● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال دوم ، شمارهٔ ۲ پی‌درپی(۶) ، صفحه ۱۶ الی ۲۲ ، بهار ۱۳۷۹

ارتباط میان بتالاکتاماز و پروتئین A در استافیلوکوکوس آرئوس

دکتر روحا کسری کرمانشاهی[۱] ، دکتر حسین کیوانی امینه[۲]، مسعود گلعلی‌پور[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 آرئوس گونه شاخص و بیماریزای انسانی می‌باشد. چندین عامل حدت در این باکتری مشخص گردیده است که پروتئین A و بتالاکتاماز مهمترین عوامل ویرولانس آن می‌باشند. هدف مطالعه بررسی ارتباط بین دو عامل حدت (بتالاکتاماز و پروتئین A) در این میکروارگانیسم بوده است.

مواد و روشها: مقاومت به بتالاکتامهای حساس به بتالاکتاماز (پنی‌سیلین G، سفازولین، سفالوتین) و مقاوم به بتالاکتاماز (متی‌سیلین و اگزاسیلین) به روش انتشار بررسی شدند. میزان حداقل غلظت بازدارنده رشد (M.I.C) و تولید بتالاکتاماز با روش رقت و اسپیدومتری مشخص شده است. در این نمونه‌ها خالص‌سازی پروتئین A به طریق کروماتوگرافی تعویض یونی در سلولزدی‌اتیل‌آمینواتیل (DEAE.Cellulose) انجام گرفت. برای لیزنمودن دیواره سلولی از روش گرمایی استفاده شد.

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

نتیجه‌گیری: در بررسی ارتباط وجود پروتئین A در سویه‌های دارای بتالاکتاماز مشخص شد که حدود ۹۳/۷٪ افزایش سویه‌ها دارای پروتئین A می‌باشند، در حالیکه این مقدار در مورد سویه‌های فاقد بتالاکتاماز بسیار کمتر است (۵۰٪) از طرفی این ارتباط در مورد مقاومت به پنی‌سیلین مشهودتر است، یعنی در سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین هیچ موردی از تولید پروتئین A مشاهده نشده است.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس آرئوس، بتالاکتاماز، پروتئین A، آنتی‌بیوتیک، ویرولانس.*

مقدمه

باکتری استافیلوکوکوس آرئوس یکی از باکتریهای بیماریزای مهمی است که در این میان می‌توان به عفونت‌های پوستی از جمله جوش‌ها، کورک‌ها، سلولیت، زردزخم و فولیکولیت (۴-۱)، سندرم شوک توکسیک

* هزینهٔ 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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.2.2.6]

(TSS)، اندوکاردیت و استئومیلیت و عفونت مجاری ادراری و مسمومیت غذایی که ناشی از آنتروتوکسین تولید شده توسط این باکتری، اشاره کرد(۱و۵).

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 (ویرولانس) 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 آنتی‌بادی‌های IgG_4 ،IgG_2 ،IgG_1 است، ولی برای اتصال با IgG_3 انسانی قابلیت ندارد (۱۱-۷). پروتئینA دارای ۴۵۰ اسید آمینه و ۶ جایگاه مختلف است که ۵ جایگاه مشابه یکدیگر بوده و محل اتصال SPA به FC آنتی‌بادی‌هاست. با اتصال آنتی‌بادی به پروتئین A پوششی متشکل از آنتی بادی سطح باکتری به وجود می‌آید که سبب محافظت استافیلوکوکوس آرئوس از اثرات فاگوسیتوز و افزایش ویرولانس باکتری می‌شود و در واکنش‌های دیگری مانند: ۱ـ فعال شدن کمپلمان ۲ـ واکنش ازدیاد حساسیت ۳ـ شیمیوتاکسی ۴ـ تحریک لنفوسیت‌ها ۵ ـ تولید انترفرون ۶ـ سیتوتوکسیسیتی سلول و ایجاد آسیب بافتی که در اثر اتصال پروتئین A صورت می‌گیرد(۹و۷).

کپسول پلی‌ساکاریدی استافیلوکوکوس آرئوس در بدن، به عنوان عامل بیماریزایی عمل می‌کند و نیز تولید تعدادی پروتئین‌های ترشحی نظیر آنزیم‌ها و توکسین‌های گوناگون (αتوکسین، βتوکسین، γتوکسین، δتوکسین) و نیز توکسینهای اپیدرمولیتیک مسبب سندرم پوسته ریز استافیلوکوکی Staphylococcal Scalded (S.S.S.S) Skin Syndrome را باعث می‌شود. از میان عوامل بیماریزایی باکتری استافیلوکوکوس آرئوس، در این پژوهش، وجود پروتئین A و آنزیم بتالاکتاماز که سبب مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیکهای 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 و تولید بتالاکتاماز باعث مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیکها 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(۵و۱۴-۱۲).

