Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 3 (10-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Study of Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* and CA-MRSA Nasal Colonization in 2-5 Years Old Children in Isfahan

Ramin Dibaj[1], Prisa Shoaei[2], Abdolrazagh Hashemi[3], Abass Daei Naser[4], Hasan Shojaei[4]

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
2. Nosocomial Infection Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. Department of Epidemiology, Pasteur Institute of Iran.
4. Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Article Information

Article history:
Received:2014/06/10
Accepted:2014/08/05
Available online:2014/10/08

Article Subject:
Antimicrobial Resistance

IJMM 1393; 8(3): P 22-30

Corresponding author at:

Dr. Hasan Shojaei

Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Email:
h_shojaei@idrc.mui.ac.ir

Abstract

Background and Aim: We carried out a descriptive study to determine the extent of nasal colonization and characteristics of *Staphylococcus aureus* and CA-MRSA isolates in 2-5 year old children of day care centers in Isfahan.

Materials and Methods: The characteristics of isolates were determined using standard phenotypic profiles including colony morphology, Gram staining, catalase, hyaluronidase, coagulase and Dnase tests as well as mannitol fermentation. The MRSA detection was carried out according to CLSI guidelines with oxacillin agar screen test. Methicillin resistance was further confirmed by detection of a 310 bp fragment of *mecA* gene of MRSA by PCR. Drug susceptibility testing to antibiotics other than methicillin was conducted by disk diffusion. The Beta-lactamase production and inducible clindamycin resistance were also determined by performing the double-disc diffusion and D-test.

Results: Out of 323 children, 115 (35.6%) carried *S. aureus* and 11 (9.5%) carried MRSA. All MRSA strains were found to contain *mecA* gene. The susceptibility of strains to vancomycin, rifampicin and Linezolid were 100%. The susceptibility of strains to gentamicin, clindamycin, erythromycin, co-trimoxazole, amoxiclav, ciprofloxacin, tetracycline and penicillin were 99%, 97%, 94%, 94%, 93%, 88%, 44.4% and 1.8% respectively. Beta-lactamase production was seen in 19 (16.5%) of staphylococcal strains. Inducible clindamycin resistance was seen in 4 (3.5%) of the isolates.

Conclusions: Our data indicates that the spread of CA-MRSA within Iranian population is worthy of consideration and merits further molecular investigation to determine the source and mode of transmission.

Key Words: Beta-lactamase, inducible clindamycin resistance, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, mecA gene.

Copyright © 2014 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Dibaj R, Shoaei P, Daei nasser A, Shojaei H. Study of prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* and CA-MRSA nasal colonization in 2-5 years old children in Isfahan. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (3) :22-30

How to cite this article:

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی فراوانی و میزان کلونیزاسیون بینی *استافیلوکوکوس اورئوس* و سویه های مقاوم به متی سیلین وابسته به جامعه در کودکان ۵-۲ سال مهدکودک‌های شهراصفهان

رامین دیباج[۱] ، پریسا شعاعی[۲] ،عبدالرزاق هاشمی[۳] ، عباس داعی ناصر[۴] ، حسن شجاعی[۴*]

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲. مرکز تحقیقات عفونتهای بیمارستانی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ،اصفهان، ایران
۳. گروه اپیدمیولوژی ، انیستیتوپاستور ایران
۴. مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ،اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت:۱۳۹۳/۰۶/۱۰
پذیرش۱۳۹۳/۰۷/۱۲
انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۷/۲۰
موضوع:
مقاومت پادزیستی

IJMM 1392; 8(3): P 22-30

نویسنده مسئول:
دکتر حسن شجاعی

گروه میکروب شناسی ،دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان،اصفهان

تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۲۲۴۰۹

پست الکترونیک:
h_shojaei@idrc.mui.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: مطالعه توصیفی حاضر برای تعیین میزان کلونیزاسیون بینی و ویژگی‌های میکروبیولوژیک *استافیلوکوکوس اورئوس* و سویه های مقاوم به متی سیلین وابسته به جامعه در کودکان ۵-۲ سال مهدکودکهای شهر اصفهان اجراء شد.

مواد و روش کار: ویژگی‌های میکروبیولوژیک ایزوله‌ها با استفاده از روشهای استاندارد میکروبیولوژیک مانند رنگ آمیزی گرم، تولید آنزیم های کاتالاز، کوآگولاز، هیالورونیداز، دی ان آز و تخمیر قند مانیتول تعیین شدند. سویه های مقاوم به متی سیلین با استفاده از روش کشت در محیط حاوی اگزاسیلین بر اساس دستورالعمل CLSI و استفاده ازPCR برای ردیابی باند ۳۱۰ جفت بازی ژنmecA شناسایی شدند. حساسیت ایزوله ها در مقابل پادزیستهای دیگر به غیر از متی‌سیلین با استفاده از روش دیسک دیفیوژن انجام پذیرفت. تولید بتالاکتاماز و مقاومت القایی به کلیندامایسین با روش دیسک دوگانه و D-test انجام پذیرفت.

