University of Thi-Qar Journal Of Science (UTsci)
Website: http://jsci.utq.edu.iq **Email: utjsci@utq.edu.iq**
Volume 6, Number 1, December 2016

التحري عن جين *mecA* للمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* المسببة لالتهاب الثدي

ميادة باسم رسول الدباغ سميرة كاظم حميد
جامعة الكوفة – كلية التربية للبنات

الخلاصة

جمعت 128 عينة القيح من النساء المصابات بالتهاب الثدي ، شخصت المكورات العنقودية الذهبية بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرات والفحص المجهري والفحوصات البايوكيميائية ، والكشف عن وجود الجين *mecA* في هذه العزلات باستخدام تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل ، حيث توصل هذا البحث الى النتائج التالية :-

أظهرت النتائج بأن (22) عزلة لم يظهر فيها نمو وبنسبة (17.19%) و 106 (82.81)%عزلة كانت تابعة للمكورات العنقودية ، و 34 من هذه العزلات كانت تابعة للمكورات العنقودية الذهبية وبنسبة (32.07)%

وعند الكشف عن وجود العامل الوراثي *mecA* للعزلات التابعة للمكورات العنقودية الذهبية (34) كانت عدد العزلات الحاملة للجين 14 وبنسبة (41.1) %، ومن نتائج هذه الدراسة يمكن الاستنتاج انه يوجد اقتران شديد بين هذا العامل الوراثي والمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين ، كما يوجد ارتباط بين هذا العامل الوراثي وامراض التهاب الثدي ، كما ان هذه الدراسة تلفت الانتباه الى الزيادة الحالية في حالات الاصابة بالمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين في محافظة النجف الاشرف مما يزيد من اهمية العمل على تحقيق وسائل مكافحة العدوى لمنع المزيد من انتشارها في المجتمع .

Investigation of *mec A gene* of *Staphylococcus aureus* causing Mastitis

Mayadah B. Rasul AL-Debbag Samirah K. Hamid

Kufa University-College of education for Girls

Abstract

128 of pus samples were collected from women's infected with Mastitis. The identification of the *Staphylococcus aureus* isolates depended on colonial morphology, microscopic examination and biochemical tests as a primary identification, and detection of found *mec A* gene using the polymerase chain reaction. The researches to the following results:

The results showed that 22 isolates did not appear any growth and percentage (17.19)% whereas 106 (82.81%) isolates belongs to *Staphylococcus* and 34 from this isolates belongs to *Staphylococcus aureus* and percentage (32.07)%

the research has detected the presence of genetic factor *mec A* belongs to *Staphylococcus aureus* (34) where the number of the samples carrying the gene 14 (41.1%).The results also includes a high association between this genetic factor and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Besides, there is also a correlation between MRSA and Mastitis diseases. This study draws attention to the current increase in MRSA in Najaf city which increases the importance of working to develop means of infection control to prevent further spread in the community.

University of Thi-Qar Journal Of Science (UTsci)
Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq
Volume 6, Number 1, December 2016

1- المقدمة

تعد المكورات العنقودية *Staphylococcus spp* من أكثر الأنواع البكتيرية انتشاراً في الطبيعة إذ توجد على الجلد والأغشية المخاطية والقناة التنفسية العليا وفي الهواء والتربة إذ يقدر الحاملون (Carriers) للنوع *S. aureus* في مقدمة أنوفهم بـ (40-50)% لذلك فهي جزء من النبيت الطبيعي للإنسان ، لكنها تعد من البكتريا التي يمكن ان تسبب أخماج خطيرة عند حدوث خلل او اضطرابات في دفاعات جسم المضيف المناعية (Brooks *et al.*, 2007) ، وكثيرا ما تصبح البكتريا انتهازية (David and Daum, 2010) ، وهي أحد الممرضات المسببة لالتهاب الثدي الاكثر انتشارا في مختلف انحاء العالم (Getahun, 2006) .