تعیین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام و حداقل غلظت مهار کننده (MIC): مقاومت به آنتی‌بیوتیکهای 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 ۰/۵ مک‌فارلند ($1/5\times10^{8}$cell/ml) رسید، توسط سوآب استریل از آنها نمونه برداشته و در سطح محیط کشت مولرهینتون آگار به شیوهٔ چمنی بطور یکنواخت کشت داده، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکهای پنی‌سیلین 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 آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم به بتالاکتاماز (اگزاسیلین و متی‌سیلین) استفاده

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.2.2.6]

گردید. با این تفاوت که به محیط مولر هینتون ۴ درصد NaCl اضافه گردید که این امر برای جداسازی بهتر سویه‌های مقاوم به گروه متی‌سیلین‌ها مفید می‌باشد(۱۲و۵و۱۴).

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC): از روش رقت لوله‌ای در محیط کشت آبگوشت غذایی استفاده شده است و براساس غلظت‌های کاهش یابنده آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بصورت رقت‌های 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 غلظت‌های آنتی‌بیوتیکها طبق فرمول:

$$\text{وزن(میلی‌گرم)} = \frac{\text{غلظت (میکروگرم برمیلی‌لیتر)} \times \text{حجم(میلی‌لیتر)}}{\text{فعالیت (میکروگرم برمیلی‌لیتر)}}$$

محاسبه و تهیه شد (۱۴). از منابع میکروبی که حاوی $1/5\times10^{6}$ باکتری در میلی لیتر بود (معادل ۰/۰۱ غلظت مایه میکروبی تنظیم شده با ۰/۵ مک فارلند) یک میلی‌لیتر به هر لوله افزوده گردید. حجم نهایی در هر لوله ۲ میلی‌لیتر و غلظت محلول‌ها نصف است.

○ تعیین مقاومت به بتالاکتاماز: روش اسیدومتری که در آن افزایش اسیدیته ناشی از شکستن حلقه بتالاکتام، موجب شناسایی آنزیم می‌شود، روش به کار رفته در این تحقیق بوده است (۵و۱۳و۱۵) در این روش از یک لوله مویینه و معرف فنل قرمز استفاده می‌شود. 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 قهوه‌ای تغییر می‌کند که به علت تولید اسید پنی‌سیلوئیک که در اثر شکسته شدن پنی‌سیلین G توسط آنزیم مزبور می‌باشد، بوجود می‌آید.

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

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

یافته‌ها

درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام با استفاده از دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوگرام بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار انجام شد. بعد از اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد در اطراف دیسکها و با مقایسه اعداد به دست آمده با مقادیر استاندارد حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیکهای پنی‌سیلین، 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 آنتی‌بیوتیک، پنی‌سیلین (حساس به بتالاکتاماز) و اگزاسیلین (مقاوم به بتالاکتاماز) به روش رقت در محیط آبگوشت انجام شد. دامنهٔ رقت آنتی‌بیوتیکها از ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تا ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بوده است. برای آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین اگر مقادیر اولیه MIC بین ۲ تا ۴ میکروگرم در

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.2.2.6]

میلی‌لیتر به دست می‌آمد دوباره آزمایش تعیین MIC با رقت ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام می‌شد تا سویه‌های حدفاصل (boarderline) از سویه‌های مقاوم تفکیک شوند. در نهایت سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین ۹۶ درصد و سویه‌های حساس ۴ درصد تعیین شدند. پراکنش درصد سویه‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف پنی‌سیلین در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشترین درصد (۲۷٪) در ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و پس از آن در ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر دیده می‌شود. کمترین درصد در ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شده است.

جدول ۱. پراکنش حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) پنی‌سیلین و اگزاسیلین در سویه‌های مختلف استافیلوکوک آرئوس

غلظت مختلف آنتی‌بیوتیک	پراکنش MIC پنی‌سیلین	پراکنش MIC اگزاسیلین
۰/۲۵micgr/ml	٪۳	۰
۰/۵micgr/ml	٪۷	٪۶
۱micgr/ml	۰	٪۱۶
۲micgr/ml	٪۱۳	٪۶
۴micgr/ml	٪۱۰	٪۱۱
۸micgr/ml	٪۷	٪۱۱
۱۶micgr/ml	٪۱۷	٪۲۷
۳۲micgr/ml	٪۲۷	٪۱۱
۶۴micgr/ml	٪۱۳	٪۶
۱۲۸micgr/ml	٪۳	٪۶

در مورد اگزاسیلین ۲۷٪ سویه‌ها حساس، ۳۰٪ مقاوم و ۴۳٪ سویه‌ها حد فاصل تعیین شده‌اند. مجموع سویه‌های مقاوم (۳۰٪) و سویه‌های حد فاصل (۴۳٪) برابر ۷۳٪ است. این سویه‌ها همگی در آزمایش آنتی‌بیوگرام در محیط کشت مولر هینتون فنوتیپ مقاومت از خود نشان داده‌اند.

پراکنش درصد سویه‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف اگزاسیلین در جدول ۱ مشاهده می‌شود. بیشترین درصد (۲۷٪) در ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر و پس از آن در، یک میکروگرم در میلی‌لیتر دیده می‌شود. کمترین درصد (صفردرصد) در ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شده است.