یافته‌ها: از میان ۳۲۳ کودک مورد بررسی ۱۱۵ (۳۵/٦٪) کودک با *استافیلوکوکوس اورئوس* کلونیزه شده بودند که ۱۱ سویه (۹/۵٪) مقاوم به متی سیلین و حاوی ژن *mecA* بودند. همه ایزوله ها به وانکومایسین، ریفامپسین و لینزولاید حساس بودند. میزان حساسیت به پادزیستهای جنتامایسین، کلیندامایسین، اریترومایسین، کوتریموکسازول، آموکسی کلاو، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و پنی سیلین به ترتیب: ۹۹٪، ۹۷٪ ، ۹٤٪ ، ۹٤٪، ۹۳٪، ۸۸٪، ٤٤/٤٪ و ۱/۸٪ تعیین شد. ۱۹ ایزوله(۱٦/۵٪) بتالاکتاماز مثبت و ٤ ایزوله (۳/۵٪) دارای مقاومت القایی به کلیندامایسین بودند.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان می دهد گسترش سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در جامعه شایسته توجه می‌باشد. با این وجود مطالعات مولکولی برای تعیین منبع و نحوه انتقال این باکتریها در سطح جامعه ضروری می باشد.

کلمات کلیدی : *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، بتالاکتاماز، مقاومت القایی به کلیندامایسین، ژن mecA.

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

مقاومت دارویی *استافیلوکوکوس اورئوس* از گذشته تاکنون همواره عامل ایجاد مشکلات جدی در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری بوده است. *استافیلوکوکوس اورئوس* به تمامی‌انواع پادزیست‌های شناخته شده کاربردی مانند بتالاکتام‌ها، گلیکوپپتیدها، آمینوگلیکوزیدها، کوئینولون‌ها و غیره مقاومت

کسب نموده است و یا در حال مقاوم شدن می‌باشد (۱). مقاومت به متی سیلین از سال ۱۹۶۰ و با ظهور سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین پدیدار و به عنوان یک مشکل جهانی تا به امروز ادامه پیدا کرده است (۲).

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در گذشته محدود به بیمارستان‌ها بود و اصطلاحاً به این سویه‌ها، سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین کسب شده از بیمارستان hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) اطلاق می‌گردید (۳). با ظهور سویه‌های مقاوم به متی سیلین در سطح جامعه اهمیت مقاومت به متی سیلین دارای اهمیت دوچندان شده است. سویه‌های مذکور که اصطلاحاً سویه‌های مقاوم کسب شده از جامعه Community-associated MRSA, CA-MRSA) نامیده می شود به متی‌سیلین مقاوم بوده ولی الگوی حساسیت دارویی این سویه‌ها نسبت به پادزیست‌های دیگر غیر از بتالاکتام‌ها، همانند سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی سیلین (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA) می‌باشد (۴). همچنین این سویه‌ها بر خلاف سویه‌های HA-MRSA ، نیاز به عوامل زمینه‌ای خطرساز مانند بستری شدن در بیمارستان، بیماری‌های مزمن، دیالیز کلیوی، استفاده از مواد مخدر و یا مبتلا بودن به بیماری ایدز ندارند (۵). سویه‌های CA-MRSA غالباً آبسه‌های پوستی، فورنکلوزیس، پنومونی نکروز دهنده شدید و شوک ایجاد می‌نمایند (۶). سویه‌های فوق بیشتر در جوامع بسته مانند سربازخانه‌ها، مهدکودک‌ها، زندان‌ها و مراکز نظیر آنها که افراد در تماس نزدیک بهم قرار دارند، معضل جدی می‌باشند (۷).

کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* بویژه انواع مقاوم به متی‌سیلین آن، راهی برای گسترش این باکتری در سطح جامعه و ایجاد بیماری خطرناک در افراد می باشد (۸). مطالعه میزان شیوع کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در کشورهای در حال توسعه که از سطح بهداشت بالایی برخوردار نیستند، بدلیل ایجاد عفونتهای پوستی و بافت نرم اهمیت بالایی دارد (۹). عواقب عفونت با *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در حال گردش در جامعه بسیار خطرناک بوده به ویژه اینکه درمان داروئی مؤثری نیز وجود ندارد.

با توجه به اهمیت سویه‌های مقاوم کسب شده از جامعه (CA-MRSA) و ارزیابی میزان گسترش آن در جامعه و کمبود اطلاعات کافی در این زمینه در کشورمان مطالعه حاضر اجراء شد تا بتوان تخمین دقیق‌تری از وضعیت موجود در زمینه میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در جامعه و در گروه سنی که تماس کمتری با محیط بیمارستانی داشته اند، یعنی کودکان گروه سنی زیر ۵ سال در مهدکودک‌های اصفهان مشخص شود و علاوه بر تعیین مقاومت پادزیستی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* به متی سیلین میزان حساسیت یا مقاومت به سایر پادزیست‌ها نیز ارزیابی شود. برای دستیابی به این اهداف مجموعه‌ای از روش های فنوتیپیک و مولکولی برای شناسایی سویه ها مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت یک مطالعه مقطعی به بررسی میزان کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* و سویه های مقاوم به متی سیلین در بینی کودکان سالم (۳۲۳ نفر) در سنین ۲-۵ سال و بررسی ویژگی های میکروبیولوژیک آنها از جمله حساسیت دارویی، تعیین MIC، D-test و تولید بتالاکتاماز و.... در مهد کودک‌های سطح شهر اصفهان انجام شد.

