------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 17، العدد 11، خاص بعلوم الحياة، ص226-236، 2006-----

استخدام اليوريا والحرارة لتحييد المحتوى البلازميدي في جرثومة *Proteus mirabilis* المعزولة من عينات سريرية

خالد دحام احمد   ديانا نور الدين مصطفى

قسم علوم الحياة

كلية التربية

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2003/1/9 ، تاريخ القبول 2003/9/6)

الملخص

تم جمع 25 عزلة من جرثومة *Proteus mirabilis* المعزولة من حالات مرضية مختلفة في الإنسان. شخصت هذه الجراثيم باستخدام نظام API 20E. اختبرت العزلات لتعيين مقاومتها للمضادات الحيوية امبسلين، تتراساكلين. كلورامفينيكول، ستربتومايسين، سيفالكسين، ناليدكسك أسيد، تراي ميثبريم. ثم صنفت إلى ست مجاميع استنادا إلى ذلك والى مصدر العزلة. استخدمت اليوريا والحرارة عند درجة حرارة 44 °م لإزالة مقاومة العزلات للمضادات وبيان تأثيرهما. تم الربط بين تأثيري اليوريا والحرارة معا. وأظهرت النتائج بان لليوريا تأثير ملحوظ على مقاومة معظم المضادات الحيوية بتركيز 400 مايكرو غرام /مل حيث كانت النسبة المئوية للمستعمرات التي فقدت مقاومتها بمدى (18-92) بالإضافة إلى ذلك فان التحييد بالحرارة عند درجة حرارة 44 °م قد تم انجازه وأظهرت النتائج بان الحرارة كانت أكثر كفاءة في تحييد مقاومة امبسلين، وكلورامفينكول. لم يظهر ربط تأثيري اليوريا مع الحرارة أي زيادة في نسب التحييد. وأخيراً لم يكن هنالك تحييد لمقاومة الستربتومايسين ترايميثبريم مما يشير إلى انه هذه المورثات واقعة على كروموسوم الخلية الجرثومية وعدم فعالية المحيدات الكيميائية والفيزيائية المستخدمة على المقاومة الممنوحة من قبل المورثات الواقعة على الكرموسوم.

Utilization of the Urea and Temperature for Curing the Plasmid Content of the *Proteus mirabilis* Isolated from Clinical Specimens

Khalid D. Ahmed **Diana N. Mustafa**

Department of Biology
College of Education
Mosul University

ABSTRACT

Twenty fife isolate of *Proteus mirabilis* were collected taken from different human infection and diagnosed by API 20E TEST. These isolates tested for their resistance to Ampicillin, Tetracycline, Chloramphenicol, Streptomycin, Cepfaloexin, Naldixic acid and Trimethoprime, then classified into 6 groups according to antibiotics resistance. In order to remove their antibiotics resistance in these studied isolates, the chemical substance urea and physical agent heat at 44 °C were used. Then combined the effects to these to agents also used The results revealed that the urea cause remarkable curing of most antibiotics resistance at concentrations 400 µg/ml, were the percent of colonies that lose their antibiotic resistance range (18-92). In addition, curing by heat at temperature 44°C was carried out and the results showed that this agent appear to be more efficient than urea in curing the Amp and Cm resistance. The combined effects of urea and heat at 44 °C does not show any increasing in curing percents. Finally no curing for the resistance of Streptomycin and Trimethoprime which may indicate that gene for conferring these resistance located on the bacterial chromosome of *P. mirabilis* isolates and this leads that no effects of the used of curing agents on antibiotics resistance genes located on chromosome.

المقدمة

تنشا في مستعمرة الخلايا الجرثومية التي تحمل البلازميدات عزلات فاقدة للبلازميدات العائدة لها هذه الظاهرة تسمى التحييد، العزلات الناشئة تبقى حية ولكنها تفتقد إلى الصفات التي تتحد بمورثات البلازميد ويستدل على أنها لم تنشا بواسطة حدوث الطفرة عن طريق التكرار العالي الذي تنشا به، وكذلك من حقيقة فقدان العديد من الصفات في حادثة مفردة، ممكن أن يكون فقدان البلازميدات ذاتيا من خلال فشل نسخة البلازميد في الانتقال إلى الخلية البنوية (كوادينوف، 1985). كذلك وجد بان بعض المعاملات مثل التعرض إلى الاكردينات او مادة Sodium dodecyle sulphate (SDS) او Ethidum bromid او اليوريا تقضي على تكرار بلازميدات معينة بصورة منتخبة دون التأثير على تكرار الكروموسوم الرئيس (Kanekar و Kulkarni، 1998; Adachi وآخرون، 1972).

