

Antibacterial Effect of Mixed Oxidant Solution on Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

Fariba Karimi¹, Ahmad Ahmadi², Ghane Zandi³, Abbas Aghaei⁴, Abbas Ahmadi⁵, Farid Zandi⁶

1. MSc of Medical Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran ORCID ID: 0009-0008-8573-2978

2. Electrical Engineering Student, Department of Electrical Engineering, Technical Faculty, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-0065-6371

3. Ph.D. of Information Technology (IT), Roonak Beautiful Morning Star Company, Growth center, Science and Technology Park of Kurdistan, Kurdistan University, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1920-3564

4. Ph.D of Epidemiology, Social Determinants of Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0001-9612-1250

5. Ph.D of Molecular Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-1643-3500

6. Ph.D of Medical Bacteriology, Medical Laboratory, Shohada Dehgolan Hospital, Kurdistan University of Medical Sciences, Dehgolan, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98-910-8570565, Email: zandifarid@gmail.com, Postal cod: 6667145979, ORCID ID: 0000-0003-3053-4460

ABSTRACT

Background and Aim: Nosocomial infections are one of the important causes of annual mortality in the world. Many of these infections caused by drug-resistant bacteria have failed the treatment strategy of such infections. One of the causes of nosocomial infections is methicillin-resistant bacteria (MRSA). Eradication of these, bacteria carrying the drug resistance gene, using disinfectants can reduce nosocomial infections caused by MRSA and other bacteria carrying the resistance gene. The aim of this study was to investigate antibacterial effect of mixed oxidant solution produced by disinfectant generator on methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates.

Materials and Methods: In this study, tested disinfectant solution was made by Mixed Oxidant Generator. Also, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) was prepared from 90 clinical samples of teaching hospitals of Kurdistan University of Medical Sciences. Then the samples cultured by swap method. Two phenotypic and genotypic methods were used to confirm staphylococci carrying the *mecA* gene.

Results: The results show that the Mixed Oxidant solution produced from 2% saline contains the highest concentration of oxidant gradients, so that diluting 1:4 of this solution (Mixed Oxidant solution) eliminates MRSA isolates. In contrast, the Mixed Oxidant produced from 0.1% saline has a low concentration of mixing oxidant gradients, as it was the lowest antibacterial effect to inhibit the growth of MRSA in direct concentration.

Conclusion: Due to the remarkable effectiveness, health and economic efficiency of the produced oxidant solution, it is recommended as a suitable large-scale disinfectant for various disinfection purposes is recommended.

Keywords: Disinfection, Hypochlorous acid, Mixed oxidant, MRSA, Staphylococcus aureus.

Received: Nov 03, 2023

Accepted: Sep 29, 2024

How to cite the article: Fariba Karimi, Ahmad Ahmadi, Ghane Zandi, Abbas Aghaei, Abbas Ahmadi, Farid Zandi. Antibacterial Effect of Mixed Oxidant Solution on Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). SJKU 2025;30(4):1-13.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

اثر ضد باکتریایی محلول میکس اکسیدانت (Mixed Oxidant Solution) بر ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)

فریبا کریمی^۱، احمد احمدی^۲، قانع زندی^۳، عباس آقائی^۴، عباس احمدی^۵، فرید زندی^۶

۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۲۹۷۸-۸۵۷۳-۰۰۰۸-۰۰۰۹
۲. دانشجوی کارشناسی مهندسی برق، گروه مهندسی برق، دانشکده مهندسی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۶۳۷۱-۰۰۶۵-۰۰۰۲-۰۰۰۰
۳. دکترای فناوری اطلاعات، شرکت ستاره زیبای صبح روناک، مرکز رشد، پارک علم و فناوری کردستان، سنندج، دانشگاه کردستان، ایران. کد ارکید: ۳۵۶۴-۱۹۲۰-۰۰۰۳-۰۰۰۰
۴. دکترای تخصصی اپیدمیولوژی، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مؤثر بر سلامت، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۱۲۵۰-۹۶۱۲-۰۰۰۱-۰۰۰۰
۵. دکترای تخصصی پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید: ۶۴۳۶-۵۲۰۹-۰۰۰۱-۰۰۰۰
۶. دکترای تخصصی باکتری‌شناسی پزشکی، آزمایشگاه تشخیص طبی، بیمارستان شهداء دهگلان، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دهگلان، ایران. پست الکترونیک: zandifarid@gmail.com (نویسنده مسئول) تلفن: ۰۸۷۳۵۱۲۵۶۶۸، کد پستی: ۶۶۶۷۱۴۵۹۷۹، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۰۰۰۳-۴۴۶۰

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های بیمارستانی یکی از عوامل مهم مرگ‌ومیر سالیانه در جهان است. بسیاری از این عفونت‌ها که توسط باکتری‌های مقاوم به دارو انجام می‌شود استراتژی درمان این عفونت‌ها را با شکست مواجه کرده است. یکی از عوامل عفونت‌های بیمارستانی باکتری‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) می‌باشد. ریشه‌کنی این باکتری‌های حامل ژن مقاومت دارویی با استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها می‌تواند عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری و دیگر باکتری‌های حامل این ژن مقاومت را کاهش دهد. هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتی‌باکتریال محلول میکس اکسیدانت تولید شده به وسیله دستگاه مولد این محلول بر روی ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تولید محلول ضدعفونی‌کننده مورد آزمایش با استفاده از دستگاه مولد میکس اکسیدانت (Mixed Oxidant Generator) انجام گرفت. همچنین استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) از ۹۰ نمونه بالینی بیمارستان‌های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان تهیه و کشت داده شد. به منظور تأیید استافیلوکوک‌های حامل ژن *mecA* از دو روش فوتوتیپی و ژنوتیپی استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که محلول مولتی اکسیدانت تولید شده از محلول نمکی ۲ درصد حاوی بیشترین غلظت میکس اکسیدانت است به طوری که تا رقت ۱:۴ نیز موجب عدم رشد MRSA ها گردید. در مقابل محلول میکس اکسیدانت تولید شده از محلول ۰/۱ درصد دارای غلظت پایین میکس اکسیدانت و همچنین کمترین اثر آنتی‌باکتریال بوده به طوری که در غلظت مستقیم باعث کاهش رشد MRSA ها می‌شود.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثربخشی فراوان، سلامت و همچنین صرفه اقتصادی محلول میکس اکسیدانت تولید شده، استفاده از آن به عنوان ضدعفونی‌کننده مناسب در مقیاس وسیع جهت اهداف مختلف ضدعفونی و گندزدایی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: استافیلوکوک اورئوس، اسید هیپوکلروس، ضدعفونی، میکس اکسیدانت، MRSA.