ایزوله های مورد بررسی

از هر کودک دو نمونه سوآب بینی جمع آوری و در محیط ژلوز خوندار کشت و برای جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش‌های مرسوم میکروبشناسی به مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری استان اصفهان انتقال داده شدند که در ادامه جزئیات روش کار آورده شده است.

کشت و جداسازی

برای جداسازی اولیه *استافیلوکوکوس آرئوس* از نمونه‌های سواب بینی، ابتدا از محیط ژلوز خوندار استفاده شد. کلنی‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس* با استفاده از روش رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین هویت ایزوله‌هایی که دارای آرایش خوشه‌ای در لام گرم بودند از تست‌های تولید آنزیم های کاتالاز، هیالورونیداز، Dnase، تخمیر قند مانیتول، تست کلمپینگ فاکتور (Clumping factor) و کوآگولاز در لوله استفاده شد (۱۰).

تعیین حساسیت دارویی با روش دیسک دیفیوژن

برای ارزیابی حساسیت دارویی از آخرین پروتکل (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI)

استفاده گردید.. بطور خلاصه برای ارزیابی مقاومت به متی سیلین از روش حساسیت به اگزاسیلین مبتنی بر روش تهیه رقت در آگار یا غربالگری در آگار (Agar dilution with oxacillin) و برای ارزیابی حساسیت به سایر پادزیست‌ها و پس از تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلند برای از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. جزییات روش اول در پارگراف بعدی آمده است و در مورد روش دوم یعنی روش دیسک دیفیوژن سوسپانسیون حاصل از نیم مک فارلند به صورت سفره‌ای بر روی محیط کشت مولر هینتون تلقیح شد و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل وانکومایسین(V)، کوتریموکسازول (SXT)، تتراسایکلین (TE)، اریترومایسین(E)، کلیندامایسین (CC)، آموکسی کلاوونیک اسید (AMC)، ریفامپیسین (RA)، جنتامایسین (GM)، سیپروفلوکساسین (CP) و لینزولاید (LNZ) با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار گرفت. بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته، هاله عدم رشد برای هر پادزیست سنجیده شد و با استفاده از جدول استاندارد، نتایج به صورت مقاوم، حساس و یا بینابینی گزارش شدند(۱۱).

در کلیه مطالعات فنوتیپیک و مولکولی از سویه *استافیلوکوکوس آرئوس* مقاوم به متی سیلین استاندارد COL (*Staphylococcus aureus* subsp. aureus *COL;* (MRSA)) بعنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

ارزیابی مقاومت سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* به متی سیلین با استفاده از روش غربالگری در آگار (Agar screening method)

برای غربالگری سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از محیط مولر هینتون آگار حاوی ۴٪ نمک و ۶ میکروگرم در هر میلی لیتر از اگزاسیلین (6 µg/ml of oxacillin) استفاده شد. از کلنی تازه *استافیلوکوکوس اورئوس* در مولر هینتون براث کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه و بصورت کشت نقطه‌ای به محیط فوق تلقیح و برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه گردید. پیدایش حتی یک کلنی دلیل بر وجود مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شد (۱۲).

شناسایی سویه‌های مقاوم به متی سیلین با استفاده از دیسک سفوکسیتین

برای شناسایی سویه‌های مقاوم به متی سیلین مبتنی بر حساسیت به سفوکسیتین، همانند روش دیسک دیفیوژن از دیسک سفوکسیتین (۱۰ میکروگرمی) استفاده شد. هاله عدم رشد کمتر از ۲۱ میلی متر (≤ 21 mm) بود سویه مقاوم و بیشتر از ۲۲ میلی متر (≥ 22 mm) سویه حساس در نظر گرفته شد (۱۲).

تعیین MIC سویه‌های مقاوم به متی سیلین (اگزاسیلین)

برای این منظور از روش Oxacillin agar dilution test استفاده شد. از محیط کشت مولر هینتون آگار با غلظت ۲٪ نمک برای تعیین حساسیت دارویی ایزوله ها نسبت به اگزاسیلین استفاده گردد. پادزیست اگزاسیلین ۰/۰۶، ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکروگرم در هر میلی لیتر به محیط کشت آگاری اضافه گردید. برای تلقیح باکتری از تعداد 10^4 عدد باکتری بصورت نقطه‌ای کشت داده شد و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و در نهایت عدم رشد در غلظت کمتر از ۲ میکروگرم در هر میلی لیتر (≤ 2 µg/ml) به منزله حساسیت و رشد در غلظت‌های بیشتر از ۲ میکروگرم در هر میلی لیتر (> 2 µg/ml) به منزله مقاومت مد نظر قرار گرفت (۱۲).

بررسی مقاومت القایی اریترومایسین با استفاده از D-test

مطابق پروتکل استاندارد آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن، سوسپانسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* نیم مک فارلند تهیه و تلقیح شد. دیسک کلیندامایسین ۲ میکروگرمی در فاصله ۲۰-۱۵ میلی متری از دیسک اریترومایسین ۱۵ میکروگرمی قرار داده شد. . به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شد (۱۱).