تعیین درصد مقاومت بتالاکتاماز

درصد باکتریهای دارای بتالاکتاماز با تست اسیدومتری با استفاده از لوله مویینه تعیین گردیده است بر این اساس درصد باکتری‌های دارای بتالاکتاماز ۵۳/۳ درصد و درصد سویه‌های 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 سویه‌ها از این نظر مورد بررسی قرار گرفتند. ۵۳/۳٪ از کل سویه‌ها دارای بتالاکتاماز هستند که ۸۱/۲٪ این سویه‌ها دارای مقاومت حدفاصل به اگزاسیلین و ۱۲/۵٪ آنها مقاوم به اگزاسیلین هستند. ۹۳/۷٪ از سویه‌های دارای بتالاکتاماز پروتئین A دارند. از طرف دیگر ۴۶/۷٪ از سویه‌ها فاقد بتالاکتاماز بوده و ۴۲/۸٪ از این سویه‌ها به اگزاسیلین مقاوم هستند. در عین حال تنها ۵۰٪ از این سویه‌ها دارای پروتئین A می‌باشند. ۸۷/۵٪ از سویه‌های حساس به اگزاسیلین و ۱۰۰٪ سویه‌های 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 نمونه‌ها (نمودار ۱) بر اساس جذب نوری فراکسیونها ترسیم شد. در کروماتوگرام حاصله یک قله اصلی وجود دارد ویک قله کوچکتر در فراکسیونهای ۱۵ تا ۱۹ مشاهده شده است. آزمایش هماگلوتیناسیون فعالیت پروتئین A را در قله بزرگ نشان داده است. در حالیکه قله کوچکتر عاری از پروتئین A به نظر می‌رسد. تأیید خلوص نمونه خالص شده توسط

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.2.2.6]

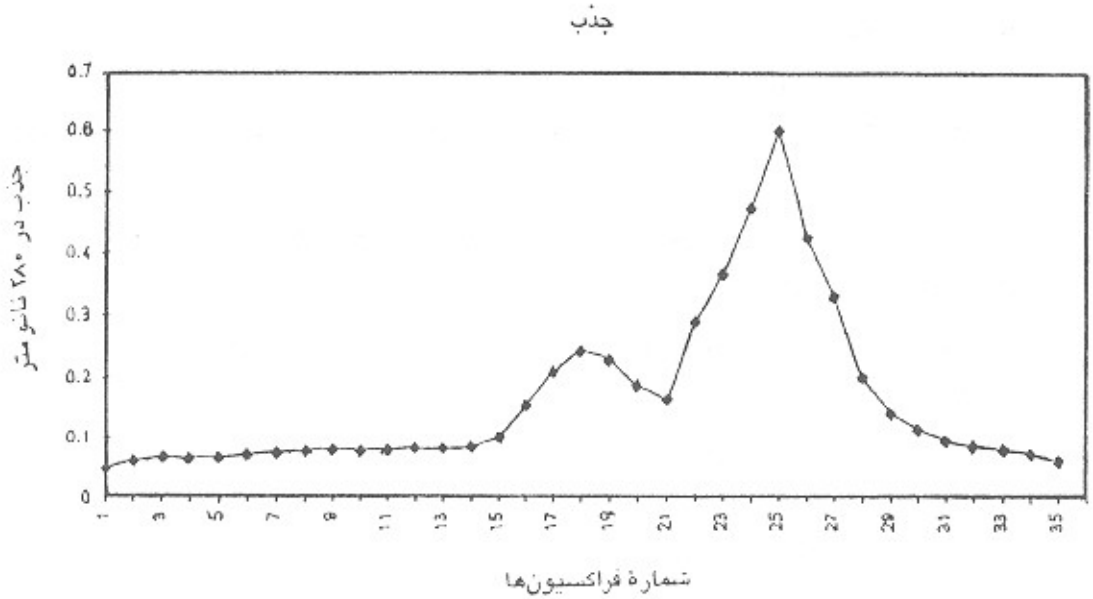
الکتروفورز به روش سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمیدژل (S.D.S-PAGE) انجام شد (نتایج دراین مقاله نیامده است).

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 آرئوس (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 تا۴ 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، درحالیکه میزان پروتئین A در سویه‌های فاقد بتالاکتاماز بسیار کمتر و حدود ۵۰٪ است و بنابراین ارتباط و همبستگی مشخصی بین حضور پروتئین A و بتالاکتاماز در باکتری استافیلوکوکوس آرئوس مشاهده می‌شود. مشاهدات قبلی وجود ارتباط میان مقاومت به متی‌سیلین (MRSA) و عدم وجود پروتئین A را تأکید کرده است (۱۹و۱۸)، دراین 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 اتصال یابنده به پنی‌سیلین‌های (Penicillin (Binding Protein=P.B.P) موجود در دیواره سلولی و تبدیل آنهابه 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 تنظیم کننده بیان ژن‌های این دو پروتئین با پروتئین‌های منتقل کننده 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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.2.2.6]



نمودار ۱. کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی

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

****

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, Newjersy, 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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.2.2.6]

9. Hanson D, Schumaker NY. A model for the formation and interconversion of protein A Immunoglobolin 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. Maximm 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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.2.2.6]