أستخدام أشعة بيتا وجاما كمثبط لمضخة الدفق MexAB-OprM ومضخة الدفق MexXY لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

خالد هادي مهدي[1] نبراس رضا محمد[2] هناء صالح سبع[2]

[1] جامعة بغداد / كلية التربية للعلوم الصرفة /ابن الهيثم

[2] الجامعة المستنصرية / كلية العلوم

الخلاصة

تم الحصول على بكتريا ***Pseudomonas aeruginosa*** من مسوحات اخذت من مرضى لمناطق الوجه واعلى الصدر و الظهرفي مستشفيات مدينة الطب والصدر، نشطت هذه البكتريا وأجري لها تخافيف حسب الطريقة المتبعة ادناه ، تم تعريضها الى أشعة بيتا وجاما الصادرة من مصدر ^{137}CS وبفعالية (1.712μci) والباعث لأشعة بيتا بطاقة 513.97 keV وبشدة 94.4% أضافة الى أشعة جاما بطاقة 661.66 keV وبشدة 85.1% وبجرعة 1.460راد لكل ساعة وبفترات (3,2,1) ساعة مستمرة و2 ساعة متقطعة ، أجري لها سلسلة من التخافيف العشرية بعد التعريض وأخذ من التخفيف الأول وزرعت على الوسط الزرعي وحسب عدد مستعمراتها ونسبة القتل لها ، وتم ملاحظة بزيادة وقت التعرض للأشعاع تزداد نسبة القتل للبكتريا وظهرت عليها تغيرات مظهرية واضحة في شكل المستعمرات وقوامها وتشوهات واضحة عليها، بعدها أستخلص RNA من البكتريا المعرضة للأشعاع وبكل الفترات ودرس تعبيرها الجيني بأستعمال تقنية qRT–PCR ، وحسب تعبيرها الجيني حسب معادلة Livak للكشف عن التعبير الجيني لمضخة الدفق MexAB-OprM بدراسة الجين *mexB* والكشف عن التعبير الجيني لمضخة الدفق MexXY بدراسة الجين *mexX* قبل التعريض للأشعاع وبعد التعريض للأشعاع من أجل المقارنة ، وتم ملاحظة ان بكتريا *P.aeruginosa* كان تعبيرها الجيني جدا عالي لهذه المضخات قبل التعرض للاشعاع وهذا يدل على مقاومة البكتريا و التعبير لمضخة الدفق من أجل المقاومة لدفق مضادات أو مواد مختلفة في تركيبها الكيميائي ، وبعد التعريض لأشعة بيتا وجاما أصبح تعبيرها الجيني قليل جدا وقد وصل الى الصفر ، حيث كانت قيم التعبير الجيني قليلة جدا بعد التعرض للأشعاع وهذا يدل على أن البكتريا فقدت المقاومة ولم تعبر جينيا لهذه المضخات أي أنها أصبحت ضعيفة وأن DNA متأثر بأشعة بيتا وجاما وهذا واضح من قلة التعبير الجيني للمضخات أعلاه بعد التعرض لأشعة بيتا وجاما ، وهذا يدل على أن أشعة بيتا وجاما هي مثبط جيد وكفوء وفعال لمضخات الدفق MexAB–OprM ومضخة الدفق MexXY (وهي المضخات المسؤولة عن دفق مضادات متعددة وهي السبب في المقاومة) .