من المعروف ان اليوريا مادة مغيرة لطبيعة البروتين Denaturation ولكن بالإضافة إلى ذلك فقد لوحظ بأنها تزيل عوامل R و F من الخلايا الحاملة لها وان خلايا +F ممكن ان تتحول الى خلايا -F عن طريق المعاملة بهذه المادة، يتضمن فعل اليوريا آليات مختلفة عن حالة التحييد بالاكردينات التي تثبط

تضاعف الـــ Episome فعل اختياريا والآلية التي ممكن من خلالها فقدان بلازميد F من الخلايا المعاملة باليوريا تتضمن حدوث طفرة يتم من خلالها تثبيط نمو خلايا +F والسماح لخلايا -F بالنمو، إن معاملة سلالة *E. coli* K-12 JE2100 الحاملة لعامل R100 باليوريا أنتجت خلايا خالية من البلازميد ولكن بتردد اقل من تاثير هذه المادة على عامل F وبالإضافة إلى قابلية اليوريا على تحييد البلازميدات فقد لوحظ انها تؤثر على الخلايا بطرائق أخرى مثل حصول طفرات عوز غذائي Auxotrophs (Tomoeda et al ., 1970).

قد يحدث فقدا للبلازميدات عند تنمية الجراثيم في درجة حرارية مرتفعة ويستدل حدوث التحييد من خلال حساسية هذه الجراثيم للمضادات الحيوية التي كانت مقاومة لها او من خلال فقدان الامراضية التي تسببها تلك الجراثيم والمسؤول عنها تلك البلازميدات المحيدة (Barrow وآخرون، 1987). ان تنمية جرثومة *E. coli* K-12 الحاملة عامل Rts1 في درجة حرارة 42 °م ادت الى فقدان المقاومة للامبيسلين، تتراسايكلين ، كلورامفينكول والستربيتومايسين والمسؤول عنها هذا البلازميد- (Ike et al., 1980). كذلك فان تنمية جرثومة *Proteus mirabilis* الحاملة لعامل Rts1 في درجة حرارة 44 °م أدى الى فقدان المقاومة للكانامايسن والمسؤول عنها ذلك العامل (Terawaki and Rownd, 1972).

المواد وطرق العمل

جمع العينات:

تم الحصول على 25 عزلة جرثومة *Proteus mirabilis* من مختبر الأحياء المجهرية في مستشفى الرازي العام في الموصل وخلال ثلاثة أشهر ومن حالات مرضية مختلفة في الانسان (الادرار، القيح، البراز، الاذن، عنق الرحم).

تشخيص العزلات الجرثومية:

نظام API 20E:

استخدم لتشخيص العزلات الجرثومية النقية حيث اتبعت طريقة (Atlas et al., 1995).

تحضير المحاليل الخزينة للمضادات الحيوية:

اتبعت الطريقة التي استخدمه Ahmed (1989) لتحضير محاليل خزينة من المضادات الحيوية التتراسايكلين T30mg، الامبسلين Amp 10mg، الكلورامفينكول C30mg، الستربيتومايسين Sm 25mg، التراي مثبريم SXT 30mg، السيفالكسين CEF 30mg وناليدكسك اسيد NAL.

وسط المضادات الحيوية:

حضر هذا الوسط من إضافة المضاد الحيوي إلى وسط الاكار المغذي المعقم والمبرد إلى درجة حرارة (45-50) وبالتراكيز النهائية (مايكرو غرام /مل) المستخدمة وذلك حسب طريقة Grant and Pittard (1974).

تحييد البلازميدات:

أ- استخدام اليوريا كميد للبلازميدات

اتبعت طريقة (Tomoeda et al., 1970).

ب-استخدام الحرارة كعامل محيد

اتبعت طريقة (Baldwin et al., 1969).

ج- استخدام اليوريا والحرارة معا كمحيد للبلازميدات

اتبعت طريقة (Verma et al., 2000). لمعرفة تأثير اليوريا تركيز 200 مايكرو غرام /مـل مـع درجة 44 °م على بلازميدات عزلات جرثومة *P. mirabilis* المدروسة.

