

IDENTIFIKASI MUTAN-MUTAN *Klebsiella pneumoniae* YANG RESISTEN TERHADAP ANTIBIOTIKA BRL 41897A DENGAN METODA SOUTHERN BLOT

IDENTIFICATION OF *Klebsiella pneumoniae* RESISTANT MUTANTS AGAINST BRL 41897A ANTIBIOTIC USING SOUTHERN BLOT ANALYSIS.

M. Kuswandi

Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

ABSTRAK

Pembuatan mutan-mutan *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap Antibiotika BRL 41897A memakai mutagenesis dengan *TnphoA* telah menghasilkan tak kurang dari 30 mutan teridentifikasi. Untuk mengetahui (1) apakah mutan-mutan tersebut resisten karena adanya sisipan (insert) dari *TnphoA* atau bukan dan (2) berapa gena yang disisipi oleh *TnphoA*, maka dilakukan isolasi kromosom dari mutan-mutan dan kemudian dilakukan identifikasi dengan metoda Southern Blot dengan memakai "probe" dari fragmen *TnphoA* sendiri. Dari hasil analisis Southern Blot menunjukkan bahwa dari 10 mutan yang diperiksa, minimal 1 mutan (KSL19) membawa satu copy *TnphoA*, dan minimal 2 mutan KSL38 dan KSL52 membawa 2 copy *TnphoA*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa mutagenesis dengan *TnphoA* terbukti merupakan metoda yang efisien untuk pembuatan mutan yang mudah diseleksi, terutama mutasi gena yang mengontrol ekspresi protein membran luar dan protein periplasmik.

Kata kunci : Mutan *K. pneumoniae*- resisten BRL41897 – *TnphoA* – Southern Blot.

ABSTRACT

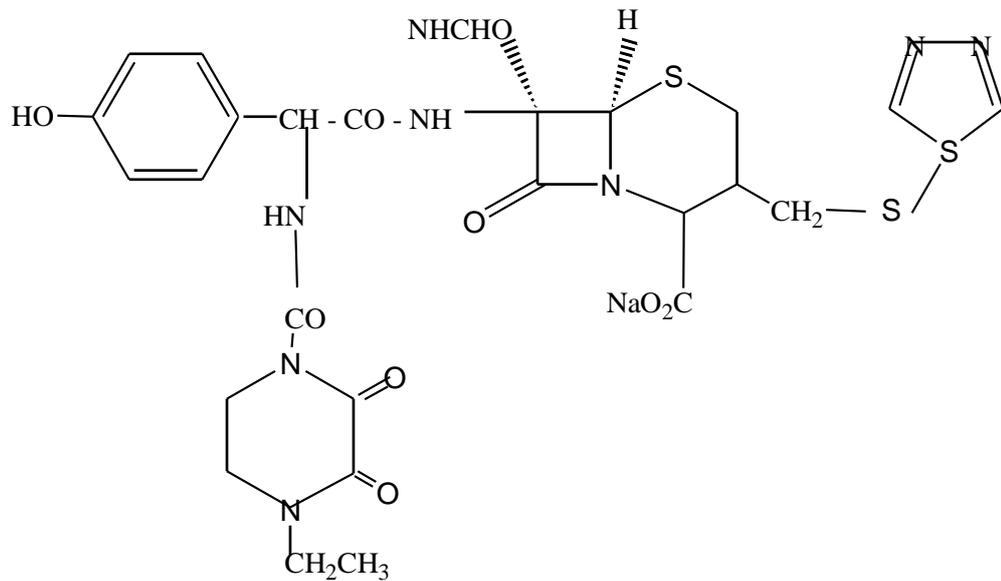
Isolation of *Klebsiella pneumoniae* resistant mutants against BRL 41897A antibiotics using *TnphoA* has yielded 30 mutants which have been characterized. In order to identify whether the mutants are as a result of the insertion (transposition) of *TnphoA*, and to count how many copies of *TnphoA* are inserted in the each mutant chromosome, several chromosomal DNA of the mutants have been cut with restriction enzymes and analysed using Southern blot method and DIG conjugation. The results showed that at least one mutant (KSL19) carried one copy of transposon, whereas at least 2 mutants (KSL38 and KSL52,) have 2 copies. It is obvious that *TnphoA* mutagenesis provides an efficient method of selecting mutants which are defective in genes controlling expression of the outer membrane and the periplasmic membrane proteins.