Use of beta and gamma inhibitor pump stream MexAB-OprM pump stream MexXY bacterium Pseudomonas aeruginosa rays

Khalid H. Mahdi[1] Nebras R. Mohammed[2] Hanaa S. said[2]

[1]Department of Physics – College of Education-Ibn Al Haitham– Baghdad University

[2]Department of Biology – College of Science – Al- Mustansiriya University

Abstract

Pseudomonas aeruginosa was obtained from samples collected in Medical and Al-Sader hospetals from faces and shollders of patients , they activated then held conducted her dilution according to the method used below ,it has been exposed to Beta and Gamma irradiation that emitted from ^{137}CS source with activity 1.712 **μ**ci,which emitte Beta and Gamma irradiation with energy of 513.97 keV with indensity of 94-4% and Gamma with energy of 661.66 keV with intensity of 85.1% ; or a dose of 1.460 rad per hour. for a time of (1,2,3,) hr. for a contenouse exposure and 2 hr. by two steps , it has been conducted her dilution , taked from the first diluted and culture on cultural media ,it has been calculated number of colony and percentage killing of P.aeruginosa . It has been obtained to increase the times increased the percentage killing of P.aeruginosa , the morphology of colony were different from origin appear her clea rchange .

Detection of gene expression of *P.aerginosa* before exposure to Beta and Gamma irradiation and after exposure to Beta and Gamma irradiation was performed done by using q RT-PCR technique after RNA extraction of *P.aerginosa* and cDNA synthesis ,calculated gene expression according to Livak equation to detection of gene expression of MexXY and MexAB-OprM efflux pumps by studied *mexB* and *mexX* gene , The results showed that gene expression were high in efflux pumps to MexXY and MexAB-OprM efflux pumps of *P.aerginosa* before exposure to Beta and Gamma irradiation . but The results showed that gene expression were very fewer in efflux pumps to MexXY and MexAB-OprM efflux pumps of *P.aerginosa* after exposure to Beta and Gamma irradiation , and the gene expression to MexXY efflux pumps and MexAB-OprM efflux pums reach until zero . The Beta and Gamma irradiation was efficiency, active , inhibitors to MexXY and MexAB-OprM efflux pumps . This result give indicat to DNA was effected by Beta and Gamma irradiation , Beta and Gamma irradiation were efficient to killing of *P.aeruginosa* .

المقدمة

تسبب بكتريا *P. aeruginosa* أمراضا عديدة في جسم الأنسان منها أخماج الجروح والحروق ، وأخماج العين ، وأخماج الجلد ،والمجاري البولية ، والأذن الوسطى ، وتجرثم الدم Bacteremia ، وتسبب أمراضا عديدة عند الأشخاص الذين يعانون من نقص المناعة والأشخاص المصابين بالأيدز فهي أحد أهم الأنواع البكتيرية المسببة لما يعرف بالأصابات المكتسبة في المستشفيات

Nosocomial infection [1] . يعود سبب صعوبة علاج الأصابات بهذه البكتريا الى مقاومتها للعديد من المضادات المايكروبية ، مثل مضادات البيتالاكتام والماكروليد ، فضلا عن مقاومتها العالية لمضادات فلوروكوينولونات Flouroquinolones ، مما يجعلها احدى أخطر الممرضات وأكثرها إصابة للأنسان [2].

إن ألية الضخ البكتيري المعتمد على الطاقة هو السبب الرئيسي في مقاومة المضادات وخاصة في الممرضات الأنتهازية ذات المقاومة المتعددة للمضادات [3]. ومضخات الدفق وهي ناقلات بروتينية تقع في الغشاء السايتوبلازمي للخلايا وتؤدي دور مهم في دفق العديد من المواد وطرحها الى خارج الخلية البكتيرية ، يشفر جينوم هذه البكتريا لأنواع من مضخات الدفق المشفر لها كروموسوميا والتي تعود للعائلة Resistance Nodulation cell-Division (RND) ، وهذا مايسمى بمضخات دفق المتعددة MDR–Efflux pumps مثل مضخة الدفق MexAB–OprM المشفر لها كروموسوميا ومضخات دفق أخرى مهمة سريريا مثل MexXY [5,4] ، ومن أمثلة المضادات التي تدفقها هذه المضخات الى خارج الخلية البكتيرية والتخلص منها هي , Tetracycline [6] Macrolides, Trimethoprim,B- Chloramphenicol, Quinolones, Novobiocin, lactams).