تعیین تولید آنزیم بتا-لاکتاماز

مقداری از کلنی تازه *استافیلوکوکوس اورئوس* را بر روی دیسک‌های Cefinase تهیه شده از شرکت Becton Dikension USA که قبلاً با کمی آب مقطر استریل خیس داده شده است

منتقل گردیده و بر اساس تولید رنگ قرمز ناشی از تجزیه حلقه بتا لاکتام موجود در دیسک، تولید آنزیم‌های بتا لاکتاماز بررسی گردید (۱۱).

تشخیص مولکولی سویه های مقاوم به متی سیلین

استخراج DNA ژنومیک

برای استخراج DNA از روش استاندارد و با تغییراتی برای جداسازی DNA از *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد (۱۳). بطور خلاصه در این روش استفاده از بافر حاوی Tris- EDTA برای تهیه سوسپانسیون میکروبی و سپس انکوبه کردن با لیزواستافین با غلظت نهایی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت و بعد ازآن اضافه کردن محلول پروتئیناز k حاوی سدیم دودسیل سولفات و انکوبه کردن در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت استفاده شد. سپس از محلول گوانیدیوم برای لیز کامل سلولی و در نهایت از محلول فنل- کلروفرم برای خالص سازی DNA ژنومی با استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از ایزوله ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز در ژل آگارز صورت گرفت (۱۳).

شناسایی ژن *mecA* با استفاده از روش مولکولی PCR

تایید مولکولی مقاومت به متی سیلین بر مبنای ردیابی مارکر ژنتیکی *mecA* برابر روش پیشنهادی استاندارد (۱۴) صورت گرفت. بطور خلاصه می توان گفت که در این روش از یک جفت پرایمر اختصاصی یعنی دو پرایمر (mecAF و mecAR) که بر اساس قسمتی از ژن mecA استافیلوکوکوس‌ها طراحی شده است استفاده شد که جزییات توالی این پرایمرها در منبع مورد اشاره آمده است. برای تکثیر و رد یابی مارکر ژنتیکی یاد شده از روش PCR و با برنامه دمائی زیر که شامل: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سلسیوس ۵دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل: ۹۴ درجه سلسیوس ۱۵ ثانیه، ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. حاصل کار با تولید قطعه ای به طول ۳۱۰ جفت باز منجر به شناسایی سویه های مقاوم به متی‌سیلین گردید (۱۴).

جدول ۱: نتایج الگوی حساسیت دارویی ۱۱۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بینی کودکان به آنتی‌بیوتیکهای غیر از متی‌سیلین

الگوی حساسیت	P	V	SXT	TE	E	CC	AMC	RA	GM	CP	LNZ
حساس	۲	۱۱۵	۱۰۸	۵۱	۱۰۸	۱۱۱	۱۰۷	۱۱۵	۱۱٤	۱۰۱	۱۱۵
بینابینی	–	–	۱	۲٤	۲	–	–	–	–	۱٤	–
مقاوم	۱۱۳	–	٦	٤۰	۵	٤	۸	–	۱	–	–
در صد مقاومت	%۹۸/۳	-	%۵/۲	%۳۴/۸	%۴/۳	%۳/۵	%۷	-	%۰/۸۶	-	-

P ;پنی سیلین V: ;وانکومایسین SXT: ;کوتریماکسازول TE: ;تتراسیکلین E: ;اریترومایسین CC: ;کلیندامایسین AMC: ;آموکسی‌کلاو ; RA:ریفامپسین GM: ;جنتامایسین CP: ;سیپروفلوکساسین:LNZ ; لینزولاید

یافته ها

فراوانی کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* در بینی کودکان زیر ۵ سال

بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه از ۳۲۳ کودک، تعداد ۱۱۵ نفر (۳۵/۶٪) در بینی با *استافیلوکوکوس اورئوس* کلونیزه شده بودند. تعداد ۳۰ کودک نیز با انواع دیگر *استافیلوکوکوس* معروف به انواع کواگولاز منفی کلونیزه شده بودند. در عین حال تعداد ۱۲ کودک نیز با *سودوموناس ائروژینوزا* کلونیزه شده بودند.

فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین بر اساس روش غربالگری در آگار

بر اساس روش غربالگری در آگار بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی ۴٪ نمک و ۶ میکروگرم در هر میلی لیتر از اگزاسیلین از مجموع ۱۱۵ *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بینی کودکان، تعداد ۱۱ ایزوله (۹/۵٪) بعنوان مقاوم به متی‌سیلین شناسایی شدند و بقیه یعنی تعداد ۱۰۴ ایزوله (۹۰/۵٪) بعلت عدم رشد در محیط یاد شده بعنوان حساس به متی‌سیلین در نظر گرفته شدند.

فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مبتنی بر حساسیت به سفوکسیتین

با استفاده از روش دیسک دیفیوژن با دیسک سفوکسیتین تمامی ۱۱ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* که با روش غربالگری در آگار مقاوم به متی‌سیلین شناسایی شده بودند، با این روش نیز مقاومت آنها تایید گردید.

