

ارتباط میان بتالاکتاماز و پروتئین A در استافیلوکوکوس آرنوس

دکتر روحا کسری کرمانشاهی^۱، دکتر حسین کیوانی امینه^۲، مسعود گلعلی پور^۳

۱- دانشیار گروه بیولوژی دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، ۲- استادیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران،

۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم اصفهان

سابقه و هدف: استافیلوکوکوس آرنوس گونه شاخص و بیماریزای انسانی می باشد. چندین عامل حدت در این باکتری مشخص گردیده است که پروتئین A و بتالاکتاماز مهمترین عوامل ویرولانسی آن می باشند. هدف مطالعه بررسی ارتباط بین دو عامل حدت (بتالاکتاماز و پروتئین A) در این میکروارگانیسم بوده است.

مواد و روشها: مقاومت به بتالاکتاماهای حساس به بتالاکتاماز (پنی سیلین G، سفازولین، سفالوتین) و مقاوم به بتالاکتاماز (متی سیلین و اگزاسیلین) به روش انتشار بررسی شدند. میزان حداقل غلظت بازدارنده رشد (M.I.C) و تولید بتالاکتاماز با روش رقت و اسیدومتری مشخص شده است. در این نمونه ها خالص سازی پروتئین A به طریق کروماتوگرافی تعویض یونی در سلولز دی اتیل آمینواتیل (DEAE.Cellulose) انجام گرفت. برای لیز نمودن دیواره سلولی از روش گرمایی استفاده شد.

یافته ها: نتایج نشان دادند که مقاومت به داروهای پنی سیلین ۹۶٪، سفازولین ۸۳٪، سفالوتین ۸۶٪ و درصد مقاومت به اگزاسیلین ۷۲٪ بوده است. نمونه های به دست آمده از خالص سازی پروتئین A دارای یک باند مشخص در الکتروفورز (SDS-PAGE) بود و وزن ملکولی ۴۲ کیلو دالتون بود.

نتیجه گیری: در بررسی ارتباط وجود پروتئین A در سویه های دارای بتالاکتاماز مشخص شد که حدود ۹۳/۷٪ افزایش سویه ها دارای پروتئین A می باشند، در حالیکه این مقدار در مورد سویه های فاقد بتالاکتاماز بسیار کمتر است (۵۰٪) از طرفی این ارتباط در مورد مقاومت به پنی سیلین مشهودتر است، یعنی در سویه های مقاوم به پنی سیلین هیچ موردی از تولید پروتئین A مشاهده نشده است.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس آرنوس، بتالاکتاماز، پروتئین A، آنتی بیوتیک، ویرولانسی.

مقدمه

باکتری استافیلوکوکوس آرنوس یکی از باکتریهای بیماریزای مهمی است که در این میان می توان به عفونت های پوستی از جمله جوش ها، کورک ها، سلولیت،

زرد زخم و فولیکولیت (۴-۱)، سندرم شوک توکسیک

لازمه این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی از اعتبارات قسمت پژوهشی تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان و آزمایشگاه بیوتکنولوژی بیمارستان امین دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین شده است.

بیماریزایی باکتری استافیلوکوکوس آرئوس، در این پژوهش، وجود پروتئین A و آنزیم بتالاکتاماز که سبب مقاومت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام می‌گردد و ارتباط میان این دو فاکتور مورد بررسی قرار گرفت. زیرا از یک طرف وجود پروتئین A در باکتری سبب فرار آن از سیستم ایمنی می‌شود و از طرف دیگر وجود تولید بتالاکتاماز باعث مقاومت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیکها و عدم پاسخ مثبت به درمان می‌گردد. در نتیجه باکتری بهتر می‌تواند در بیمار پایداری نماید و باقی بماند. این بررسی نشان دهنده میزان صحت این فرض خواهد بود.