أن حدوث الطفرات في الجينات يؤدي إلى حصول تطور سريع في مقاومة بكتريا *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية وذلك خلال مدة قصيرة من أستعمال هذه المضادات في العلاج، ويعد هذا النوع من المقاومة خطرا وذلك بسبب تطور المقاومة أثناء العلاج وهو ما قد يسبب فشلا في علاج إصابات هذه البكتريا ، الأمر الذي يتطلب البحث عن علاجات جديدة أو أستعمال أكثر من علاج في ان واحد للحد من مقاومة هذه البكتريا [8,7] والبحث عن مثبطات لهذه المضخات التي لها دور كبير في المقاومة لأنواع مختلفة للمضادات .

وتقنية q RT-PCR هي إحدى تقنيات البايولوجي الجزيئي تستعمل لتضخيم الجين وتحديد وجوده ، فضلا عن تحديد التعبير الجيني له حتى ولو لكمية قليلة من الجينات ، تسمح لتضخيم منتج Complemantry DNA (cDNA) المنسوخ عكسيا من mRNA وهذا ما يسمى quantitative reverse transcription Real Time PCR (q RT –PCR) الذي يعتمد على إستعمال أنزيم Reverse Transcriptase المسؤول عن تحويل (RNA) الى (cDNA) ، ممكن عمل مقارنة للجين الهدف Target gene مع الجين الأصلي House keeping gene الذي يكون ضروري وأساسي لحياة الخلية ويكون بناء mRNA منه مستقر وامن في أنسجة مختلفة ، وتتميز تقنية Real Time PCR بعدم الحاجة لأجراء الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز لناتج تفاعل تضخيم الجينات أذ يعمل الجهاز على التفلور والناتج من عملية تضخيم الجين [9].

أشعة بيتا هي عبارة عن الكترونات أو بوزونات (الكترون موجب الشحنة) تمتلك سرعة عالية تنتج عن النواة نتيجة لتفكك البروتون أو النيوترون تنتج البوزون والألكترون ويرافق أنبعاثها جسيم يعرف النيوترينو أو مضاد النيوترينو على التوالي ، أشعة جاما هي أشعة كهرومغناطيسية تصدر نتيجة لأنتقال النواة من الحالة المثارة مباشرة الى الحالة الارضية أو على مراحل بالأنتقال الى حالة أقل أثارة ، ثم أقل وصولا للحالة الارضية نتيجة أية عملية نووية أخرى كأنبعاث الفا أو بيتا أو تفاعل نووي اخر ، للتخلص من طاقة الأثارة [10].

المواد وطرائق العمل

أولا : تعريض خلايا بكتريا *P.aeruginosa* لأشعة بيتا وكاما وحساب نسبة القتل :

❖ **زرع البكتريا و تحديد نسبة القتل**

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [11] لتعريض خلايا البكتريا تحت الأختبار لأشعة بيتا وجاما وكالاتي :

- نقلت مستعمرات نقية لبكتريا *P.aeruginosa* منماة على وسط الأجار المغذي لمدة 24 ساعة الى 150 مل من الوسط Trypticase soy broth المعقم وحضنت لمدة 18 ساعة بدرجة 37°م .
- أجري عمل طرد مركزي لمدة عشرة دقائق بسرعة 5000 دورة بالدقيقة وأخذ الراسب pellet وأعيد تعليقه ب 150 مل من محلول الملح الفسيولوجي المعقم للحفاظ على حيوية الخلايا .
- أخذ 1 مل من العالق البكتيري وعرض الى أشعة بيتا وكاما وبجرع مختلفة ولفترات (3,2,1) ساعة بشكل مستمر و 2 ساعة متقطع على مرحلتين . كل مرحلة ساعة واحدة وكما في جدول (3) ، مع ترك أنبوبة سيطرة بدون تعريض للأشعاع .
- تم حساب الجرع الممتصة وفق العلاقات الاتية[10]:

$D= 0.0576\ Ø\ E\ (mrad/h)$ و $D= 0.00179\ Ø\ E\ (mrad/h)$ بالنسبة لاشعة بيتا وجاما على التوالي حيث ان E هي الطاقة و Ø هي الفيض $(S/4\pi R^2)$ و S هي الفعالية و R هي المسافة .

