انتاج انزيم البيتالاكتاميز من قبل بكتريا Klebsiella oxytoca

لمى سعيد محمد و مي طالب فليح

كلية العلوم ، قسم علوم الحياة ، جامعة بغداد.

الخلاصة

تم الحصول على ثلاث وسبعين عزلة من بكتريا Klebsiella من 200 عينة ادرار مأخوذة من اشخاص مصابين بالتهاب المجاري البولية واظهرت عائدية 4 عزلات (K38,K33,K27,K44) للنوع K.oxytoca .أختبرت حساسية العزلات الاربعة لمضادات الحياة المختلفة فكانت جميع العزلات البكتيرية مقاومة لمضادات البيتالاكتام التي تضمنت كل من Penicillin G و Penicillin Benzathin و Ampicillin و Amoxicillin و Piperacillin و Cephalothin وClavulanicacid - Amoxicillin Aztreonam و Cefotaxime و Cefixime وCeftazidim و Tobramycin وClindamycin و Cotrimoxazol وCephoxitin وكانت جميع العزلات حساسة لمضادات الحياة Nitrofurantoin و Amikacin و Ticarcillin-Clavulanic acid ،وكانت نصف العزلات حساسة لمضاد الحياة Nalidixic acid والنصف الآخر اظهرت حساسية متوسطة له ، تم تحديد التركيز المثبط الادنى من مضادات الحياة التي شملت Amoxicillin و Penicillin G و Ampicillin و Piperacillin و Amoxicillin-Clavulanic acid فكان ولجمي ع العزلات البكتيرية اكثر من 1024 مايكروغرام/ملليتربينما كان لمضاد الحياة Amikacin (32 و16 و4 و2) مايكروغرام /ملليترللعزلات K38 و K33 و K44 و K27 على التوالي بينما كانت قيمة التركيز المثبط الادنى لمضاد الحياة Nalidixic acid (128و64 و 16 و8) مايكروغرام/ملليتر للعزلات K38 و K33 و K44 و K27 على التوالي .درست قدرة انتاج البيتالاكتاميز من العزلات البكتيرية المنتخبة بطريقة اليود القياسية والطريقة الحامضية القياسية ، واظهرت النتائج ان العزلة K.oxytoca K38 هي الاغزر انتاجآ للانزيم . تضمنت الظروف المثلى لانتاج البيتالاكتاميز من العزلة المنتخبة استخدام وسط نقيع القلب والدماغ وبكمية لقاح بكتيري 5% عند رقم هيدروجيني 7 لمدة 4 ساعات من الحضن بدرجة حرارية 37 مئوية بحاضنة هزازة سرعة اهتزازها 125 دورة في الدقيقة.

المقـدمـــــة

تعد بكتريا K. oxytoca احد اهم الانواع البك تيرية التابعة للعائلة المعوية المعزولة من عينات الادرار ، اهم صفاتها الكيموحيوية انتاجها لآنزيم الـ Tryptophanase واليوريز وتخميرها للسكريات المختلفة واستهلاكها للاسيتات كمصدر وحيد للكاربون(Hansen et al .,2004) .تنتج افراد العائلة المعوية انواع مختلفة من ان زيمات البيتالاكتاميز اهمهـــا النوعـــــــان TEM و SHV (Heritage et al., 1999). يضم كل نوع منهما انواع اخرى تنتج بسبب حصول طفرات وراثية في الجين المشفر لآنتاج الانزيم (Cheng and Chen, 1994) . حيث يكون هذا الانزيم واسع المدى ويعمل على مدى واسع من مضادات البيتالاكتام (Neuwirth et al, 1996) وبسبب انتاج انزيم البيتالاكتاميز ذي المدى الواسع فآنها تكون مقاومة لمضادات البيتالاكتام التي تشمل مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات (Alvares et al., 2004) وتعتبر بكتريا K.oxytoca من اهم الانواع البكتيرية المنتجة لآنزيمات البيتالاكتاميز(Jones et al., 2004). يعمل هذا الانزيم على كسر حلقة البيتالاكتام الموجودة في تركيب مضاد الحياة فتتحول الى مركبات فاقدة للفعاليـــة (Sykes and Metter, 1976) .تمتاز انزيمات البيتالاكتاميز ذات المدى الواسع بتخصصها للمادة الاساس التي تعمل عليها (Bush, 1989) .وبصورة عامة تصنف هذه الانزيمات الى ثلاثة اصناف تسمى انزيمات الصنف الاول بالانزيمات السيرينية وتسمى انزيمات الصنف الثاني بالانزيمات المعـدنية امـا انزيمـات الصنـف الثال ـث فتسمـى بالـ AmpC betalactamas اذا كانت مشفرة عن طريق البلازميد (Fournier et al, 1996) .ينتج انزيم البيتالاكتاميز من البكتريا اما تركيبيآ أي ان انتاجه يكون مستمرآ من الخلية البكتيرية او يكون مستحثآ حيث