تعیین MIC سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (اگزاسیلین)

ارزیابی حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) ایزوله‌ها نشان داد که همگی ایزوله دارای MIC بیشتر ازµg/ml ۲ می باشند که بر اساس دستورالعمل NCCLS نشان دهنده مقاوم بودن ایزوله‌ها به متی‌سیلین می‌باشد. از مجموع ۱۱ ایزوله برای ۱ سویه حداقل غلظت بازدارنده رشد بیش از ۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر بود، برای ۲ ایزوله حداقل غلظت بازدارنده رشد بیش از ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر، برای ۴ ایزوله حداقل غلظت بازدارنده رشد بیش از ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر و برای ۴ ایزوله دیگر دارای حداقل غلظت بازدارنده رشد بیش از ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر تعیین گردید.

میزان حساسیت دارویی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* به سایر پادزیست‌ها

نتایج مربوط به آنتی بیوگرام ۱۱۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده در جدول شماره ۱ آورده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* بالاترین میزان مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی سیلین با ۹۸/۳٪ و بعد از آن به تتراسایکلین با ۳۴/۸٪ نشان دادند. تمام ایزوله‌های جدا شده نسبت به پادزیستهای لینزولاید، ریفامپیسین و وانکومایسین حساس بودند و موردی از مقاومت در مقابل پادزیستهای یاد شده یافت نشد.

تعیین مقاومت القایی به کلیندامایسین با استفاده از D-test

از مجموع ۱۱۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بینی کودکان، مقاومت القاء شده به کلیندامایسین توسط اریترومایسین که تحت عنوان D-test شناخته می‌شود، در ۱۱۱ ایزوله (۹۶/۵٪) مشاهده نشد و فقط در ۴ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* (۳/۵٪) مقاومت یاد شده وجود داشت که این ۴ ایزوله جزو سویه های MRSA شناسایی شده بودند.

تعیین تولید آنزیم بتا-لاکتاماز

از مجموع ۱۱۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۹ ایزوله (۱۶/۵٪) بتالاکتاماز مثبت بودند. از این تعداد تعداد ۱۱ ایزوله (۹/۵٪) جزو سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین یاMRSA بودند، و تعداد ۸ (۷٪) ایزوله حساس به متی سیلین بودند.

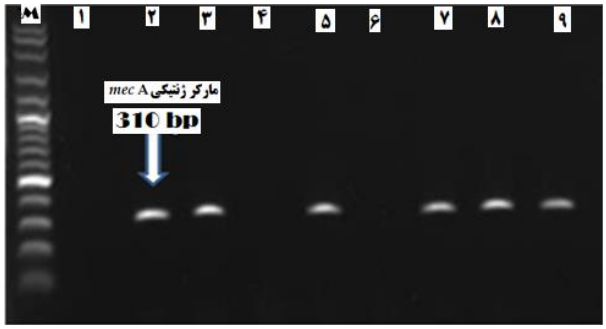
شناسایی مولکولی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

تمامی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین که بر اساس روشهای فنوتیپیک که جزییات آن در بالا به آن اشاره شد تحت مطالعه مولکولی قرار گرفتند. تایید مولکولی مقاومت به متی‌سیلین بر مبنای ردیابی مارکر ژنتیکی *mecA* که دارای اندازه ۳۱۰ جفت باز می باشد و با شرحی که در بخش روش کار داده شد صورت گرفت.

تصویر شماره یک نشان می‌دهد که تمامی سویه های مقاوم به متی سیلین دارای مارکر ژنتیکی ۳۱۰ جفت بازی *mecA* می‌باشند. در صورتی چنین قطعه‌ای در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی سیلین دیده نشد.

بحث

از زمانی که انسان توانمندی شناسایی عوامل عفونی میکروبی را کسب نموده است، *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهمترین عوامل عفونی شناخته شده‌ای بوده است که باعث عفونت‌های جدی و مرگ آوری در جامعه انسانی به‌ویژه بیمارستان‌ها شده است (۱۵، ۱۶).



شکل ۱: تصویر شماره ۱ : الکتروفورز نتایج PCR و مشاهده باند ۳۱۰bp مربوط به ژن mec A در سویه‌های استافیلوکوکوس *اورئوس* مقاوم به متی سیلین. M: مارکر وزن مولکولی (قطعات از بالا به پایین به ترتیب ۱۰۰۰ الی ۱۰۰ جفت باز می باشند). ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت (سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین COL) ستونهای ۳، ۵، ۷، ۸ و ۹ ایزوله های استافیلوکوکوس *اورئوس* مقاوم به متی سیلین جداشده از بینی کودکان ایرانی تحت مطالعه *ستونهای ۴ و ۶ ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین .*

بروز مقاومت به پادزیستها در *استافیلوکوکوس اورئوس* و بویژه مقاومت به پادزیست متی سیلین از مهمترین دغدغه های نظام های سلامت در دنیا بشمار می رود. *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به دو دسته کسب شده از اجتماع (CA-MRSA) و کسب شده از محیط بیمارستان (HA-MRSA) تقسیم می‌گردد. در تعریف این دو واژه همچنان اختلاف وجود دارد. بدلیل اینکه کولونیزه شدن با MRSA معمولاً غیر قابل ردیابی است و در مواقعی عفونت با آن در ماههای بعد از کلونیزه شدن (معمولاً بعد از مرخص شدن از بیمارستان) رخ می‌دهد با این وجود امروزه محققین اعتقاد دارند که ایزوله MRSA جدا شده حتی در بیمارستان از نوع CA-MRSA است (۶).

