التأثير التطفيري للهايدروكسيل امين على مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة في عزلات من جرثومة *Klebsiella pneumoniae* *

د. خالد دحام احمد
كلية التربية / جامعة الموصل

إبراهيم طلال داؤد
كلية التمريض / جامعة الموصل

الاستلام ١١ / ١١ / ٢٠٠٧

القبول ٠٣ / ٠٣ / ٢٠٠٨

Abstract

Twenty isolates of bacteria *Klebsiella* were collected from different clinical specimens of human infection from Al-Salam, Al-Khansa'a and Ibn-Alatheer hospitals in Mosul city. These isolates were identified by using microscopical examination, culture characteristics, biochemical tests and API20E test used for confirmation detection. The isolates belonged to the species *K. pneumonia*. The ability of the isolates to resist nine antibiotics and heavy metals (cadmium chloride and mercury chloride) were tested. The isolates varied in there antibiotic resistance, but they all they resisted heavy metals. Moreover the mutagen hydroxylamine (H.A.) was used to remove the antibiotic and heavy metal resistance in these isolates by two methods. 1M concentration of (H.A.) for 50 minutes treatment appear to be very effective and high percents of antibiotic resistance for amoxicillin 40% and trimethprim 38% occur in some isolates and for cefalixin 28% in other isolates. Increasing the mutagen concentration to 2M for 50 minutes appeared even more effective.

الخلاصة

جمعت 20 عزلة من جرثومة *Klebsiella* من نماذج سريرية مختلفة في الإنسان ومن مستشفيات السلام والخنساء وابن الأثير بالموصل . شخصت مجهرياً ومزرعياً وكيمياحيويا واستخدم اختبار API20E للتشخيص التأكيدي . أظهرت النتائج انها تعود إلى النوع *K.*

* بحث مستل

pneumonia. اختبرت قابلية هذه العزلات على مقاومة تسعة من المضادات الحيوية وللمعادن الثقيلة (كلوريد الكادميوم، كلوريد الزئبقيك)، وتبين ان هناك اختلافا في مقاومتها للمضادات الحيوية لكنها كانت جميعها مقاومة للمعادن الثقيلة. استخدم مطفر هايدروكسيل امين لإزالة المقاومة في هذه الع زلات وبطريقتي: تركيز معين وفترات معاملة مختلفة ، وتراكيز مختلفة لفترة معاملة معينة. حيث كان تركيز (1) مولاري لمدة (50) دقيقة هو أكثر تأثيراً وبلغت أعلى النسب المئوية لإزالة المقاومة للمضاد اموكسلين وتراي مثبريم هي 40 و38% على التوالي في بعض العزلات، وللمضاد سيفالكسين كانت 28% في عزلات أخرى. زيادة تركيز المطفر إلى 2 مولاري ومدة معاملة 50 دقيقة على ما يبدو كان أكثر تأثيراً.

استعراض المراجع Literature review

يزداد الاهتمام بجرثومة *Klebsiella pneumoniae* لما تسببه للعديد من الأمراض، إذ لوحظ انها المسؤولة عن 8% من حالات الإصابة بعدوى المستشفيات بالولايات المتحدة (1). وهي تأتي بعد جرثومة *E. coli* في حالات الإصابة بتجرثم الدم. فقد لوحظ ان العديد من سلالات *K. pneumoniae* لها القدرة على إنتاج انزيمات بيتا– لاكتام يز واسعة الطيف Extended Spectrum β-Lactamases (ESBLs) التي يتم تشفيرها بصورة رئيسية من مورثات واقعة على البلازميدات وتكون مسؤولة عن المقاومة لمضادات أخرى مثل امينوكلايكوسيدات وان انتشار هذه البلازميدات قد أدى إلى زيادة في انتشار المقاومة لمضادات β-lactam بالعائلة المعوية وخصوصاً بجرثومة *K. pneumoniae* (3,2).