ينتج الانزيم عند وجود محفز (مضاد الحياة) (MacFaddin,2000) .ونظراً لأهمية البيتالاكتاميز كونه السبب الرئيس في مقاومة بكتريا K.oxytoca المعزولة من عينات الادرار لمضادات البيتالاكتام جاءت هذه الدراسة لتحقيق الغايات الاتية :

1. عزل وتشخيص بكتريا K.oxytoca من عينات الادرار.
2. دراسة حساسية البكتريا لمضادات الحياة المختلفة .
3. التحري عن انتاج البيتالاكتاميز ودراسة الظروف المثلى لأنتاجه.

طرائق العمل

جمع العينات :جمعت 200 عينة ادرار من اشخاص مصابين بألتهاب المجاري البولية ولكلا الجنسين وبنسبة اكبر من النساء بعمر (15–50) سنة.

العزل والتشخيص: زرعت العينات على وسط الماكونكي وعند الحصول على عزلات نقية تم التشخيص بأجراء الاختبارات الكيموحيوية وبالأعتماد على (Collee et al., 1996 ;Holt et al.,1994) وتم تأكيد التشخيص بأستخدام نظام Api 20 E.

اختبار حساسية بكتريا K.oxytoca لمضادات الحياة

حضر مزروع بكتيري منشط من عزلات البكتريا قيد الدراسة ونشر المزروع على وسط Muller Hinton ثم اضيفت مضادات الحياة وحضنت ا لاطباق ثم قيست اقطار منطقة التثبيط (Vercauteren et al., 1997).

اختبار تحديد التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) :

حضر مزروع بكتيري حاوي على 10^8 خلية بكتيرية/ مليليتر وحضرت تراكيز متدرجة من مضادات الحياة التي اضيف اليها العالق البكتيري وحضنت لمدة 18 ساعة ثم قدرت النتائج التي كانت بتعيين تركيز المضاد في اول انبوبة رائقة بعد سلسلة من الانابيب العكرة الذي عد التركيز المثبط الادنى (Vercauteren et al ., 1997).

التحري عن انتاج البيتالاكتاميز

تم التحري عن انتاج الانزيم بأستخدام طريقة اليود القياسية (Iodometric test) والطريقة الحامضية القياسية (Acidemetric test) وكذلك تم التحري عن انتاج الانزيم ذي المدى الواسع بأستخدام طريقة الاقراص المضاعفة (Livermore and Brown,2001)

تحديد الظروف المثلى لأنتاج الانزيم

تم تحديد الوسط الامثل للأنتاج بأستخدام وسط Nutrient agar ووسط Brain Heart agar بمقدار 50 مليليتر لكل منهما وحقنا بحجوم اللقاح المختلفة التي بلغت (1%،3%،5%،10%) غم/مللتر من العالق البكتيري وحددت درجة الحرارة المثلى للأنتاج بأستخدام الوسط الامثل للأنتاج وحجم اللقاح الامثل للأنتاج بدرجات متفاوتة بلغت (55,45,37,25) درجة مئ وية وحدد الرقم الهيدروجيني الامثل بأستخدام الوسط الامثل وحجم اللقاح الامثل والدرجة المثلى للأنتاج وبأرقام هيدروجينية مختلفة (9,8,7,6,5,4,3)، وحدد زمن الحضن الامثل للأنتاج بأستخدام الوسط الامثل للأنتاج وحجم اللقاح الامثل للأنتاج ودرجة الحرارة المثلى للأنتاج والرقم الهيدروجيني الامثل للأنتاج بفترات زمنية مختلفة (24,18,10,6,4,3) ساعة وكذلك حدد تركيزالبنسلين جي اللازم اضافته للوسط الامثل للأنتاج بأستخدام (500,400,300) مايكروغرام/مليليتر منه ثم قدرت فعالية الانزيم في كل حالة.