النتائج والمناقشة

جمع العزلات الجرثومية وتشخيصها:

تم الحصول على عزلات جرثومة *P. mirabilis* من حالات مرضية مختلفة لمدة ثلاثة اشهر، كانت هذه العزلا ت من النماذج المرضية الأتية: الادرار (6 عينات)، البراز (5 عينات)، القيح (8 عينات)، الاذن (4 عينات)، وعنق الرحم اثنان الماخوذة من الانسان.

شخصت هذه العزلات مختبريا باستخدام اختبار الـ API 20E وحسب طريقة (Atals et al., 1995).

مقاومة المضادات الحيوية:

اجري فحص المقاومة لعزلات جرثومة الـ *P. mirabilis* وجرثومة *Escherichia coli* سلالة الـ JM83 المختبرية لسبع من المضادات الحيوية صنفت العزلات الجرثومية الى ست مجاميع استنادا الى الاختلاف في مقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة ومصدر العزلة كما مبين في الجدول (1).

الجدول 1 : مصادر عزلات جرثومة الـ *P. mirabilis* وسلالة JM83 المختبرية ومقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة.

رقم العزلة	منطقة العزل	المقاومة او الحساسية للمضادات الحيوية (بالمايكروغرام/مل)						
		T 30	C 30	SXT 30	Amp 10	Sm 25	NAL 30	CEF 30
1	الاذن	S	R	R	R	R	R	R
2	القيح	R	S	R	R	R	S	R
3	الادرار	R	R	R	R	R	S	S
4	البراز	R	R	R	S	S	R	R
5	عنق الرحم	R	R	R	S	S	S	R
6	الادرار	R	R	R	S	S	S	R
E. coli JM83	مختبرية	S	S	R	S	R	S	S

حيث تشير :

R: الى صفة المقاومة للمضاد الحيوي.

S: الى صفة الحساسية للمضاد الحيوي.

تبين من الجدول انه تم الحصول على عزلتين من جرثومة الـ *P.mirabilis* من مصدر واحد (الإدرار) إذ أظهرتا اختلافا في مقاومتهما للمضادات الحيوية المدروسة ويلاحظ أيضا" انه جميع العزلات الجرثومية أبدت اختلافا في مقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة وان جميع العزلات الجرثومية كانت مقاومة للتراي ميثوبريم. ان الاساس الوراثي لمقاومة المضادات الحيوية يكون ناتجا عن وجود موروثات مسؤولة عن هذه المقاومة واغلمحمولة على الكروموسوم او على البلازميد، فضلا عن ذلك فان مقاومة المضادات الحيوية قد تكون ناتجة عن حدوث طفرة مثل مقاومة الارثرومايسين والستريبتومايسين (Laurence and Bennett , 1987).

تحييد البلازميدات:

لقد تم دراسة القابلية على تحييد البلازميدات في العزلات الجرثومية المدروسة باستخدام: مادة اليوريا بتراكيز (100، 200، 400) مايكروغرام /مل، درجة حرارة 44 °م ثم استخدام درجة الحرارة واليوريا معا.

استخدام اليوريا كمحي للبلازميدات:

ان استخدام اليوريا بتركيز 100 مايكروغرام /مل لم يكن له تاثير على العزلات الجرثومية المدروسة بينما ظهر هذا التاثير عند استخدام تراكيز اعلى من هذه المادة تمثلت بـــ (100، 200) مايكروغرام /مل.

الجدول 2 : إزالة المقاومة للمضادات الحيوية في عزلات جرثومة *P. mirabilis* بوساطة المعاملة اليوريا بتركيز 200 مايكروغرام /مل.

رقم العزلة	منطقة العزل	النسبة المئوية لتحييد الموروثات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية باستخدام تراكيز نهائية بالمايكروغرام /مل						
		Amp 10	C 30	NAL 30	CEF 30	T 30	SXT 30	Sm 25
1	الاذن	0	14	18	2	S	0	0
2	القيح	0	S	S	16	18	0	0
3	الادرار	0	68	S	S	22	0	0
4	البراز	S	8	4	0	28	0	S
5	عنق الرحم	S	48	56	26	20	0	S
6	الادرار	S	52	S	0	56	0	S

حيث تشير :

S : الى صفة الحساسية.

