تعيين صفة القفز لبعض المورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية في جرثومة *Pseudomonas aeruginosa*

خالد دحام احمد
علوم حياة / كلية التربية

ريان مازن فيصل
علوم الحياة / كلية العلوم

جامعة الموصل

الاستلام 03/12/2006
القبول 07/06/2007

Abstract

Forty isolates of *Pseudomonas* were collected from different human clinical speciemens (Urine, Stool, Sputum, Pus, Blood and Ear swab) . They were microscopically examined and their identification was confirmed by API 20E test which showed that all of them belonged to the species *Pseudomonas aeruginosa* .Their response to eight antibiotics used in this study was tested .There were differences in pattern of their resistance. Depending on their source of isolation six isolates were chosen to determine the transposition property of some antibiotic resistance genes carried on plasmid DNA of the chosen bacterial isolates. It was found that the isolate from ear infections contained transposon with a gene for amplicillin resistance on the plasmid DNA . These genes had the ability to jump from its location on the plasmid DNA to the chromosomal DNA of the laboratory strain *E. coli* JMP294 .

الخلاصة

تم جمع 40 عزلة من جرثومة *Pseudomonas* من نماذج سريرية مختلفة في الإنسان شملت (البول ، الخروج ، القشع ، القيح ، الدم ، مسحات الأذن) . فحصت وشخصت مجهريا وجرى تأكيد التشخيص باستخدام اختبار API 20E فتبين أن جميع العزلات تعود إلى النوع *Pseudomonas aeruginosa* . اختبرت قابلية هذه العزلات على مقاومة ثمانية مضادات حيوية مستخدمة في هذه الدراسة ،وأظهرت هذه العزلات اختلافا في مقاومتها, ثم اختيرت ستة عزلات اعتمادا على اختلاف مصادر عزلها لاستخدامها لتعيين صفة القفز لبعض المورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية والمحمولة على الـ DNA البلازميدي في العزلات المنتخبة من هذه الجرثومة ، أظهرت النتائج احتواء العزلة المعزولة من مسحات الأذن على مورثات قافزة تحمل صفة المقاومة لمضاد الامبسلين واقعة على الـ DNA البلازميدي لهذه العزلة ، وتمكنت هذه المورثات من القفز من موقعها على الـ DNA البلازميدي إلى الـ DNA الكروموسومي للسلالة المختبرية *E.coli* JMP294.

المقدمة

يعد النوع *Pseudomonas aeruginosa* أهم الأنواع التي تسبب الأمـــراض فـــي الإنسان وهي عصيات سالبة لصبغة كرام غير مخمرة لسكر اللاكتوز متحركة بواسطة سوط قطبي واحد ، غير مكونة للمحفظة والسبورات وموجبة تجاه فحصي الكتاليز والاوكسديز (1) والنوع *P.aeruginosa* كبقية الأنواع التابعة لجـــنس *Pseudomonas* متكيـــف تغـــذويا ويستطيع تحليل مدى واسع من المواد العضوية بوصفها مصادر كاربونية ونتروجينيـــة (2). وبسبب قدرة هذه الجرثومة على التواجد في بيئات مختلفة مثل البيئات الرطبة الدافئة والبيئات الفقيرة الحاوية لكميات ضئيلة من المواد العضوية ومياه الصرف والجلـــد والمحاليـــل غيـــر المعقمة واقنعة التنفس الاصطناعي جعلها المسؤولة عن 5–15 % من إصابات المستـــشفيات (Hospital infections) وجعلها الجرثومة المعروفة لـــدى وحـــدات العنايـــة المركـــــزة (Intensive care unit) (1,3).

إن ما معروف عن الإصابات الانتهازية المتسببة من قبل جرثومـــة *P.aeruginosa* أنها صعبة العلاج بسبب قدرة هذه الجرثومة على مقاومة العديد من المضادات الحيوية مثـــل الامبسلين والكلورامفينيكول والسيفاليكسين وحامض النالدكسيك والتتراسايكلين فـــضلا عـــن اختلاف حساسيتها للمضادات الحيوية داخـــل جـــسم الكـــائن الحـــي (*In vivo*) وخارجـــه (*In vitro*) بسبب قدرتها على التطبع (Adaptation) (4) .