مواد و روشها

روش شناسایی باکتری: روشهای بکار رفته برای شناسایی باکتری استافیلوکوکوس آرئوس که اکثراً از نمونه‌های کلینیکی بوده، تست‌های بیوشیمیایی (کاتالاز، کوآگولاز DNase، کشت در محیط مانیتول سالت آگار، محیط کشت آگار خون‌دار، نوترینت آگار) می‌باشد (۱۴ و ۱۵-۱۲).

تعیین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام و حداقل غلظت مهار کننده (MIC): مقاومت به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام در مورد دو دسته از آنها بررسی شد. باکتریها از کشت تازه برداشت و در محیط آبگوشت غذایی (نوترینت برات) تلقیح و در ۳۷ درجه سانتیگراد اتوگذاری گردید. وقتی کدورت آنها به لوله ۵/۰ مک فارلند (1×10^8 cell/ml) رسید، توسط سوآب استریل از آنها نمونه برداشته و در سطح محیط کشت مولر هیتون آگار به شیوه چمنی بطور یکنواخت کشت داده، دیسک‌های آنتی بیوتیکهای پنی سیلین G، سفازولین و سفالوتین در سطح محیط کشت قرار داده شد و بعد از ۲۴ ساعت اتوگذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. از همین روش در مورد آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم به بتالاکتاماز (اگراسیلین و متی سیلین) استفاده

(TSS)، اندوکاردیت و استئومیلیت و عفونت مجاری ادراری و مسمومیت غذایی که ناشی از آنروتوکسین تولید شده توسط این باکتری، اشاره کرد (۵ و ۱).

استافیلوکوکوس آرئوس دارای عوامل بیماریزایی گوناگونی همچون عوامل چسبنده سطح سلول است که سبب اتصال به پروتئین‌های بافت میزبان می‌شوند. معروفترین عامل چسبنده این باکتری همان کوآگولاز باند یا Clumping factor است (۶)، عامل دیگر حدت (ویروالانس) در بیماریزایی این باکتری، پروتئین A است که یک پروتئین دیواره سلولی در این باکتری است و به صورت کووالانت به پپتیدوگلیکان متصل است. وزن ملکولی این پروتئین ۴۲ کیلو دالتون است و حدود ۱/۷٪ وزن خشک سلول را تشکیل می‌دهد. ویژگی مهم پروتئین A، قابلیت اتصال آن به قطعه FC آنتی بادی‌های IgG₄، IgG₁، IgG₂، است، ولی برای اتصال با IgG₃ انسانی قابلیت ندارد (۱۱-۷). پروتئین A دارای ۴۵۰ اسید آمینه و ۶ جایگاه مختلف است که ۵ جایگاه مشابه یکدیگر بوده و محل اتصال SPA به FC آنتی بادی‌هاست. با اتصال آنتی بادی به پروتئین A پوششی متشکل از آنتی بادی سطح باکتری به وجود می‌آید که سبب محافظت استافیلوکوکوس آرئوس از اثرات فاگوسیتوز و افزایش ویروالانس باکتری می‌شود و در واکنش‌های دیگری مانند: ۱- فعال شدن کمپلمان ۲- واکنش ازدیاد حساسیت ۳- شیمیوتاکسی ۴- تحریک لنفوسیت‌ها ۵- تولید آنترفرون ۶- سیتوتوکسیسیته سلول و ایجاد آسیب بافتی که در اثر اتصال پروتئین A صورت می‌گیرد (۷ و ۹).