النتائج والمناقشة

العزل: تم الحصول على 4 عزلات بكتيرية وبنسبة (5.48%) تابعة للنوع البكتيري K.oxytoca وعزلتين (2.74%) تابعة للنوع K.ornithinolytica و67 عزلة (91.78) تابعة للنوع K.pneumonia جدول(1) ،حيث تميزت العزلات التابعة للنوع K.oxytoca بقدرتها على تخمير السكريات المختلفة والنمو عند 10 درجة مئوية واستهلاكها للأسيتات كمصدر وحيد الكاربون وعدم تحليلها للحامض الاميني الاورنثين وعدم انتاجها كبريتيد الهيدروجين في وسط تخمر السكريات الثلاثية (Holt et al, Stock and; Wiedemann ,2001).

جدول(1) الاختبارات الكيموحيوية لعزلات بكتريا K.oxytoca.

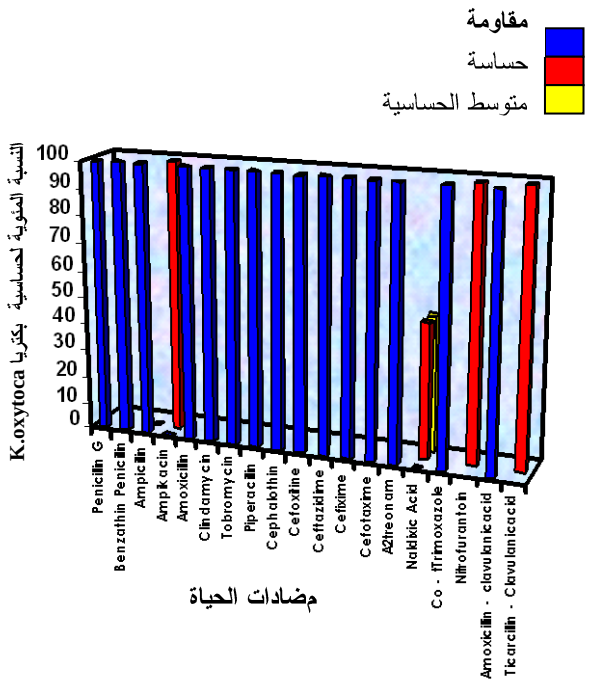
الاختبارات الكيموحيوية	K27	K33	K38	K44
1- اختبار الاندول	+	+	+	+
2- اختبار Vogus Proskauer	+	+	+	+
3- اختبار Methyl red	-	-	-	-
4- اختبار استهلاك السترات	+	+	+	+
5- اختبار الحركة	-	-	-	-
6- اختبار تحلل الاورنثين	-	-	-	-
7- اختبار انتاج اليوريز	+	+	+	+
8- النمو في درجة حرارة 10 مئوية	+	+	+	+
9- اختبار تخمر السكريات الثلاثية	A/A ±	A/A ±	A/A ±	A/A ±
10- اختبار تميؤ الجيلاتين	+	+	+	+
11- اختبار استهلاك الاسيتات	+	+	+	+
12- انتاج الاوكسيديز	-	-	-	-
13- انتاج الكتاليز	+	+	+	+
14- اختبار تخمر السكريات :				
a- كلوكوز	+	+	+	+
B - سكروز	+	+	+	+
c- لاكتوز	+	+	+	+
d- سيليبايوز	+	+	+	+
e- اينوسيتول	+	+	+	+

