------مجلة علوم الرافدين، المجلد 24، العدد 1، ص9-18، 2013------

دراسة المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة في جرثومة *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات التهاب الضرع في الأبقار

بيداء غانم محمد — قسم علوم الحياة — كلية التربية للبنات — جامعة الموصل

سمية ياسين الدباغ — قسم الأحياء المجهرية — كلية الطب البيطري — جامعة الموصل

عامر يحيى الجلبي

(تاريخ الاستلام 18/ 3 /2012 ؛ تاريخ القبول 10 /9 / 2012)

الملخص

تم إجراء الدراسة الحالية على جرثومة *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات التهاب الضرع (السريري وتحت السريري) في الابقار، شخصت العزلات باستخدام الصفات الزرعية والاختبارات الكيمياحياتية فضلاً عن استخدام نظام API الخاص بجرثومة *Staph. aureus*. اختبرت مقاومة العزلات للمضادات الحيوية عند تراكيزها النهائية مايكروغرام / مل Penicillin, Gentamicin, Oxacillin, Vancomycine Tetracycline, Erythromycin, Methicilin , . فضلاً عن ذلك فقد اختبرت مقاومة هذه العزلات لأربعة معادن ثقيلة هي (كلوريد الزنك، كلوريد الكادميوم، النحاس و كلوريد الزئبق) وقد اظهرت العزلات تبايناً واضحا في مقاومتها للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة. تم اجراء التحول الوراثي لجرثومة *E.coli* سلالة k12JM83 المختبرية بالـ DNA البلازميدي المنقى من العزلات المدروسة لتعيين مواقع المورثات المانحة لصفة المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة وقد اظهرت النتائج ان المورثات المانحة لمقاومة المضادات الحيوية المدروسة ولعزلات جرثومة *Staph. aureus* واقعة على الـ DNA البلازميدي وكان مدى التحول بين (0.8 – 2.0) × 10^{-4} . كذلك اظهرت النتائج ان المورثات المانحة المقاومة للمعادن الثقيلة واقعة على الـ DNA البلازميدي.

الكلمات الدالة: *Staph.aureus*، التهاب الضرع في الابقار، المقاومة للمضادات الحيوية، المقاومة للمعادن الثقيلة.

A Study on Antibiotics and Heavy Metals Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Mastitis in Cows

Baydaa Gh. Mohamad *Department of Biology College of Education University of Mosul*

Sumaya Y. Al-Dabbagh *Department of Microbiology College of Veterinary Medicine University of Mosul*

Amer Y. Al-Chalaby *University of Mosul*

ABSTRACT

The present study was conducted on *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical cases of mastitis in cows. Isolates were diagnosed by conventional and biochemical tests and API kit which was used to confirm the identification of *Staph. aureus*. Antibiotic resistance of these bacteria were tested against Penicillin, Gentamicin, Oxacillin, Tetracycline, Erythromycin, methicilin, vancomycin and the heavy metals like cadmium chloride, zinc chloride, mercury chloride and copper. The genetic transformation of the standard strain of *E. coli* k12JM83 was done with the plasmid DNA purified from these study isolates. The results revealed that the location of antibiotic resistance genes were found to be on plasmid. Transformants were obtained at a frequency of $(0.8 - 2.0) \times 10^{-4}$. The results showed that location of heavy metals resistance genes were located on plasmid DNA also.

Keywords: *staph.aureus* , Bovine mastitis, Antibiotic resistance, Heavy metals resistance.

المقدمة

تعد جرثومة المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* من الجراثيم المهمة والتي من الممكن عزلها من حليب الأبقار حيث يمكن أن تتواجد هذه الجرثومة في الحليب نفسه أو على سطح الضرع إضافة إلى انها قد تلوث مكائن الحلب وأيدي العمال وملابسهم مما جعلها احد أهم الأسباب الرئيسية لحالات التهاب الضرع الحاد والمزمن وتحت السريري في المجترات (Kumare *et al*., 2010).

وقد أشارت العديد من الدراسات إلى التشابه الكبير بين جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من حالات التسمم الغذائي في الإنسان وتلك المعزولة من حالات التهاب الضرع في المجترات (Mork *et al*., 2004).