کپسول پلی ساکارییدی استافیلوکوکوس آرئوس در بدن، به عنوان عامل بیماریزایی عمل می‌کند و نیز تولید تعدادی پروتئین‌های ترشحی نظیر آنزیم‌ها و توکسین‌های گوناگون (α توکسین، β توکسین، γ توکسین، δ توکسین) و نیز توکسینهای اپیدرمولیتیک مسبب سندرم پوسته ریز استافیلوکوکی Staphylococcal Scalded (S.S.S.S) Skin Syndrome را باعث می‌شود. از میان عوامل

برای شکستن باکتری و آزاد سازی پروتئین A از دیواره آن از روش گرمایی که سلول باکتری در معرض بافر فسفات جوشانده می شود. سپس پروتئین A آزاد شده را توسط سانتریفون ۳۰ که ویژه پروتئین های با وزن ملکولی ۴۲۰۰۰ دالتون بود، تغلیظ شد و نهایتاً پروتئین A غلیظ شده، خالص سازی شد که از روش کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده گردید. رزین بکار رفته DEAE-cellulose به عنوان تعویض کننده آنیونی و بافر بی کربنات آمونیوم به عنوان بافر ستون استفاده شده است (۱۶) و بعد از خارج کردن پروتئین با گرادیان غلظت و جمع آوری آن در لوله ها، جذب نوری فراکسیونهای بدست آمده در طول موج ۲۸۰ نانومتر (توسط اسپکتروفتومتر U.V) خوانده شد و کروماتوگرام نمونه بر اساس جذب نوری فراکسیونها ترسیم شد و نمونه بدست آمده توسط این روش با تست همالوگوتیناسیون بررسی شد و وجود پروتئین A در آن تأیید شد (نتایج در این مقاله نیامده است).

یافته ها

درصد مقاومت به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام با استفاده از دیسک های استاندارد آنتی بیوگرام بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار انجام شد. بعد از اندازه گیری قطر هاله های عدم رشد در اطراف دیسکها و با مقایسه اعداد به دست آمده با مقادیر استاندارد حساسیت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای پنی سیلین، سفازولین و سفالوتین به ترتیب برابر ۹۶ درصد، ۸۳/۳ درصد، ۸۶/۶ درصد و مقاومت به اگزاسیلین ۷۳ درصد تعیین گردید میزان حداقل غلظت بازدارنده مقدار رشد (MIC):

میزان MIC برای دو آنتی بیوتیک، پنی سیلین (حساس به بتالاکتاماز) و اگزاسیلین (مقاوم به بتالاکتاماز) به روش رقت در محیط آبگوشت انجام شد. دامنه رقت آنتی بیوتیکها از ۲۵/۰ میکروگرم در میلی لیتر تا ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر متغیر بوده است. برای آنتی بیوتیک اگزاسیلین اگر مقادیر اولیه MIC بین ۲ تا ۴ میکروگرم در

گردید. با این تفاوت که به محیط مولر هیتون ۴ درصد NaCl اضافه گردید که این امر برای جداسازی بهتر سویه های مقاوم به گروه متی سیلین ها مفید می باشد (۱۲ و ۱۴).

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC): از روش رقت لوله ای در محیط کشت آبگوشت غذایی استفاده شده است و براساس غلظت های کاهش یابنده آنتی بیوتیک های مورد آزمایش بصورت رقت های دو برابر بکار رفت، و از دوازده لوله استفاده شد. که از آنها یک لوله برای کنترل مثبت و یکی برای کنترل منفی در نظر گرفته شد و غلظت های آنتی بیوتیکها طبق فرمول:

$$\text{غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)} \times \text{حجم (میلی لیتر)} = \text{وزن (میلی گرم)} \\ \text{فعالیت (میکروگرم بر میلی لیتر)}$$

محاسبه و تهیه شد (۱۴). از منابع میکروبی که حاوی $10^6 \times 1/5$ باکتری در میلی لیتر بود (معادل ۱/۰ غلظت مایه میکروبی تنظیم شده با ۵/۰ مک فارلند) یک میلی لیتر به هر لوله افزوده گردید. حجم نهایی در هر لوله ۲ میلی لیتر و غلظت محلول ها نصف است.