(+) يمثل النتيجة الموجبة (-) يمثل النتيجة السالبة (A) حامض

حساسية بكتريا K.oxytoca لمضادات الحياة: كانت جميع العزلات مقاومة لمضادات البيتالا كتام سواء كانت بنسلينات او سيفالوسبورينات التي شملت Penicillin G و Ampicillin و Benzathin Penicillin و Amoxicillin و Piperacillin و Cephalothin و Amoxicillin - Clavulanicacid و Aztreonam و Cefotaxime و Cefixime و Ceftazidim و Tobramycin و Clindamycin و Cotrimoxazol و Cephoxitin وكانت جميع العزلات حساسة لمضاد Nitrofurantoin و Ticarcillin'clavulanic acid بسبب التأثير التآزري لكل من المضاد- المثبط الذي جعل البكتريا حساسة له (Sirot et al.,1998) شكل(1) وذلك بسبب انتاج انزيم البيتالاكتاميز ذي المدى الواسع (Fournier et al., 1999)، وكانت نصف العزلات حساسة لمضاد Nalidixic acid ونصفها مقاومة له ويعود ذلك الى وجود بروتينات خارج الغلاف الخلوي البكتيري (Outer membrane proteins) اللازمة لدخول هذا المضاد الى داخل الخلية البكتيرية (Martinez-Martinez et al., 2002) وكانت جميع العزلات حساسة لمضاد Amikacin وذلك لنفاذية هذا المضاد عبر الغلاف الخلوي البكتيري (Jawetz.,1998).

اما التركيز المثبط الادنى من بعض مضادات الحياة فكانت اكثر من 1024 مايكروغرام/مليليتر من مضادات Penicillin G و Ampicillin و Amoxicillin و Amoxicillin-Clavulanic acid، وكانت اكثر من 1024مايكروغرام/مليليتر من مضاد Cefotaxim للعزلات

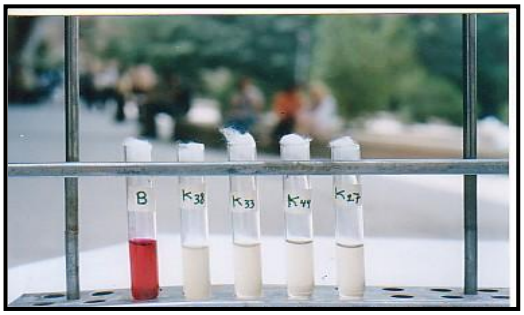
K38، و K33، و K44 اما للعزلة K27 فكان 512 مايكروغرام/مليليتر،اما لمضاد Amikacin فكانت 32 و 16 و 4 و 2 مايكروغرام/مليليتر للعزلات K38، و K33، و K44 ، وK27 على التوالي بينما كانت لمضاد Nalidixic acid 128 ،64 ، 16 ،8 مايكروغرام/مليليتر للعزلات K38 ، و K33 ، و K44 ، وK27 وتعزى هذه المقاومة الى الانتاجية العالية لأنزيم البيتالاكتاميز ذي المدى الواسع التي تؤدي الى اســـــــــتبدال احماض امينية محل الاخرى وينتــــــــــج عــــــن ذلك المقاومة العالية للبكتريا (Schroeder et al, 2002; Nicolas9-Chanoine et al ., 1997)



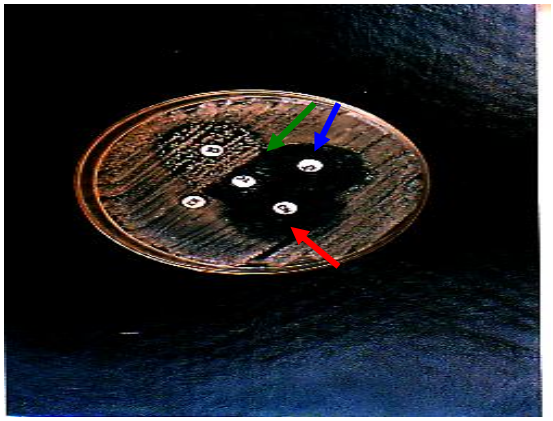
شكل(1)النسب المئوية لحساسية بكتريا K.oxytoca لمضادات الحياة.