- بعد أنتهاء وقت التعريض للأشعاع تم عمل تخافيف متسلسلة بأستعمال محلول الملح الفسيولوجي ونقل 0.1 مل من كل تخفيف وزرعت من التخفيف الأول على أطباق Trypticase soy agar معقم و حيث توزيع البكتريا المخففة على أربعة أنابيب أختبار وفي كل أنبوبة وضع 1 مل منها وعرضت الى أشعة بيتا وجاما مباشرة وبجرع مختلفة وبفترات مختلفة ولمتوسط مدى 1 سم وبعد الانتهاء من وقت التعريض أخذ 5 مايكروليتر ووزعت بالناشر الزجاجي على وسط Trypton soy agar وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37 °م وفي اليوم التالي تم حساب أعدادها وحساب نسبة القتل من المعادلة المذكورة ادناه .
- تم حساب عدد المستعمرات لكل طبق وحسب نسبة القتل من القانون الاتي :.

$$\text{نسبة القتل} = \frac{\text{Treated}-\text{Control}}{\text{Control}} \times ١٠٠$$

Control : تعني البكتريا قبل تعريضها للأشعاع .

Treated : تعني البكتريا بعد تعريضها للأشعاع .

ثانيا : دراسة التعبير الجيني لمضخة الدفق MexXY ومضخة الدفق MexAB- OprM بدراسة الجين *mexX* وجين *mexB* قبل تعريض البكتريا وبعد تعريض البكتريا لأشعة بيتا وأشعة جاما باستعمال تقنية (q RT – PCR) Quantitative Real Time PCR شملت :

❖ عدة لاستخلاص RNA الكلي

SV Total RNA Isolation System Kit

وعدة Go Taq ® 1-Step RT-q PCR System

❖ **محاليل البواديء Primers Solution**

أختير الباديء النوعي المستهدف لجين *mexB* في بكتريا *P. aeruginosa* المشفر لمضخة الدفق MexAB-OprM على وفق ما ذكر [12] ، وجين *mexX* المشفر لمضخة الدفق MexXY على وفق ماذكر [13] .

جدول (1) البواديء المستعملة في q RT–PCR .

ت	أسم الجين	الباديء Primer	تتابع الباديء (Primer sequencing) 5'-3'	عدد القواعد	حجم الناتجbp	المصدر
1	mexX	mexX1	5'-TGAAGGCGGCCCTGGACATCAGC -3'	23	326	(16)
		mexX2	5' -GATCTGCTCGACGCGGGTCAGCG-3'	23		
2	Rps	rpsl-F	5'-GCAAGCGCATGGTCGACAAGA-3'	21	201	
		rpsl-R	5'-CGCTGTGCTCTTGCAGGTTGTGA-3'	23		
3	mexB	mexB1	5'-ATCCGCCAGACCATCGCCA-3'	19		(18)
		mexB2	5'-CATCACCAGGAACACGAGGAGG-3'	22		

❖ الكشف عن التعبير الجيني لمضخة الدفق MexXY ومضخة الدفق MexAB-OprM بدراسة الجين *mexX* وجين *mexB* بأستعمال تقنية qRT-PCR ، وقد أستعملت المكونات المبينة في جدول(2) لهذا الغرض .