○ تعیین مقاومت به بتالاکتاماز: روش اسیدومتری که در آن افزایش اسیدیته ناشی از شکستن حلقه بتالاکتام، موجب شناسایی آنزیم می شود، روش به کار رفته در این تحقیق بوده است (۵ و ۱۳ و ۱۵) در این روش از یک لوله موینه و معرف فنل قرمز استفاده می شود. در صورت مثبت بودن آزمایش بعد از تلقیح باکتری دارای آنزیم بتالاکتاماز در عرض ۵ تا ۱۵ دقیقه رنگ محلول فنل قرمز که در pH=۸/۵ بنفش رنگ است به زرد یا قهوه ای تغییر می کند که به علت تولید اسید پنی سیلوئیک که در اثر شکسته شدن پنی سیلین G توسط آنزیم مزبور می باشد، بوجود می آید.

○ تخلیص پروتئین A: تخلیص پروتئین A شامل سه مرحله شکستن باکتری و آزاد کردن پروتئین A از دیواره، تغلیظ و خالص سازی است.

اگزاسیلین در جدول ۱ مشاهده می شود. بیشترین درصد (۲۷٪) در ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر و پس از آن در، یک میکروگرم در میلی لیتر دیده می شود. کمترین درصد (صفر درصد) در ۲۵/۰ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شده است.

تعیین درصد مقاومت بتالاکتاماز

درصد باکتریهای دارای بتالاکتاماز با تست اسیدومتري با استفاده از لوله مویینه تعیین گردیده است بر این اساس درصد باکتریهای دارای بتالاکتاماز ۵۳/۳ درصد و درصد سویه های فاقد بتالاکتاماز ۴۶/۷ تعیین گردیده است. ارتباط میان تولید بتالاکتاماز و وجود پروتئین A:

به منظور بررسی ارتباط احتمالی میان دو عامل بتالاکتاماز و پروتئین A تمام سویه ها از این نظر مورد بررسی قرار گرفتند. ۵۳/۳٪ از کل سویه ها دارای بتالاکتاماز هستند که ۸۱/۲٪ این سویه ها دارای مقاومت حداقل به اگزاسیلین و ۱۲/۵٪ آنها مقاوم به اگزاسیلین هستند. ۹۳/۷٪ از سویه های دارای بتالاکتاماز پروتئین A دارند. از طرف دیگر ۴۶/۷٪ از سویه ها فاقد بتالاکتاماز بوده و ۴۲/۸٪ از این سویه ها به اگزاسیلین مقاوم هستند. در عین حال تنها ۵۰٪ از این سویه ها دارای پروتئین A می باشند. ۸۷/۵٪ از سویه های حساس به اگزاسیلین و ۱۰۰٪ سویه های مرزی دارای پروتئین A هستند و هیچ سویه مقاوم به اگزاسیلین که دارای پروتئین A باشد یافت نشده است.

○ خالص سازی پروتئین A

نتیجه مربوط به خالص سازی پروتئین A توسط روش کروماتوگرافی تعویض یونی در کروماتوگرام نمونه ها (نمودار ۱) بر اساس جذب نوری فراکسیونها ترسیم شد. در کروماتوگرام حاصله یک قله اصلی وجود دارد و یک قله کوچکتر در فراکسیونهای ۱۵ تا ۱۹ مشاهده شده است. آزمایش همالگوتیناسیون فعالیت پروتئین A را در قله بزرگ نشان داده است. در حالیکه قله کوچکتر عاری از پروتئین A به نظر می رسد. تأیید خلوص نمونه خالص شده توسط

میلی لیتر به دست می آمد دوباره آزمایش تعیین MIC با رقت ۳ میکروگرم در میلی لیتر انجام می شد تا سویه های حدفاصل (boarderline) از سویه های مقاوم تفکیک شوند. در نهایت سویه های مقاوم به پنی سیلین ۹۶ درصد و سویه های حساس ۴ درصد تعیین شدند. پراکنش درصد سویه ها نسبت به غلظت های مختلف پنی سیلین در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشترین درصد (۲۷٪) در ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر و پس از آن در ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر دیده می شود. کمترین درصد در ۱ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شده است.