من الجدول يلاحظ عدم حدوث تحييد لمقاومة الـــ Amp كما ان نسب التحييد لمقاومة الـــ CEF كانت واطئة في العزلات الجرثومية وتقع ضمن المدى (2–26) %. ومن الجدير بالذكر ظهور زيادة كبيرة في نسبة تحييد المقاومة للـــ Nal في العزلة رقم (5) والمعزولة من عنق الرحم تمثلت بنسبة 56 %. كذلك لوحظ من الجدول ظهور تحييد عال لمقاومة الـــ C و The تمثل بالمدى 14–68 % وبالمدى 18–56 % على التوالي في العزلات الجرثومية المدروسة. فضلا عن ذلك حدثت زيادة كبيرة في نسب تحييد المقاومة لكل من مضادات الـــ T , CEF , NAL , C , Amp عند استخدام اليوريا بتركيز 400 مايكروغرام / مل حيث ان النسب التي حصلنا عليها والمبينة في الجدول رقم (3) المذكور في ادناه كانت ضمن المديات (4–28) %، (52–72) %، (28–92) %، (18–78) %، (20–72) % على التوالي.

الجدول 3 : ازالة المقاومة للمضادات الحيوية في عزلات جرثومة الـ *P. mirabilis* بوساطة المعاملـة باليوريا بتركيز 400 مايكروغرام /مل.

رقم العزلة	منطقة العزل	النسبة المئوية لتحييد الموروثات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية باستخدام تراكيز نهائية بالمايكروغرام /مل						
		Amp 10	C 30	NAL 30	CEF 30	T 30	SXT 30	Sm 25
1	الاذن	0	66	28	18	S	0	0
2	القيح	4	S	S	78	20	0	0
3	الادرار	28	70	S	S	60	0	0
4	البراز	S	72	92	72	64	0	S
5	عنق الرحم	S	52	36	44	56	0	S
6	الادرار	S	60	S	56	72	0	S

حيث تشير :

S : الى صفة الحساسية للعزلة غير المحيدة.

ومن الجدير بالذكر عدم حدوث تحييد لمقاومة الـ Sm , SXT عند استخدام التراكيز المختلفة من اليوريا . وقد لاحظ Tomoeda وآخرون (1970) ان الية التحييد بوساطة اليوريا ربما تعود الى حدوث تغيير في فعالية الانزيمات (كتغير في شكل متعدد الببتيد) المسؤلة عن تضاعف الـ DNA وبالتالي توقف البلازميدات عن تضاعفها وهذه الالية ربما تعتمد على كون اليوريا مادة مغيرة لطبيعة البروتين (Denaturation) كما لاحظ ان زيادة تركيز اليوريا في الوسط اكثر من 300 مايكروغرام / مل يؤدي الى حدوث زيادة في نسبة تحييد بلازميد F في جرثومة الـ *E. coli* كما وان لليوريا تاثير على بلازميد R ولكن بتردد اقل من تاثيرها على بلازمي F .

استخدام درجة الحرارة كعامل محيد:

الجدول 4 : إزالة المقاومة للمضادات الحيوية في عزلات جرثومة *P. mirabilis* بوساطة تنميتها عند درجة حرارة 44 °م.

رقم العزلة	منطقة العزل	النسبة المئوية لتحييد المورثات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية باستخدام تراكيز نهائية بالمايكروغرام /مل						
		Amp 10	C 30	NAL 30	CEF 30	T 30	SXT 30	Sm 25
1	الاذن	0	76	46	10	S	0	0
2	القيح	6	S	S	34	20	0	0
3	الادرار	82	82	S	S	94	0	0
4	البراز	S	78	30	82	50	0	S
5	عنق الرحم	S	68	36	72	46	0	S
6	الادرار	S	72	S	6	44	0	S

حيث تشير :

S : الى صفة الحساسية للعزلة غير المحيدة.

يلاحظ من الجدول ظهور تحييد واضح للعزلات الجرثومية المدروسة لأغلب المضادات الحيوية المستخدمة حيث تم الحصول على نسب عالية لتحييد المقاومة الـــ T و Amp وبنسب (94، 82) % على التوالي في العزلة رقم (3) والمعزولة من الادرار كما يلاحظ ظهور نسبتي تحييد عالية للـــ Cf متمثلة بـــ 82 %، 72 % في عزلتي 4 و 5 والمعزولتين من البراز وعنق الرحم على التوالي. فضلا عن ذلك ظهور نسب تحييد عالية لمقاومة الـــ Cm للعزلات المدروسة تقع ضمن المدى (68-82) % كما ان العزلة رقم 1 والمعزولة من الاذن اظهرت نسبة تحييد 46% لمقاومة الـــ Nal. اخيرا فان استخدام رجة الحرارة كمحيد لم يتمكن من احداث تحييد لمورثات مقاومة الـــ Sm، SXT.