ان استخدام المضادات الحيوية تعد إحدى الطرائق المستخدمة لعلاج حالات التهاب الضرع في المجترات، إلا أن استخدام المضادات الحيوية بصورة مستمرة وبشكل عشوائي ادى إلى مقاومة هذه الجراثيم للمضادات الحيوية فقد سجل (Dingwell *et al*., 2003) مقاومة جرثومة *Staph. aureus* للمضادات الحيوية بنسب تتراوح بين 20 – 78% ولأكثر من مضاد حيوي واحد. وتعد مقاومة جرثومة *S. aureus* للمضادات الحيوية من اهم المشاكل في عدم السيطرة على المرض وتفاقمه وبالتالي زيادة تعرض الانسان لحالات التسمم الغذائي من خلال انتقال الجرثومة عبر السلسة الغذائية (Kapur *et al*., 1995).

بينت الدراسات الوراثية ان المقاومة تحدث نتيجة تغيرات وراثية، وبذلك تكتسب الجراثيم صفة المقاومة للمضادات الحيوية وتشمل المقاومة نوعين المقاومة الكروموسومية والمقاومة الخارج كروموسومية إذ تحوي الجراثيم على وحدات وراثية مستقلة تقع خارج الكروموسوم يطلق عليها البلازميدات plasmids ومن ضمنها R-plasmid فهو يؤدي دورا رئيسياً في انتشار المقاومة (Koniman *et al*., 1997 and Hardy, 2002).

ويسبب هذا البلازميد مشكلات خطيرة اذ يحمل الجينات التي تمنح صفة المقاومة للمضادات الحيوية وبذلك تستطيع الجرثومة النمو بوجود المضاد الحيوي.

وفي العديد من الجراثيم تشفر البلازميدات أيضا لأنظمة المقاومة للمعادن الثقيلة وبضمنها النيكل والكادميوم والزنك والزئبق وان بلازميدات المقاومة R-plasmid هي التي تحدد المقاومة للمعادن الثقيلة (David and Frank, 1975)، ومما يزيد من خطورة هذا البلازميد هو امكانية حصول نقل بلازميد المقاومة R-plasmid ليس من خلية إلى اخرى ضمن النوع الواحد فحسب ولكن بين سلالات من انواع مختلفة (Mckinzey, 2007)، وكذلك إمكانية انتقاله من الحيوانات إلى الانسان عبر السلسة الغذائية أو نتيجة التعامل مع الحيوانات كالكلاب والابقار (Kapur *et al*., 1995 ; Call *et al* ., 2008 and Sharma *et al* ., 2011) لذلك تعد هذه البلازميدات من عوامل الضراوة في الجراثيم اذ تزيد من أمراضية الجرثومة ويكون من الصعب علاجها والسيطرة عليها نتيجة مقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة (Momtaz *et al*., 2010).

لذا هدفت الدراسة الحالية الى عزل جزيئات الـ DNA البلازميدي من سلالات جرثومة *Staph. aureus* وتنقيتها وتحديد مواقع المورثات المانحة لصفة المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة باستخدام التحول الوراثي Genetic transformation.

المواد وطرائق العمل

العزلات الجرثومية

تم الحصول على 6 عزلات من جرثومة *Staphylococcus aureus* من كلية الطب البيطري / جامعة الموصل، والمعزولة من حالات التهاب الضرع في الابقار. شخصت العزلات باستخدام الصفات المجهرية والزرعية والكيمياحياتية فضلاً عن استخدام تقنية API للمكورات العنقودية لتأكيد تشخيصها وحسب طريقة الشركة المصنعة، كما تم استخدام عزلة من جرثومة *E. coli* k12JM83 القياسية وهي سلالة مختبرية معلومة النمط الوراثي كما هو مبين في الجدول (1).

الجدول 1: النمط الوراثي لسلالة *E.coli* k12JM83.

السلالة	النمط الجيني	المصدر
E. coli k12JM83	ara, A (lacpro A, B), rp51, θ80, lacz Δ M15 k^{rt}, k^{mt}	George M. Weinstok, Department of biochemistry and Molecular Biology, University of Texas, U.S.A

الاختبارات الكيمياحياتية

اختبار Coagulase، اختبار الكاتاليز، اختبار الاوكسيديز، اختبار اختزال النترات، اختبار تحلل الجيلاتين، اختبار تخمر الكاربوهيدرات و اختبار DNase فضلاً عن استخدام تقنية API الخاصة بالمكورات العنقودية المجهزة من قبل شركة BioMrieux الفرنسية.