وتتمكن هذه البكتريا من احداث الضرر للمضيف من خلال الآليات الآتية: الالتصاق بأنسجة المضيف والتضاعف والانتشار بصورة كبيرة في الأنسجة محدثة فيها الضرر وذلك بإفراز مواد إلى خارج الخلية البكتيرية (Bacterial Extracellular Substances) وبعض من هذه النواتج الأيضية عبارة عن انزيمات (Enzymes) التي تزيد من قابلية البكتريا على اختراق انسجة المضيف وبعض هذه الانزيمات يعد من عوامل الإمراضية بسبب وجودها في سلالات *S. aureus* الأكثر ضراوة (O'Neill *et al*, 2007) ، أما البعض الآخر من النواتج الايضية لهذه البكتريا عبارة عن ذيفانات (Toxins) التي تعمل كأنزيمات والكثير منها يقع تحت السيطرة البلازميدية وجزء منها يقع تحت السيطرة الكروموسومية (Brooks *et al*, 2007) وهذه القابليات تعتمد على طبيعة المضيف الذي يواجه عوامل الفوعة التي تنتج من بكتريا *S. aureus* (Nair, 2000) .

صفة المقاومة للمثيسيلين كان نتيجة وجود الجين *mecA* الذي يشفر penicillin-binding protein (PBP2A) مع الفة منخفضة لمضادات β-lactam ، ويحمل هذا الجين على الاشرطة الكروموسومية العنقودية Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*(SCC) ، وهي العنصر الوراثية المتحركة الفريدة من نوعها المندمجة في كروموسوم المكورات العنقودية (Hiramatsu *et al.*, 2004) ، وكان التشخيص المظهري وطرق اختبار الحساسية تستغرق وقتا طويلا ومعظمها تمتلك محددات وراثية (Costa *et al.*, 2004) inherent limitations ، ومع ذلك فان طريقة الـ PCR كشفت النهج السريع والموثوق به لتشخيص هذه الكائنات المجهرية ، فان *mecA*- based PCR methods كانت مقبولة كالمعيار الذهبي "gold standard" (Bishop *et al.*, 2006) .

2- طرائق العمل

2-1-جمع العينات وتشخيصها

جُمعت 128 عينة قيح من النساء اللواتي يُعانينْ من التهاب الثدي والتي تراوحت أعمارهن م (20-45) سنه ، لعزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* في مستشفى الصدر التعليمي .

عزلت وشخصت المكورات العنقودية الذهبية بالاعتماد على الصفات الزرعية والمظهرية والفحص المجهري والاختبارات البايوكيميائية .

2-2-الأختبارات البايوكيميائية Biochemical Tests

2-2-1- اختبار إنتاج أنزيم الاوكسيديز Oxidase test

نُقل جزء من مستعمرة بكتيريَّة فتية نقيَّة منماة على وسط الآكار المُغذي بعمر 24 ساعة إلى ورقة ترشيح مشبعة مسبقا بكاشف أنزيم الأوكسيديز بوساطة أعواد خشبيَّة مُعقمة ، تحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي الغامق فوراً دليل على إيجابية الإختبار (Harley and Prescott, 2007) .

2-2-2-اختبار إنتاج أنزيم الكاتليز Catalase test

نُقل جزء من مستعمرة فتية للعزلة على شريحة زجاجيَّة وأضيفت اليها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين , فظهور الفقاعات الغازية يثبت إيجابية الاختبار (Forbes *et al.*, 2007) .