التحري عن انتاج الانزيم : بينت النتائج ان جميع العزلات البكتيرية التابعة للنوع K.oxytoca منتجة لأنزيم البيتالاكتاميز الذي عمل على تحطيم حلقة البيتالاكتام في البنسلين وانتاج حامض البنسلويك الذي اختزل اليود وعمل على ايقاف التفاعل الحاصل ما بين اليود والنشاء وتحويل اللون الازرق الناتج من تفاعلهما الى لون شفاف وان العزلة K38 هي الاغزر انتاجاَ للأنزيم وذلك لكونها الاسرع في تحويل لون الدليل (اليود والنشاء) في طريقة اليود القياسية شكل (2) والفينول الاحمر في الطريقة الحامضية القياسية شكل (3) حيث عمل الانزيم على تحطيم حلقة البيتالاكتام في مضاد الــ Cefotaxime (المادة الاساس) وحوله الى Cephalosporanic acid مما ادى الى تحويل الفينول من اللون الاحمر الى اللون الاصفر شكل(3) وايضاَ كان الانزيم من النوع الواسع المدى بسبب توسع منطقة التثبيط شكل (4) حول اقراص السيفالوسبورينات الموضوعة حول قرص مضاد الحياة المثبط (Ticarcilline-Clavulanic acid) Livermore and Brown,2001).

شكل (2) التحري عن انتاج البيتالاكتاميز من بكتريا K.oxytoca بطريقة اليود القياسية.



شكل (3) التحري عن انتاج البيتالاكتاميز من بكتريا K.oxytoca بالطريقة الحامضية القياسية.

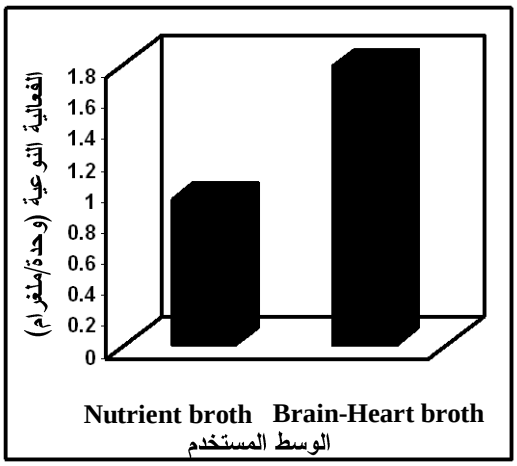


شكل (4)التحري عن البيتالاكتاميز ذي المدى الواسع المنتج من بكتريا K.oxytoca)

Ticarcilline-Clavulanic acid: TC
Cefoxitine :CN
Cefotaxime :CA

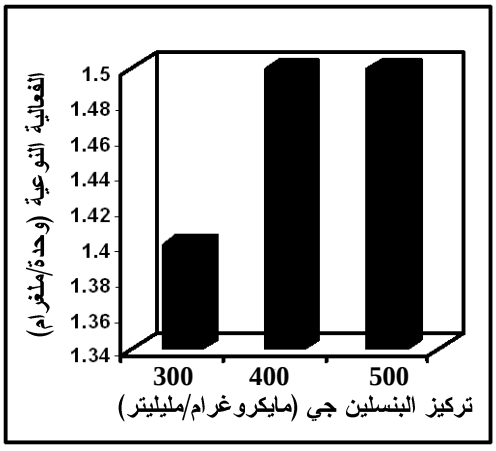
تحديد الظروف المثلى لأنتاج الانزيم:

كان وسط نقيع القلب والدماغ هو الامثل لأنتاج الانزيم شكل (5) حيث بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 1.8 وحدة/ملغرام بروتين



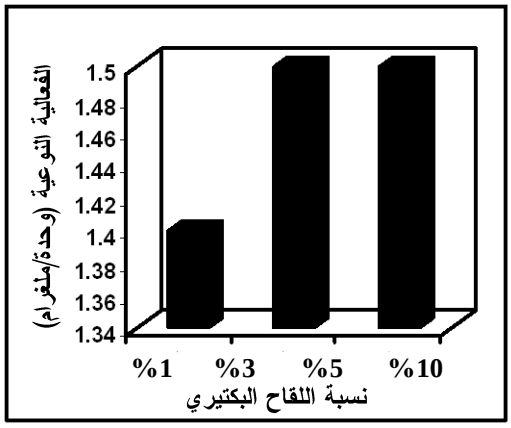
شكل (5) فعالية البيتالاكتاميز المنتج من العزلة K.oxytoca K38 بأستخدام وسطين مختلفين.