Key words: Resistant *K. pneumoniae* mutants- *TnphoA* mutagenesis – BRL 41897A- Southern Blot.

PENDAHULUAN

Antibiotika BRL 41897A (Gambar 1) adalah antibiotika yang dirancang oleh para peneliti dari Smith Kline-Beecham untuk memperbaiki aktivitas Sefalosporin, dengan memasukkan gugus katekol pada posisi 7 α dari formamido Sefalosporin (Basker dkk., 1984, 1986).

Struktur molekul BRL41897A yang mirip dengan siderofor Enterobaktin, masuk kedalam sel bakteri memakai sistem transport Fe yaitu sistem *tonB* yang terekspresi bila bakteri ditumbuhkan diatas media yang kekurangan Fe (Watanabe dkk., 1987; Critchley dkk., 1991, Kuswandi dan Lambert,1997). Hasil dari penelitian yang telah dilakukan menunjukkan antibiotika ini mempunyai aktivitas yang tinggi terhadap Gram negatif, terutama *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* (Nikaïdo dan Rosenberg, 1990). Penelitian kami juga menunjukkan tingginya aktivitas antibiotika ini terhadap 3 isolat *K. pneumoniae* dari RSU DR. Sardjito yang resisten terhadap ampisilin (Kuswandi dan Lambert, 1997).



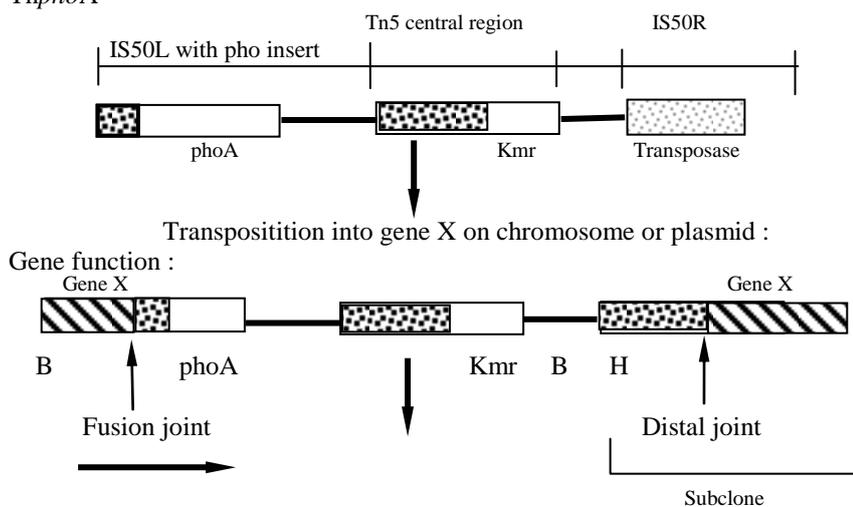
Gambar 1. Struktur molekul dari antibiotika BRL41897A.

Untuk mengantisipasi munculnya bakteri yang resisten terhadap antibiotika tersebut dikemudian hari, dalam rangka agar setelah dipasarkan antibiotika ini mempunyai efektifitas yang cukup lama, maka kami mencoba mensintesa mutan mutan yang resisten terhadap BRL 41897A tersebut sehingga dapat dipelajari karakter mereka dan gen mana yang menyebabkan mutan tersebut resisten terhadap antibiotika ini dengan cara memasukkan plasmid yang mengandung *TnphoA* kedalam *Klebsiella pneumoniae* (Kuswandi, 1997).