2-2-3-إختبار انتاج إنزيم الكواكيوليز Coagulase test

أُستعمل هذا الاختبار للتفريق بين سلالات الـ *S. aureus* المنتجة لهذا الإنزيم وغير المنتجة له ، وقد تم عمل الاختبار بطريقة الأُنبوب وكالآتي :

نُقل جزء من النمو البكتيري الى انبوبة أختبار حاوية على 5 مل من Brain heart infusion Broth بواسطة الناقل ويحكم غلق الأنابيب وتُحضن لليلة كاملة بدرجة 37 °م ثم توضع في جهاز الطرد المركزي 1000 دورة بالدقيقة لمدة 3 دقيقة ثم يؤخذ 0.5 مل من

University of Thi-Qar Journal Of Science (UTsci)
Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq
Volume 6, Number 1, December 2016

المحلول الطافي مع حجم مساوي له من البلازما ويوضعان في حمام مائي بدرجة 37°م لبضع ساعات ، تختثر البلازما يثبت إيجابية الاختبار (Brooks *et al.*, 2007).

2-2-4-تخمر سكر المانيتول Mannitol salt agar

زُرعت البكتريا على وسط المانيتول الملحي الصلب الذي يحتوي على تركيز ملحي عالي(NaCl 7%) ، للكشف عن قابلية البكتريا *S. aureus* على تخمير سكر المانيتول وتغير لون الوسط من الاحمر الى الاصفر (Brooks *et al.*, 2007).

2-3-التحري عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين (MRSA)

أُجري إختبار الحساسيّة للمضاد الحيوي المثيسيلين باستعمال طريقة Kirby-Bauer disk diffusion method ، وباستعمال وسط Muller Hinton Agar المُحضر طبقا لتعليمات الشركة المصنعة وذلك بتعقيم الوسط وتبريده إلى درجة حرارة 50°م بعدها صب في أطباق بتري معقمة بمقدار 20 مل في كل طبق ، وبعد تصلب الأطباق والتأكد من عدم تلوثها تم تلقيح الوسط الزرعي بالنمو البكتيري الفتي بعمره 18 ساعة والمماثل بالكثافة الضوئية لأنبوبة ماكفرلاند ، حيث أُضيف 0.3 مل من هذا النمو البكتيري ونشر بواسطة الناشر(Spreader) بصورة متجانسة ، بعدها تركت الأطباق لمدّة 15 دقيقة لتمام امتصاص النمو ، ثم وضعت اقراص الحاوية على مضاد المثيسيلين على سطح الوسط الزرعي وعند الضغط الخفيف على سطح القرص بواسطة ملقط (Forceps) معقم يتم تثبيته على سطح الوسط الزرعي ، بعدها حضنت الأطباق في حاضنة هوائية لمدّة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م ثم قرأت النتائج وحددت منطقة التثبيط (Inhibition zone) (وهي هالة شفافة تحيط بقرص المضاد الحيوي محسوبا معها قطر نفس قرص المضاد الحيوي) بإستعمال مسطرة مدرجّة , وعدت البكتريا حساسة (Sensitive) أو مقاومة (Resistance) للمثيسيلين وفق المواصفات الواردة في (CLSI, 2012) .

2-4-التحري عن جين *mecA* في عزلات *Staphylococcus aureus* باستعمال تقنية الـ PCR

تم التحري عن جين الـ *mecA* في 34 عزلة لبكتريا *S. aureus* وبأستعمال تقنية الـ PCR وذلك حسب الخطوات الاتية :

2-4-1:استخلاص DNA البكتيري

تم باستعمال طريقة الغليان (Boiling method) وفقا لما ورد في (Sambrook and Russell, 2005) .

2-4-2- تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

بعد تحضير البادئ Suspension Primer اعتمادا على النشرة المرفقة مع العبوة , تم تحضير المزيج الخاص بتفاعل سلسلة البلمرة في أنابيب PCR التي تمَّ توفيرها مع العدُة والمُتضمنة على المكونات التي يحتاجها التفاعل ،اضيفت المكونات الأُخرى الرئيسة لمزيج التفاعل طبقاً لما ورد في تعليمات الشركة وكالآتي:

جدول (1) مزيج تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة

مزيج تفاعل PCR	الحجم
مزيج التفاعل (master mix)	5µl
قالب الـ DNA	5µl
البادىء الامامي	3.5µl
البادىء الخلفي	3.5µl
الماء الخالي من الأنزيمات	3 µl
المجموع	20µl

ثم مزج الخليط بجهاز المازج (vortex) لمدَّة 10 ثانية ، بعدها نقلت الأنابيب الى جهاز المدور الحراري (PCR Thermocycler) لتضخيم الجين .