وكان تركيز 400 مايكروغرام/ملليتر من البنسلين جي هو اللازم اضافته الى الوسط حيث كانت الفعالية النوعية للأنزيم1.5 وحدة/ملغرام بروتين في الراشح شكل (6) حيث كان هذا التركيز كافي للعمل على جدار الخلية البكتيرية ولتحفيزها على الانتاج (Fujii et al .,1985) .

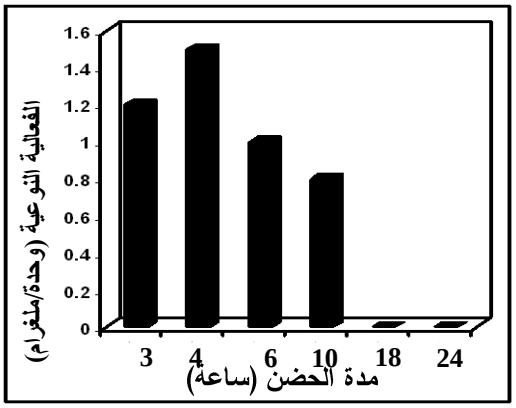


شكل (6) تأثير تركيز البنسلين جي في انتاج البيتالاكتاميز من العزلة K.oxytoca K38.

وكان حجم لقاح 5% الامثل لأنتاج الانزيم حيث بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 1.5 وحدة/ملغرام بروتين شكل(7)، وبلغ زمن الحضن الامثل للأنتاج 4 ساعات شكل(8)، حيث ان اللقاح الكبير والفترة القصيرة للحضن ادت الى استغلال كل مكونات الوسط الغذائية وبالتالي نمو الخلايا وانتاج الانزيم (Fujii et al.,1985) .



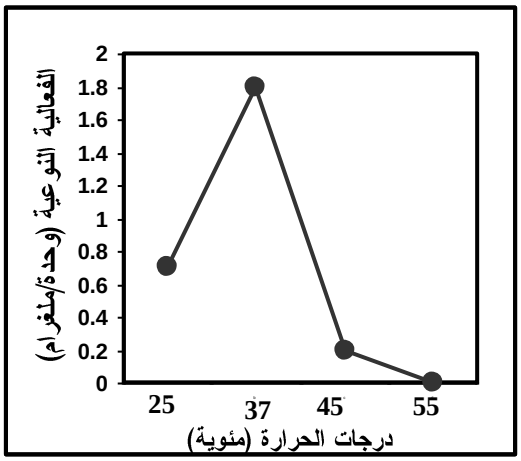
شكل (7) تأثير نسبة اللقاح البكتيري في انتاج البيتالاكتاميز من العزلة K.oxytoca K38.



شكل (8) تأثير مدة الحضن في انتاج البيتالاكتاميز من العزلة K.oxytoca K38.

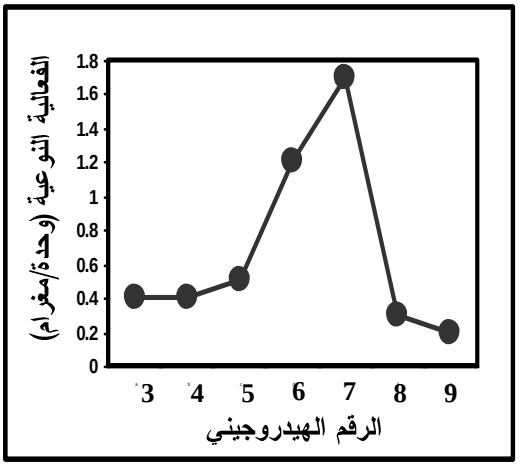
وبلغت درجة الحرارة المثلى للأنتاج 37 مئوية حيث بلغت الفعالية عندها 1.8 وحدة/ملغرام بروتين شكل(9) وقد انخفضت الفعالية الانزيمية في الدرجات الحرارية المرتفعة والمنخفضة ويعود ذلك الى تأثير درجة الحرارة في الطبيعة البروتينية للبيتالاكتاميز وتشير اغلب الدراسات الى ان اغلب الاجناس البكتيرية تتوقف عن النمو والانتاج عند الدرجات الحرارية العالية

Fournier et al.,1996) Mammeri et; al., 2003; Babini et al, 2003)



شكل (9) تأثير درجة الحرارة في فعالية البيتالاكتاميز المنتج من العزلة K.oxytoca K38.