مطالعات جدیدتر به خوبی نشان می‌دهند که CA-MRSA توانمندی انتشار به بیمارستان و شیوع عفونت بیمارستانی را دارا می‌باشند (۱۷،۱۸). بر این اساس مطالعه میزان شیوع و بررسی اپیدمیولوژیک این گروه از MRSA به ویژه در کشورهای در حال توسعه که از سطح بهداشت بالایی برخوردار نیستند، اهمیت بالایی دارد. به ویژه آنکه در اجتماع، *استافیلوکوکوس اورئوس* به صورت شایع عامل عفونت‌هایی همچون عفونت پوست و بافت نرم می‌گردد. عواقب عفونت با *استافیلوکوکوس اورئوس* در حال گردش در جامعه بسیار خطرناک بوده به ویژه اینکه درمان داروئی مؤثری نیز وجود ندارد(۶).

هدف از انجام این مطالعه نیز جداسازی و تعیین هویت ایزوله‌های MRSA و همچنین تایید مولکولار سویه ها در مهدکودک‌های شهر اصفهان بود.

در این مطالعه تعداد ۱۱۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس تعدادی از تست‌های بیوشیمیایی استاندارد جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفتند. ابتدا بر اساس حضور کوکسی گرم مثبت با آرایش خوشه‌ای شکل به حضور *استافیلوکوکوس* مشکوک شده و بعد از خالص سازی با استفاده از تست کاتالاز جنس *استافیلوکوکوس* از جنس استرپتوکوکوس تفکیک گردید. با استفاده از تست‌های همچون واکنش مثبت در تست کواگولاز (روی لام و لوله‌ای)، واکنش مثبت در تستهای هیالورونیتداز و دی ان از و قدرت تخمیر مانیتول ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از سایر استافیلوکوکوس‌ها جداسازی گردید.

بر اساس توصیه NCCLS (۱۱)، تعداد ۱۱۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از کودکان با استفاده از روش استاندارد Agar screening method (مولر هینتون غنی شده با ۴٪ نمک و۶ µg/ml از اگزاسیلین) موردغربال گری قرار گرفتند. بر اساس روش مذکور تعداد ۱۱ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم تشخیص داده شدند که معادل ۹/۵٪ ایزوله ها بود.

در تأیید CA-MRSA بودن ۱۱ ایزوله جدا شده در این مطالعه، لازم است اشاره گردد که تمامی ایزوله‌ها از کودکانی جدا شده بودند که هیچ‌کدام از مؤلفه‌های خطر همچون تاریخچه بستری شدن در بیمارستان، جراحی، دیالیز، ساکن شدن به مدت طولانی در یکی از مراکز بهداشتی، دارای کاتتر و یا دیگر تجهیزات مصنوعی روی پوست و یا سابقه جدا شدن MRSA را نداشتند (۶).

شناسایی صحیح مقاومت به اگزاسیلین و سایر پادزیست‌های مقاوم به پنی سیلینازها که ناشی از حضور ژن *mecA* باشد، برای اطمینان از درمان مناسب برای عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* به ویژه عفونت‌هایی با منشاء جامعه لازم است (۱۹). بر اساس دستورالعمل NCCLS اگزاسیلین مناسب ترین پادزیست مقاوم به پنی سیلینازها می‌باشد که می‌توان از آن برای تعیین حساسیت دارویی ایزوله‌های مشکوک به MRSA استفاده نمود چراکه دارای حساسیت بالا و در عین حال پایداری مناسب در آزمایشگاه است (۱۱). از سویی دیگر به

دلیل وجود روش‌های مختلف آزمایشگاهی تفسیر نتایج باید با دقت صورت پذیرد. در مطالعه حاضر نیز از اگزاسیلین استفاده گردید.

توصیه NCCL اشاره دارد که بعد از شناسایی سویه های MRSA بر اساس روش های فنوتیپیک (**۱۱**)، لازم است هویت دقیق مقاومت با استفاده از روش مولکولی که شامل شناسایی حضور ژن *mecA* است بررسی گردد. در این مطالعه با تکثیر قطعه ای به طول ۳۱۰ جفت باز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *mecA* تعداد ۱۱ ایزوله که قبلاً با استفاده از روش های فنوتیپیک مقاوم شناسایی شده بودند، مجدداً مقاوم شناسایی گردیدند و مورد تأیید نهایی قرار گرفتند. با استفاده از روش مولکولی مورد اشاره، میزان مقاومت ۹/۵٪ برآورد گردید.

در مطالعات مختلف استفاده از تکنیک PCR برای تعیین میزان شیوع سویه های MRSA مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه ای در انگلستان، از تعداد ۴۳۹ سواب بینی، تعداد ۳۹ نمونه (۸/۲٪) ایزوله MRSA مورد شناسایی قرار گرفت. در این مطالعه اشاره گردیده است که شناسایی مولکولی به دلیل صحت، سرعت و حساسیت بالا، دارای ارزش بالایی برای شناسایی سویه های MRSA می باشد (**۲۰**).

