

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. DOI: [10.22034/30.4.1](https://doi.org/10.22034/30.4.1)

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: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۰۰۵۳-۴۴۶۰

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 آنتی باکتریال 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 فوتیپی و ژنوتیپی استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که محلول مولتی اکسیدانت تولیدشده 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 تولیدشده از محلول ۰/۱ درصد دارای غلظت پایین میکس اکسیدانت و همچنین کمترین اثر آنتی باکتریال 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 تولیدشده، 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 ارگانیسم‌های 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 دکلوئیزاسیون (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 به‌طوری‌که باکتری‌های مرتبط با این نوع عفونت‌ها را از بین ببرد (۴). به‌عنوان مثال از عوامل دکلوئیزه کننده در بینی که میکروارگانیسم‌های ساکن بینی از جمله استافیلوکوکها را هدف قرار می‌دهند عبارتند از: موپیروسین (Mupirocin, MUP)، باسیتراسین (Bacitracin, BAC)، رتاپامولین (Retapamulin)، و پویدونید درحالی‌که عوامل دکلوئیزه 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 میکروارگانیسمها تا به امروز

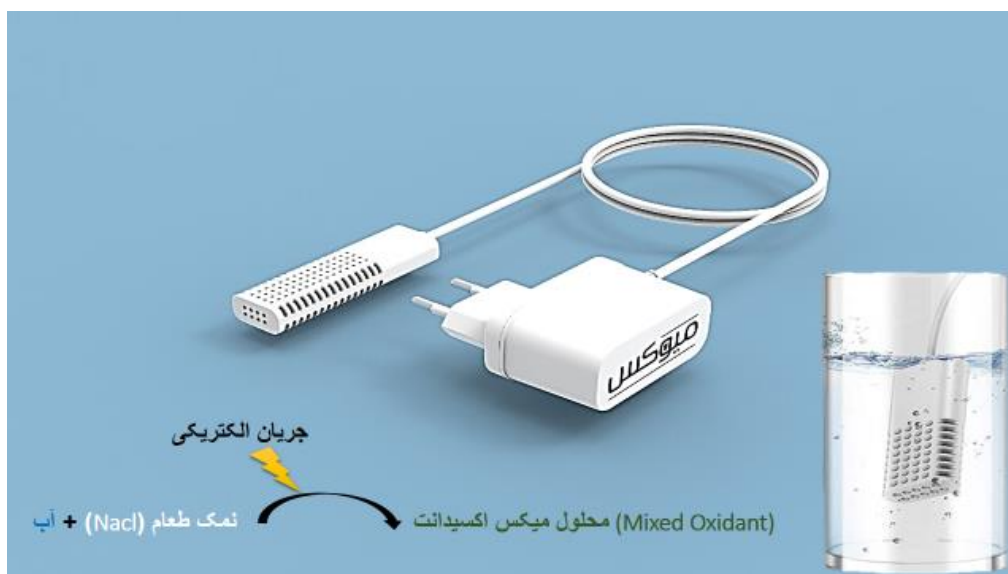
MUP و CHG هستند که در پی مقاومت به MUP و کاهش حساسیت دارویی به CHG، اکتندیدین (Actinidine, OCT) به‌عنوان یک گزینه جایگزین در نظر گرفته می‌شود (۴). درواقع نگرانی اصلی در مورد استفاده گسترده از عوامل دکلوئیزه کننده، ایجاد مقاومت دارویی در میکروارگانیسمها است (۴). مطالعات نشان می‌دهد که میزان شیوع مقاومت 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). درحالی‌که 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 میکروارگانیسم‌های 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 ازن‌زنی است (۱۰، ۱۱). فناوری تولید محلول میکس اکسیدان حاصل از فرآیند الکترولیز محلول نمک طعام (NaCl) است و مخلوطی از