الطفرة الجينية Mutation هي تغيير في تسلسل النيوكليوتيدات أو نوعها أو عددها في الـ DNA بالخلايا الحية وتحدث بفعل عوامل داخلية أو خارجية، الطفرات قد تحدث بصورة طبيعية خلال فترة حياة الكائن وتكون بترددات واطئة وتعرف بالطفرات التلقائية Spontaneous mutation (4). أو قد تنتج الطفرات باستخدام مطفرات Mutagens التي قد تكون بايولوجية أو فيزياوية أو كيميائية وان هذا النوع من الطفرات يحدث بتردد أعلى من الطفرات التلقائية وتعرف بالطفرات المستحثة Induced mutation (5).

وقد استخدمت المواد الكيمياوية المطفرة Chemical mutagen substances للمرة الأولى عام ١٩٤٠ الباحثة Charlotte Auerbach، وتبين ان معظم الطفرات التي تنتج بفعل المطفرات الكيمياوية هي طفرات نقطية Point mutation (6) وتتضمن التغيير في زوج من النيوكليوتيدات، وهذه الطفرات تشمل طفرات استبدال قاعدة Base-substitution mutation التي تتضمن استبدال نيوكليوتيد بآخر ، أما طفرات الإزاحة Framshift mutation فانها

تتضمن إضافة نيوكليوتيد واحد أو أكثر في حالة طفرات الإضافة Addition mutation أو حذف نيوكليوتيد واحد أو أكثر في حالة طفرات الحذف Deletion mutation (8,7).

من المطفرات الكيميائية هو هيدروكسيل امين الذي يتفاعل بشكل متخصص مع السايتوسين (C) حيث يؤدي إلى تكوين مشتق Hydroxylaminocytosine يعاني من تغييرات توتوميرية لكي يزدوج بكفاءة مع الادنين ومن ثم يحصل تحول من نوع Transition G.C. → A.T. (9). يتضمن البحث جمع عزلات جرثومية تعود إلى جنس ال *Klebsiella* . وتشخيصها ثم دراسة التاثير التطفيري للهيدروكسيل امين على إزالة مقاومة هذه العزلات للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة.

المواد وطرائق العمل Materials & Methods

جمع العينات Collection of Specimens

تم جمع ٢٠ عينة من جرثومة *Klebsiella* من مختبرات ا لتشخيص المجهري لمدينة الموصل في مستشفيات السلام العام والخنساء للولادة والأطفال وابن الأثير التعليمي للولادة والأطفال. تعود هذه العزلات إلى نماذج سريرية مختلفة في الإنسان من كلا الجنسين وتضمنت (المهبل Vagina والسائل المنوي Seminal fluid والدم Blood والجروح Wounds والادرار Urine) ، نقلت هذه العزلات إلى مختبراتنا باستخدام موائل الاكار المغذي.

الصفات الزرعية Cultured Characters

استخدمت طريقة التخطيط بتلقيح النماذج الجرثومية على وسط اكار ماكونكي ثم حضنت عند درجة ٣٧°م لمدة ١٨-٢٤ ساعة بعد مدة التحضين ، تمت تنقية المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز التي لها صفات مستعمرات جرثومة *Klebsiella* ولعدة مرات لغرض الحصول على مزارع نقية.

الصفات الشكلية والاختبارات الكيموحيوية Morphological characters & Biochemical tests

تم عمل مسحات من العزلات الجرثومية وصبغها بصبغة كرام Gram stain ثم أجريت العديد من الاختبارات الكيموحيوية والتي شملت:

مجموعة اختبارات IMViC : IMViC group tests

وهي مجموعة مهمة من الاختبارات لتمييز أفراد العائلة المعوية عن بعضها وتضم : اختبار إنتاج الاندول ، اختبار المثيل الأحمر ، اختبار فوكس بروسكور ، اختبار استهلاك السترات.

وقد أجريت هذه الاختبارات تبعاً للطرق الموضحة في (11,10). ثم اجري اختبار API20E حسب طريقة Parks وآخرون (12) وذلك لتأكيد تشخيص العزلات بصورة سريعة حيث يظهر التفاعلات الكيموحيوية الرئيسة بشكل محدد ومنظم.

مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic resistance

حُضّرت محاليل خزينة من المضادات الحيوية المستخدمة وكذلك المعادن الثقيلة ، كما هو موضح في الجدول (١).

الجدول (١): التراكيز الخزينة والنهائية للمضادات الحيوية والسوائل المذيبة لها المستخدمة بالدراسة

المضاد الحيوي	المختصر	التركيز الخزين mg/ml	التركيز النهائي µg/ml	المذيب
امبسلين	Ap	25	50	ايثانول ٧٠%
سيفالكين	Cf	20	30	ماء مقطر
كلورامفينيكول	Cm	20	10	ايثانول مطلق
حامض نالدكسيك	Nal	20	30	ايثانول ٧٠%
تتراساكلين	Tc	12.5	15	ايثانول ٥٠%
تراي مثبريم	Tm	20	10	ماء مقطر
اموكسلين	Ax	25	50	ايثانول ٧٠%
جنتامايسين	Gm	80	30	ماء مقطر
ستربتومايسين	Sm	25	25	ماء مقطر

أما المعادن الثقيلة المستخدمة (كلوريد الكادميوم وكلوريد الزئبقيك) فقد حضرت بتركيز خزين قدره 25 مليغرام/مل، واستخدمت بتركيز نهائي قدره 25 مايكروغرام /مل، أضيفت التراكيز النهائية إلى الأوساط الزرعية بعد تعقيمها باستخدام جهاز المعقام Autoclave وتبريدها لدرجة ٥٠°م ثم صبت بأطباق بتري وزرعت بالعينات الجرثومية قيد الدراسة وحضنت بدرجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة ثم سجلت النتائج.

تطفير عزلات جرثومة *K. pneumoniae* بوساطة المطفر هايدروكسيل امين (H.A.)

Mutagenesis of *K. pneumoniae* isolates by the chemical mutagen Hydroxylamine (H.A.)

استخدمت طريقة Miller (13) للتطفير باستخدام (H.A.) ولكن مع وجود إضافات اخرى تتضمن استخدام تركيز معين لأوقات زمنية مختلفة (تركيز 1 مولاري لأوقات 25، 50، 75، 100 دقيقة)، وكذلك استخدام تراكيز مختلفة ولمدة زمنية معينة.

تحضير الطبق الرئيس للعزلات المعاملة بالمطفر

Master Plate Preparation for Mutagen Treatment Isolates

حضرت تخافيف عشرية من المزرعة الجرثومية التي تحوي عزلات معاملة بالم طفر (H.A) ثم اخذ ٠.١ مل من التخافيف الثلاثة الاخيرة 10^{-5} ،10^{-6} ،10^{-7} وفرشت على وسط الاكار المغذي ثم حضنت بدرجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة، نقلت ١٠٠ مستعمرة عشوائية لكل عزلة إلى أطباق الاكار المغذي لتكوين الطبق الرئيس Master Plate. ثم نقلت على اوساط حاوية على مضادات حيوية ومعادن ثقيلة كلاً على حد ة وحضنت بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة وتم تسجيل النتائج.

النتائج والمناقشة Results & Discussion

جمع العزلات الجرثومية وتشخيصها Collection & Diagnosis of Bacterial Isolates

بعد جمع عينات من جرثومة *Klebsiella* من حالات مرضية مختلفة تضمنت الادرار (٤ عينات)، الدم (٥ عينات)، المهبل (٣ عينات)، السائل المنوي (٤ عينات)، الجروح (٤ عينات) والمعزولة من الإنسان. أجريت الاختبارات الشكلية على العزلات قيد الدراسة ولوحظ ان مستعمراتها كبيرة الحجم، لزجة ومخاطية، ومخمرة على وسط اكار الماكونكي، كما تم صبغ الخلايا بصبغة كرام ولوحظ انها عصيات سالبة لصبغة كرام.

أما الاختبارات الكيموحيوية لعزلات هذه الجرثومة فانها كانت سالبة لاختبار الاندول والمثيل الأحمر وموجبة لاختبار الفوكس بروسكور وكذلك محللة للسترات، في حين كانت سالبة لفحص الاوكسديز، ولغرض التأكد من تبعية العزلات إلى النوع *K. pneumoniae* استخدم اختبار API20E. وأظهرت نتائج الفحص ان العزلات الجرثومية تعود إلى النوع *pneumoniae*.

مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic resistance

اجري فحص المقاومة للمضادات الحيوية لعزلات جرثومة *K. pneumoniae* كما هو مبين في المواد وطرائق العمل وكما موضح في الجدول ٢ حيث اختيرت ٥ عزلات من جرثومة *K. pneumoniae* والتي أظهرت مقاومة عالية لمعظم المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة المستخدمة.

الجدول (٢): مقاومة عزلات جرثومة *Klebsiella pneumoniae* للمضادات الحيوية المستخدمة.

رقم العزلة	منطقة العزل	أوساط الاكار المغذي الحاوي على التراكيز النهائية للمضادات الحيوية المستخدمة (مايكروغرام/مل)								
		Ap 50	Cf 30	Cm 10	Nal 30	Tc 15	Tm 10	Ax 50	Gm 30	Sm 25
1	المهبل	R	S	R	S	S	R	R	S	S
2	السائل المنوي	R	R	R	R	S	R	R	S	S
3	الجروح	R	R	R	S	S	R	R	R	R
4	الدم	R	R	R	R	S	R	R	R	S
5	الدم	R	S	R	S	S	R	R	S	S
6	الدم	R	S	R	S	S	R	R	R	R
7	الادرار	R	R	R	R	R	R	R	S	S
8	الادرار	R	S	R	S	S	R	R	S	R
9	الادرار	R	S	S	S	R	R	R	S	S

حيث تشير:

R: إلى صفة المقاومة للمضاد الحيوي.

S: إلى صفة الحساسية للمضاد الحيوي.

يتبين من الجدول ٢ ان جميع عزلات جرثومة *K. pneumoniae* كانت مقاومة وبنسبة (١٠٠%) للمضادات Ax, Tm, Ap. كما تم الحصول على عزلات من مصدر واحد (الدم) وأظهرت اختلافا في مقاومتها للمضادات الحيوية المدروسة وكذلك الحال بالنسبة للعزلات الجرثومية المعزولة من الإدرار. في حين كانت نسبة المقاومة للمضادات الاخرى على النحو الآتي: (٨٨.٨%) للـCm و(٣٣.٣%) للـCf وللـNal وللـGm وللـSm على التوالي و(٢٢.٢%) للـTc. وهذه تتفق مع ما وضحه الباحث Al-Doori وآخرون (14) في دراسته على الجرثومة نفسها والتي تضمنت دراسة أكثر من ١١٢ سلالة لجرثومة *K. pneumoniae* والتي أظهرت مستوى عالياً من المقاومة للمضادات الحيوية . ان مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية قد تكون ذات أساس وراثي كروموسومي أو لا كروموسومي، نتيجة لوجود البلازميدات والتي بانتقالها بين

الجراثيم تؤدي إلى انتشار المقاومة لهذه المضادات. كما انه يوجد مقاومة ذات أساس غير وراثي تكون نتيجة لوجود تطبع أو تكيف Adaptation لهذا المضاد من جانب الجرثومة ومن ثم يحصل تغيير بالنمط المظهري فقط، وهناك الجراثيم غير الفعالة أيضياً قد تقاوم تأثير المضاد وان مثل هذه المقاومة مهمة في الإصابات المزمنةChronic infections (15).

وبالنسبة للمعادن الثقيلة المستخدمة (كلوريد الكادميوم وكلوريد الزئبقيك) فقد كانت جميع العزلات مقاومة لها وعند التركيز ٢٥ مايكروغرام/مل. ان المورثات التي تشفر المقاومة للمعادن الثقيلة قد تكون واقعة على البلازميدات، فقد وجد في عدد من أفراد العائلة المعوية احتواؤها على البلازميد R100 وهو يمنح المقاومة للعديد من المضادات مثل كلورام فينيكول وتتراساكلين فضلاً عن انه يمنح المقاومة لايونات الزئبق (16). كما وجدت مورثات واقعة على عناصر قافزة تشفر المقاومة للمعادن الثقيلة، ووجد بجرثومة *Pseudomonas putida* احتواؤها على العنصر القافز Tn1861 الذي يشفر المقاومة للزئبق وله القابلية على الحركة من الكر وموسوم إلى البلازميد (17).