در مطالعه دیگر از کشور تایلند، تعداد ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از سواب بینی با استفاده از روش های فنوتیپیک و مولکولی (PCR ژن*mecA*) مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه اشاره شده است که با استفاده از روش های فنوتیپیک، امکان تفکیک سویه های حساس به متی سیلین که مقادیر بالایی از آنزیم های پنی سیلیناز را تولید می کنند، از سویه های MRSA بسیار ناچیز بوده و این گروه اول به سادگی به عنوان سویه های MRSA قلمداد می شوند. لذا لازم است با روش مولکولی حضور ژن*mecA* به عنوان شاخص مقاوم بودن را مورد ارزیابی قرار داد (**۲۱**).

در مطالعه ای در ایران نشان داده شده است که ۸۸٪ ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* MRSA می‌باشند. در این مطالعه تأکید شده است که شیوع MRSA در ایران رو به افزایش است (**۲۲**). علیرغم وجود تعدادی دیگر از گزارشات مربوط به شیوع MRSA ، مطالعات چندانی از بررسی میزان شیوع MRSA در مهد کودک‌ها در ایران منتشر نشده است.

اشاره شده است که بیان هتروژن مقاومت به متی سیلین در بین سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* می تواند ارزیابی میزان مقاومت را با استفاده از روش های فنوتیپیک با چالش جدی مواجه کند (**۲۳، ۲۴**). بر این اساس است که شناسایی حضور ژن *mecA* به عنوان استاندارد طلایی مطرح است (**۲۵**). در مطالعه حاضر نیز از شناسایی ژن *mecA* به عنوان روش تأییدی استفاده گردید و نتایج بدست آمده از روش فنوتیپیک را مورد تأیید قرار داد.

در مطالعه‌ای توسط Moghadami و همکاران در سال ۲۰۱۰، *استافیلوکوکوس آرئوس*های CA-MRSA و HA-MRSA جداسازی و از لحاظ مقاومت دارویی و اپیدمیولوژیک مورد بررسی قرار گرفته اند. ایزوله‌های مورد بررسی از هفت بیمارستان مورد بررسی قرار گرفتند که نشان داده شده تقریبا ۱۴٪ ایزوله‌های بیمارستانی CA-MRSA می‌باشند (**۲۶**). میزان کلونیزاسیون CA-MRSA در جامعه بویژه در مکانهایی مانند سربازخانه ها و مهدکودکها که افراد در تماس نزدیک با یکدیگر قرار دارند نقش مهمی در گسترش این باکتری و به طبع آن ایجاد عفونت در افراد سالم بدون مولفه خطر ایفا می کند. این میزان بسته به منطقه جغرافیایی در کشورهای مختلف ، متفاوت می باشد و از کمتر از ۱٪ تا ۱۵٪ متغیر گزارش شده است (**۲۷-۳۸**). علارغم وجود تعدادی دیگر از گزارشات مربوط به شیوع MRSA ، مطالعات چندانی از بررسی میزان شیوع MRSA در مهد کودک‌ها در ایران منتشر نشده است. در تنها مطالعه انجام گرفته در این زمینه ، Sedighi و همکاران در سال ۲۰۱۱، میزان شیوع MRSA در بینی کودکان در مراکز نگهداری کودکان در همدان ۴/۱٪ گزارش شد (**۳۸**).

مطالعه حاضر که با استفاده از مجموعه ای از روشهای استاندارد فنوتیپیک و مولکولی انجام شد به خوبی میزان شیوع MRSA را در مهدکودک‌های اصفهان نشان می‌دهد و نتایج آن می تواند بعنوان الگوی مطالعات وسیعتری در ایران مورد استفاده قرار گیرد. چنانچه مطالعات تکمیلی و جامع تری در سایر نقاط ایران انجام شود شاید بتوان با آنالیز مجموعه داده های بدست آمده قضاوت مناسبتری در مورد میزان گستردگی و ابعاد مشکل انتشار سویه‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* مقاوم یه متی‌سیلین در جامعه داشت و راهکارهای مناسبی نیز برای کنترل مساله پیشنهاد نمود. آنچه که در حال حاضر می توان گفت این است

که مساله را باید جدی گرفت و نگران روند رو به گسترش عفونتهای خطرناک ناشی از این باکتری در جامعه بود.

