (chelating agents) مثبطه للانزيم، واشار (17) الى ان

استخدام EDTA كماده مثبطه لانزيمات MβLs تعطي نتائج جيده للكشف عن قابلية العزلات على انتاج هذه الانزيمات علما ان هناك مركبات اخرى يمكن استعمالها في هذا المجال مثل Thiol ومن ضمنها 2-mercaptopropionic acid تستخدم للكشف عن MβLs .

أنتخبت هذه العزلات للكشف عن الجين bla_{IMP-1} المشفر لانزيمات MßIs بأستعمال تقنيه التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) واعتماد البادئ :

(F) 5- ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC – 3

(R) 5-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC _ 3

وبعد ترحيل الناتج على هلام الأكاروز بتركيز 1.2 % لوحظ ظهور حزمة ناتجة عن عملية التضاعف في عزلتين في أشارة الى أرتباط البادئ مع التسلسل المكمل له في دنا القالب.

أجريت تجارب الأقتران البكتيري لأختبار أمكانية أنتقال المحددات الوراثيه المسؤوله عن أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنبه بين العزلات المرضيه وعزلات مياه المجاري . أظهرت النتائج أنتقال صفه المقاومه المتعدده للمضادات الحيويه (لمضادات السيفوتاكسيم و الجنتامايسين والترايميثبريم) ولكن لم نلاحظ أنتقال صفة أنتاج انزيمات البيتالاكتاميز المعدنيه الى الخلايا الأقترانيه مما قد يشير الى كون المحددات الوراثيه المسؤوله عن أنتاجها محموله على الكروموسوم .في حين تمكن (26) من نقل صفة مقاومة مضادات السيفوتاكسيم و السفتازديم من بكتريا *Serratia marcescens* المعزوله من حالات مرضيه عند الأنسان الى بكتريا *E.coli* بالأقتران . واكد (9) الى ان أنتقال البلازميدات يحدث من خليه الى اخرى بالأقتران بين الانواع والأجناس البكتيريه سواء في البيئه أو في اجهزه الجسم المختلفه، وأن هذا يؤدي الى تطور و أنتشار المقاومه المتعدده للمضادات الحيويه المحموله على بلازميدات متنقله بين البكتريا، وهذا يعمل على اضافه صفات جديده الى الخليه المستلمه فضلا عن الصفات التي تمتلكها اصلا ، وأكد (27) ان بكتريا *E.coli* في الأمعاء تعمل كمخازن لجينات المقاومه وتعمل على نشر هذه الجينات بين الممرضات المختلفه للانسان والحيوان .

المصادر:

1)Troy, M. S.; Rose,J.B.; Jenkins,T.J; Farrah,S.R. and Lukasik,J., Microbial source tracking: Current Methodology and future directions. Appl. Environ. Microbiol. 68:5796-5803. 2002.

2) Mani,N.; Christian, H.; Jonathan, D.; Hanzelka,B.; Ute Müh,U.; Mullin,S. ; Liao,Y.; Grillot,Y.; Stamos, D.;Paul ,S.; Charifson,C. and Trudy ,H. G., *In Vitro* Characterization of the Antibacterial Spectrum of Novel Bacterial Type II Topoisomerase Inhibitors of the Aminobenzimidazole Class . J.Antimicrob. Agents and Chemother. 50(4) :1228-1237. 2006.

3) Prescott J. F.; Baggot,J.D. and Walker,R.D. , Antimicrobial Therapy in Veterinary Epidemiology, 3rd ed. IowaState University Press, Ames. 2000.

4) Yamasaki, K.; Komatsu, T.; Yamashita, K.; Ura, H.; Satoh, R.; Kinoshita, S. and Aihara, M., Production of CTX-M_3 Extended-spectrum β-lactamases & IMP-1 metallo-β-lactamases by five gram-ve bacilli.J. Antimicrob. Agent. Chemother., 51: 631-638. 2003.

5) Paterson,D.; Robert ,A.and Bonomo,A . Extended-Spectrum ß-Lactamases: a Clinical Update . Clinic. Microbiol. Reviews 18(4) , 657-686 . 2005.

6) Osana,E.;Arakawa,Y.;Wacharo,R.;Ohata,M. and Kato,N.Molecular characterization of an enterobacterial metallo-B-lactemas found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance .Antimicrob.Agent.Chemother.38:71-78.1994.

7) Shibata, N., Doi,Y.; Yamane,K.; Yagi,T.; Kurokawa,H.; Shibayama,K.; Kato,H.; Kai,K. and Arakawa,Y., PCR typing of genetic determinants for metallo-ß-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J. Clin. Microbiol. 41:5407-5413, 2003.

8) Pitout,-J.D.D. ;Gregson, D.; Poirel, L.; McClure, J.;Le, P. and Church ,L., Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo-ß-Lactamases in a Large Centralized Laboratory ,J. of Clinic. Microbiol., 43 (7): 3129-3135. 2005,

9) Dionisio, F.; Matic, I.; Radman, M.; Rodrigues, O.R. and Taddei, F., Plasmids spread very fast in heterogenous bacterial communities. Genetics., 162: 1525-1532. 2002.