اختبار المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة

اجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة الحالية لعزلات جرثومة *Staph. aureus* والعزلة القياسية *E. coli*k12 عند تراكيزها النهائية مايكروغرام / مليلتر وهي:

Vancomycine (Va 30 µg), Erythromycin (E 15 µg), Tetracyclin (Tc 30 µg), Gentamycin (Gn 10 µg), penicillin (Pen – 10 u), Methicilin (30 µg), Oxacillin (Oxa 30 µg)

حسب طريقة (Salle, 1973).

اما المعادن الثقيلة فقد حضرت من اذابة المعادن الثقيلة (كلوريد الزئبق، كلوريد الزنك، الكادميوم، النحاس) بتركيز خزين 25 µg / ml في الماء المقطر المعقم وحفظت بدرجة حرارة 4°م ثم أضيفت إلى وسط الاكار المغذي المعقم والمبرد إلى درجة حرارة (45- 50°م) وبالتركيز النهائي 25 µg / ml(David and Frank, 1975).

عزل الـ DNA البلازميدي

استخدم مقياس (50) مل من المزرعة الجرثومية حسب طريقة (Birnboin and Doly, 1979) لعزل الـ DNA البلازميدي من عزلات جرثومة *Staph. aureus* وتنقيته.

تقدير تركيز الـ DNA البلازميدي طيفياً

تم تقدير تركيز الـ DNA البلازميدي حسب طريقة (Ahmad, 1989).

التحول الوراثي Genetic Transformation

لغرض تحديد مواقع المورثات المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية والمعان الثقيلة تم نقل الـ DNA البلازميدي من جرثومة *Staph. aureus* إلى السلالة القياسية *E. coli* k12 معلومة النمط الجيني، وان عملية التحول الوراثي تتضمن:

1. تحضير الخلايا المؤهلة من سلالة *E. coli* k12 :

اجري تحضير الخلايا المؤهلة من جرثومة *E. coli* k12 حسب طريقة (Mandel and Higa, 1970).

2. التقاط الـ DNA البلازميدي:

تم اجراء تجربة التقاط الـ DNA البلازميدي المنقى من سلالات جرثومة *S. aureus* من قبل الخلايا المؤهلة حسب طريقة (Lederberg and Cohen, 1974).

النتائج و المناقشة

تشخيص العزلات الجرثومية

أظهرت نتائج التشخيص بأن الجرثومة عائدة لجنس المكورات العنقودية الذهبية *Staph. aureus* اعتمادا على الصفات الشكلية والزرعية والاختبارات الكيموحياتية ومنها اختبار coagulase واختبار تخمر الكاربوهيدرات كذلك تم اجراء اختبار API الخاص بالمكورات العنقودية oxidase, catalase, والذي اثبت عائدية العزلات قيد الدراسة إلى النوع *Staph. aureus*.

اختبار الحساسية والمقاومة للمضادات الحيوية

تم اختبار حساسية ومقاومة عزلات جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من حالات التهاب الضرع في الابقار فضلاً عن سلالة *E. coli* k12 المختبرية ولسبعة مضادات حيوية حسب طريقة (Salle, 1973)، وكذلك تم اختبار حساسية العزلات الجرثومية *Staph. aureus* و *E. coli* k12 لأربعة معادن ثقيلة حسب طريقة (David and Frank, 1935)، وقد أظهرت العزلات قيد الدراسة تبايناً واضحاً في حساسيتها ومقاومتها للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة قيد الدراسة.

الجدول 2: حساسية ومقاومة عزلات جرثومة *Staph. aureus* للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة عند تراكيزها النهائية µg / ml.