اما الرقم الهيدروجيني الامثل للأنتاج فكان 7 حيث بلغت عنده الفعالية 1.7 وحدة/ملغرام بروتين شكل (10)، وتشير اغلب الدراسات الى ان انتاجية البيتالاكتاميز تتأثر بالرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي المستحدم في تنمية البكتريا المنتجة، حيث تقل الانتاجية في الاوساط الحامضية والقاعدية وعادة تكون اعلى انتاجية في الاوساط المتعادلة (Marches et al.,1998)



شكل (10) تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج البيتالاكتاميز من العزلة K.oxytoca K38.

المصادر

[1] A. Marches; G. Alert; G. C. Schito; P. H. Lagrange and A. Philippon, Characterization of FOX-3 an AmpC-type plasmid–mediated β-lactamase from an Italian isolates of Klebsiella oxytoca , J. Antimicrob. Agents Chemother, Vol. 42, 1998, pp. 464 – 467.

[2] B. Fournier; P. H. Lagrane and A. Philippon. β-lactamase gene promoter of 71 clinical strains of Klebsiella oxytoca. J Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 40 No. (2), 1996, pp.460-463.

[3] B. Fournier; A. Graved; D. C. Hooper and P. H. Roy. Strength and regulation of the different promoters for chromosom-al β-lactamase of Klebsiella oxytoca. J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 43 No. (4), 1999. pp. 850 - 855 .

[4] C .Neuwirth ; E . Siebore; J. Lopez; A. Pechinot and K. A. Kazmiercza,. Out break of TEM-24- produsing Enterobacter aerogenes in an intensive care unit and dissemination of the extended spectrum β-lactamase to other members of the family Enterobacteriaceae. J. Clin .Microbiol. Vol. 34 No. (1), 1996, pp. 76-79.

[5] D. S. Hansen; H. M. Aucken; T. Abiola and R. Podschun. Recommanded test panel for differentiation of Klebsiella species on the basis of trilateral interlabor - atory evaluation of 18 biochemical tests. J. Clin. Microbiol. Vol. 42 No. (8), 2004, pp.3665-3669.

[6] D. M .Livermore and D. F. J. Brown Detection of β-lactamases - mediated resistance. J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 48, 2001, pp.59-64.

[7] D. Sirot; R .Labia; P. Pouedras; C. C. Claris; C. Cerceau and J. Sirot,. Inhibitor resistant OXY-2 derived β-lactamase produced by Klebsiella oxytoca. J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 42 No. (9), 1998, pp. 2184-2187.

[8] E .Jawetz; J. l. Melink and E. A. Adelberg. Medical Microbiology. 21th ed. Typo press. Lebanon. 1998.

[9] E. Vercauteren; P. Descheema-eker; M. Ieven; C. C. Sanders, and H. Goossens,. Comparison of screening methods for detection of extended spectrum β-lactamase and their prevalence among blood isolates of Escherichia coli and Klebsiella spp. In a Belgian teaching hospital. J. Clin. Microbiol. Vol. 35 No. (9), 1997, pp. 2191-2197.

[10] I. Stock and B. Wiedemann. Natural antibiotic susceptibility of Klebsiella pneumonia, K. oxytoca, K. planticola, K. ornithinolytica and K. terrigena strains. J.

Wenzel,. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit- a European and North American surveillance study (2999-2002). J. Ann. microbial. Antimicrob. Vol. 3, 2004, pp. 14.

[21] N. R. Holt; N. R. Krieg; P. H. A. Sneath and S. T. Williams, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9 th ed. Williams and Willkins. Maryland. USA. 1994.

[22] R.B. Sykes and M. Matter. The betalactamase of gram negative bacteria and their role in resistance of betalactam antibiotics. J. Microb. Chemother. Vol. 2, 1976 pp.115-157.

[23] T. Fujii; K. Sato; M. Inou and S. Mitsuhashi. Purification and proreties of inducible penicillin β- lactamase isolated from Alcaligenes faecalis. J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 27 No. (4), 1985, pp. 608-611. lactamase mutant. J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 46 No. (11), 2002, pp.3568-3573.