ترکیبات مختلف باقابلیت بالای ضد عفونی کنندگی است. سهم اصلی این مواد گندزدا را ترکیبات کلر آزاد (ClO^-), HClO و Cl_2 (محلول) و مقادیری از ترکیبات دیگر مانند دی اکسید کلر (ClO_2) محلول، ازن محلول (O_3)، آب اکسیژنه (H_2O_2) و اکسیژن محلول تشکیل می دهد که بسته به میزان pH محلول سهم اسید هیپوکلروس (HClO) از ۶۰ درصد تا ۹۸ درصد در آن به عنوان ترکیب اصلی متغیر است (۱۲، ۱۳). امروزه کلرزنی پرکاربردترین روش برای گندزدایی آب آشامیدنی در سراسر جهان است. کلر آزاد به طور عمده در دو شکل مختلف وجود دارد، اسید هیپوکلروس (HOCl) و یون هیپوکلریت (OCl^-). HOCl یک مولکول اکسیدان قدرتمند طبیعی است به طوری که جزئی از پاسخ ایمنی ذاتی انسان بشمار می آید. این ترکیب به عنوان یک جز فعال کننده عمده گلبول های سفید شناخته می شود و خواص ضد میکروبی بسیار قوی را نشان می دهد (۱۴). HOCl را می توان 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 بی خطر است، اثرات تحریک کننده گی ندارد و در مواردی خوردن گی بسیار کمی دارد (۱۴). HOCl با استفاده از مکانیسم مهار فرآیندهای بیولوژیکی شامل: رشد باکتری ها، تقسیم سلول و سنتز پروتئین، اکسیداسیون آنزیم های سولفیدریل و اسیدهای آمینه، کاهش تولید آدنوزین تری فسفات، شکستن DNA و کاهش سنتز DNA، باکتری ها را از بین می برد. این ترکیب بیولوژیکی دارای یک طیف گسترده ضد میکروبی است به طوری که عوامل بیماری زا مانند باکتری ها، مایکوباکتری ها، اسپور باکتری ها، ویروس ها، قارچ ها، جلبک ها و پروتوزوئاها را از بین می برد. در زمینه پزشکی، از محلول های 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 می شود (۱۴). تا به امروز گزارش های زیادی از اثرات ضد میکروبی HOCl تولید شده توسط فرآیند الکترولیز گزارش شده است. در مطالعه حاضر ابتدا ویژگی های محلول نمکی الکترولیز شده با غلظت های مختلف بررسی گردید سپس اثر ضد باکتریایی محلول های میکس اکسیدانت تولید شده با توجه به غلظت محلول مذکور در برابر ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) بررسی گردید.

مواد و روش ها

تهیه محلول میکس اکسیدان (Mixed oxidant solution) و اندازه گیری غلظت کلر موجود (Available Chlorine Concentration) به منظور تهیه غلظت های ۰/۱ درصد، ۰/۵ 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 لوله کشی آب شهری حل گردید. سپس محلول های 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 محلول های حاصل از الکترولیز و همچنین آب مورد استفاده به وسیله معرف pH (ساخته شده به وسیله شرکت مرک آلمان) اندازه گیری شد. همچنین میزان غلظت کلر موجود (ACC) در هریک از محلول های Mixed Oxidant و همچنین آب شرب مصرفی به روش تیتراسیون سنجش گردید (۱۵). به منظور افزایش دقت و پرهیز از خطاهای احتمالی تمام پارامترهای اندازه گیری شده به صورت ۲ مرتبه و در فاصله ۱ ساعت انجام گردید.



شکل ۱. نمونه دستگاه میکس اکسیدانت (Mixed Oxidant Generator مدل Portable). 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 میکس (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

تشخیص فنوتیپی سویه‌های استافیلوکوک ارئوس مقاوم به متیسیلین (MRSA)

ادارای) جمع آوری شد. تشخیص فنوتیپی سویه‌های MRSA با استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین μg 30 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 پلیمراز (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'
CCA و Forward
5'- AACGTTGTAACCACCCCAAGA -3'
Revers: تهیه شده از شرکت سیناژن استفاده شد (۱۶). واکنش پلی‌مراز 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 آگاروز. DNA M: سایز مارکر ۵۰ جفت بازی، ستون ۱: نمونه کنترل مثبت ژن *mecA*