جدول ۱. پراکنش حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) پنی سیلین و

اگزاسیلین در سویه های مختلف استافیلوکوک آرنوس		
غلظت مختلف	پراکنش MIC	پراکنش MIC
آنتی بیوتیک	پنی سیلین	اگزاسیلین
۰/۲۵ micgr/ml	۳٪	۰
۰/۵ micgr/ml	۷٪	۶٪
۱ micgr/ml	۰	۱۶٪
۲ micgr/ml	۱۳٪	۶٪
۴ micgr/ml	۱۰٪	۱۱٪
۸ micgr/ml	۷٪	۱۱٪
۱۶ micgr/ml	۱۷٪	۲۷٪
۳۲ micgr/ml	۲۷٪	۱۱٪
۶۴ micgr/ml	۱۳٪	۶٪
۱۲۸ micgr/ml	۳٪	۶٪

در مورد اگزاسیلین ۲۷٪ سویه ها حساس، ۳۰٪ مقاوم و ۴۳٪ سویه ها حد فاصل تعیین شده اند. مجموع سویه های مقاوم (۳۰٪) و سویه های حد فاصل (۴۳٪) برابر ۷۳٪ است. این سویه ها همگی در آزمایش آنتی بیوگرام در محیط کشت مولر هیتون فنوتیپ مقاومت از خود نشان داده اند.

پراکنش درصد سویه ها نسبت به غلظت های مختلف

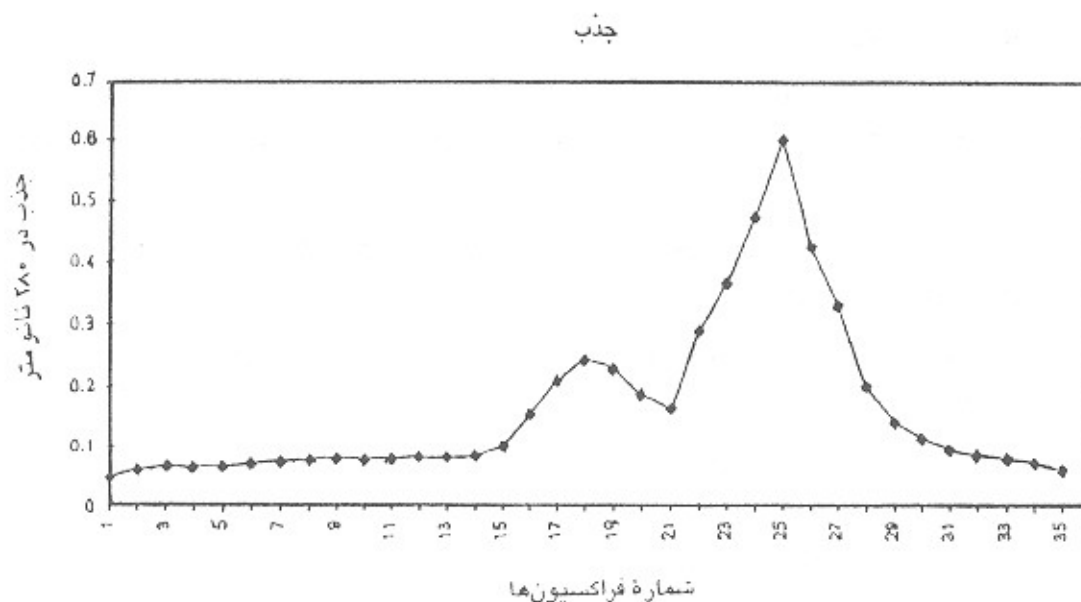
بنابراین ارتباط و همبستگی مشخصی بین حضور پروتئین A و بتالاکتاماز در باکتری استافیلوکوکوس آئروس مشاهده می‌شود. مشاهدات قبلی وجود ارتباط میان مقاومت به متی‌سیلین (MRSA) و عدم وجود پروتئین A را تأکید کرده است (۱۸ و ۱۹)، در این تحقیق نیز وجود چنین ارتباطی تأیید شده است. ۸۷/۵٪ از سویه‌های حساس به اگزاسیلین دارای پروتئین A و همه سویه‌های مرزی نیز این پروتئین را دارا هستند. اما در هیچ یک از سویه‌های مقاوم به اگزاسیلین پروتئین A شناسایی نشد. بر این اساس اینطور به نظر می‌رسد که ارتباط اساسی میان مقاومت به متی‌سیلین و پروتئین A موجود است. پروتئین A یک پروتئین دیواره سلولی است و مقاومت به متی‌سیلین نیز در اثر تغییر در پروتئین‌های اتصال‌یابنده به پنی‌سیلین‌های (Penicillin Binding Protein=P.B.P) موجود در دیواره سلولی و تبدیل آنها به PBP2a یا PBP2 است که به دلیل کاهش میل ترکیبی با آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام (چه مقاوم به بتالاکتاماز و چه حساس به آن) سبب مقاومت به آنها می‌شود. احتمالاً مکانیسم تنظیم‌کننده بیان ژن‌های این دو پروتئین با پروتئین‌های منتقل‌کننده این دو به دیواره سلولی توسط سیستم مشترکی کنترل می‌شوند (۲۰). بنابراین وجود مقاومت به متی‌سیلین نیازمند عدم وجود پروتئین A در دیواره سلولی است، در حالیکه حساسیت به متی‌سیلین یا مقاومت مرزی به متی‌سیلین (که ناشی از حضور بتالاکتاماز است) مانع ظهور پروتئین A در سطح سلولی نمی‌شود. نتایج این تحقیق نیز این امر را تأیید می‌کند. در واقع هرچند ۹۷ درصد سویه‌های بتالاکتاماز مثبت دارای پروتئین A هستند و تنها ۵۰ درصد از سویه‌های بتالاکتاماز منفی دارای پروتئین A می‌باشند، با این حال تمام این ۵۰ درصد جزو سویه‌های حساس به پنی‌سیلین بوده و ۵۰ درصدی که فاقد پروتئین A می‌باشند همان سویه‌های متی‌سیلین مقاومند. به این ترتیب در این پژوهش از یک‌طرف ارتباط میان بتالاکتاماز و پروتئین A