Mutagenesis dengan transposon *TnphoA* dipilih untuk mensintesa mutan dengan alasan karena kita dapat dengan relatif mudah menseleksi dan mengidentifikasi dan akhirnya melakukan “sequencing” dari gena yang disisipi oleh transposon tersebut, khususnya gena yang memproduksi protein penyusun membran luar atau membran periplasmik (Gambar 2) (Taylor dkk, 1989; Manoil dan Beckwith, 1985).

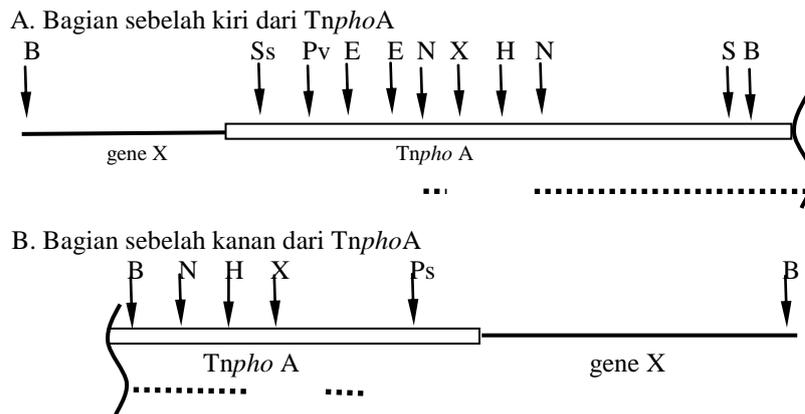
Dalam penelitian ini dipakai *K. pneumoniae* karena merupakan salah satu bakteri yang sering menyebabkan infeksi nosokomial di Rumah Sakit (McGowan, 1985; Ullmann, 1978) dan termasuk bakteri yang patogen terutama menyerang orangtua (49%) dan 30% dari mereka adalah penderita UTI (*urinary tract infectious*) (Young, 1982).

TnphoA



Gambar 2. Fusi dari gen *phoA* aktif memakai transposon *TnphoA*. (Taylor *et al.*, 1989).

Warna biru pekat dari mutan diatas medium XP menunjukkan adanya penyisipan satu atau lebih gena *phoA* yang dibawa *TnphoA* kedalam kromosom *K.pneumoniae* dengan cara transposisi. Dengan analisis dengan metoda Southern Blot maka akan dapat diketahui berapa “copy” *TnphoA* yang menyisip dan sekaligus panjang fragmen yang membawa gen *phoA* tersebut. Kemudian dengan memakai enzim restriksi yang memotong *TnphoA* , maka akan dapat dibuat klon fragmen baik dengan seluruh *TnphoA* didalamnya (misal memakai *KpnI*), atau bagian kiri saja (misal dengan *BamHI*, *HindIII* atau *XhoI*), atau bagian kanan saja (misalnya dengan *HindIII*, *XhoI* atau *BamHI*) (Gambar 3).



Gambar 3. Enzim restriksi diujung kanan kiri dalam fragmen *TnphoA*.

Keterangan:

B: *BamHI*; E: *EcoRI*; H: *HindIII*; X: *XhoI*; Ps: *PstI*; Pv: *PvuII*; S: *SalI*; N: *NcoI*; Ss: *SstI*.

Enzim Restriksi seperti *XbaI*, *KpnI* dan *EcoRV* tidak memotong dalam *TnphoA*.

Garis titik-titik (...) adalah fragmen yang dipakai sebagai “probe”.

Hasil penelitian terdahulu (Kuswandi, 1997) menunjukkan mutagenesis dengan *TnphoA* menghasilkan cukup banyak mutan (300 mutan) yang resisten terhadap BRL 41897A, dan 33 mutan telah diukur KHM nya.

Karakterisasi mengenai profil protein membran luar dan membran periplasmik dari beberapa mutan (KSL 19, KSL31, KSL32, KSL33, KSL38, KSL41, KSL52, KSL 57, KSL58, KSL59, KSL62) akan dilaporkan terpisah .

Penelitian selanjutnya dengan analisis Southern Blot memakai fragmen *TnphoA* sendiri sebagai “probe” (Gambar 3), akan dapat diketahui apakah mutan membawa gena yang disisipi *TnphoA* atau tidak dan sekaligus berapa *TnphoA* yang masuk.