[24] W. A. Schroeder; T. R. Locke and S. E. Jensen. Resistance to β-lactamase inhibitor protein does not parallel resistance to clavulanic acid in TEM β-lactamase mutant. J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 46 No. (11), 2002, pp.3568-3573.

[25] Y. Cheng and M. Chen. Extended spectrum β-lactamase in aclinical isolates of Enterobacter gergoviae and Escherichia coli. J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 38, 1994, pp. 2838-42.

Abstract

Seventy three Klebsiella isolates were obtained from 200 urine sample taken from patients with urinary tract infection. Four of these isolates were identified as K. oxytoca. The sensitivity of bacteria to different antibiotics was tested ,all bacterial isolates were resistant to β-lactam antibiotics included Penicillin G, Benzathin Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Piperacillin, Cephalothin, Amoxicillin - Clavulanic acid, Aztreonam, Cefotaxime, Cefixime, Ceftazidim, Tobramycin, Clindamycin, Cotrimoxazol, and Cephoxitin. All isolates were sensitive to Nitrofurantoin, Amikacin and Ticarcillin-Clavulanic acid whereas half of the isolates

Med. Microbiol. Vol. 50 ,2001, pp.396-406 .

[11] G. S. Babini; M .Yuan; L. M. C. Hall and D. M. Livermore. Variable susceptibility to piperacillin/ tazobactam amongst Klebsiella spp. with extended spectrum β-lactamase. J. Antimicrob. agent Chemother (2003) Vol.51: pp.605-612.

[12] H. Mammeri; L. Poirel and P. Nordmann. In vivo selection of chromosomally encoded β-lactamase variant conferring ceftazidime resistance in Klebsiella oxytoca .J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 47 No. (12), 2003, pp.3739-3742.

[13] J. F. MacFaddin. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Lippincott, Williams and Wilkins. Philadelphia. London. 2000.

[14] J . G. Collee; A. G. Fracer; B. P. Marmion and A. Simmon. Practical Medical Microbiology. 14 th ed. Churichill Livingstone. Sigapore. 1996 .

[15] J . Heritage; F. H. M' Zali; D. G .Binzi and P. M. Hawkey. Evaluation and spread of SHV extended spectrum β-lactamase in gram-negative bacteria. J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 44, 1999, pp.309-318 .

[16] K. Bush (1989). Characterization of beta lactamases. J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 33: pp.259-263.

[17] L. M .Martinez-Martinez; A. Pascual; M. D. C. Conejo; I. Garcia; P. Joyanes; A. D. Sanchez and V. J. Benedi. Energy–Dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of Klebsiella pneumonia and relationship to extended spectrum β-lactamase production. J. Antimicrob. Agents Chemother. 2002, pp. 3926-3932.

[18] M., Alvares; J. H. Tran; N. Chow, and G. A. Jacoby. Epidemiology of conjucative plasmid mediated Amp C β-lactamases in the United State. J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 84 No.(2) , 2004: pp. 533-537.

[19] M. H. Nicolas- Chanoine,. Inhibitor –resistant β-lactamase. J. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 40, 1997, pp. 1-3

[20] M. Jones; D. C. Draghi; C. Thornsberry; J. A. Karlowsky; D. F . Sahm and R. P.

were sensitive to Nalidixic acid and the other half showed an intermediate sensitivity to it . The minimum inhibitory concentration had been determined for Penicillin G, Amoxicillin, Ampicillin, Piperacillin and Amoxicillin - Clavulanic acid it was 1024 microgram/ milliliter for all isolates. Whereas it was (32,16,4,2) microgram /milliliter for the isolates K38, K33, K44 and K27 respectively to Amikacin. It was (128,64,16 and 8) microgram/milliliter for the isolates K38, K33, K44 and K27 respectively to Nalidixic acid .The ability to produce betalactamase from these isolates was studied by the iodometric and acidimetric tests. All isolates produced the enzyme but K.oxytoca isolate K38 was the highly producer. The optimum conditions of betalactamase production from the selected isolate were the use of Brain Heartinfusion broth with 5% of bacterial inoculum at pH 7 for 4 hours of incubation at 37 C^o in shaker incubator (125 rpm).