الکتروفورز به روش سدیم دودسیل سولفات پلی‌اکریل آمیدزل (S.D.S-PAGE) انجام شد (نتایج در این مقاله نیامده است).

بحث

همانطور که در یافته‌ها آمده است درصد بالایی از مقاومت به هر پنج آنتی‌بیوتیک بکار رفته که شامل پنی‌سیلین، سفازولین، سفالوتین و اگزاسیلین و پنی‌سیلین در باکتری استافیلوکوکوس آئروس (*Staphylococcus aureus*) مشخص گردیده است که این امر در مورد پنی‌سیلین‌ها از دهه ۴۰ نشان داده شده است (۱۷). از طرفی با توجه به اینکه اگزاسیلین و متی‌سیلین هر دو از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز مقاوم هستند و نیز سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) نیز از دهه ۷۰ شروع به گسترش نموده‌اند و در این بررسی نیز درصد سویه‌های مقاوم به اگزاسیلین ۷۳٪ برحسب درصد سویه‌ها مشخص است که بیشترین میزان مقاومت در MIC‌های بالا در حدود ۱۶، ۳۲ و ۶۴ است (جدول ۱). در واقع بسیاری از سویه‌های MRSA نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام حساس به بتالاکتاماز نیز مقاوم هستند (۱۸). مقاومت به پنی‌سیلین در سویه‌های حد فاصل ناشی از تولید بیش از اندازه بتالاکتاماز است. هرچند میزان MIC این سویه‌ها زیاد نیست (بین ۲ تا ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) اما درصد بالایی از سویه‌های MRSA (۴۳ درصد) متشکل از همین سویه‌هاست. درصد سویه‌های دارای بتالاکتاماز ۵۳/۳٪ است که در این سویه‌ها ۸۱/۲٪ آنها دارای مقاومت مرزی به اگزاسیلین و ۱۲/۲٪ آنها مقاوم به اگزاسیلین هستند. در حالی که تنها ۴۲/۸٪ از سویه‌های فاقد بتالاکتاماز دارای مقاومت به اگزاسیلین می‌باشند.