MATERIAL DAN METODE

Bakteri yang dipakai *Klebsiella pneumoniae* M10

Strain yang kehilangan polisakarida pada kapsul tetapi mempunyai lipopolisakarida (LPS) tipe O₂ . Strain ini derivat dari strain NCTC5055 (kapsul tipe K₂, LPS tipe O₂) dengan cara mutagenesis kimia (Poxton dan Sutherland, 1976) dan menghasilkan siderofor dan IROMP (Iron Regulated Outer Membrane Protein) (Williams dkk., 1983)

Mutan – mutan *K. pneumoniae* yang resisten terhadap BRL 41897 yaitu mutan KSL19, KSL38, KSL39, KSL 41, KSL51, KSL52, KSL57, KSL 62.

Isolasi DNA kromosom

Bakteri ditumbuhkan dalam LB yang berisi 0,5% b/v glukosa selama semalam. Sel dipanen dengan cara disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit. Sel kemudian disuspensi dalam 4 ml bufer (15% sukrose, 50 mM Tris HCl, 50 mM EDTA pH 7,5), yang berisi 10 mg lisozim padat (SIGMA), diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar. Selanjutnya ditambah dengan 2 ml TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0 dan 1mM,

EDTA) berisi 10 % b/v SDS, campur pelan-pelan, inkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambah dengan fenol/kloroform sama banyak dan dicampur hati-hati dengan tangan selama 5 menit, lalu disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Lapisan atas yang jernih dipindahkan ke dalam tabung Universal 30 ml, ditambah 0,1 volume Na-asetat 3M dan 2 volume etanol, lalu dicampur secara hati-hati. DNA segera diambil dengan menggunakan pipet pastur yang ujungnya dibengkokkan. DNA yang diperoleh dimasukkan ke dalam etanol 70% dan dicuci dengan hati-hati. DNA diambil dan dilarutkan kembali ke dalam bufer TE 0,5 ml, diekstraksi dengan fenol/kloroform dan dilanjutkan dengan presipitasi etanol, akhirnya dilarutkan dalam 300 μ l TE.

Isolasi DNA plasmid

Isolasi DNA plasmid dikerjakan menurut Sambrook (1989).

Colony blot

Filter nilon diletakkan pada permukaan media agar yang mengandung antibiotika. Koloni yang berwarna putih dari hasil transformasi digoreskan pada filter nilon tersebut dan pada media agar yang lain sebagai "master". Kemudian keduanya diinkubasikan pada suhu 37°C semalam. Filter nilon tersebut diambil, diletakkan di atas kertas 3MM yang telah direndam dalam SDS 10% b/v, selama 5 menit. Selanjutnya filter diletakkan selama 5 menit di atas kertas 3MM yang telah dibasahi dengan larutan denaturasi (0,6 M NaCl, 0,2 M NaOH). Kemudian filter diletakkan selama 5 menit di atas kertas 3MM yang telah dibasahi dengan larutan penetral (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris HCl, pH 7,0). Setelah itu, filter diletakkan selama 5 menit pada kertas 3MM yang mengandung 2X SSC dan akhirnya filter dikeringkan dengan meletakkannya di atas kertas 3MM yang kering. Setelah kering, filter disinari dengan sinar UV (permukaan yang ada koloninya menghadap ke UV) selama 3 menit.

Analisis Southern Blot

DNA yang telah dipotong ditransfer dari gel agarosa ke membran nilon (Boehringer Mannheim) seperti dipaparkan oleh (Southern, 1975). Secara singkat, DNA pada gel agarosa didenaturasi dengan NaCl 0,6M, NaOH 0,2M, selama 30 menit. Fragmen-fragmen diblot dengan cara menstransfer dengan kapiler 20 X dapar SSC (3M NaCl, 0,3 M natrium sitrat, pH =7,0) pada suhu 20°C semalam.