2-4-3-الدورات الحراريَّة للاختبار PCR Thermocycler conditions

أجري اختبار تفاعل سلسلة البلمرة باستعمال جهاز المدور الحراري PCR وكما هو واضح في الجدول (2) .

جدول (2) ظروف تفاعل الـ monoplex PCR للجين *mecA*

الشركة (المنشأ)	المصدر	Final elongation	Elongation	Annealing	Denaturation	Initia Denaturation	Gene
IDT (United Stated)	(Al-Talib *et al.*, 2009)	72°C for 5 min	30 Cycle: 72°C for 1min	(50-51)°C for 30 sec	94°C for 30 sec	94°C for 1min	*mecA*

University of Thi-Qar Journal Of Science (UTsci)
Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq
Volume 6, Number 1, December 2016

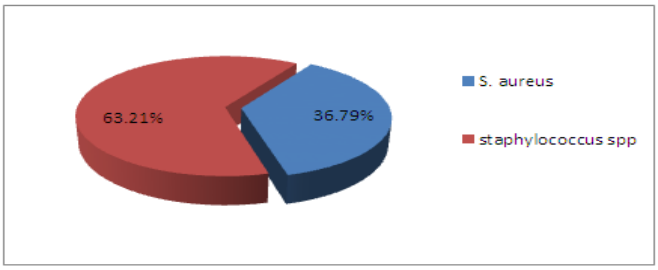
2-4-4-الترحيل الكهربائي الهلامي

Gel Electrophoresis

أُجري الترحيل الكهربائي بإستعمال هلام الأكاروز بنسبة 1% لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة (PCR product)، وبعد اكتمال عملية الترحيل فحص الهلام الحاوي على ناتج الPCR بإستعمال مصدر للأشعة فوق البنفسجية (U.V light source) , واخيرا صور الهلام لغرض توثيق النتائج ووحدة قياسه .

3-النتائج والمناقشة

جُمعت 128 عينة لغرض عزل وتشخيص المكورات العنقودية الذهبية تشخيصا اوليا أُجريت العديد من الإختبارات التشخيصيَّة والتي شملت الصفات الزرعية ونتائج الفحص المجهري والفحوصات البايوكيمياوية ، حيث ظهرت (106) من العزلات على الوسط التفريقي Gelatin mannitol salt agar تعود لجنس المكورات العنقودية وبنسبة (82.81)% بينما 22 المتبقية لم تظهر أي نمو على هذا الوسط التفريقي وبنسبة (17.19)% ، ثم أُجريت العديد من الاختبارات الكيموحيوية وخاصة اختبار Coagulase للتأكد من العزلات العائدة لنوع *S. aureus* والتي كان عددها (34) عزلة بنسبة (32.07)% اما العزلات المتبقية لم تنتج انزيم Coagulase والتي كان عددها (67) بنسبة (63.21)% شكل (1) .



شكل (1):نسبة *S. aureus* المعزولة من العينات السريرية لالتهاب الثدي

3-1-الخصائص الزرعية والمظهرية

ان عزلات *S. aureus* نمت على وسط المانيتول الملحي Mannitol salt agar هوائيا حيث تغيير لون phenol red في الوسط من اللون الوردي إلى الأصفر نتيجة لقدرتها على تخمير سكر المانتول وبعض العزلات لم يتغير لون الوسط لعدم قدرتها على تخمير سكر المانتول وهذا يتفق مع ما ذكره كل من (Schleifer and Bell, 2009) . بينما اظهر الفحص المجهري لـ *S. aureus* بأن خلاياها كانت موجبة لصبغة كرام كروية متجمعة بصورة ثنائية أو رباعية أو على هيئة عناقيد غير منتظمة Bunches of grapes وكما هو واضح في الجدول (3).