وصول مقاله: ۱۴۰۲/۰۸/۱۲ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۳/۰۷/۰۷ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۰۸

مقدمه

بیش از ۲۰٪ از بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه (Intensive Care Units, ICUs) در طول بستری در بیمارستان به یک عفونت مرتبط با مراقبت‌های بهداشتی مبتلا می‌شوند. بسیاری از این عفونت‌ها توسط ارگانسیم‌های مقاوم به چند دارو ایجاد می‌شوند و در نتیجه تعداد آنتی‌بیوتیک‌های موجود برای درمان را محدود می‌کنند (۱). استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, MRSA) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های مرتبط با مراقبت‌های بیمارستانی است (۲). ریشه‌کنی باکتری‌های حامل ژن MRSA باعث کاهش عفونت بالینی و جلوگیری از انتقال عفونت می‌شود (۲). بدین منظور فرآیند دکلونیزاسیون (مانعت از تجمع باکتری) به‌عنوان اقدامی مقرون به‌صرفه و مؤثر برای کاهش عفونت‌های ناشی از MRSA ها به شمار می‌آید (۳). استراتژی مانعت از تجمع باکتری که فرآیند ضد عفونی کردن یکی از راه‌های آن است، می‌تواند عوامل پاتوژن مرتبط با عفونت‌های سیستمیک، عفونت گلو، عفونت پوست و عفونت‌های دهانی را شامل شود به طوری که باکتری‌های مرتبط با این نوع عفونت‌ها را از بین ببرد (۴). به‌عنوان مثال از عوامل دکلونیزه کننده در بینی که میکروارگانسیم‌های ساکن بینی از جمله استافیلوکوکها را هدف قرار می‌دهند عبارتند از: موپیروسین (Mupirocin, MUP)، باسیتراسین (Bacitracin, BAC)، رتاپامولین (Retapamulin)، و پویدونید (Altanax/Altargo) و پویدونید درحالی که عوامل دکلونیزه کننده موضعی شامل کلرهگزیدین گلوکونات (Chlorhexidine Gluconate, CHG)، پویدونید (Povidone-iodine, PVP-I)، تریکلوزان (Triclosan, TCS) و هیپوکلریت سدیم (Sodium Hypochlorite, NaOCl) هستند (۴). عوامل دارویی کاملاً کلنی زدا و از بین برنده میکروارگانسیمها تا به امروز MUP و CHG هستند که در پی مقاومت به MUP و

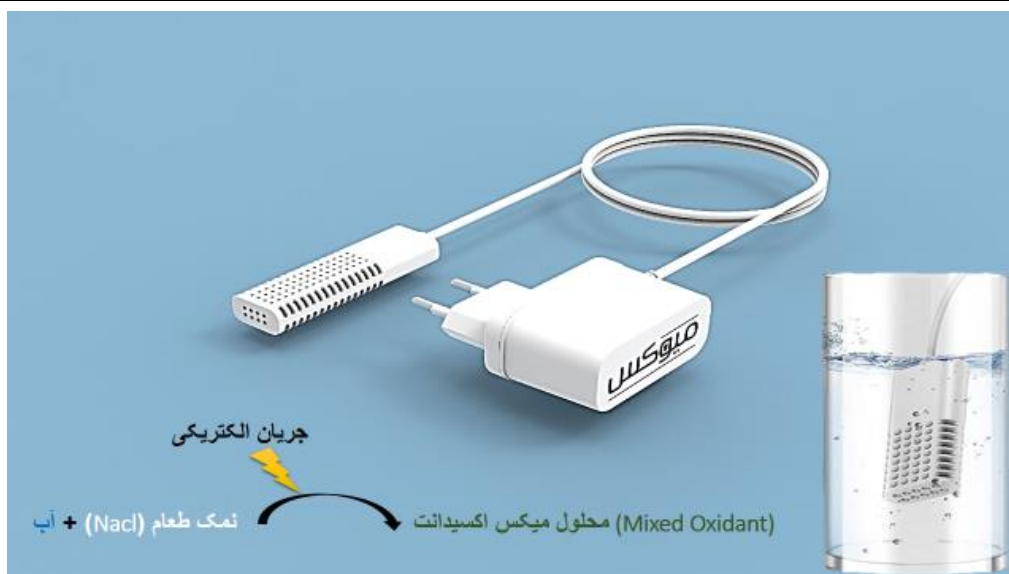
کاهش حساسیت دارویی به CHG، اکتندیدین (Actinidine, OCT) به‌عنوان یک گزینه جایگزین در نظر گرفته می‌شود (۴). در واقع نگرانی اصلی در مورد استفاده گسترده از عوامل دکلونیزه کننده، ایجاد مقاومت دارویی در میکروارگانسیمها است (۴). مطالعات نشان می‌دهد که میزان شیوع مقاومت به MUP در سطح بالا (MRSA MUP (HLR) در سراسر جهان ۱۳/۸٪ و در آسیا ۱۳/۴٪ است. اگرچه یک مطالعه مقطعی آینده‌نگر در سنگاپور در سال ۲۰۱۳ نشان می‌دهد که این رقم ۳۱/۱٪ است (۴). درحالی که گزارش شده است شیوع CHGRS در ایالات متحده آمریکا پایین است (۰/۶-۱/۶٪) (۵)، مطالعه‌ای در بیمارستان تایوان، افزایش شیوع CHG RS MRSA از ۱/۷٪ در سال ۱۹۹۰ به ۴۶/۷٪ در سال ۲۰۰۵ نشان می‌دهد (۶). همچنین مطالعه Htun و همکاران حساسیت کاهش یافته به اکتندیدین (OCT RS MRSA) را به میزان ۹٪ شیوع در یک شبکه بهداشت و درمان در سنگاپور نشان می‌دهد (حداقل غلظت بازدارندگی (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ≥ 2 میکروگرم در میلی‌لیتر) (۷). محلول میکس اکسیدان (Multi-Oxidant Solution یا Mixed-Oxidant Solution) یک نوع محلول ضد عفونی کننده و گندزدا است که برای گندزدایی، ضد عفونی کردن و از بین بردن میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا با کاربردهای مختلف از جمله تصفیه آب آشامیدنی، آب صنعتی، تصفیه فاضلاب و پساب، گندزدایی آب استخر و ... مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸، ۹). استفاده از محلول میکس اکسیدان برای گندزدایی نسبت به سایر روش‌ها مانند هیپوکلریت سدیم و پرکلرین دارای مزایای مختلفی مانند بالاتر بودن قدرت گندزدایی، دارا بودن مقدار باقی مانده در آب و ایمنی بیشتر نسبت به روش‌هایی مانند کلر گازی و ازن زنی است (۱۰، ۱۱). فناوری تولید محلول میکس اکسیدان حاصل از فرآیند الکترولیز محلول نمک طعام (NaCl) است و مخلوطی از ترکیبات مختلف با قابلیت بالای ضد عفونی کننده است.