Melabel asam nukleat- Digoksinin (DIG) dan deteksinya

Kedalam tabung mikrofuga dimasukkan 10 ng-3 μ g DNA yang sudah dimurnikan dan linear, serta telah didenaturasi selama 10 menit pada 95°C dan didinginkan secara cepat di atas es/NaCl selama 3 menit, ditambah 2 μ l campuran heksanukleotida, 2 μ l campuran dNTP yang dilabel, air steril sampai dengan 19 μ l dan terakhir ditambah 1 μ l larutan Klenow (2 unit). Semua reagen disuplai dari Boehringer Mannheim. Tabung kemudian disentrifuga secara cepat untuk mencampur reagen didalamnya, diinkubasi selama 60 menit pada 37°C. Kemudian 2 μ l larutan EDTA 0,2M, pH8,0 ditambahkan kedalamnya untuk menghentikan reaksi. DNA kemudian diendapkan dengan menambahkan 2,5 μ l LiCl 4M dan 75 μ l etanol dingin (-20°C). Tabung disimpan semalam pada -70°C. Selanjutnya tabung disentrifugasi pada 12000 g selama 10 menit dan "pelet" dicuci dengan 50 μ l etanol dingin (70% v/v), disentrifugasi, dan pelet dikeringkan dibawah vakum dan dilarutkan dalam 50 μ l campuran TrisHCl 10mM, 1mM EDTA, pH8,0 pada 37°C.

Hibridisasi dengan "probe" DIG-DNA

Membran nilon dari Southern blot disinari UV selama 3 menit. Filter di hibridisasi dalam boks plastik dengan ukuran yang cocok, minimal dalam 20 ml larutan hibridisasi setiap 100 cm² filter pada 68°C selama 1 jam dengan digoyang secara hati-hati. Setelah larutan prehibridisasi dibuang, kemudian diganti dengan larutan hibridisasi (5 x SSC, 0,1% (b/v) N-laurilsarkosinat, Garam Na (Sigma), SDS 0,02% (b/v). Kemudian ditambah larutan yang baru dibuat 1% (b/v) "blocking reagent" (Boehringer Mannheim), yang dibuat 1 jam sebelumnya dengan cara mencairkannya pada suhu 50-70°C yang berisi "probe" DNA yang

baru saja dilabel (kurang lebih 2,5 ml larutan setiap 100 cm² filter). Kemudian diinkubasi selama 6 jam pada suhu 68⁰C dengan goyangan yang hati-hati.

Filter kemudian dicuci dengan cara menginkubasikannya 2x 5 menit pada temperatur kamar dengan minimal 50 ml campuran 20 x SSC (NaCl 3M, Na Sitrat 0,3M, pH7,0 (20⁰C)) dengan 0,1% SDS. Filter kemudian digunakan secara langsung untuk deteksi DNA yang telah dihibridisasi pada filter tersebut atau disimpan ditempat kering untuk deteksi kemudian.

Deteksi hibrida "probe-target DNA"

Filter-filter hibrida dicuci secara cepat selama 1 menit dalam bufer 1 (tris HCL 100 mM, NaCl 150mM, pH7,5 (200C)), dan diinkubasi selama 30 menit dengan kurang lebih 100 ml bufer 2 (blocking reagent 15% (b/v) dalam bufer 1, disiapkan 1 jam sebelum dipakai dengan cara mencairkan pada suhu 50-70⁰C). Filter diinkubasi selama 30 menit dengan kurang lebih 20 ml larutan anti DIG-konjugat encer, yaitu telah diencerkan sampai dengan 150 mU/ml (1:5000 dalam bufer 2). Antibodi-konjugat yang tak terikat dibuang dengan cara dicuci dengan 2 x 15 menit dengan 100 ml bufer 1 dan membran diekuilibrasikan dengan 20 ml bufer 3 (tris HCl 100mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 50mM, pH9,5 (20⁰C)) selama 2 menit. Akhirnya filter-filter diinkubasi ditempat gelap dengan kurang lebih 10 ml larutan pewarna-substrat yang dibuat baru dalam boks plastik. Warna akan muncul dalam beberapa menit dan reaksi komplit setelah 12- 16 jam. Filter dikeringkan pada temperatur kamar dan disimpan. Larutan pewarna: larutan NBT (Nitro Blue Tetrazolium salt) ditambah 35 µl larutan X-fosfat dan 10 ml bufer 3. Semua inkubasi dilakukan pada temperatur kamar dengan goyangan hati-hati kecuali reaksi pembentukan warna.