أوساط الاكار المغذي الحاوي على التراكيز النهائية للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بالمايكروغرام / مليلتر											رقم العزلة
Cupper 25	**$HgCl_2$ 25**	**Cd^{+2} 25**	$ZnCl_2$ **25**	**Va 30**	**Me 30**	**E 15**	**Oxa 30**	**Te 30**	**Gn 10**	**Pen 10**	
R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	1
R	S	R	S	S	R	S	R	S	R	R	2
R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	3
R	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	4
R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	5
R	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R	6
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*E. coli*k 12

Gn: Gentamycin, Pen: Penicillin, Te: Tetracyclin
Oxa: Oxacillin, E: Erthrymycin, Me: Methicilin
Va: Vancomycin
Cd^{+2}: Cadmium Chloride
$ZnCl_2$: Zinc Chloride, $HgCl_2$: mercury Chloride

من الجدول (2) يتبين أن عزلات جرثومة *Staph. aureus* أظهرت تفاوتا في مقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة وبناء على ذلك فقد تم وضعها في ست مجاميع. إذ تظهر النتائج ان هناك عزلات مقاومة لخمسة مضادات حيوية كما في المجموعة الاولى والخامسة في حين ان المجموعة السادسة كانت مقاومة لثلاثة مضادات حيوية فقط في حين تراوحت المجاميع الاخرى في مقاومتها لـ اربعة مضادات حيوية فضلا عن ان المجاميع الستة قد اشتركت في مقاومتها للميثيسيلين. إن التباين في خاصية المقاومة للمضادات الحيوية يرجع إلى امتلاك الجراثيم مورثات واقعة على الكروموسوم أو على الـ DNA البلازميدي وهناك اليات مختلفة تبديها جراثيم الـ *Staph. aureus* من اجل مقاومة المضادات الحيوية وتعد المقاومة المحمولة على البلازميدات اكثر الانواع شيوعا في جرثومة *Staph. aureus* وهذا يتفق مع ما اشار اليه (Call *et al*., 2008) بأن المقاومة للمضادات الحيوية شائعة في جراثيم *Staph. aureus* المعزولة من حالات التهاب الضرع في الابقار حيث تحتوي هذه الجراثيم على بلازميدات ذات مقاومة متعددة وتحتوي هذه الجرثومة على بلازميدات متعددة الاحجام يتراوح حجمها من 17-55 kb من نوع R. plasmid والتي تبدي المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.

لقد تم إجراء اختبار المقاومة للمعادن الثقيلة حسب طريقة العمل ألمبينه وكانت النتائج كما مبين في الجدول (2) حيث يلاحظ ان المقاومة كانت مطلقة لجميع عزلات جرثومة *Staph. aureus* أي بنسبة 100% لكل من النحاس والكادميوم بينما كانت حساسة بنسبة 100% للزئبق وكانت اربع عزلات بين ست عزلات مقاومة للزنك، في العديد من الجراثيم تحمل المقاومة للمعادن الثقيلة على البلازميدات وان البلازميدات المقاومة R. plasmid تحدد المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة ويعتقد بأن هذه المقاومة لا تنشأ عن طريق الصدفة وان هناك عوامل انتخابية تحدد ظهورها ومنها التلوث البيئي (Poston and Llisawhee ; 1991) تمت المحاولة من خلال هذه الدراسة اثبات ان مصدر المقاومة للمعادن الثقيلة المدروسة (Cu^{+} , $HgCl_2$, $CdCl_2$, $ZnCl_2$) (كلوريد النيكل، كلوريد الزنك، النحاس، كلوريد الزئبق) هي جينات واقعة على الـ DNA البلازميدي وان هناك علاقة بين المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة.

التحول الوراثي

ومن اجل تعيين مواقع هذه المورثات المقاومة للمعادن الثقيلة وكذلك المقاومة للمضادات الحيوية وتحديد العلاقة بينهما فقد تم اجراء تجربة التحول الوراثي باستخدام سلالة *E. coli* K12 المختبرية المعلومة الـنمط الوراثي من خلال تحويل الـ DNA البلازميدي المنقى والمحضر من عزلات جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من حالات التهاب الضرع في الابقار وبالتالي اكساب سلالة *E. coli* K12 صفات وراثية جديدة تعتمد على الصفات المحمولة على الـ DNA البلازميدي وبالتالي تعيين مواقع المورثات المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة قيد الدراسة.

الجدول 3: تردد التحول الوراثي وكفاءة التحول الوراثي لجرثومة *Staph. aureus* المعزولة من التهاب الضرع في الأبقار.