قد تكتسب المقاومة للمضادات الحيوية نتيجة لاكتساب البلازميدات (Acquisition of plasmids) إذ تمتلك كلتا المجموعتين من الجراثيم الـــسالبة والموجبـــة لـــصبغة كـــرام بلازميدات مقاومة R plasmids تشفر صفة المقاومة للعديد من المـــضادات الحيويـــة مثـــل البنسلين والاريثرومايسين والتتراسايكلين وغيرها من المضادات الحيوية والتي يكون بعضها ذاتي الانتقال(Self transmissible) والذي بدوره يسمح للبلازميدات الأخرى غير المتنقلـــة ذاتيا بالانتقال إلى خلية أخرى . لقد درس بشكل مفـــصل دور البلازميـــدات فـــي المقاومـــة للمضادات الحيوية ولوحظ أن المحددات r هي المسبب الرئيس في زيادة نسبة الجراثيم متعددة المقاومة للمضادات(Multi drug-resistant bacteria) (5) . وقد لوحظ حديثا أن سبب هذه المقاومة هو امتلاك جرثومة *P.aeruginosa* اثنا عشر نظـــامَ ضـــخٍ معقـــدٍ للمقاومـــة (Resistance modulation efflux system) والى حد ألان قد تمت دراسة أربعة من هذه الأنظمة بشكل مفصل ولوحظ أنها تتحفز عند وجود المادة الأساس التي تعمل عليها (6) .

يمكن أن تنتقل مورثات المقاومة للمضادات الحيوية في البكتريا أيضا عن طريق قطع من الـــ DNA تمتلك القدرة على التنقل إلى مواقع مختلفة فـــي الكروموســـوم والبلازميـــد البكتيري يطلق عليها المورثات القافزة(Transposons) (7) ويعتبـــر اكتـــساب الوحـــدات

الوراثية المتنقلة(Mobile genetic elements) التي تشفر المقاومة للعديد من المضادات الحيوية هي المسؤول الأكثر شيوعا عن تراكم المحددات r في جينيوم الخلايا البكتيرية (8), مثل المورث القافز Tn2603 والذي اظهر بأنه يؤثر تأثيرا مباشرا في انتشار المورثات المسؤولة عن مقاومة الامبسلين (9) .

يهدف هذا البحث إلى عزل طفرات مقاومة للمضادات الحيوية Cm و Nal و Ap و Tc و Cf و Sm و Cip و Tob من عزلات جرثومة *P.aeruginosa* المعزولة من حالات مرضية مختلفة في الإنسان والتحري عن صفة القفز لبعض المورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية في عزلات جرثومة *P.aeruginosa* قيد الدراسة باستخدام تقنيات الاقتران الجرثومي والتحول الوراثي والتحييد البلازميدي(Plasmid curing) .

المواد وطرائق العمل

جمع العزلات الجرثومية

تم جمع 40 عزلة من جرثومة *Pseudomonas* من مختبرات التشخيص المجهري لمدينة الموصل, عزلت هذه الجراثيم من نماذج سريرية مختلفة تضمنت البول Urine والخروج Stool والقشع Sputum والقيح Pus والدم Blood ومسحات الإذن Ear swab في الإنسان ومن كلا الجنسين, نقلت هذه العزلات إلى مختبراتنا باستخدام موائل الاكار المغذي .كما استخدم السلالة *E.coli* JMP294 المجهزة من كلية الطب/جامعة بغداد والسلالة *E.coli* JM83المجهزة من كلية التربية / جامعة الموصل .

تشخيص العزلات الجرثومية

الفحص المجهري والصفات المزرعية

تم عمل مسحات من مستعمرات جرثومة *Pseudomonas* وصبغت بصبغة كرام ، وكذلك لوحظت أشكال المستعمرات المنفردة وصفاتها من حيث ارتفاع المستعمرات وحجمها وشكل حوافها .

الاختبارات الكيموحيوية

لغرض التاكد من تبعية العزلات الجرثومية للنوع*P.aeruginosa* أجريت عليها بعض الاختبارات الكيموحيوية والتي شملت اختبار إنتاج انزيم الكتاليز (10) اختبار إنتاج صبغة البايوسيانين (2), ثم اجري الاختبار API 20E المجهز من شركة Biomerieux وحسب طريقة (10).