3-2-الفحوصات البايوكيميائية

Biochemical Examination

أظهرت النتائج أن جميع عزلات *S. aureus* كانت موجبة لاختبار Catalase وقد أُجري هذا الاختبار للتفريق بين المكورات العنقودية والمسبحيات الكرويَّة Streptococci إذ تُعطي الأخيرة نتائج سالبة لاختبار Catalase, بينما المكورات العنقوديَّة تنتج هذا الانزيم لأنها هوائية أو لاهوائيَّة اختياريَّة ويعزى ذلك إلى احتوائها على إنزيم superoxide dismutase والذي يحميها من التأثير الضار لمادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتحويله إلى ماء وأُوكسجين، كما اجري إختبار Oxidase للتفريق بين هذه البكتريا وبكتريا *Micrococcus* ، اذ تعد البكتريا الاخيرة موجبة لهذا الإختبار (Brooks *et al.*, 2007).

كما أظهرت نتيجة موجبة لأنزيم مختر بلازما الدم Coagulase ، ويفضل عمل اختبار انتاج انزيم coagulase بطريقة الانابيب لان الاختبار بطريقة الشريحة ربما يعطي نتائج غير دقيقة بسبب المواد المستخدمة او بسبب خلل في تقنية العمل (Kloos and Jorgensen, 1985) وكما هو واضح في الجدول (3).

عند استعمال طريقة الانبوبة tube coagulase test للكشف عن انتاج انزيم الـ Coagulase الحر المفرز خارج الخلية الذي يتفاعل مع عامل تفاعل الـ Coagulase (coagulase reacting factor) (CRF) في البلازما ليشكل معقد وهو الخثرينthrombin الذي يحول مولد الليفين (fibrinogen) الى ليفين (fibrin) وهو بدوره ينتج خثرة من البلازما , بينما طريقة الشريحة تستعمل للكشف عن انزيم coagulase المرتبط بجدار الخلية الذي يعرف كعامل التكتل (clumping factor) الذي يرتبط بمولد الليفين في البلازما ليشكل خثرة الليفين التي تترسب على جدار الخلية البكتيرية ومن ثم هذه البكتريا تتمسك بعضهم بعضا ويلاحظ التكتل (Kateete *et al.*, 2010) .

University of Thi-Qar Journal Of Science (UTsci)
Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq
Volume 6, Number 1, December 2016

جدول(3): الاختبارات التشخيصية لعزلات *S. aureus*

نوع الاختبار التشخيصي	عدد العزلات الموجبة	النسبة المئوية (%)
تخمر المانيتول	28	84.6
الفحص المجهري	34	100
Catalase	34	100
Oxidase	0	0
انتاج Coagulase بطريقة الانابيب	34	100

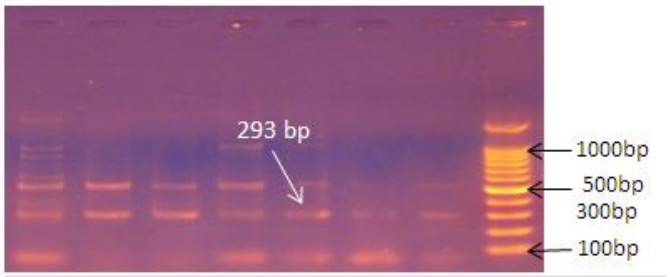
3-3-التحري عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسلين (MRSA) مظهريا

تم التحري عن صفة المقاومة للمثيسلين مظهريا باستعمال أختبار اقراص الحساسية الدوائية للمثيسلين وقد أظهرت النتائج بأن جميع العزلات كانت مقاومة للمثيسيلين وبنسبة (100%). سجل Al-Maliki، (2009) نسبة المقاومة (80.3%)، كما بين Al-Geobory, (2011) أن نسبة المقاومة بلغت حوالي 90.90%. وأوضح Al-Dahbi and Al-Mathkhury, (2013) بأن نسبة المقاومة بلغت حوالي 94.3%، وأيضا Peck *et al,* (2009) وجدوا أن حوالي51.4% من العزلات كانت مقاومة لـ Methicillin في حين 48.6 % كانت حساسة لها.