استخدام المطفر هايدروكسيل امين Using Hydroxylamine as Mutagen

بعد معاملة عزلات جرثومة *K. pneumoniae* بالمطفر (H.A.) حيث استخدم بتركيز ١ مولاري لأوقات زمنية (٢٥، ٥٠، ٧٥، ١٠٠) دقيقة لجميع العزلات. أظهرت النتائج ان مدة المعاملة بالمطفر ٥٠ دقيقة كانت أكثر الأوقات فعالية في إزالة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة مقارنة بالأوقات الأخرى، يوضح الجدول (٣) هذه المدة.

الجدول (٣): النسب المئوية لإزالة بعض الصفات المظهرية في عزلات جرثومة *Klebsiella pneumoniae* بعد المعاملة بالمطفر هايدروكسيل امين بتركيز ١ مولاري لمدة زمنية ٥٠ دقيقة.

رقم العزلة	مصدر العزلة	عدد المستعمرات الجرثومية المختبرة	النسب المئوية للمستعمرات الجرثومية الفاقدة المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة									
			Ap	Cf	Cm	Nal	Tc	Tm	Ax	Gm	Sm	$HgCl_2$	$CdCl_2$
1	المهبل	100	0	S	0	S	S	38	40	S	S	30	2
2	**السائل المنوي**	100	0	S	2	0	S	16	10	S	S	22	0
3	الجروح	100	2	28	4	S	S	22	18	2	0	28	4
4	الدم	100	0	20	0	4	S	34	8	0	S	18	0
7	الإدرار	100	0	16	0	0	2	12	10	S	S	20	0

يتبين من الجدول (٣) ان أعلى نسبة مئوية للمستعمرات الجرثومية فاقدة المقاومة للمضادات الحيوية باستخدام هايدروكسيل امين كانت للمضاد الحيوي Ax وTm للعزلة ١ فقد بلغت ٤٠% و٣٨% على التوالي. في حين كانت على الوسط الحاوي على Cf للعزلات ٣ و٤ و٧ تتراوح بين ١٦-٢٨%. من جهة أخرى كانت العزلات قد أظهرت نسباً واطئة لفقدان المقاومة لبقية المضادات الحيوية المستخدمة وهي Ap وCm وNal وTc وGm وSm.

أما على الأوساط الحاوية على المعادن الثقيلة نلاحظ تأثير الهيدروكسيل امين قد اظهر أعلى النسب لفقدان المقاومة لكلوريد الزئبقيك للعزلة ١ وبلغت ٣٠% وتراوحت باقي النس ب للعزلات الجرثومية على الوسط نفسه بين ١٨-٢٨% . أما على الوسط الحاوي على كلوريد الكادميوم فان جميع العزلات الجرثومية المختبرة قد أظهرت نسبا واطئة لفقدان المقاومة على هذا الوسط لم تتجاوز ٤%.

ان الاختلاف في نسب إزالة المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيل ة التي حصلنا عليها ربما يعود إلى زيادة في تكرار القاعدة النايتروجينية سايتوسين في المورثات التي حدث فيها التطفير وهنا يمكن ان تكون احتمالية حدوث الطفرة كبير لان المطفر يعمل على السايتوسين . فضلاً عن ذلك قد يعود إلى حجم المورث حيث يمكن للمطفر ان يرتبط بمواقع متعددة للمورث ويظهر تأثيره، من جهة أخرى فان النتائج الواطئة التي حصلنا عليها ربما تعود إلى احتمال حدوث الطفرة في مواقع غير فعالة للمورث بحيث لا تؤثر على فعالية البروتين أو غيره(7).