مقاومة المضادات الحيوية

من اجل تحديد العزلات الطافرة من جرثومة *P. aeruginosa* التي لها القابلية على مقاومة المضادات الحيوية الكلورامفينيكول (Chloramphinicol,Cm)، حامض

النالدكسيك(Nalidixic acid,Na) ، الامبسلين(Ampicillin,Ap) ، التتراسايكلين(Tetracyclline,Tc) ، السيفالكسين(Cefalexin,Cf) ، الستربتومايسين(Streptomycin,Sm) ، السبروفلوكساسين(Ciprofloxacin,Cip) ، التوبرامايسين(Tobramycin,Tob) ، لقحت أوساط المضادات الحيوية المحضرة حسب طريقة Grant وPittard (11) بعزلات هذه الجرثومة بطريقة التخطيط ، حضنت الأطباق بدرجة 37 ^{o}م ولمدة 24 ساعة ثم حددت العزلات المقاومة والحساسة تجاه المضادات الحيوية المستخدمة.

تعيين صفة القفز لبعض المورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية في جرثومة *P.aeruginosa*

استخدمت الطريقة المذكورة في Freifelder (12) للتحقق فيما اذا كانت المورثات الواقعة على الـ DNA البلازميدي لجرثومة *P.aeruginosa* قافزة ام لا وتتضمن الخطوات الاتية.

أولا:الاقتران الجرثومي

اتبعت طريقة Olsen واخرين(13) في الاقتران الجرثومي ,إذ استخدمت السلالة المختبرية *E. coli* JMP294 كخلايا مستلمة لدراسة صفة الانتقال الذاتي للـ DNA البلازميدي في عزلات جرثومة *P. aeruginosa* من خلال عملية الاقتران الجرثومي بين جنسين مختلفين ،تم الاستفادة من حساسية السلالات المختبرية المستخدمة للمضاد الحيوي الامبسيلين ومقدرتهما على تخمير سكر اللاكتوز على عكس جرثومة *P. aeruginosa* في الحصول على سلالتين جرثوميتين مختلفتين بعليمتين وراثيتين ثم اختبر نمو المستعمرات المقترنة على أوساط حاوية على المضادات الحيوية الأخرى قيد الدراسة التي كانت السلالة المستلمة حساسة لها بينما تقاومها السلالة الواهبة.

ثانيا:تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي للمستعمرات المقترنة

أجريت عملية التحييد للمحتوى البلازميدي في بعض المستعمرات المقترنة المنقاة على وسط الاقتران نفسه لتحفيز المورثات القافزة على القفز, وذلك باستخدام درجة الحرارة 44 ^{o}م عاملا محييدا وحسب طريقة Baldwin و Strickland (14) .

ثالثا:عزل الـ DNA البلازميدي من المستعمرات المقترنة والمحتفظة بصفة المقاومة للمضادات الحيوية بعد تحييدها وتحويله إلى سلالة *E. coli* JM83 المختبرية

لإثبات أن بقاء المقاومة للمضادات الحيوية بعد التحييد يعود إلى امتلاك جرثومة *P. aeruginosa* مورثات قافزة وليس إلى فشل عملية التحييد ، تم تطبيق خطوات عزل الـ DNA البلازميدي من المستعمرات المقترنة وحسب طريقة Birnboim و Doly (15)

ثم تحويلها إلى السلالة المختبرية *E. coli* JM83 حسب طريقة Lederbergو Cohen (16).
إن انتقال صفة المقاومة لهذه المضادات الحيوية إلى السلالة المختبرية يدل على فشل عملية التحييد ، أما عدم نقل هذه الصفة فتدل على حدوث عملية القفز Transposition من الـ DNA البلازميدي إلى الـ DNA الكروموسومي للسلالة *E.coli* JMP294 .

النتائج والمناقشة

جمع العزلات الجرثومية وتشخيصها

بعد زرع العزلات على الأوساط المختبرية لوحظ من الصفات المزرعية أن مستعمراتها كبيرة الحجم (1.5-2.5mm) قليلة التحدب وذات مظهر خشن محاطة بحافة مسننة من النمو كما صبغت بصبغة كرام للتعرف على شكل الخلايا فلوحظ أنها عصيات سالبة لصبغة كرام قليلة الإنحناء . كانت هذه العزلات موجبة لفحص الأوكسديز والكتاليز ومحللة للسترات ، وكانت نسبة 82.5% منها منتجة لصبغة البايوسيانين بعد تنميتها على وسط اكار عزل الزوائف . ولغرض التأكد من تبعية العزلات المنتخبة إلى النوع *P.aeruginosa* استخدم اختبار API 20E

مقاومة المضادات الحيوية

بعد إجراء فحص المقاومة للمضادات الحيوية لعزلات جرثومة *P. aeruginosa* والسلالات المختبرية قيد الدراسة للمضادات الحيوية اختيرت 6 عزلات من مجموع العزلات المشخصة كلا من مصدر مع مراعاة الحصول على اختلافات في المقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة كما هو في الجدول(1).