از میان سویه‌های دارای بتالاکتاماز ۹۳/۷٪ از سویه‌ها دارای پروتئین A هستند، در حالیکه میزان پروتئین A در سویه‌های فاقد بتالاکتاماز بسیار کمتر و حدود ۵۰٪ است و



نمودار ۱. کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی

و محصول بدست آمده هم از نظر خلوص و هم از نظر صنعتی بسیار مناسب تشخیص داده شد.

مشخص گردید و از طرفی دیگر با ترکیب شدن روش کروماتوگرافی تعویض یونی و روش آزاد سازی گرمایی، یک روش آسان و ارزانی جهت تهیه پروتئین A بدست آمد

References

1. Schaechter M, Medoff G, Mechanism of microbial disease, williams and willkings, Baltimore. 1989.
2. Parker M, martinko SL, Brocks Biology of microorganisms, 8th ed. Prentice Hall, international Inc, Newjersey, 1997.
3. Nobert A, Tietz ML, Fundamentals of clinical chemistry, philadelphia, W.B. Saunders Co, New York. 1987.
4. Abramson C. Staphylococcal enzymes. the staphylococci, ed. Cohen, John Wiley, New York, 1972; 187-248.
5. Collee JA, Duguid JP, Fraser AG. Manual of clinical microbiology, Churchill Livingston London, 1989; 159-323.
6. Drummond Mc, Tager M. Fibrinogen clotting and fibrinopeptide formation by staphylococcus aureus J Bacteriol 1963; 85: 628-635.
7. Bjork I, Peterson BA, Sjoquist J. Some physiological properties of protein A from s. aureus, Eur J Biochem 1972; 29: 579-584.
8. Cox AR, Conquest C. A major out break of methicillin resistant staphylococcus aureus caused by a new phage-type. J Hospi Infect 1995; 29: 87-106.

9. Hanson D, Schumaker NY. A model for the formation and interconversion of protein A Immunoglobulin G soluble complexes. *The J Immunol*; 1984; 132: 1397-1399.
10. Kronvall G, Williams JC. Differences in antiprotein A activity among IgG sub group. *J Immunol* 1969; 103: 826-833.
11. Maxim EP, Mathews LH. Single-tube mixed agglutination test for the detection of staphylococcal protein A. *J Clinic Microbiol* 1976; 4: 418-422.
12. Balows A, Hausler W. *Manual of clinical microbiology*. American society of microbiology CV Mosby Co. ST Louis, 1991; 202-215.
13. Baron E, Finegold S. *Diagnostic microbiology*, CV Mosby Co. Washington DC, 1990; 400-402.
14. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus and micrococcus, manual of clinical. Microbiology*, 6th ed, Murray press, Washington DC, 1995; 282-298.
15. Ross WG, Kirby M. Comparison of assay techniques for beta-lactamase activity. *Analy Biochem* 1973; 454: 9-16.
16. Uppsalla Pharmacia, *Ion exchange chromatography principles and methods*, pharmacia. Uppsalla Sweden, 1988.
17. Nicolas M. Beta-lactam resistance mechanisms in gram-negative bacteria. *Microbio Sci* 1986; 11: 334-339.
18. DeLencastre H, De jonge BLM. Molecular aspects on methicillin resistance in *s. aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33: 7-24.
19. Delencustre H, Safiguerideo AM. Multiple mechanisms of methicillin resistance. *J Bacteriol* 1991; 48: 133-139.