زیادی از اثرات ضد میکروبی HOCl تولید شده توسط فرآیند الکترولیز گزارش شده است. در مطالعه حاضر ابتدا ویژگی‌های محلول نمکی الکترولیز شده با غلظت‌های مختلف بررسی گردید سپس اثر ضد باکتریایی محلول‌های میکس اکسیدانت تولید شده با توجه به غلظت محلول مذکور در برابر ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه محلول میکس اکسیدان (Mixed oxidant solution) و اندازه‌گیری غلظت کلر موجود (Available Chlorine Concentration) به منظور تهیه غلظت‌های ۱/۱ درصد، ۵/۵ درصد، ۱ درصد و ۲ گرم درصد محلول NaCl، به ترتیب ۲ گرم، ۱۰ گرم، ۲۰ گرم و ۴۰ گرم نمک خوراکی (NaCl) به وسیله ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی وزن گردید و در ۲ لیتر آب شرب خانگی تهیه شده از سیستم لوله‌کشی آب شهری حل گردید. سپس محلول‌های نمکی آماده شده به وسیله دستگاه مولد محلول میکس اکسیدانت میوکس (Portable Model Mixed Oxidant Generator) به مدت ۷ دقیقه با استفاده از جریان الکتریکی ۵ ولت (V) و ۲ آمپر (A) الکترولیز گردید. این دستگاه از نمونه راکتورهای الکتروشیمیایی بدون غشاء است که به وسیله شرکت فناور "ستاره زیبای صبح روناک" در ایران ساخته شده است (شکل ۱). در ادامه pH محلول‌های حاصل از الکترولیز و همچنین آب مورد استفاده به وسیله معرف pH (ساخته شده به وسیله شرکت مرک آلمان) اندازه‌گیری شد. همچنین میزان غلظت کلر موجود (ACC) در هر یک از محلول‌های Mixed Oxidant و همچنین آب شرب مصرفی به روش تیتراسیون سنجش گردید (۱۵). به منظور افزایش دقت و پرهیز از خطاهای احتمالی تمام پارامترهای اندازه‌گیری شده به صورت ۲ مرتبه و در فاصله ۱ ساعت انجام گردید.

سهم اصلی این مواد گندزدا را ترکیبات کلر آزاد (ClO⁻، HClO و Cl₂ محلول) و مقادیری از ترکیبات دیگر مانند دی‌اکسید کلر (ClO₂) محلول، ازن محلول (O₃)، آب اکسیژنه (H₂O₂) و اکسیژن محلول تشکیل می‌دهد که بسته به میزان pH محلول سهم اسید هیپوکلروس (HClO) از ۶۰ درصد تا ۹۸ درصد در آن به‌عنوان ترکیب اصلی متغیر است (۱۲، ۱۳). امروزه کلرزنی پرکاربردترین روش برای گندزدایی آب آشامیدنی در سراسر جهان است. کلر آزاد به‌طور عمده در دو شکل مختلف وجود دارد، اسید هیپوکلروس (HOCl) و یون هیپوکلریت (OCl⁻). HOCl یک مولکول اکسیدان قدرتمند طبیعی است به‌طوری‌که جزئی از پاسخ ایمنی ذاتی انسان بشمار می‌آید. این ترکیب به‌عنوان یک جز فعال‌کننده عمده گلبول‌های سفید شناخته می‌شود و خواص ضد میکروبی بسیار قوی را نشان می‌دهد (۱۴). HOCl را می‌توان با الکترولیز نمک طعام و همچنین مخلوط کردن NaClO و HCl در آب تولید کرد و تولید آن را به میزان اسیدیته ضعیف با pH در حدود ۶ تنظیم کرد. این نوع محلول تولید شده اسیدی ضعیف حاوی HOCl از نظر بیولوژیکی بی‌خطر است، اثرات تحریک‌کنندگی ندارد و در مواردی خوردندگی بسیار کمی دارد (۱۴). HOCl با استفاده از مکانیسم مهار فرآیندهای بیولوژیکی شامل: رشد باکتری‌ها، تقسیم سلول و سنتز پروتئین، اکسیداسیون آنزیم‌های سولفیدریل و اسیدهای آمینه، کاهش تولید آدنوزین تری فسفات، شکستن DNA و کاهش سنتز DNA، باکتری‌ها را از بین می‌برد. این ترکیب بیولوژیکی دارای یک طیف گسترده ضد میکروبی است به‌طوری‌که عوامل بیماری‌زا مانند باکتری‌ها، مایکوباکتری‌ها، اسپور باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و پروتوزوئاها را از بین می‌برد. در زمینه پزشکی، از محلول‌های هیپوکلریت رقیق شده در آب یا نمک برای شستشوی واژن، مثانه، مجاری ادرار و همچنین کنترل سلامت پای ورزشکاران و پیشگیری از عفونت و ترمیم سوختگی استفاده می‌شود (۱۴). تا به امروز گزارش‌های



شکل ۱. نمونه دستگاه میوکس (Portable Mixed Oxidant Generator مدل). این دستگاه با استفاده از جریان الکتریکی ۵ ولت (V) و ۲ آمپر (A) محلول نمک طعام (NaCl) را الکترولیز و تبدیل به محلول میکس اکسیدانت (Mixed Oxidant) می‌کند.

ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی محلول میکس اکسیدانت (Mixed Oxidant) به منظور به دست آوردن داده‌های پایه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب شرب مصرفی و محلول‌های Mixed Oxidant تولیدشده مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا پتانسیل اکسایش-کاهش (ORP) و pH با استفاده از (DKK-TOA Co. Ltd, Japan) ، میزان کلرین موجود (ACC) با استفاده از (RC-3F, Kasahara)

ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی محلول میکس اکسیدانت (Mixed Oxidant) به منظور به دست آوردن داده‌های پایه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب شرب مصرفی و محلول‌های Mixed Oxidant تولیدشده مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا پتانسیل اکسایش-کاهش (ORP) و pH با استفاده از (DKK-TOA Co. Ltd, Japan) ، میزان کلرین موجود (ACC) با استفاده از (RC-3F, Kasahara)

جدول ۱. خصوصیات فیزیکوشیمیایی محلول‌های نمکی الکترولیز شده (Mixed Oxidant): خصوصیات فیزیکوشیمیایی رقت‌های مختلف محلول NaCl مورد استفاده در این مطالعه پس از الکترولیز توسط دستگاه میوکس (MIOX) در جدول زیر نشان داده شده است.

پارامترهای فیزیکوشیمیایی	آب شرب مصرفی	محلول ۰/۱ درصد NaCl	محلول ۰/۵ درصد NaCl	محلول ۱ درصد NaCl	محلول ۲ درصد NaCl
pH	۷/۷	۷/۲	۷/۵	۷/۴	۷/۳
ORP (mV)	+۸۵۲	+۸۰۰	+۷۵۰	+۷۳۰	+۸۳۴
ACC (ppm)	۰/۸	۲۰	۴۶	۱۳۰	۱۸۵

تشخیص فنوتیپی سویه‌های استافیلوکوک ارئوس مقاوم به متیسیلین (MRSA) در مطالعه حاضر ۹۰ نمونه بالینی از کارکنان بخش‌های مختلف و همچنین نمونه‌های بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان (شامل زخم، دست، بینی و سوندهای ادراری) جمع‌آوری شد. تشخیص فنوتیپی سویه‌های

تشخیص فنوتیپی سویه‌های استافیلوکوک ارئوس مقاوم به متیسیلین (MRSA)

MRSA با استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین $30 \mu\text{g}$ تهیه شده از شرکت Sigma آمریکا، بر اساس استانداردهای (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) سال ۲۰۲۰ ویرایش ۳۰ و به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. در این روش از کشت تازه باکتری سوسپانسیونی با کدورت استاندارد نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$) در سرم فیزیولوژی تهیه و سپس با استفاده از سواب استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شده از شرکت Merck آلمان به صورت چمنی کشت داده شد. در ادامه دیسک آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین با در نظر گرفتن فاصله استاندارد بر روی محیط گذاشته شد و پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هاله عدم رشد باکتری اندازه‌گیری گردید. به طوری که هاله عدم رشد کمتر از ۲۱ میلی‌متر (< 21 میلی‌متر) به عنوان مقاومت به سفوکسیتین و وجود سویه MRSA در نظر گرفته شد. در این راستا از سویه استاندارد استافیلوکوک ارئوس مقاوم به متیسیلین تهیه شده از انستیتو پاستور تهران به عنوان سویه کنترل استفاده گردید.

تشخیص مولکولی سویه‌های استافیلوکوک ارئوس مقاوم به متیسیلین (MRSA) به منظور شناسایی ژن *mecA* جهت تأیید تشخیص سویه‌های MRSA به روش مولکولی، از روش واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا باکتری‌های خالص در محیط آگار خوندار (Agar

Blood) کشت و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. جهت استخراج DNA از روش فنل-کلروفرم و جهت ردیابی ژن *mecA* از پرایمرهای اختصاصی شامل 5'- TGCTATCCACCCTCAAACAGG-3' Forward و 5'- AACGTTGTAACCACCCCAAGA -3' Revers: تهیه شده از شرکت سیناژن استفاده شد (۱۶). واکنش پلی‌مرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (با استفاده از مستر میکس (Master Mix) شرکت آمپلیکون دانمارک) انجام شد. مخلوط واکنش PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix، ۱ میکرولیتر (μl) از هر پرایمر، ۵/۵ میکرولیتر (μl) آب مقطر دی‌یونیزه و ۵ میکرولیتر (μl) DNA استخراج شده بود (۱۷). واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر مدل (Mastercycler Eppendorf®) انجام گرفت که برنامه دما و زمان لازم جهت تکثیر ژن *mecA* شامل: واسرشت (Denaturation) اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل واسرشت (Denaturation) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه، اتصال (Annealing) در ۵۷ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه و نهایتاً طویل شدن (Extension) نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه انجام گرفت. از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE برای جداسازی محصولات PCR ژن مورد نظر استفاده شد (شکل ۲).