جدول (1) مصادر عزلات جرثومة *P. aeruginosa* والسلالات *E. coli* المختبرية قيد الدراسة ومقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة

رقم العزلة	منطقة العزل	أوساط الأكار المغذي الحاوي على التراكيز النهائية للمضادات الحيوية المستخدمة بـــ $\mu g / ml$							
		Cm (10)	Nal (30)	Ap (50)	Tc (15)	Cf (30)	Sm (25)	Cip (30)	Tob (10)
1	البول	R	R	R	R	R	R	R	S
2	الخروج	R	R	R	R	R	R	S	S
3	القشع	R	R	R	R	R	R	S	R
4	القيح	R	R	R	R	R	R	S	S
5	الدم	R	R	R	R	R	S	S	S
6	مسحات الأذن	R	R	R	R	R	S	R	S
E. coli JM83	مختبرية	S	S	S	S	S	R	S	S
E. coli JMP294	مختبرية	R	S	S	R	R	S	S	S

حيث تشير

R : إلى صفة المقاومة للمضاد الحيوي

S : إلى صفة الحساسية للمضاد الحيوي

تعيين صفة القفز لبعض المورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيويـــة فـــي جرثومـــة *P. aeruginosa*

للتحقق من كون المورثات المحمولة على الـــ DNA البلازميدي لجرثومة *P. aeruginosa* قافزة أم لا تم إتباع الخطوات الاتية:

أولا:الأقتران الجرثومي

بعد حصول الاقتران بين عزلات جرثومة *P. aeruginosa* الواهبة والسلالة *E.coli* JMP294 المستلمة واللتان تختلفان على الأقل بعليمتين وراثيتين ,تم الحصول على النتـــائج التالية الموضحة في الجدول (2).

الجدول (2) نتائج عملية الاقتران الجرثـومي لعـزلات *P. aeruginosa* مـع الـسلالة المختبرية *E. coli* JMP294

عزلات *P. aeruginosa* الواهبة		السلالة المستلمة *E. coli* JMP294	الصفات الوراثية للمستعمرات المقترنة على اوساط المضادات الحيوية المناسبة	ترددالاقتران ($\times10^{-7}$)
رقم العزلة	صفة المقاومة للمضادات الحيوية			
1	Ap^R,Nal^R, Sm^R,Cip^R,lac^-	Ap^S,Nal^S, Sm^S, Cip^S , lac^+	Ap^R,Nal^R, Sm^S, Cip^S , lac^+	0.50
4	Ap^R,Nal^R, Sm^R, lac^-		Ap^R,Nal^R, Sm^S, lac^+	0.76
5	Ap^R,Nal^R, lac^-		Ap^R,Nal^R, lac^+	0.97
6	Ap^R,Nal^R, Cip^R,lac^-		Ap^R,Nal^R, Cip^S ,lac^+	2.35

وضع الحرف R فوق رمز المضاد يشير إلى امتلاك الجرثومة ذلك المورث

وضع الحرف S فوق رمز المضاد يشير إلى عدم امتلاك الجرثومة ذلك المورث

lac^+ يشير إلى امتلاك الجرثومة لمنظومة اللاكتوز, lac^- عدم امتلاكها لمنظومة اللاكتوز

يوضح الجدول (2) أن عملية الاقتران بين العـزلات (1 و 4 و 5 و 6) الواهبـة أدت إلى انتقال صفة المقاومـة لـبعض المـضادات الحيويـة إلـى الـسلالة المختبريـة *E. coli* JMP294 المستلمة . إذ ظهرت المستعمرات المقترنة بلـون وردي علـى وسـط الماكونكي الحاوي على المضاد الحيوي الأمبسلين وذلك بعد تنقيتها لأكثر من مرة على الوسط نفسه . أعيد زرع المستعمرات المقترنة على أوساط غذائية تحوي المـضادات Nal و Sm و Cip كلا على حدة ولوحظ أن المستعمرات المقترنة استطاعت أن تنمو علـى الأوسـاط الغذائية الحاوية المضاد Nal ولم تستطيع ان تنمو على الأوساط الحاوية علـى المـضادات Sm و Cip . وتشير مقاومة المستعمرات المقترنة إلـى المـضادات Nal وAp إلـى أن مورثات المقاومة لهذه المضادات تقع على جزيئات بلازميدية تمتلك صفة الانتقال الذاتي إلى السلالات المستقبلة .