ان حدوث التحييد لمقاومة المضادات الحيوية المستخدمة عند درجة 44 °م قد يعود الى ان تضاعف بلازميدات R الحاملة لمورثات مقاومة المضادات الحيوية هذه يكون حساسا للحرارة حيث لاحظ Terawaki وآخرون (1967) بان عامل Rts1 والذي يستوطن بشكل طبيعي في جرثومة *P. vulgaris* يكون تضاعفه حساسا للحرارة Thermosensitive، وفي دراسة اخرى لوحظ بان Rts1 يتداخل مع النمو العادي لمضيفة عند النمو بدرجة 43 °م عن طريق تداخل الجزء الحساس للحرارة من نتاجات مورثات Rts1 مع الوظائف الطبيعية لخلية المضيف، لذا يحدث موت لجزء من الخلية المضيفة مثلا دوث تراكم للأغشية السايتوبلازمية في مناطق متعددة من الخلية المضيفة، وفي دراسة أخرى استخدمت فيهاغ

جرثومة *P. mirabilis* كمضيف لبلازميد Rts1 لوحظ بان كمية ال DNA البلازميدي للـــ Rts1 يقل من 7% الى 3% من كمية الـــ DNA الكلي اثناء الساعات القلائل الاولى من النمو عند 42 °م (Dijoseph واخرون، 1973). وقد لاحظت الباحثة (حامد، 2001) ان استخدام درجات حرارة 43 °م كمحيد ادى الى تحييد واضح لمقاومة الـــ Ap , Tc , Cm , Sm , Pen من عزلات جرثومة *S. aureus* وهذا يتفق مع ماتوصلنا إليه إلا اننا لم نلاحظ تحييدا لمقاومة الـــ Steering matrix.

ان استخدام العامل الفيزيائي (الحرارة) عند 44 °م اظهر تحييدا لمقاومة معظم المضادات الحيوية مقارنة مع استخدام اليوريا بتراكيزها 200 مايكروغرام /مل ووجود بعض التقارب بين النتائج التي حصلنا عليها هنا وبين نتائج استخدام اليوريا بتركيز 400 مايكروغرام /مل مع ملاحظة زيادة كبيرة في النسب الملاحظة باستخدام اليوريا بهذا التركيز، اذن يمكن القول ان استخدام العامل الفيزيائي في تحييد عزلات جرثومة *P.mirabilis* المدروسة كان افضل من استخدام المادة الكيميائية في تحييد العزلات.

الجدول 5 : ازالة المقاومة للمضادات الحيوية في عزلات جرثومـــة *P. mirabilis* بوســاطة المعاملــة باليوريا بتركيز 200 مايكرو غرام /مل مع تنمية هذه العزلات عند درجة حرارة 44°م.

رقم العزلة	منطقة العزل	النسبة المئوية لتحييد الموروثات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية باستخدام تراكيز نهائية بالمايكروغرام /مل						
		Amp 10	C 30	NAL 30	CEF 30	T 30	SXT 30	Sm 25
1	الإذن	14	0	72	26	S	0	S
2	القيح	62	S	S	64	50	0	30
3	الإدرار							
4	البراز	S	0	10	66	18	0	S
5	عنق الرحم	S	20	64	60	26	0	S
6	الإدرار	S	30	S	54	26	0	S

حيث تشير :

S الى صفة الحساسية للعزلة غير المحيدة.

يتبين من الجدول ان العزلة رقم (3) والمعزولة من الادرار لم تتمكن مستعمراتها من النمو على وسط الاكار المغذي بوجود اليوريا بتركيز 200 مايكروغرام /مل مع استخدام درجة حرارة 44 °م عند التحضين اذ ان هذه الظروف كانت قاتلة لها، ما لوحظ زيادة كبيرة في نسب تحييد المقاومة للـــ Amp , NAL , C وضمن المديات (14-62)%، (10-72)%، (26-66)% على التوالي، في حين

لوحظ انخفاض في نسب تحييد المقاومة للـ Cm وتقارب في نسب تحييد المقاومة للـT وذلك بالمقارنة مع استخدام اليوريا بتركيز 200 مايكروغرام /مل لوحدها كمحيد، اما عند المقارنة مع استخدام الحرارة لوحدها كمحيد فقد لوحظ تقارب مع نسب تحيد الـ T , CEF , NAL , Amp وانخفاض ملحوظ في مقاومة الـ C.