ان النتائج التي تم الحصول عليها تتفق مع تلك التي حصل عليها الباحث Ahmed وآخرون (18) حيث لاحظ ان هناك نسباً عالية للمستعمرات فاقدة المقاومة للمضادات الحيوية Cf وCm وTc وTm بعد معاملة جرثومة *Proteus mirabils* بالهايدروكسيل امين بتركيز ١ مولاري بزمن ٥٠ دقيقة. وهناك عدد من الظروف الخلوية الحيوية فمثلاً الحالة الايضية والفترة الزمنية للتعريض للمطفر والحرارة وكذلك قابلية الإصلاح للخلايا كل هذه العوامل تؤثر على عملية التطفير بالمواد الكيميائية وكما أوضحت ذلك الباحثة Asia (19) بعد معاملة عزلات جرثومية من جنس *Staphylococccus* بتراكيز مختلفة من حامض النتروز وحصلت على نسباً عالية من إزالة المقاومة للمضادات Ap و Cf.

معاملة عزلات جرثومة *K. pneumoniae* بالمطفر هيدروكسيل امين بتراكيز مختلفة لمدة زمنية معينة

Treatment of *K. pneumoniae* Isolates With Hydroxylamine Mutagen at Different concentrations for Limited Period

عوملت عزلات جرثومة *K. pneumoniae* بالمطفر هيدروكسيل امين بتراكيز مختلفة لمدة زمنية معينة حيث تبين ان تركيز ٢ مولاري لمدة ٥٠ دقيقة هو أكثر تأثيراً من باقي التراكيز. يوضح الجدول (٤) هذه المدة.

الجدول (٤): النسب المئوية لإزالة بعض الصفات المظهرية في عزلات جرثومة *Klebsiella pneumoniae* بعد المعاملة بالمطفر هايدروكسيل امين بتركيز ٢ مولاري ولمدة زمنية ٥٠ دقيقة.

رقم العزلة	مصدر العزلة	عدد المستعمرات الجرثومية المختبرة	النسب المئوية للمستعمرات الجرثومية الفاقدة المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة									
			Ap	Cf	Cm	Nal	Tc	Tm	Ax	Gm	Sm	$HgCl_2$	$CdCl_2$
1	المهبل	100	0	S	2	S	S	40	56	S	S	36	4
2	**السائل المنوي**	100	2	S	0	2	S	18	20	S	S	28	2
3	الجروح	100	0	40	0	S	S	30	22	4	2	32	0
4	الدم	100	4	26	4	0	S	36	16	0	S	26	0
7	الادرار	100	0	20	2	0	2	20	24	S	S	30	0

من الجدول (٤) يتضح ان المورثات نفسها مانحة المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة قد تأثرت بالمطفر (H.A.) حيث ان هناك زيادة في نسبة إزالة المقاومة للمضادات Tm و Ax و Cf ووصلت إلى ٥٦% وكذلك الحال بالنسبة إلى كلوريد الزئبقيك الذي وصل إلى ٣٦% إلا ان هذه الزيادة لم تكن كبيرة.

ان تـأثير الهايدروكسيل امي ن التطفيري يمكن ان يكون فعالاً عند معاملة الـ DNA البلازميدي المنقى من عزلات جرثومة *K. pneumoniae* به وكما أشار إليه Tessman وآخرون (20). حيث أوضح كل من Gardener و Snustad (21) ان تـأثير الهايدروكسيل امين يكون فعالاً عند معاملة DNA البلازميدي به *in vitro* ويكون ذا تأثير منخفض عند معاملته *in vivo*. وهذا يتفق مع ما حصل عليه محمد (22) في تطفير الـDNA البلازميدي لجرثومة *E. coli* باستخدام الهايدروكسيل امين.

المصادر References

1. Perilli, G. M. L.; Coli, A.; Tamborini, A.; Amicosante, G.; Tonido, A.; Endimiani, A. and Luzzaro, F. (2004). Bacteremia dute to *Klebsiella pneumoniae* isolates producing the TEM-52 extended-spectrum β-lactamase treatment out come of patients receiving imipenem or ciprofloxacin, Clin. Infect. Dis., 38:243-249.