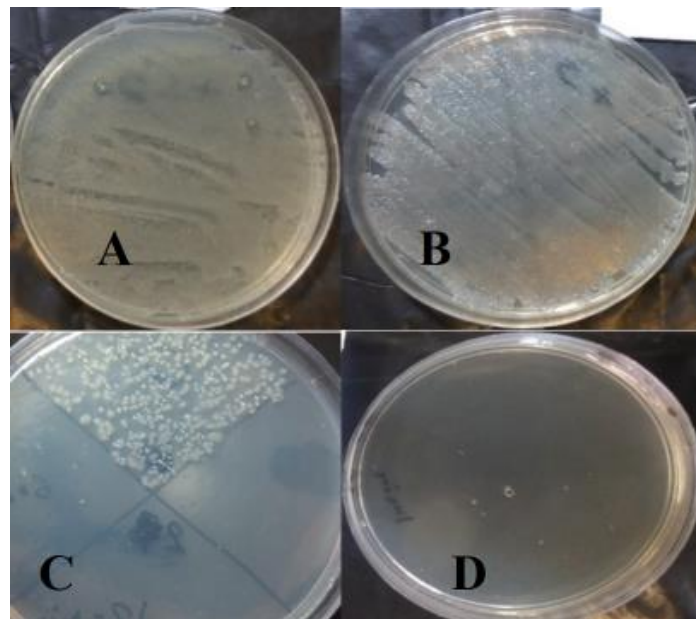
شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز. M DNA: سایز مارکر ۵۰ جفت بازی، ستون ۱: نمونه کنترل مثبت ژن *mecA*

م تفاوت استفاده شد و کلیه آزمون‌های فوق چهار نوبت تکرار شدند. برای تهیه نمونه شاهد، ۴۵۰ میکرو لیتر (μl) از محلول بالاترین غلظت نمکی (۲ گرم درصد) را با ۵۰ میکرو لیتر (μl) سوسپانسیون باکتری تهیه شده مخلوط گردید و ۱۰۰ میکرو لیتر (μl) از آن به پلیت مولر هیتتون آگار تلقیح شد همچنین ۴۵۰ میکرو لیتر (μl) از الکل ۷۰ درصد به عنوان کنترل مثبت با ۵۰ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتری تهیه شده مخلوط گردید و پس از ۵ دقیقه ۱۰۰ میکرو لیتر از آن به پلیت مولر هیتتون آگار منتقل شد. با رقیق سازی مواد و بررسی رقت‌های مختلف چهار محلول Mixed Oxidant، حداقل غلظتی که از رشد باکتری جلوگیری می‌کند (MIC) مورد بررسی قرار گرفت. محاسبه MIC به روش رقت‌های متوالی (Serial Dilution) انجام گرفت. به این ترتیب که از محلول‌های Mixed Oxidant مورد نظر در لوله‌های متوالی غلظت‌های متوالی تهیه و سپس غلظت‌های متفاوت بر باکتری تأثیر داده شد و حداقل غلظت مهارکنندگی محاسبه گردید. از محلول‌های Mixed Oxidant مورد بررسی با روش رقت‌های متوالی (Serial Dilution) در لوله‌های متفاوت، رقت‌های ۱، ۱:۲، ۱:۴، ۱:۸ از چهار محلول Mixed Oxidant تهیه شد و در ادامه طبق روش انتخاب شده اول بر اساس استاندارد اروپایی (EN

ارزیابی اثر ضد باکتریایی محلول میکس اکسیدانت (Mixed Oxidant) در ادامه روش اجرایی بر اساس استاندارد اروپایی (EN 1040: 2005 CSN EN) که برای ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی محلول‌های شیمیایی ضد عفونی کننده استفاده می‌شود، انتخاب شد (۱۸). بدین صورت که از باکتری‌های آماده شده در شرایط آزمایشگاه در ابتدا با استفاده از محلول (PBS فسفات بافر سالین) با $\text{pH}=7$ معادل کدورت محلول نیم مک فارلند ($10^8 \text{ ml/CFU} \times 1/5$) لوله استاندارد تهیه شد. این کدورت با قرار دادن لوله در دستگاه اسپکتوفوتومتری تأیید شد به طوری که در طول موج ۶۰۰ نانومتر (nm) جذب نوری (OD) ۰/۱ را نشان داد. سپس به مقدار ۴۵۰ میکرو لیتر (μl) از هر یک از چهار محلول الکترو لیز شده Mixed Oxidant با غلظت‌های مختلف در ظروف جداگانه آماده شد. ۵۰ میکرو لیتر (μl) از سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شده از باکتری را جداگانه به هر ظرف اضافه نموده و بعد از زمان‌های ۱ دقیقه، ۲ دقیقه و ۵ دقیقه به طور مساوی به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول‌های فوق را به محیط‌های کشت مولر هیتتون آگار در جای مخصوص خود تلقیح شدند و بلافاصله در پلیت‌ها پخش گردید. در ادامه از ۴ پلیت متفاوت برای چهار زمان

با نمونه کنترل به عنوان اثر بخشی مملول Mixed Oxidant در نظر گرفته شد. طبق این روش آستانه حساسیت باکتری به مملول Mixed Oxidant، 10^3 CFU/ml بود. در صورتی که پلیتهای باکتری مجاور شده با مملول Mixed Oxidant دارای $10 \leq$ ml/CFU بود، به عنوان عدم رشد باکتری چهار مملول الکترولیز شده محسوب و اثر آنتی باکتریال ماده تأیید گردید (شماره ۳).

1040: 2005 CSN EN سوسپانسیون باکتری با کدورت $10^8 \times 1/5$ ml/CFU در مواجهه با مملولهای مذکور زمان ۲ دقیقه قرار گرفت، سپس در پلیتهای متفاوت از محیط کشت مولر هینتون قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوبه گردید. در ادامه کلنی باکتریها شمارش شدند و فعالیت ضد باکتریایی در واحد تشکیل کلنی (ml/CFU) بیان گردید. کاهش CFU Unit Forming Colony در مقایسه



شکل ۳. تصاویر اثر ضد باکتریایی مملول میکس اکسیدانت (Mixed Oxidant) بر روی باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سلین (MRSA). (A) رشد کامل باکتری در مواجهه با غلظت نمک ۲ درصد (نمونه شاهد). (B) کنترل مثبت بدون اثر مملول Mixed Oxidant (رشد کامل باکتری). (C) کاهش رشد باکتری. (D) عدم رشد باکتری.