Antibiotika

BRL 41897 A dan BRL 42948 A, diperoleh dari kebaikan hati DR. I. Chepron, Smith Keine Beech Pharmaceuticals, Brocklan Park, Surry, UK. Mitomisin, Rifampisin, Gentamisin, Kanamisin, Tetrasiklin diperoleh dari SIGMA

Media antibiotika.

Larutan antibiotika steril (telah difilter) dimasukkan ke dalam media Nutrient Broth atau Luria Broth dengan 1,5% agar teknik yang telah disiapkan secara aseptis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

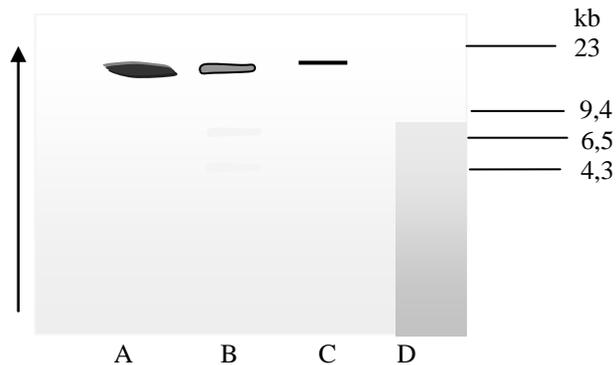
Setelah isolasi kromosom dari mutan mutan KSL19, KSL38, KSL39, KSL41, KSL51, KSL52, KSL57 dan KSL62 kemudian dipotong dengan enzim restriksi, misal enzim restriksi *KpnI*, selanjutnya ditotolkan pada gel agarosa dan di elektroforesis.



Gambar 4. Elektroforegram hasil analisis Southern Blot dari DNA kromosom mutan dipotong dengan *KpnI* dengan probe fragmen *NcoI*.
A: KSL62; B:KSL57; C:KSL52; D:KSL51; E:KSL41; F:KSL39;
G:KSL38; H:KSL19; I:M10; K: λ dipotong dengan *HindIII*.

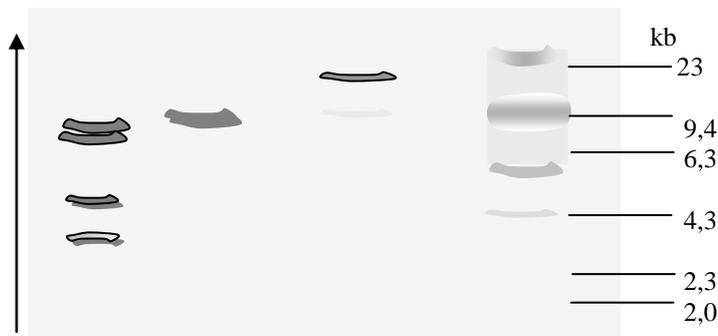
Selanjutnya adalah mentransfer DNA dari gel ke membran nilon seperti cara Southern blot dan dilanjutkan deteksi fragmen DNA yang membawa *TnphoA* dengan metoda DIG konjugat, dan hasilnya (Gambar 4) menunjukkan bahwa kemungkinan mutan KSL62, KSL 52, KSL51, KSL39, KSL38 dan KSL 19 yang membawa satu copy *TnphoA*. Namun hasil ini perlu dikonfirmasi lebih lanjut misal dengan memakai enzim restriksi lain yang memotong fragmen transposon menjadi beberapa bagian.