إن عدم انتقال صفة المقاومة للستربتومايسين في العزلة (1 و 4) وكذلك عدم انتقال صفة المقاومة للسبرودار في العزلة (1 و 6) إلى السلالة المستلمة والموضحة نتائجهـا فـي الجدول (2) يبرهن على أن المورثات المسؤولة عن مقاومة هذين المضادين تقـع علـى الكروموسوم البكتيري وهذا يتفق مع Holloway وآخرين (17) إذ لوحظ أن المقاومـة

للستربتومايسين في سلالة PAO *P. aeruginosa* لم تنتقل إلى السلالات المختبرية بل تقع على الكروموسوم قريبا من المورث *argF* وعلى بعد55 دقيقة في كروموسوم هذه البكتريا.

ومن الجدول (2) يلاحظ أن تردد الإقتران بين عزلات جرثومة *P.aeruginosa* قيد الدراسة والسلالة المختبرية JMP294 هي أعلى مما حصل عليه Tsuda وآخرون (18) في سلالة PAO *P.aeruginosa* والتي بلغت أقل من (10^{-8}) . لم تنجح عملية الاقتران الجرثومي بين العزلتين (2 و 3) والسلالة *E. coli* JMP294 وقد يعود السبب إلى فقدان أحد العناصر الضرورية لإتمام عملية الاقتران وبالتالي تنعدم صفة الانتقال الذاتي في بلازميدات هذه الجرثومة .

إن انتقال صفة المقاومة لبعض المضادات الحيوية من عزلات جرثومة *P. aeruginosa* عن طريق الاقتران إلى السلالات المختبرية من جرثومة *E. coli* يتفق مع ما توصل اليه Marchandin وآخرون (19) اذ لاحظوا ان المورثات المسؤولة عن إنتاج انزيمات بيتا – لاكتاميز واسعة المدى (Extended Spectrum β-lactamase) والمورثات المقاومة لمضادات الكلايكوسيدات الأمينية والكلورامفينيكول ومركبات السلفا تشفر جميعها من قبل بلازميد حجمه180 كيلو قاعدة يمتلك صفة الانتقال الذاتي إلى سلالة *E. coli* HB101 عن طريق الاقتران.

ثانيا:تحييد المحتوى البلازميدي للمستعمرات المقترنة

بعد الحصول على المستعمرات المقترنة أعيد زرعها لعدة مرات على نفس الوسط المستخدم في عملية الاقتران لتحفيز مورثات مقاومة المضادات القافزة بالقفز ، ثم اجري عملية تحييد المحتوى البلازميدي لهذه المستعمرات المقترنة باستخدام درجة حرارة 44 ^{o}م بوصفه عاملا محيّدا . يوضح الجدول (3) النتائج التي حصلنا عليها من تحييد المستعمرات المقترنة من جرثومة *P. aeruginosa* مع السلالة *E. coli* JMP294 .

الجدول (3) النسب المئوية لعملية تحييد المحتوى البلازميدي لبعض المستعمرات المقترنة من جرثومة *P.aeruginosa* الواهبة مع سلالة *E. coli* JMP294 المستلمة باستخدام درجة حرارة 44 ^{o}م بوصفه عاملا محيدا

رقم العزلة المقترنة	رقم المستعمرة المقترنة	النسبة المئوية لتحييد المورثات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية المنتقلة بالاقتران	
		Ap	Nal
1	1	96	94
	2	100	100
	3	94	98
4	1	96	S
	2	100	92
	3	94	96
5	1	98	96
	2	92	98
	3	98	94
6	1	0	100
	2	2	98
	3	0	94