نماذج الـ DNA البلازميدي المنقاة من عزلات جرثومة *Staph.aureus*	تركيز الـ DNA المنقى بـ *g*/ml	كفاءة التحول الوراثي	تردد التحول الوراثي
1	0.97	$66x10^{12}$	$0.8x10^{-4}$
2	1.62	$60x10^{12}$	$1.2\ x10^{-4}$
3	0.71	$53x10^{12}$	$1.5\ x10^{-4}$
4	0.78	$36x10^{12}$	$0.9\ x10^{-4}$
5	1.1	$56x10^{12}$	$1.1\ x10^{-4}$
6	1.2	$62x10^{12}$	$2\ x10^{-4}$

من خلال الجدول (3) نلاحظ ان مصدر المقاومة للمضادات الحيوية المدروسة هي مورثات واقعة على الـ DNA البلازميدي وقد اظهرت تجربة التحول الوراثي عدم وجود أي مورث مقاوم للمضادات الحيوية قيد الدراسة واقع على الـ DNA الكروموسومي وهذا يتفق مع ما حصل عليه (Call *et al*., 2008) حيث اشار إلى امتلاك جرثومة *Staph. aureus* لبلازميد وزنه الجزئي 17.2 Kb يحمل المقاومة لعدد من المضادات الحيوية وهذا البلازميد له القابلية على الانتقال إلى السلالات الحساسة من الجرثومة وهذا ما اشار اليه ايضاً (Febler *et al*., 2010) ان معظم سلالات جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من حالات التهاب الضرع في الابقار تحوي بلازميدات مقاومة لستة مضادات حيوية وايضا اشار (Mckinzey, 2007) إلى امتلاك جرثومة *Staph. aureus* بلازميدات مقاومة لأكثر من واحد من المضادات الحيوية وهذه البلازميدات من النوع الذي له القابلية على التحول إلى السلالات الحساسة من الجرثومة وهذا ما اثبتته دراستنا.

كذلك تبين من الدراسة ان مصدر المقاومة للمعادن الثقيلة المدروسة (كلوريد الزنك، النحاس وكلوريد الكادميوم) هي مورثات واقعة على الـ DNA البلازميدي من خلال تجربة التحول الوراثي حيث نلاحظ ان السلالة *E. coli*12 كانت حساسة للمعادن المذكورة اصبحت بعد التحول الوراثي مقاومة لهذه المعادن وهذا يتفق مع ما حصل عليه (David and Frank, 1975) حيث اشار (Covaco *et al*., 2010) إلى امتلاك جرثومة *Staph. aureus* بلازميدات مسؤولة عن مقاومة الكادميوم و الزنك والنحاس.

كما بين (Yoo and Silver, 1991) ان البلازميد P1258 الحامل لمقاومة البنسلين يحمل جينات مقاومة الكادميوم والزنك وان هذا البلازميد له القابلية على الانتقال إلى العزلات الحساسة من الجرثومة ناقلا صفة المقاومة للبنسلين والمعادن الثقيلة، كذلك وجد (Baker *et al*., 2011) ان الجينات المسؤولة عن منح صفة المقاومة لمعدن cupper واقعة على البلازميد. وتكون مرتبطة مع مقاومة المضادات الحيوية فيما جاءت دراستنا مخالفة لما حصل عليه (Alison *et al*., 1977) حيث كانت جميع العزلات حساسة لمعدن الزئبق أي بنسبة 100% وهذا يفسر استخدامه كمطهر في السابق نلاحظ ايضا من الجدول (3) ان قيم التردد الوراثي كانت متقاربة لجميع عزلات جرثومة *Staph. aureus*. ربما دل ذلك على وجود تقارب في حجم الـ DNA البلازميدي لجميع العزلات وهذا يتفق مع ما حصل عليه (Dham and Shuait, 2000) في دراستهما للتحول الوراثي في جرثومة *Staph. aureus*.

المصادر

Ahmad, K. D. (1989). The positive control of ilvc Expression in *E. coli* K-12. Ph.D. Thesis, Univ. Durahm. England.

Baker, J.; Sengupta, M.; Jayaswal, R.; Morrissey, J. (2011). The *Staphylococcus aureus* CsoR regulates both chromosomal and plasmid encoded copper resistance mechanisms. *Enviromental Microbiology*., **13**, 2495-2507.

Birnboim, H. C.; Doly, J. A. (1979). A rapid Alkaline extraction procedure for screening recombination plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7** , 1513-1520.

Call, D. R.; Davis, M. A.; Sawant, A. A. (2008). Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production . *Animal health Research Reviews*., **2**, 159-167.