Hasil analisis lain dengan enzim restriksi yang sama *KpnI* tetapi hanya untuk 3 mutan KSL19, KSL38 dan KSL52 memperlihatkan KSL19 memberikan pita lebih tipis dari yang lain, sehingga kemungkinan KSL 19 saja dari ketiga mutan yang hanya membawa satu copy transposon (Gambar 5).



Gambar 5. Elektroforegram hasil analisis Southern Blot dari DNA kromosom mutan KSL19, KSL38, KSL 19 yang dipotong dengan *KpnI* menggunakan fragmen *NcoI* sebagai probe (lihat gambar 3). A: KSL52; B:KSL38; C:KSL19; D: M10.

Untuk mengkonfirmasi lebih lanjut apakah mutan KSL19 tersebut memang hanya disipi oleh 1 copy transposon atau lebih maka dipakai enzim restriksi yang memotong bagian dalam transposon sehingga menjadi dua bagian, dalam hal ini misalnya *BamHI* yang akan memberikan hasil bila hanya 1 copy yang menyisip pada satu gen maka akan memberikan 2 pita sedang bila 2 copy transposon menyisip akan memberikan 4 pita pada analisis Southern Blot.



Gambar 6. Elektroforegram hasil analisis Southern Blot dari DNA kromosom mutan yang dipotong dengan *BamHI* menggunakan fragmen *EcoRI* sebagai probe (lihat gambar 3). A;KSL52; B:KSL38; C:KSL19; D:M10; E: λ dipotong dengan *HindIII*.

Pada Gambar 6 hasil Southern Blot memberikan ketegasan bahwa KSL19 dari ketiga mutan yang diperiksa adalah mutan yang membawa 1 copy *TnphoA* karena *BamHI* memotong KSL19 menjadi 2 fragmen terhibridisasi, sedang KSL38 dan KSL52 membawa 2 copy transposon karena memberikan 4 fragmen.

Dari hasil Southern blot tersebut jelas menunjukkan bahwa mutagenesis dengan *TnphoA* selain memberikan kemudahan dalam deteksi mutan sejak seleksi koloni yang membawa sisipan *TnphoA* sampai

berapa gen yang tersisipi oleh *TnphoA* dan dilanjutkan nanti dengan mempermudah dalam sekuensing yakni penentuan primer yang akan dipakai.

KESIMPULAN

Dari hasil Southern Blot yang kemudian dilanjutkan dengan deteksi dengan DIG konjugat menunjukkan bahwa minimal satu mutan KSL 19 yang membawa 1 copy dari *TnphoA*, dan 2 mutan yang diperiksa (KSL38 dan KSL52) membawa dua copy *TnphoA* didalam kromosomnya. Hasil analisis menunjukkan bahwa mutagenesis dengan menggunakan *TnphoA* selain memberikan mutan yang juga mudah dideteksi dengan warna biru koloni yang jelas, menghasilkan banyak mutan secara mudah dan mudah mendeteksi gena yang dimutasi dengan analisis Southern Blot.