جدول (2) المكونات اللازمة لخليط تفاعل q RT–PCR الخاص بتضاعف جين *mexX* وجين *mexB*

ت	المكونات	التركيز النهائي	حجم خليط التفاعل لأنبوبة واحدة (مايكروليتر)
1	محلول Go Taq®1–Step RT–qPCR	1x	12.5
2	الباديء الأمامي 10 بيكومول	1 بيكومول	2.5
3	الباديء الخلفي 10 بيكومول	1بيكومول	2.5
4	RT mix	1X	0.5
5	قالب RNA		5

6	ماء مقطر معقم		2
	الحجم النهائي		25

ثم برمج جهاز q RT-PCR على النحو الاتي :

الخطوة	العملية	
1	دورة واحدة لمدة(15) دقائق عند درجة حرارة (95) م° للمسخ الأولي لشريط cDNA القالب.	
2	**(40) دورة تضمنت :**	
	A	(20) ثانية عند درجة حرارة (95) م° لمسخ cDNA القالب .
	B	(20) ثانية عند درجة حرارة (60) م° لأرتباط البواديء ب cDNA القالب.
	C	(30) ثانية عند درجة حرارة (72) م° لأستطالة البواديء المرتبطة .
3	دورة واحدة لمدة (5) دقائق عند درجة حرارة (72) م° للأستطالة النهائية لشريط cDNA المتضاعف .	

❖ الكشف عن قيم التعبير الجيني و حساب قيمة ΔCt بحل القيم بيانيا بأستعمال معادلة Livak method :

أستعملت المعادلة أدناه لحساب قيم Cycle Threshold (Ct) التي تظهر على شكل منحنيات تفكك Dissassociation Curve والتي يكون التألق (Fluorescence) عندها في أوجه وتمثل هذه القيم كمية التعبير الجيني للجين *mexX* وجين *mexB* في العزلات قيد الدراسة حيث أن ΔCt لكل عينة تحسب على النحو الاتي [14] حسب معادلة Livak .

النتائج والمناقشة

أولا : نتائج تعريض بكتريا *P.aeruginosa* لأشعة بيتا وجاما وحساب أعدادها و نسبة القتل:

بعد زرع بكتريا *P.aeruginosa* وبعد أجراء الخطوات اللازمة لتحضيرها كما هو مذكور بطريقة Trampus ، عرضت الى أشعة بيتا وجاما مباشرة وبجرع مختلفة كما في الجدول (3) وبفترات مختلفة ، والنتائج موضحة في جدول (3) .

جدول (3) عدد المستعمرات النامية لبكتريا *P.aeruginosa* بعد تعرضها لأشعة بيتا وجاما ووقت وجرعة تعريضها للأشعاع وحساب عدد مستعمراتها و نسبة القتل لها :

العينة	الوقت (h)	الجرعة الممتصة (Rad)	عدد مستعمرات بكتريا P. aeruginosa	النسبة المئوية للقتل %
P1	2 متقطعة	2.919	11	92 %
P2	3 مستمرة	4.379	39	74 %
P3	2 مستمرة	2.919	64	57 %
P4	1 مستمرة	1.460	72	52 %
Control	150 مستعمرة			

P1, P2, P3, P4 تعني بكتريا *P.aeruginosa* وضع لها هذا الرمز لتمييزها بالجرع عن الأخرى .

أوضحت النتائج في جدول (3) أنه عند تعريض بكتريا *P.aeruginosa* الى مصدر مشع وهو سيزيوم ولمدة ساعتين وبفترات متقطعة كانت نسبة القتل لها أعلى من تعريضها بالمستمر حتى وعند زيادة فترة التعريض ، وبذلك أثبت أن التعريض المتقطع هو أفضل من التعريض المستمر لتقليل أعداد البكتريا والقضاء على بكتريا *P.aeruginosa* المسببة لأمراض خطسرة كونها بكتريا أنتهازية ، حيث كانت نسبة القتل 92% عند تعريضها بفترات متقطعة .أما التعريض المستمر فبزيادة الوقت تزداد نسبة القتل ، لذلك تحتاج الى وقت أكثر لكي يتم القضاء عليها بمعدل عالي .