يوضح الجدول (3) أن جميع المستعمرات المقترنة من العزلة (1 و 4 و5) مع السلالة *E. coli* JMP294 قد حصل فيها تحييد لمحتواها البلازميدي وبنسب عالية تراوحت من (90–100 %) للمضادين Ap وNal وذلك باستخدام درجة حرارة 44 ^{o}م بوصفها عاملا محيدا, كما يلاحظ من الجدول نفسه أن المستعمرات المقترنة الناتجة من إجراء عملية الاقتران بين العزلة 6 من جرثومة *P. aeruginosa* المعزولة من الاذن وسلالة *E. coli* JMP294 لم يحدث لها تحييد لمقاومة الأمبسلين حيث كان أعلى نسبة تحييد حصل عليه هو (2 %) وهذا يدل إما على فشل عملية التحييد أو يدل على وجود مورثات قافزة تشفر المقاومة للأمبسلين تقع على بلازميدات جرثومة *P. aeruginosa* اذ ادى تكرار زرع المستعمرات المقترنة على نفس الوسط المستخدم في الاقتران والحاوي على الأمبسلين إلى تحفيز هذا المورث المتنقل على القفز إلى الكروموسوم وهذا ما لاحظهTomich وآخرون (20) . كما يلاحظ أيضا من الجدول (3) حدوث تحييد بنسبة

عالية (90–100 %) لمقاومة حامض النالدكسيك في العزلة 6 وهذا يشير إلى عـدم وقـوع المورث المسؤول عن مقاومة هذا المضاد على المورث المتنقل المقاوم للأمبسلين .

ثالثا:عزل الـ DNA البلازميدي من السلالات المقترنة والمحيدة المحتفظة بصفة المقاومة للمضادات الحيوية وتحويله إلى السلالة *E. coli*JM83

لغرض التأكد من أن بقاء المقاومة للمضادات الحيوية لبعض المـستعمرات المقترنـة المحيدة يعود إلى وجود مورثات قافزة محمولة على بلازميدات جرثومـة *P. aeruginosa* وليس إلى فشل عملية التحييد فقد تم اختيار بعض السلالات المقترنة والمحيدة والتي احتفظـت بصفة المقاومة للمضادات الحيوية في العزلة (6) لغرض عزل الـ DNA البلازميدي منها ثم حول إلى سلالة JM83 *E. coli* وكانت النتيجة انتقال صفة المقاومة لحامض النالدكـسيك لبعض المستعمرات المتحولة المقاومة لهذا المضاد بينما لم يحصل انتقـال لـصفة المقاومـة للأمبسلين ولجميع المستعمرات المختبرة وهذا ما يؤكد قفز المورثات المتنقلـة التـي تـشفر المقاومة لمضاد الأمبسلين من بلازميدات العزلة 6 من جرثومة *P.aeruginosa* والمعزولة من مسحات الأذن إلى كروموسوم سلالة JMP294 *E.coli* ، وهذا ينطبق مع ماتوصل اليـه Hasan واخرون (21) عند استخدام نفس الطريقة في دراسة صفة القفز لمورثات المقاومـة للمضادات الحيوية في جرثومة *Proteus mirabilis* إذ اظهر الـ DNA البلازميدي لهـذه الجرثومة احتواءه مورثات قافزة تشفر المقاومة للمضادين الامبسلين والتتراسايكلين .

كمـا لاحـظ Moore و Krishnapillai (22) امـتلاك جينـوم بكتريـا *P. aeruginosa* نوعين من المورثات المتنقلة وهي Tn7 و Tn501 والتي تمكنت مـن القفز على البلازميد RP4 في هذه الجرثومة وبالتالي سهلت من عملية نقـل تلـك المقاومـة وبتردد أعلى من غيرها من ميكانيكيات إكساب المقاومة, اذ يمتلك البلازميد RP4 القدرة على الانتقال الذاتي بين افراد جنس الـ *Pseudomonas* فضلا عن قدرته على الانتقال إلى معظم أجناس العائلة المعوية Enterobacteriaceae (24,23) .كما تتفق نتائجنا مع ما توصـل إليه Nass وآخرون (25) عندما لاحـظ امـتلاك بكتريـا *Proteus mirabilis* المـورث bla_{TEM-67} واقعا" على بلازميد بحجم 48 Kb هذا المورث مسؤول عـن مقاومـة مـضاد الأموكسيلين ويمتلك القابلية على القفز إلى الـ DNA الكروموسومي لبكتريا *E.coli* .