تحلیل آماری

آزمایشها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. در قسمت آمار توصیفی از آماره های فراوانی، میانه و میانگین و انحراف معیار میانگین برای گزارش یافتهها استفاده گردید. در قسمت آمار تحلیلی از آزمونهای مجذور کای یا دقیق فیشر و همچنین تی مستقل یا معادل ناپارامتریک آن من ویتنی استفاده شد. دادههای به دست آمده از این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافتهها

در تحقیق حاضر عملکرد چهار مملول Mixed Oxidant با منشأ غلظت نمکی متفاوت بر ایزوله های MRSA در زمان ۲ دقیقه کاملاً تأیید شد. به طوری که در زمان مذکور که مملول Mixed Oxidant مورد آزمایش قرار گرفتند، در هیچ پلیتهای رشد باکتری مشاهده نشده و تعداد کلنی کانت (colony count) صفر محاسبه گردید. آزمایشها چهار بار تکرار و در هر تکرار، میزان رشد باکتریایی در زمان ۲ دقیقه محاسبه شد. نتایج این مطالعه

(رقتهای ۱:۴، ۱:۸) و ۲ درصد NaCl (رقت ۱:۸) موجب کاهش بار باکتریایی و کاهش تعداد کلنی ایزوله‌های MRSA گردید. همچنین نتایج نشان می‌دهد محلول‌های الکترولیز شده ۰/۱ درصد NaCl (رقتهای ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸) و ۰/۵ درصد NaCl (رقت ۱:۸) فاقد اثر آنتی باکتریال هستند. نتایج حاصل در جدول (۲) نشان داده شده است.

نشان می‌دهد که محلول‌های الکترولیز شده ۰/۵ درصد NaCl (رقت ۱)، محلول‌های ۱ درصد NaCl (رقتهای ۱، ۱:۲)، محلول‌های ۲ درصد NaCl (رقتهای ۱، ۱:۲، ۱:۴) موجب عدم رشد کامل ایزوله‌های MRSA می‌شود. از طرفی محلول‌های الکترولیز شده ۰/۱ درصد NaCl (رقت ۱)، ۰/۵ درصد NaCl (رقتهای ۱:۲، ۱:۴)، ۱ درصد NaCl

جدول ۲. اثر آنتی باکتریال محلول (MIOX) Mixed Oxidant: اثر ضد باکتریایی چهار رقت مختلف محلول میکس اکسدانت (MIOX) بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سلین (MRSA) نشان داده شده است.

غلظت محلول نمکی (NaCl)	رقتهای پس از الکترولیز (محلول Mixed Oxidant)	زمان الکترولیز (دقیقه)	زمان مواجهه میکروبی (دقیقه)	اثر آنتی باکتریال
محلول ۰/۱ درصد NaCl	۱			کاهش رشد
	۱:۲	۷	۲	رشد
	۱:۴			رشد
	۱:۸			رشد
۱	عدم رشد			
محلول ۰/۵ درصد NaCl	۱			کاهش رشد
	۱:۲	۷	۲	کاهش رشد
	۱:۴			کاهش رشد
	۱:۸			رشد
۱	عدم رشد			
محلول ۱ درصد NaCl	۱			کاهش رشد
	۱:۲	۷	۲	عدم رشد
	۱:۴			کاهش رشد
	۱:۸			کاهش رشد
۱	عدم رشد			
محلول ۲ درصد NaCl	۱			عدم رشد
	۱:۲	۷	۲	عدم رشد
	۱:۴			عدم رشد
	۱:۸			کاهش رشد
۱	عدم رشد			

کارکنان بیمارستانی و محیط آن می‌تواند خطر آلودگی و انتقال باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را به حداقل برساند (۲۱). در این راستا استفاده از مواد ضد عفونی کننده جهت کنترل آلودگی‌های میکروبی محیطی و دست‌ها به عنوان عامل اولیه انتقال میکروبی و همچنین یکی از مهمترین حلقه‌ها در زنجیره انتقال عامل عفونت است به طوری که این اقدام موجب کاهش خطر انتقال عفونت و استفاده کمتر از آنتی‌بیوتیک‌ها و حفظ تأثیر آن‌ها و جلوگیری از مقاومت‌های دارویی جدید می‌شود (۲۲، ۲۳). در نتیجه

بحث

انتقال باکتری‌های بیماری‌زا به ویژه باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مانند MRSA ها اغلب عامل اصلی شیوع عفونت‌های بیمارستانی و مراکز درمانی هستند (۱۹). پیشگیری از انتشار استافیلوکوکوس از فردی به فرد دیگر دشوار است به طوری که این موضوع در محیط‌های درمانی و بیمارستانی به واسطه وجود کارکنان درمانی به عنوان عوامل بالقوه انتقال اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (۲۰). استریل کردن

۲ دقیقه)، قابلیت میکروب کشی بالایی در از بین بردن این باکتری را دارد، بدین معنی که این محلول سالم و طبیعی از لحاظ قدرت باکتریسیدال در غلظت های ارائه شده، در زمان مورد بررسی این مطالعه (۱ تا ۲ دقیقه) بسیار قوی عمل می کند. در بحث انتخاب مواد ضد عفونی کننده برتر، فاکتورهای دیگری جهت مقایسه و برتری مواد دارای اهمیت است که از جمله آنها به صرفه اقتصادی، قابلیت دسترسی، قابلیت استفاده گسترده و وسیع لطیف، سازگاری با بدن، دوستدار محیط زیست بودن و ماندگاری اثر آنتی باکتریال ماده ضد عفونی کننده می توان اشاره کرد. در ادامه بررسی های آزمایشگاهی این مطالعه مشخص شد که محلول Mixed Oxidant تولید شده توسط دستگاه میوکس به مراتب غلیظ تر از کمترین غلظت لازم جهت حذف باکتری های MRSA است به طوری که الکترولیز محلول نمکی ۰/۵ درصد (با غلظت مستقیم)، محلول نمکی ۱ درصد (با رقت ۱:۲) و محلول نمکی ۲ درصد (با رقت ۱:۴) مانع از رشد کامل باکتری های MRSA گردید. تأثیر محلول Mixed Oxidant در رقت های مذکور از این حیث به سایر محلول های ضد عفونی برتری دارد زیرا می توان بر اساس نیاز و در محل، حجم زیادی از این محلول ضد عفونی کننده را تولید کرد. از لحاظ مقرون به صرفه بودن و همچنین با توجه به شرایط اقتصادی و سیاست های بهداشتی کشور مبنی بر کاهش واردات و خود کفایی، استفاده از مواد تولید داخل به نمونه های مشابه خارجی دارای ارجحیت است. از آنجایی که محلول Mixed Oxidant و همچنین دستگاه مولد این محلول (میوکس) تولید داخل کشور هستند و قیمت به مراتب کمتری در مقایسه با نمونه های خارجی دارند، لذا می توان این محصول را برتر از سایر محصولات مورداستفاده دانست. قابل ذکر است که اهمیت موضوع زمانی بیشتر می شود که بدانیم کیفیت محلول Mixed Oxidant و دستگاه مولد این محلول به مراتب بیشتر از نمونه های خارجی است، به طوری که این محصول تولید داخل به خوبی از عهده