- نتائج دراسة التعبير الجيني لمضخة الدفق MexAB-OprM ومضخة الدفق MexXY بأستعمال تقنية q RT-PCR

تم الكشف عن التعبير الجيني لمضخة الدفق MexAB-OprM بدراسة الجين *mexB* ومضخة الدفق MexXY بدراسة الجين *mexX* في بكتريا *P.aeruginosa* قبل تعريضها لأشعة بيتا وجاما بأستعمال تقنية q RT-PCR من خلال أستخلاص RNA البكتيري ، وكذلك تم الكشف عن التعبير الجيني للمضخات اعلاه بعد تعرضها لأشعة بيتا وجاما وذلك بأخذ البكتريا النامية والتي كانت اعدادها قليلة جدا بعد تعرضها للأشعاع وبجميع الفترات اعلاه .

من الجدول (4) يتضح أن مضخة الدفق MexXY أكثر من التعبير الجيني لمضخة الدفق MexAB-OprM قبل التعرض للأشعاع ، وأن قيم التعبير الجيني للمضختين أعلاه بدراسة الجين *mexB* وجين *mexX* قبل التعرض للأشعاع كانت جدا عالية ، أي هناك تعبير جيني عالي جدا للمضخات أعلاه ، أي يعني وجود مقاومة عالية من البكتريا لدفق مضادات مختلفة في تركيبها الكيميائي ومنها المضادات الحيوية والمايكروبية ودفق مواد عديدة .

جدول (4) قيم Ct وقيم ΔCt وقيم ΔΔCt للجين *mexX* وجين *mexB* لبكتريا *P.aeruginosa* قبل تعريضها لأشعة بيتا و جاما .

sample	Calibrator			Treated			ΔΔCt	Ration (Fold 1)
	mexX	rps	ΔCt	mexX	rps	ΔCt		
1	25.54	16.11	9.43	26.71	22.3	4.41	-5.02	32.4
2	23.26	16.33	6.93	23.94	18.85	5.09	-1.84	3.6
3	27.54	17.27	10.27	33.49	34.47	-0.98	-11.25	2435.5
4	32.74	33.95	-1.21	29.8	35.82	-6.02	-4.81	28.1
sample	Calibrator			Treated			ΔΔCt	Ration (Fold 1)
	mexB	rps	ΔCt	mexB	rps	ΔCt		
1	25.54	16.11	9.43	26.71	22.3	4.41	-5.02	32.4
2	25.22	15.76	9.46	27.41	22.12	5.29	-4.17	18.0
3	26.11	16.11	10	20.25	12.94	7.31	-2.69	6.4
4	20.78	16.33	4.45	7.13	5.34	1.79	-2.66	6.3

من الجدول (5) يتضح أن مضخة الدفق MexXY ومضخة الدفق MexAB-OprM كان تعبيرها الجيني أقل بكثير مقارنة قبل تعريضها للأشعاع بل ومنها وصلت الى الصفر أي أنها لم تعبر جينيا وهذه النتائج تبين أن أشعة بيتا وكاما هي مثبط جيد وفعال لهذه المضخات .

جدول (5) قيم Ct وقيم ΔCt وقيم ΔΔCt للجين *mexX* وجين *mexB* لبكتريا *P.aeruginosa* بعد تعريضها لأشعة بيتا و جاما .

sample	Calibrator			Treated			ΔΔCt	Ration (Fold 1)
	mexX	rps	ΔCt	mexX	rps	ΔCt		
1	0	18 .0	-18	22.98	24.94	-1.96	16.04	0.0
2	34 .0	40 .0	6.0	30 .0	0	30.0	24.0	0.0
3	26.50	17.12	9.38	24.8	14.0	10.8	1.42	0.3
4	27.7	18.0	9.7	25.0	15.0	10.0	0.3	0.8
sample	Calibrator			Treated			ΔΔCt	Ration (Fold 1)
	mexB	rps	ΔCt	mexB	rps	ΔCt		
1	0	18.0	-18 .0	22.0	23.94	-1.94	16.06	0.0
2	0	15.0	-15.0	23.98	25.94	-1.96	13.04	0.0
3	23.0	14.0	9	24.50	15.12	9.38	0.38	0.7
4	21.11	16.11	5	22.2	18.9	3.3	-1.7	3.2