3-4-التحري عن جين *mecA* في عزلات *Staphylococcus aureus* باستخدام تقنية الـ PCR

بينت النتائج أن من بين 34 عزلة مشخصة للمكورات العنقودية الذهبية 14 عزلة كانت تحمل الجين *mecA* ونسبته (41.1)% في الزوج القاعدي (293)bp وكما موضح في الشكل (2) ، وقد لوحظت المقاومة للميثيسيلين في 34عزلة عند اختباره ظاهريا بواسطة طريقة نشر الاقراص ، إن المقارنة بين الطريقة المظهرية وفحص PCR لا تظهر تطابق ، أظهرت العزلات 25 المتبقية مقاومة للميثيسيلين وكانت لاتحمل الجين *mecA* لذلك من المحتمل أن تكون المقاومة للميثيسيلين بآلية أخرى. وبالمثل فإن بعض المحققين (Araj *et al.,* 1998) توصلوا الى نتائج متباينة بين طرق نشر الاقراص والتحري الجيني للكشف عن مقاومة الميثيسيلين . تعزى المقاومة للعزلات السالبة لجين *mecA* الى تحوير جينات normal PBP والإفراط في انتاج انزيمات الـ β- lactamase والـ meticillinase (Ciftci *et al.,* 2009) .

بالإضافة إلى ذلك وجد Alper *et al.* (2009) أن من بين 13 عزلة من *S. aureus* كانت مقاومة للميثيسيلين ظاهريا ، فقط 4 (30.7%) كانت ايجابية لجين *mecA* . وان المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية يؤدي إلى حدوث تغايرات في آلية المقاومة , واكتساب عوامل المقاومة المورثّة من الأنواع البكتيرية الاخرى وحدوث طفرات وراثية في البكتريا (Hrabak *et al.*, 2010)



الشكل (2): الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم الجين *mecA* باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل monoplex PCR للـDNA المستخلص من عزلات *S. aureus* على هلام الاكاروز 1% المصبغ بصبغة بروميد الاثيديوم وبفرق جهد 80 فولت لمدة 1.15 ساعة تحت اشعة UV , المسار M:الدليل الحجمي(DNA ladder bp 1500-100). المسار من 1-7: نواتج عملية التضخيم في عزلات *S. aureus* الحاملة للجين *mecA* عند الزوج القاعدي (293 bp).

References

Al-Dahbi, A.M. and Al-Mathkhury, H.J.(2013). Distribution of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Iraqi patients and Healthcare Worker. *Iraqi. J. Sci*. 54: 293-300.

Al-Geobory, H.A.H.(2011).Comparative study between Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), and detect the antimicrobial effects of some plant extracts on them. Msc. Thesis. College of Science/ Baghdad University. Iraq.

Al-Maliki, A.A.A.(2009). AStudy of some Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and (MRSE) isolated from Baghdad hospital patients. M.Sc.Thesis. College of Science. AL-Mustansiriya University.

holder dairy farms in the central highlands of Ethiopia. MSc. Thesis, Addis Ababa University, Debre Zeit, Ethiopia.

Harley, J.P. and Prescott, L.M. (2007). Laboratory Exercises in Microbiology.. 7th ed. McGraw-Hill Higher Education. New York.p.24.

Hiramatsu, K.; Shinya, W.; Fumihiko, T.; Teruyo, I. and Tadashi, B. (2004) . Genetic characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* Vaccine 22: 55-58.