استفاده از این ضد عفونی کننده ها مرگ و میر به شدت کاهش یافته است به طوری که این موضوع نیز موجب کاهش چشمگیر هزینه ها شده است (۲۴) با وجود اینکه استفاده از ضد عفونی کننده ها یک راه مهم جهت کاهش خطر انتقال عفونت است اما انتخاب مواد ضد عفونی کننده مناسب توسط مراکز درمانی به طور تصادفی و همچنین فنون استفاده درست از انواع ضد عفونی کننده ها ضعیف است تا جایی که نیاز به آموزش و تحقیقات بیشتر در این زمینه احساس می شود (۲۵). در یک مطالعه Hyunju Son و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثر ضد باکتریایی محلول Mixed Oxidant را بررسی کردند، در این تحقیق مشخص شد که این محلول قابلیت بالایی در از بین بردن باکتری ها دارد. این مطالعه محلول Mixed Oxidant را به عنوان جایگزین قوی برای انواع محلول های ضد عفونی کننده پیشنهاد می کند (۲۶). Ken Pernezny و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثر ضد باکتریایی محلول Mixed Oxidant را بر روی باکتری های آلوده کننده سبزی ها بررسی کردند. این تحقیق نشان می دهد محلول مذکور به طور معنی دار و فراوان موجب کاهش این باکتری ها می شود (۲۷). در سال ۲۰۰۳ Sasahara T و همکاران اثر محلول Mixed Oxidant را به عنوان ضد عفونی کننده بالقوه بر روی تک یاخته انگلی کریپتوسپوریدیوم پارووم بررسی کردند. در این مطالعه اووسیت های این تک یاخته در معرض غلظت ۵ میلی گرم در لیتر (۵ ppm) محلول Mixed Oxidant قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان می دهد که محلول مذکور قابلیت از بین بردن این تک یاخته انگلی را دارد (۱۰). در رابطه با باکتری MRSA که مهمترین عامل بیماری زای منتقله از طریق محیط های بیمارستانی و درمانی است، باید ماده ضد عفونی کننده ای را ایده آل دانست که قابلیت حذف کامل این باکتری را داشته باشد، از طرفی چنین ماده ضد عفونی کننده ای نباید مستعد مقاومت دارویی باشد. طی نتایج حاصل از مطالعه حاضر محلول Mixed Oxidant در حداقل زمان استفاده (۱ تا

بیماری‌زا، نگرانی در مورد ایجاد مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد عفونی کننده همواره احساس می‌شود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از محلول Mixed Oxidant می‌تواند به حذف و قطع زنجیره انتقال باکتری‌های MRSA کمک کند. لذا انجام مطالعات متعدد برای بررسی اثرات این محلول به عنوان ضد عفونی کننده بر روی دیگر باکتری‌های مقاوم به دارو نیز ضرورت دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پروپوزال تحقیقاتی شرکت فناور " ستاره زیبای صبح روناک " واقع در پارک علم و فناوری کردستان با کد اخلاق IR.MUK.REC.1402.033 استخراج شده است و نویسندگان بر خود فرض می‌دانند از پارک علم و فناوری کردستان و دانشگاه علوم پزشکی کردستان بابت همکاری و حمایت‌هایشان صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

حذف انواع آلودگی‌های میکروبی از جمله باکتری MRSA برمی‌آید. مطالعات زیادی در رابطه با اثر محلول Mixed Oxidant به عنوان ضد عفونی کننده بر روی انواع باکتری‌ها و ویروس‌ها انجام شده است که قابلیت این محلول را به عنوان یک ضد عفونی کننده قوی نشان می‌دهد (۲۸, ۲۹, ۳۰). در مطالعه حاضر برای اولین بار قابلیت محلول Mixed Oxidant در پاک‌سازی باکتری‌های مقاوم به دارو بررسی شد و در این راستا با توجه به اهمیت باکتری MRSA این باکتری به عنوان عامل میکروبی انتخاب گردید. با این وجود عوامل مختلف بیماری‌زا مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها وجود دارند که می‌توانند عامل عفونت در محیط‌های درمانی و کلینیکی باشند. اضافه بر این، بسیاری از این عوامل فرصت طلب بوده و در میزبان حساس، قادر به ایجاد بیماری هستند. بر این اساس، کنترل آلودگی در محیط‌های حساس درمانی با تعداد بالای بیمار به صورت روزانه از اولویت و اهمیت ویژه برخوردار است. علیرغم نتایج قابل قبول به دست آمده از محصولات ضد میکروبی مختلف و با وجود اینکه زنجیره انتقال عفونت در موارد مختلفی قطع می‌شود، اما با توجه به تغییر سوشهای متداول عفونت‌زا در محیط‌های درمانی در طول زمان و پیدایش گونه‌های بسیار مقاوم و درعین حال

منابع

1. Climo MW, Sepkowitz KA, Zuccotti G, Fraser VJ, Warren DK, Perl TM, et al. The effect of daily bathing with chlorhexidine on the acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococcus*, and healthcare-associated bloodstream infections: results of a quasi-experimental multicenter trial. *Critical care medicine*. 2009;37(6):1858-65.
2. Kluytmans J, Wertheim H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection*. 2005;33(1):3-8.
3. Septimus EJ, Schweizer ML. Decolonization in prevention of health care-associated infections. *Clinical microbiology reviews*. 2016;29(2):201-22.
4. Zheng S, Chung S, Sim H, Chlebicka T, Chan Y, Lim T, et al. Impact of formulary interventions on the minimum inhibitory concentration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to mupirocin, chlorhexidine, and octenidine in a Singapore tertiary institution. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020:1-7.
5. Schlett CD, Millar EV, Crawford KB, Cui T, Lanier JB, Tribble DR, Ellis MW. Prevalence of chlorhexidine-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* following prolonged exposure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(8):4404-10.