Cavaco, L. M.; Hasman, H.; Stegger, M.; Ersen, P. S.; Skov, R.; Fluit, A. C.; I to, T.; Aarestrup, F. M. (2010). Cloning and occurrence of czrC, agene conferring cadimium and zink resistance in methicillin – resistance *Staphylococcus aureus* CC398 isolates. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy J*., **54**, 3605-3605.

David, J. G. ; Frank, E. Y. (1975). Epidemiology of Antibiotic and Heavy Metal Resistance in Bacteria: Resistance patterns in Staphylococci isolated from populations Not known to be Exposed to Heavy metals. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*., **17**, 614-621.

Dham, K. ; Shuaib, K. (2000). Introduction of plasmid DNA (R. factor) purified from awild type *of Staphylococcus aureus* in to *Escherichia coli* by transformation. *J. Edu. Sci.,* **42**, 54-58.

Ding well, R. T.; Leslie, K.E.; Duffield, T. F.; Schukken, Y. H.; Decosteaux, L.; Keefr, G.P,; Kelton. D. F.; Lissemore, K. D.; Shewfelt, W.; Dick, P.; Bagg, R. (2003). Efficacy of intra mammary tilmicosin and risk factors fure cure of *Staph. aureus* infection in the dry period. *J. Dairy Sc*i ., **86**,159-168.

Fibler, A.; Scott, C.; Kadlec, K; Ehricht, R.; Monecke, S.; Schwarz, S. (2010). Characterization of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST 398 from cases of bovine mastitis. *J. Antimicrob chemother*., **65**, 619-625.

Hardy, S. P. (2002). Human Microbiology. Liflines (Taylor and Francis). CRCpress Inc.22-28.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schrecken berger, P. C. winn; W. C. (1997). Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed., Lippincott-Raven publishers, philade lphia, USA pp. 34-37.

Kpnr, V.; Sischo, W. M.; Greer, R. S.; Whittam, T. S.; Musser, J. M. (2005). Molecular population Genetic analysis of *Staph. aureus* Recovered from cows. *J. Clinical Microbiology*., **33**, 376-380.

Kumar, R.; Yadav, B.R.; Singh; R.S. (2010). Genetic determinants of Antibiotic resistance in *Staph. aureus* is lates from Milk of Mastitic crossbred cattle. *J. Curr. Microbal*., **60**, 379-386.

Leder berg, E. M. ; Cohen, S. N. (1974). Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, **19**, 1072-1074.

Mandel, M. ; Higha, A. (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, **53**, 159-161.

Mckinzey, M. (2007). Evolutionary antibiotic resistance as documented in multiple strains of staphylococcus . *J. Eukaryon.*, **3**, 75-79

Momtaz, H.; Rahimi, E.; Tajtakhsh, E. (2010). Detection of some virulence factors in Staphylococcus aureus isolated from clinical and subclinical borin mastitis in Iran. *African J. Biotechnology*., **9**, 3753-3758.

Mork, T.; Waage, S.; Tollersrud, T.; Mosdol, G.; Sviland, S. (2004). Bacteria causing clinical mastitis in ewes in Norway. *Nor. Vet. Tidss. Kr*., 819-826.

Postsn, S. M. ; Llisawhee, F. (1991). Genetic characterization of resistance to metal ions in methicillin – resistance *Staphylococcus aureus*: elimination of resistance to cadmium – mercury and tetracycline with loss of methicillin resistance, *J. Med. Microbiol*., **34**, 193-201.

Salle, A. J. (1973). "Fundamental Principles of Bacteriology". 7th ed., Mcgraw- Hill book company, New York. pp. 637-645.

Sharma, D.; Sharma, P. K.; Malik, A. (2011). Prevalence and Antimicrobial susceptibility of druy Resistance *Staphylococcus aureus* in Raw milk of Dairy cattle.*(IRJM).*, **2**, 466-470.

Weis, A. A.; Murphy; S. D.; Silver, S. (1977). Mercury and Organomercurial resistances determined by plasmids in *Staphylococcus aureus* . *J. Bacteriology*, **132**, 197-208.

Yoon, K. P. ; Silver, S. (1991). A second gene in the *Staphylococcus aureus* "cad A" cadmium resistance determinant of plasmid p1258. *J. Bacteriology*., **173**, 7636-7642.