2. Laksai, Y.; Severino, M.; Perilli, M.; Amicosante, G.; Bonfiglio, G. and Stefani, S. (2000). First identification of an SHV-12 extended spectrum β-lactamase *Klebsiella pneumoniae* isolated in Italy, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 45:349-351.

3. Shanon, K.; Stapleton, P.; Xiang, X.; Johnson, A.; Beattie, H.; Elbakri, F.; Cookson, B. and French, G. (1998). Extended spectrum β-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial out breaks of infection in the Untied Kingdom, Journal of Clinical Microbiology, 36:3105-3110.

4. Drake, J. W. and Koch, R.E. (1976). Mutagenesis, Vol.4, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., U.S.A.

5. Tortora, G. J., Funke, B.R. and Case, C. L. (1992). Microbiology an Introduction, 4th ed., Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., U.S.A.

6. Avers, C. J. (1980). Genetics, Litton Educational Publishing, Inc., U.S.A..

7. Chuanchuen, R.; Beinlich, K.; Hoang, T. T.; Becher, A.; Karkhoffschweizer, R. R. and Schweizer, H. P. (2001). Cross resistance between triclosan and antibiotic in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: Exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutant overexpressing MexCD-Opr J, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45:428-432.

8. Mays, L. L. (1981). Genetic, A Molecular Approach, Macmillan Publishing Company, Inc., U.S.A..

9. Klug, W. S. and Cummings, M. R. (1986). Concepts of Genetics, 2nd ed., Scott Foresman and Company, U. S. A..

10. Atlas, R. M.; Brown, A.E. and Parks, L. C. (1995). Laboratory Manual Experimental Microbiology, Mosby-Year Book, Inc.

11. Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schrechberger, P. C. and Winn, W.C. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed., J. B. Lippincott Company, Philadelphia, U.S.A..

12. Parks, L. C.; Brown, A. E. and Atlas, R. M. (1995). Laboratory Manual Experimental Microbiology, Mosby-Year Book, Inc., U.S.A..

13. Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U. S. A..

14. Aldoori, Z. A.; Naom, I. S.; Clor, A. M.; Souri, V. F.; Kaddouri, M. M.; Naimi, I.; Ani, Z. A. and Murad, K. (1986). Multiple antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* in Baghdad, J. Biol. Scien. Res., 17:267-277.

15. Jawetz, E.; Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (1998). Jawetz, Melinck and Adlberg's Medical Microbiology, 21th ed., Applteon and Lange California, U.S.A..

16. Rownd, R. H.; Miki, T.; Greenberg, J.; Luckow, V. A.; Miller, J. R.; Huffman, G. A.; Proctor, G. N., Finkelstein, M.; Easton, A. M. and Barton, C. R. (1979). Structure Dissociation and Amplification of Composite R Plasmid DNA In: Mitsuhashi, S. Microbial Drug Rresistance, Vol.2, Japan Scientific Societies Press, Japan.

17. Friello, D. A. and Chakrabarty, A. M. (1980). Transposable Mercury Resistance in *Pseudomonas putida* In: Stuttard, C. and Rozee, K. R. plasmids and transposons, Academic Press, Inc., U.S.A..

18. Ahmed, K. D.; Hasan, A. H. and Aziz, Z. A. (2004). Isolation of induced mutations in some antibiotic resistance genes of *Proteus mirabilis* isolates, J. Education and Science, 16:(4).

19. Asia, Mohammed, A. A., (2006). Diagnostic and Molecular Genetic studies on the Bacteria *Staphylococccus* spp. Isolated from various clinical specimens. M.Sc. Thesis, University of Salah El-Deen.

20. Tessman, I.; Ishiwa, H. and Kumar, S. (1965). The use of hydroxylamine, Science, 148: 507-508.

21. Gardener, E. J. and Snustad, D. P. (1984). Principles of Genetic, 7th ed., John Wiley and Sons, New York, U.S.A..

٢٢. محمد، بيداء غانم (١٩٩٩). دراسة وراثية لجرثومة *Escherichia coli* المعزولة من حالات مرضية مختلفة، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.