ان التداخل بين اليوريا والحرارة لم يعط نتائج واضحة لتحييد البلازميدات وربما يعود التحييد الى درجة الحرارة لوحدها.

ومن الجدير بالذكر انه لم يحدث تحييد لمورثات الـ Sm و SXT عند استخدام المادة الكيميائية مع العامل الفيزيائي وهذا ربما يعطي دلالة على وقوع المورثات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية على الكروموسوم وليس على DNA البلازميد.

المصادر العربية

حامد، نوار طلال، 2001. إزالة مقاومة الجرثومة *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات مرضية مختلفة في الانسان للمضادات الحيوية باستخدام مواد كيمياوية وعوامل فيزياوية. رسالة ماجستير، جامعة الموصل.

كوادينوف، اورسولا، 1985. علم الوراثة. الجزء الثاني، جامعة هارفارد، مترجم، جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Adachi, H., Nakano, M., Inuzuko, M. and Tomoeda, M., 1972. Specific Roe of Sex Pili in the Effective Eliminatory Action of Sodium Dodecyl Sulfate on Sex and Drug Resistance of Factors in *Escherichia coli* . J. Bacteriol., Vol. 109, pp.1114 – 1124.

Ahmed, K.D., 1989. The Positive Control of *ilv* C Expression in *E. coli* K12. Ph.D. Thesis, Univ. Durham, England.

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

Baldwin, J.N., Strickland, R.H. and Cox, M.F., 1969. Some Properties Appl. Microbiol., Vol. 18, pp.628 – 630.

Barrow, P.A., Simpson, J.M., Lovell, M.A. and Binns, M.M., 1987. Contribution of *Salmonella gallinarum* Large Plasmid Toward Virulence in Fowl Typhoid, J. Infection and Immunity. Vol. 55, pp.388 – 392.

Dijoseph, C.G., Bayer, M.E. and Kaji, A., 1973. Host Cell Growth in the Presence of the Thermosensitiv Drug Resistance Factor Rts1. J. Bacteriol., Vol. 115, pp.399 – 410.

Grant, A.J. and Pittard, J., 1974. In Compatibility Reactions of R Plasmids Isolated from *Escherichia coli* of Animal Origin.J.Bacteriol., Vol. 120, pp.185-188.

Ike, Y., Hashimoto, H., Motohashi, K., Fujisawa, K.N.P. and Mitsuhashi, S., (1980). Isolation and Characterization of a Composite Plasmid Rms 201 Mutant Temperature Sensitive for Replication. J. Bacteriol., Vol. 141, pp.577- 583.

Kanekar, pp . and Kulkarni , Rs. (1998). Effects of Some Curing Agents on Phenotypic Stability in Pseudomonas Putida Degradingt Epsilon – Caproloctam . J . Microbiology and Bootechnology . 14(2) : 255-257.

Laurence, D.R. and Bennett, P.N., 1987. Clinical Pharmacology. 6th. ed., Churchill, Livingstone, Inc. New York.

Meyer, R., 1974. Alternate Forms of the Resistance Factor R1 in *P. mirabilis*. J. Bacteriol., Vol. 118, pp.1010- 1019.

Terawaki, Y., Takayasu, H. and Akiba, T., 1967. Thermosenitive Replication of a Kanamycin Resistance Factor. J. Bacteriol. Vol. 94, pp.687-689.

Timmis, N.K. and Puhler, A., 1984. Advanced in Molecular Genetics, Springer-Verlary. New York.

Tomoeda, M., Inuuzka, M., Anto, S. and Konishi, M., 1974. Curing Action of Sodium Dodecyl Sulfate on a *Ptoteus mirabilis* R+ Strain. J. Bateriol., Vol. 120, pp.1158 – 1163.

Verma, J.C{a}., Singh, V.P{a}. and Rathore, G{a}., 2000. Effect of Plasmid Curing on Virulence and Antibiotic Resistance in *Salmonella typhimurium*. Indian Veterinary J., Vol. 77, No. 2, pp.92 – 94.