Hrabak, J.; Zemanova, A. and Chudackova, E.(2010). Mobile genetic elements in the epidemiology of Bacterial resistance to antibiotics. Epidemol. Microbiol .Imunol;59:55-66.

Kateete, D., Kimani, C., Katabazi, F., Okeng, A., Okee, M., Nanteza, A., Joloba, M. and Najjuka, F. (2010). Identification of Staphylococcus aureus: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Ann Clin Microbiol. Antimicrob. 9:23-30.

Kloos, W., and Bannerman.T. (1995). Staphylococcus and Micrococcus. In: Murray, P., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F. C. and Yolken, R. H. (ed.). Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

Nair, S.P.; Williams, R.J. and Henderson, B. (2000). Advances in our understanding of the bone and joint pathology caused by *Staphylococcus aureus* infection. *Rheumatology*. 39:821-834.

O'Neill, E.; Pozzi, C.; Houston, P.; Smyth, D.; Humphreys, H.; Robinson, D.R. and O'Gara, J. P. (2007). Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J. Clin. Microbiol*. 45: 1379-1388.

Peck, K. R.; Baek, J. Y.; Song, J-H. and Ko, K. S. (2009). Comparison of genotypes and enterotoxin genes between *Staphylococcus aureus* isolates from blood and nasal colonizers in Korean hospitals. *J. Korean. Med. Sci*.24:585-591.

Sambrook, J. and Russell, D. (2005). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rded. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.USA.

Schleifer, K. and Bell, J.A. (2009). *Staphylococcus*. In Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology.

Alper, C., Arzu, F., Ertan, E. and Serap, S. (2009). Detection of methicillin resistance and slime factor of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. Brazilian J. Microbiol., 40: 254-261.

Al-Talib, H; Chan,Y. Y; Alyaa, A. et al. (2009). "A Pentaplex PCR Assay for the Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine Leucocidin," BMC Microbiology, Vol.9, No.1, p. 113.

Araj, G.F., Talhouk, R.S., Siman, C.J. and Maasad, M.J. (1998). Discrepancies between *mecA* PCR and conventional tests used for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Int. J. Antimicrob. Agent., 11: 47-52.

Bishop, E. J., Grabsch, E. A., Ballard, S. A., Mayall, B., Xie, S., Martin, R. and Grayson, M. L. (2006). Concurrent analysis of nose and groin swab specimens by the IDI-MRSA PCR assay is comparable to analysis by individual-specimen PCR and routine culture assays for detection of colonization by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol. 44(8): 2904-2908.

Brooks, G.F.; Carroll ,K.C.; Butel ,J.S. and S.A. Morse. (2007). Jawetz, Melnick and Adelbergs Medical Microbiology. 24th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York. P.224-232.

Ciftci, A., Findik, A., Onuk, E. and Savasan, S. (2009). Detection of methcilline resistance and slime factor productin of *staphylococcus aureus* in bovine mastitis. Brazilian J. Micro. 40: 254-261.

(**CLSI**) Clinical and laboratory standards institute (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S22. Clinical and laboratory standards institute, Wayne, PA.

Costa, A., Kay, I. and Palladino, S. (2004). Rapid detection of *mecA* and *nuc* genes in staphylococci by real-time multiplex polymerase chain reaction. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 51 (1): 13-17.

David, M. Z. and Daum, R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clinical Microbiology Reviews, 23: 616-687.

Forbes , A.; Sahm, D. and Wessfeld, A. (2007). Diagnostic microbiology. 12th ed. *Elsevier. Texas*.p.219-25.

Getahun, K. (2006). Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns of major pathogens in small

Parte, A. C., Whitman, W. B., Vos, P. De, G. M. Garrity, Dorothy Jones, Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer K. and Whitman ,W. B. ed. Biological Sciences Building University of Georgia Athens, GA -USA. p:392-420.