الأستنتاج

١- تعريض البكتريا المتقطع للأشعة أفضل من التعريض المستمر في ناحية التطفير.
٢- التثبيط لمضخة الدفق MexXY ومضخة الدفق MexAB-OprM يزداد بزيادة التعريض .
٣- أشعة بيتا وجاما هي مثبط كفوء في تثبيط الجينات الأساسية لبكتريا *P.aeruginosa* المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية وبالتالي هي كفوءة في قتل بكتريا *P.aeruginosa* ويمكن استعمالها موضعيا ومباشرة وبجرع اشعاعية مقبول بها .

المصادر

[1] **Vianelli** ,N.; Giannini, M.B and Quartic , C .(2006). Resolution of Pseudomonas aueroginosa Outbreak in a haematology unit with the use of disposable sterile water filter . Haematol,J;91(7):983-985.

[2] **Lambert,**P.A.(2002). Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa . J . Royal. Soc .Med 95: 22-26.

[3] **Morita**,Y. ; Sobel ,M.L. and Poole, K.(2006). Antibiotic Inducibility of the MexXY Multidrug Efflux System , Department of Microbiology and Immunology ,Queen's University , Kingston , Ontario ,Canada k7L 3N6.

[4] **Poole** , K.(2007) .Efflux Pumps as antimicrobial resistance mechanisms .Ann Med .39 :162-76 .

[5] **Meletis** ,G. and Bagkeri , M. (2013) . Pseudomonas aueroginosa : Multi –Drug- Resistance Development and Treatment options.edited by Silpi Basak .J.Med. Infectious Dis. ISNB 978-95351-1145-0 .

[6] **Dekievit**, T.R.; Parkins, M.D.; Gillis, R.J.;Srikumar, P.; Cerf, H.; Poole, K.; Iglewski,B.H.; and Storey, D.G.(2001).Multidrug efflux pumps : Expression patterns and contribution to antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilm. Antimicrob. Agents Chemother.45(6):1761-1770.

[7] **Lynch** , J.P.(2001).Hospital – acquired pneumonia risk factors . Microbiology and treatment . Chest;119:373S-84S.

[8] **Nass** , T ., Zerbih , M.;Girlich, D . and Nordmann, P. (2003) . Integration of Transposon Tn-Encoded inhibitor resistant B –Lactamase Gene bla TEM-67 from Proteus mirabilis , into the Escherchia coli Chromosome . J. Antimicrob. Chemother. 47(1):19-20.

[9] **Vandesomple**, J.;De Preter, K.; Pattyn,F.;Poppe, B.; Van Roy ,N.;De Paepe, A. and Speleman, F.(2002).Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes .Gen. Biol .3: 1-12 .

[١٠] أسس الفيزياء الأشعاعية أ.د / محمد عودة أحمد / و د. / احمد السريع 1988 . مباديء القمة النووية وتقنياتها دكتور – بسام محمد داخل .دار الفجر للنشر والتوزيع .

[11] **Trampus**,A.Piper ,K.E.; Steckelberg ,J.M. and Patel ,R. (2006). Effect of gamma irradiation on viability and DNA of S.epedermidis and E.coli .J.Med. Microbiol. 55: 1271- 1275 .

[12] **Dumas**, J.L.; Delden, C.V.; Perron, K. and Delden, T.K.(2006). Analysis of antibiotic resistance gene expression in Pseudomonas aeruginosa by quantitative real- time PCR. FEMS Microbiol. Lett. 254:217-225 .

[13] **Hocquet**, D.; Nordmann, P.; Gach, F.E.; Cabanne, L. and Plesiat, P.(2006). Involvement of the MexXY-OprM Efflux System in Emergence of Cefepime Resistance in Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa . Amer. Soci. Microbiol. 50(4):1347-1351.

[14] **Livak** , K.J. and Schmittgen ,T.D.(2001) . Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method . Methods 25, 402-8 .