10) Rasool, S.A.; Ahmad, A.; Khan, S. and Wahab, A., Plasmid borne Antibiotic resistance factors among indigenous *Klebsiella spp.* Pak. J. Bot., 35(2): 243-248. 2003.

11) Mulamattathil, S. G.; Esterhuysen, H. A. and Pretorius, P. J., Antibiotic resistant gram-negative bacteria in a virtually closed water reticulation system. J. Appl. Microbiol. 88:930-937. 2000.

12) Sayah, R.S.; Kaneene,–J.B; Johnson, Y. and Miller,M.Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic- and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. J.of Appl. and Environ. Microbiol., 71(3): 31394-1404, 2005,

13) Graves, A. K., Hagedorn, A.; Teetor, M.; Mahal, A. ; Booth,M. and Reneau, R. B. , Antibiotic resistance profiles to determine sources of fecal contamination in a rural Virginia watershed. J. Environ. Qual. 31:1300-1308. 2002.

14) Guan, S.; Xu, S.; Chen, J.; Odumeru,J. and Gyles,C.; Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animal and human sources. Appl. Environ. Microbiol. 68:2690-2698. 2002.

15) Krumperman, P. H., Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Appl. Environ. Microbiol. 46:165-170, 1983.

16) Greenwood, D.; Slack, R.C. and Peutherer, J.F. Medical Microbiology. (Sixteenth ed.). Churchill Livingston. 2002.

17) Yong, D.; Lee, K.; Yum, K.; Shin, H.; Rossolini, G. and Chong Y. Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo-ß-Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J. of Clinic. Microbiol., 40(10) :3798-3801, 2002.

18) Sambrook,J.; Fritsch,E.F. and Maniatis,E ., Molecular Cloning .2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y. . 1998.

19) Johann D. D. ;Pitout, D.; Daniel, B.; Gregson,B.; Poirel, L.; Jo-Ann McClure, Le, P. and Church ,D.L. ,Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo-ß-Lactamases in a Large Centralized Laboratory

J. of Clinic. Microbiol., 43(7): 3129-3135 . 2005.

20) Pagani, L.; Colinon, C.; Migliavacca,R.; Labonia, R. ; Docquier, J. Nucleo, E.; Spalla, M.; Bergoli, M. and Rossolini ,G.' Nosocomial

Outbreak Caused by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing IMP-13 Metallo-ß-Lactamase J. of Clinic. Microbiol.,43(8): 3824-3828. . 2005.

21) Schroeder, C.M.; Zhao, C.; Debroy, C.; Torcolini, J.; Zhao, S.; White, D.G.; Wagner, D.D.; Walker, R.D. and Meng, J.. Antimicrobial resistance of *E.coli* O157 isolated from humans, cattle, swine and food. Appl. Environ. Microbiol., 68(2): 576-581. 2002

22) Mammeri, H.; Nazic, H.; Naas, T.; Poirel, L.; Leotard, S. and Nordmann, P., AmpC β-lactamase in *E.coli* clinical isolate confer resistance to expanded-spectrum Cephalosporins.J. Antimicrob. Agent. Chemother., 48(10): 4050-4053. 2004.

23) Wilkerson, C.; Samadpour, M.; Kirk, N. and Robert, M.C., Antibiotic resistance and distribution of tetracycline resistance genes in *E.coli* O157: H_7 isolates from humans and bovines. J.Antimicrob. Agent. Chemother., 48(3): 1066-1067. 2004.

24) Wiggins, B. A.; Andrews, R. A.; Conway, C. L.; Corr, E. J.; Dobratz, D. P.; Dougherty, J. R.; Eppard, S. R.; Knupp, M. C.; Limjoco, J. M.; Mettenburh, J. M.; Rinehardt, J.; Sonsino, R. L.; Torrijos,R. and Zimmerman, M. E. , Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution. Appl. Environ. Microbiol. 65:3483-3486. 1999.

25) Hu Su, J.; Ou, J.T.; Shong Leu, H. and Chiu, Y., Extended-epidemic of nosocomial U.T.I caused by *Serratia marcescens*. J. Clin. Med., 41(10): 4726-4730. 2003.

26) Naumiuk, L.; Baraniak, A.; Gniadkowski, M.; Rybak, B. and Kur, J., Molecular Epidemiology of *Serratia marcescens* in two hospitals in Danzig, Poland over a 5-year period. J. Clin. Microb., 42(7): 3108-3116. 2004.

27) Balis, E.; Vatopoulous, AC.; Mainas, E.; Lada, HM.; Kiriakopolou, S.K. and Kalopothaki, V., Indication of *In vivo* transfer of an epidemic R-plasmid from *Salmonella enteritidis* to *E.coli* of the normal human gut flora. J. Clin. Microbiol.,34(4): 977-979. 1996.