6. Wang J-T, Sheng W-H, Wang J-L, Chen D, Chen M-L, Chen Y-C, Chang S-C. Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(3):514-7.
7. Htun H, Hon P, Holden M, Ang B, Chow A. Chlorhexidine and octenidine use, carriage of *qac* genes, and reduced antiseptic susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a healthcare network. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(9):1154. e1-e7.
8. Torres-Rosales E, Rivera-Garcia A, Rosario-Perez PJ, Ramirez-Orejuel JC, Paez-Esquiliano D, Martinez-Vidal S, et al. Application of Neutral Electrolyzed Water on pork chops and its impact on meat quality. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1-10.
9. Hopkins DZ, Parisi MA, Dawson PL, Northcutt JK. Surface Decontamination of Fresh, Whole Peaches (*Prunus persica*) Using Sodium Hypochlorite or Acidified Electrolyzed Water Solutions. *International Journal of Fruit Science*. 2020;9(6):1-11.
10. Sasahara T, Aoki M, Sekiguchi T, Takahashi A, Satoh Y, Kitasato H, Inoue M. Effect of the mixed-oxidant solution on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in a neonatal mouse model. *Kansenshogaku zasshi The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. 2003;77(2):75-82.
11. Stewart WJ, Santillanes MR, Schwarz K, Sanchez J, Showalter GC, Lee K. Electrolytic on-site generator. Google Patents; 2019.
12. Von Broembsen D. Mixed Oxidant Electrolytic Cell. Google Patents; 2012.
13. Boal A. On-site generation of disinfectants. National Environmental Services Center. 2009; 9(1):32-47.
14. Rahman MH, Bajgai J, Fadriquel A, Kim C-S, Lee K-J. Characteristics and Anti-bacterial Effects of Mineral Supplement-Hypochlorous Acid Water on Human Pathogenic Bacteria. 2019; 7(1):15-24.
15. Saberi EA, Farhad-Mollashahi N, Saberi M. Difference between the actual and labeled concentrations of several domestic brands of sodium hypochlorite. *Iranian Endodontic Journal*. 2019;14(2):139-43.
16. Vandana K, Singh J, Chiranjay M, Bairy I. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus*: Reason for treatment failure. *Journal of global infectious diseases*. 2009;1(1):76.
17. Sedaghat H, Esfahani BN, Mobasherizadeh S, Jazi AS, Halaji M, Sadeghi P, et al. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in Isfahan, Iran. *Iranian journal of microbiology*. 2017;9(5):264.
18. Vitt A, Sofrata A, Slizen V, Sugars R, Gustafsson A, Gudkova E, et al. Antimicrobial activity of polyhexamethylene guanidine phosphate in comparison to chlorhexidine using the quantitative suspension method. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2015;14(1):36.
19. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020;10:107.
20. Adeiza SS, Onaolapo JA, Olayinka BO. Prevalence, risk-factors, and antimicrobial susceptibility profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) obtained from nares of patients and staff of Sokoto state-owned hospitals in Nigeria. *GMS Hygiene and Infection Control*. 2020;15(6):20-29.

21. Aljamali NM, Jawad AM, Alfatlawi IO, Jawd SM. Review on Hospital Bacteria (Causes, Infections, Prevention). *infection*. 2020;11:16.
22. Lu M-C, Chen P-L, Huang D-J, Liang C-K, Hsu C-S, Liu W-T. Disinfection efficiency of hospital infectious disease wards with chlorine dioxide and hypochlorous acid. *Aerobiologia*. 2021;37(1):29-38.
23. Maillard J-Y, Bloomfield SF, Courvalin P, Essack SY, Gandra S, Gerba CP, et al. Reducing antibiotic prescribing and addressing the global problem of antibiotic resistance by targeted hygiene in the home and everyday life settings: a position paper. *American journal of infection control*. 2020; 9(7):17-25.
24. Mermel LA, Jefferson J, Blanchard K, Parenteau S, Mathis B, Chapin K, Machan JT. Reducing *Clostridium difficile* incidence, colectomies, and mortality in the hospital setting: a successful multidisciplinary approach. *The Joint Commission Journal on Quality and Patient Safety*. 2013;39(7):298-AP5.
25. Boyce JM, Pittet D. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *American journal of infection control*. 2002;30(8):S1-S46.
26. Son H, Cho M, Kim J, Oh B, Chung H, Yoon J. Enhanced disinfection efficiency of mechanically mixed oxidants with free chlorine. *Water Research*. 2005;39(4):721-7.
27. Pernezny K, Raid RN, Havranek N, Sanchez J. Toxicity of mixed-oxidant electrolyzed oxidizing water to in vitro and leaf surface populations of vegetable bacterial pathogens and control of bacterial diseases in the greenhouse. *Crop Protection*. 2005;24(8):748-55.
28. Monnin A, Lee J, Pascall MA. Efficacy of neutral electrolyzed water for sanitization of cutting boards used in the preparation of foods. *Journal of Food Engineering*. 2012;110(4):541-6.
29. Stewart M, Bogusz A, Hunter J, Devanny I, Yip B, Reid D, et al. Evaluating use of neutral electrolyzed water for cleaning near-patient surfaces. *infection control and hospital epidemiology*. 2014;10(4).
30. Tamaki S, Bui VN, Ngo LH, Ogawa H, Imai K. Virucidal effect of acidic electrolyzed water and neutral electrolyzed water on avian influenza viruses. *Archives of virology*. 2014;159(3):405-12.