المصادر

1. Finegold, S. M. and Martin, W. J.," Diagnostic microbiology". 6th ed. , C. V. Mosby Company U.S.A . (1982)
2. Collee, J. G. ; Fraser, A. G. ; Marmion, B. P. and Simmons, A . " Mackie and McCartney Practical medical microbiology". 14th ed. Longman Singapore publishers Ltd. , Singapore . (1996) .
3. Loureiro, M. M. ; Moraes, B. A. de. ; Mendonca , VLF. ; Pinheiro, G. S. and Asensi, M.D., Rio de janeiro, 97: 387-394 . (2002).
4. Nicas, T. I. and Hancock, R. E. W. J. Bacteriol., 143 : 872-878. (1980).
5. Nakahara, H. and Kozukue, H., J. of Clinical Microbiology, 15 : 166-168 . (1982).
6. Chuanchuen, R. ; Beinlich, K. ; Hoang, T. T. ; Becher, A. ; Karkhoff-Schweizer , R. R. and Schweizer, H. P., J.Antimicrobial Agents and Chemotherapy , 45 : 428-432 . (2001).
7. Hall, R. M. and Stokes, H. W., Genetica , 90 : 115-132 . (1993).
8. Carattoli, A. ; Villa, L. ; Pezzella, C. ; Bordi, E. and Visea, P. Emerging Infections Diseases, 7 : 444-447 . (2001).
9. Tanaka, M. ; Harafuji, H. and Yamamoto, T., J. Bacteriol. , 151 : 723-728 . (1982).
10. Atlas, R. M. ; Brown, A. E. and Parks, L. C." Laboratory manual, experimental microbiology". Mosby-year book , Inc.U.S.A. (1995).
11. Grant, A. J. and Pittard, J., J. Bacteriol. . 120 : 185-188 . (1974).
12. Freifelder, D."Molecular Biology , A comprehesive introduction to prokaryotes and eukaryotes".Science Books international. Inc. New York .U.S.A . (1983).
13. Olsen, J. E. ; Brown, D. J. ; Baggesen, D. L. and Bisgaard, M. Epidemiol. Infect. 108 : 243-260 . (1992).
14. Baldwin, J. N. and Strickland, R. H., J. Appl. Microbiol. 18 : 628-630 (1969).
15. Birnboim, H. C. and Doly, J., Nucleic Acid Research . 7 : 1513-1524 . (1979).
16. Lederberg, E. M. and Cohen, S. N., J. Bacteriol. 119 : 1072-1074 . (1974).
17. Holloway, B. W. ; Haas, D and Morgan, A. F. "Interaction between R plasmids and the bacterial chromosome In : Mitsuhashi , S. Microbial Drug resistance " Vol. 2 . Japan Scientific societies press .Japan . (1979).
18. Tsuda, M. Oguchi, T. and Iion, T., J. Bacteriol. , 147 : 1008-1014 . (1981).

19. Marchandin, H ; Pierre, H. J. ; Champs, C. D. ; Sirot, D. ; Darbas, H., Perigault, P. F. and Carriere, C., Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44 : 213-216 . (2000).
20. Tomich, P. K. ; An, F. Y. and Clewell, D. B., J. Bacteriol. 141 : 1366-1374 . (1980).
21. Hasan, A. H. ; Ahmed , K. D. and Mustafa , D. N., J. Al-Raffidain Sciences .2:16 . (2004).
22. Moore, R. J. and Krishnapillai, V., J. Bacteriol. , 149 : 276-283 . (1982).
23. Iyobe, S. ; Hasuda, K. ; Kato, T. ; Sagai , H. and Mitsuhashi, S., ” Drug resistance plasmids in *Pseudomonas aeruginosa* In : Susumu Mitsuhashi, Microbial Drug Resistance” . Japan Scientific Societies Press.Japan . (1979).
24. Nakazawa, T.” Thermosensitivity of TOL Plasmid in *Pseudomonas aeruginosa* and Isolation of RP4-TOL recombinants in microbial drug resistance In : Susumu Mitsuhashi, Microbial Drug Resistance “.Japan Scientific Societies Press. Japan . (1979).
25. Naas, T., Zerbib , M., Garlich, D. and Nordmann, P. Antimicrobial Agents and Chemotherapy .47:19-26 . (2003) .