Tahap selanjutnya adalah mengklon fragmen DNA mutan , terutama mutan KSL19 yang hanya 1 gena disisipi *TnphoA* (membawa 1 copy *TnphoA*), kemudian disusul mengklon gen utuh dari *K.pneumoniae* Wild Type (M10) dengan probe fragmen DNA gen tersebut dari mutan yang telah diklon sebelumnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Rasa terima kasih sebesar-besarnya atas fasilitas yang diberikan oleh Dr. Peter Lambert dari Aston University, Birmingham ,UK dan Dr. Anthony Smith dari Bath University, UK atas segala saran yang diberikan, serta BPPT-Jakarta yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Basker , M.J., C.L. Branch, S.C. Finch, A.W. Guest, P.H. Milner, M.J. Pearson, R.J. Ponsford and T.C. Smak. 1986. Studies on Semi-synthetic 7 α -Formamido-cephalosporins. *J.Antibiotics*. 39(12):1788-1791.
- Basker, M.J., R.A. Edmonson, S.J. Knott, R.J. Ponsford, B. Slocombe and S.S. White. 1984. *In vitro* Antibacterial Properties of BRL36650, a novel 6 α -Substituted Penicillin. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 26:734-740.
- Critchley, I.A., M.J. Baker, R.A. Edmondson and S.J. Knott. 1991. Uptake of a Catecholic Cephalosporin by the Iron Transport System of *E. coli*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 28:377-388.
- Curtis, N.A. C., R.L. Eisenstandt, S.J. East, R.J. Conford, L.A. Walker and A.J. White. 1988. Iron Regulated Outer Membrane Proteins of *E. coli* K-12 and Mechanism of Action of Catechol-substitutecephalosporins. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 32:1879-1886.
- Hill, H.R., C.E., Hunt and J.M. Matsen. 1974. Nosocomial Colonisation with *Klebsiella* type 26 in Neonatal Intensive-care Unit Associated with an Outbreak of Sepsis, Meningitis and Necrotizing Endocolitis. *J. Pediatrics*, 85:415-419.
- Jacoby. 1996. *In vivo* Selection of Porin-deficient Mutants of *Klebsiella pneumoniae* with Increased Resistance to Cefoxitin and Expanded-spectrum Cephalosporin. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 40(2):342-347.
- Kuswandi, M dan Lambert, P.L. 1997. Mekanisme Uptake dari BRL 41897A, Suatu Derivat Sefalosporin yang Mengandung Katekol oleh *Klebsiella pneumoniae*., *Majalah Farmasi Indonesia* 8(1).
- Kuswandi, M. 1997. Isolation of *Klebsiella pneumoniae* Mutants Resistant to the Catecholic Cephalosporin BRL 41897. Proceeding Indonesian Biotechnology Conference, Jakarta.
- Manoil, C. and J. Beckwith. 1985. *TnphoA*: A Transposon Probe for Protein Export Signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82:8129-8133.
- Martinez-martinez, L., S. Hernandez-Alex, S. Alberti, J.M. Tomas, V.J. Benedi and G.A. McGowan, J.E. (1985). Changing Etiology of Nosocomial Bacteremia and Fungemia and other Hospital Required Infections. *Rev. Inf. Dis.*, 7(suppl) :s357-s370.

- Nikaïdo, H. and E.Y. Rosenberg. 1990. Cir and Fiu Proteins in the Outer Membrane of *E. coli* Catalyze Transport of Monomeric Catechols: Study with β -lactam Antibiotics Containing Catechol and Analogous Groups. *J. Bacteriol.*, 172:1361-1367.
- Pornull,K.J., E. Goranson, A.S. Rytting and K. Dornbusch. 1993. ESBL in *E. coli* and *Klebsiella* spp. in European Septisemia Isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 32:559-570.
- Reish, O., S. Ashkenazi, N. Naor, Z. Samra and P. Merlob. 1993. An Outbreak of Multiresistant *Klebsiella* in a Neonatal Intensive-care unit. *J. Hosp. Infect.*, 25:287-291.
- Sambrook,J.T. and E.F.Fritsch.1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Southern, E.M. 1975. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98:503-517.
- Taylor, R.K., C. Manoïl and J.J. Mikalinos. 1989. Broad-Host range Vectors for delivery of Tn ϕ A: Use in Genetic Analysis of Secreted Determinants of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, 171:1870-1878.
- Ullman,U. 1978. The Patterns of Multiple Resistance in *Enterobacteriaceae* of Hospitalized Patients. *Infection*, 6:S219-S223.
- Watanabe, N., T. Nagasu, K.Katsu, and K. Kitoh. 1987. E 0702, A New Cephalosporin, is Incorporated Into *E. coli* Cells via TonB Dependent Iron transport system. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 31:497-504.
- Williams, P. 1983. The Role of the O and K Antigens in Determining the Resistance of *K. aerogenes* to Serum Killing and Phagocytosis. *J. Ge. Microbiol.*, 129, 2181-2191.
- Young, S.E.J. 1982. Bacteremia: A Survey of Cases Reported to the PHLS Communicable Disease Surveillance Centre. *J. Infection*, 5, 19-26