تشکر و قدردانی

در پایان از تمامی همکاران بخش عفونتهای بیمارستانی و مرکز بیماریهای عفونی و گرمسیری مرکز تحقیقات صدیقه طاهره (س) اصفهان که در انجام این پروژه ما را همراهی نمودند، تشکر و قدردانی می نماییم. مقاله حاضرحاصل طرح تحقیقاتی شماره ۲۸۷۱۰۰ مرکز تحقیقات بیماریهای گرمسیری و عفونی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می باشد.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 1997; 40:135–6.
2. Jevons MP. 'Celbenin'—resistant staphylococci. Br Med J. 1961; 1:124–5.
3. Ito T, Katayama Y, Asada K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec in the chromosome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45:1323–36.
4. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin Infect Dis. 2005; 40:562–73.
5. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. Clin Infect Dis. 2003; 36:131–9.
6. Diederen BM, Kluytmans JA. The emergence of infections with community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect. 2006; 52(3):157-68.
7. Turnidge JD, Bell JM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evolution in Australia over 35 years. Microb Drug Resist. 2000; 6:223–9.
8. Boyce JM. Are the epidemiology and microbiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* changing? JAMA. 1998; 279:623–24.
9. Nickerson EK, Wuthiekanun V, Day NP, Chaowagul W, Peacock SJ. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rural Asia. Lancet Infect Dis. 2006; 6(2):70-1.
10. Patricia T. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 13rd ed. St. Louis, Missouri: Mosby, Inc; 2013.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement: M100-S24. CLSI, Wayne, PA, USA, 2014.
12. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother. 2005; 56(6):1000-18.
13. Pitcher D G, Saunders N A& Owen R J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters in Applied Microbiol. 1989; pp. 151–6.
14. Geha DJ, Uh JR, Gustaferro CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 1994; 32:1768–72.
15. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 1998; 339(8):520-32 .
16. Archer GL. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. Clin Infect Dis. 1998; 26(5):1179-81.
17. Donnio PY, Preney L, Gautier-Lerestif AL, Avril JL, Lafforgue N. Changes in staphylococcal cassette chromosome type and antibiotic resistance profile in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a French hospital over an 11 year period. J Antimicrob Chemother. 2004; 53(5):808-13.
18. Carleton HA, Diep BA, Charlebois ED, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Community-adapted methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): population dynamics of an expanding community reservoir of MRSA. J Infect Dis. 2004; 190(10):1730-8.
19. Palavecino E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Clin Lab Med. 2004; 24(2):403-18.
20. Jonas D, Speck M, Daschner FD, Grundmann H. Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. J Clin Microbiol. 2002; 40(5):1821-3.
21. Siripornmongcolchai T, Chomvarin C, Chaicumpar K, Limpaiboon T, Wongkhum C. Evaluation of different primers for detecting *mecA* gene by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2002; 33(4):758-63.
22. Saderi H, Owlia P, Nadoushan MRJ. Difference in epidemiology and antibiotic susceptibility of methicillin resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. IJCID. 2009; 4(4):219-23.
23. Frebourg NB, Nouet D, Lemée L, Martin E, Lemeland JF. Comparison of ATB staph, rapid ATB staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin hetero resistance in staphylococci possessing *mecA*. J Clin Microbiol. 1998; 36(1):52-7.
24. Kobayashi N, Wu H, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa S, Uehara N, et al. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. Epidemiol Infect. 1994; 113(2):259-66.

25. Bignardi GE, Woodford N, Chapman A, Johnson AP, Speller DC. Detection of the *mecA* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillinresistance. J Antimicrob Chemother. 1996; 37(1):53-63.
26. Moghadami M, Japoni A, Karimi A, Mardani M. Comparison of community and healthcare-associated MRSA in Iran. IJCID. 2010; 5(4):206-12.
27. Oguzkaya-Artan M, Baykan Z, Artan C. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy preschool children. Jpn J Infect Dis. 2008; 61(1):70-2.
28. Miller MB1, Weber DJ, Goodrich JS, Popowitch EB, Poe MD, Nyugen V, et al.Prevalence and risk factor analysis for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in children attending child care centers. J Clin Microbiol. 2011; 49:1041–47.
29. Hewlett AL, Falk PS, Hughes KS, Mayhall CG. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in university medical center day care facility. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009; 30:985–92.
30. Lee J, Sung JY, Kim YM, Oh CE, Kim HB, Choi EH, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* obtained from the anterior nares of healthy Korean children attending daycare centers. Int J Infect Dis. 2011; 15:558–63.
31. Ho PL, Chiu SS, Chan MY, Gan Y, Chow KH, Lai EL, et al. Molecular epidemiology and nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* among young children attending day care centers and
kindergartens in Hong Kong. J Infect. 2012; 64:500–6.
32. Blumental S, Deplano A, Jourdain S, De Mendonça R, Hallin M, Nonhoff C,et al. Dynamic pattern and genotypic diversity of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal carriage in healthy pre-school children. J Antimicrob
Chemother. 2013;68(7):1517-23.
33. Tavares DA, Sá-Leão R, Miragaia M, de Lencastre H. Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in two areas (urban and rural) of Portugal. BMC Infect Dis. 2010; 10:110.
34. Gardella N, Murzicato S, Di Gregorio S, Cuirolo A, Desse J, Crudo F,et al. Prevalence and characterization of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in a city of Argentina. Infect Genet Evol.
2011; 11:1066–71.
35. Rebollo-Pérez J, Ordoñez-Tapia C, Herazo-Herazo C, Reyes-Ramos N. Nasal carriage of Panton Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy preschool children. Rev Salud Publica (Bogota). 2011; 13:824–32.
36. Nickerson EK, Wuthiekanun V, Kumar V, Amornchai P, Wongdeethai N, Chheng K, et al. Emergence of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carriage in children in Cambodia. Am J Trop Med Hyg. 2011;84:313–17.
37. Moyo SJ, Aboud S, Blomberg B, Mkopi N, Kasubi M, Manji K and et al. High nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy Tanzanian under-5 children.Microb Drug Resist. 2014; 20(1):82-8.
38. Sedighi I, Jafari Moez H, Alikhani MY. Nasal Carriage of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and their antibiotic susceptibility patterns in children attending day-care centers. Acta Microbiol Immunol Hung 2011: 58; (3), 227–34..