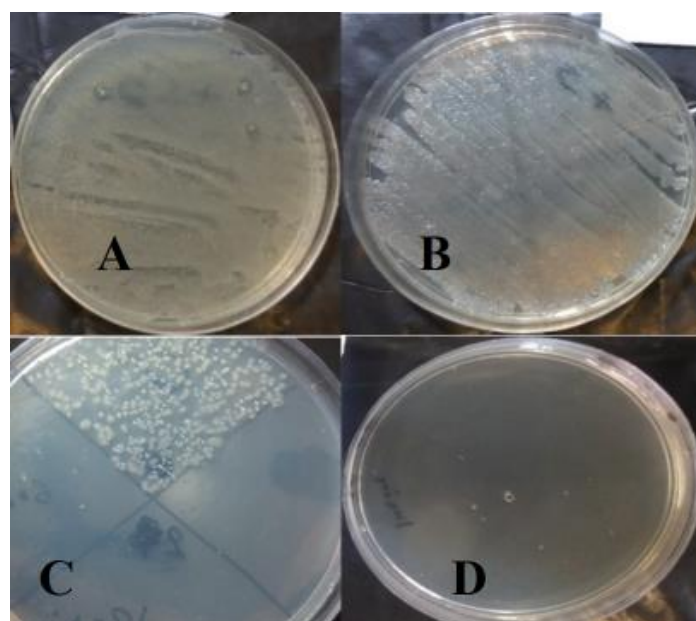
متفاوت استفاده شد و کلیه آزمون‌های فوق چهار نوبت تکرار شدند. برای تهیه نمونه شاهد، ۴۵۰ میکرو لیتر (μl) از محلول بالاترین غلظت نمکی (۲ گرم درصد) را با ۵۰ میکرو لیتر (μl) سوسپانسیون باکتری تهیه شده مخلوط گردید و ۱۰۰ میکرو لیتر (μl) از آن به پلیت مولر هیتون آگار تلقیح شد همچنین ۴۵۰ میکرو لیتر (μl) از الکل 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 هیتون 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، ۲:۱، ۴:۱، ۸:۱ 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 ($10^8 \text{ ml}/\text{CFU} \times 1/5$) لوله استاندارد تهیه شد. این کدورت با قرار دادن لوله در دستگاه اسپکتوفتومتری 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 هیتون 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 (شکل ۳).

CSN EN 1040: 2005) 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 هیتون قرار داده شد و در دمای 37°C 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 Unit Forming Colony (CFU) 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 یافته ها 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. داده های به دست آمده از این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

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 پلیتی 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.

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

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

استفاده از این ضد عفونی کننده‌ها مرگ و میر به شدت کاهش یافته است به طوری که این موضوع نیز موجب کاهش چشمگیر هزینه‌ها شده است (۲۴) با وجود اینکه استفاده از ضد عفونی کننده‌ها 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 کننده‌ها ضعیف است تا جایی که نیاز به آموزش و تحقیقات بیشتر در این زمینه احساس می‌شود (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 باکتری‌ها دارد. این مطالعه محلول Mixed Oxidant را به عنوان جایگزین قوی برای انواع محلول‌های ضد عفونی کننده پیشنهاد می‌کند (۲۶). Ken Pernezy و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثر ضد باکتریایی محلول Mixed Oxidant را بر روی باکتری‌های آلوده کننده سبزی‌ها بررسی کردند. این تحقیق نشان می‌دهد محلول مذکور به طور معنی‌دار و فراوان موجب کاهش این باکتری‌ها می‌شود (۲۷). در سال ۲۰۰۳ Sasahara T و همکاران اثر محلول Mixed Oxidant را به عنوان ضد عفونی کننده بالقوه بر روی تک‌یاخته انگلی کریپتوسپوریدیوم پارووم بررسی کردند. در این مطالعه اووسیت‌های این تک‌یاخته در معرض غلظت ۵ میلی گرم در لیتر (۵ ppm) محلول Mixed Oxidant قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که محلول مذکور قابلیت از بین بردن این تک‌یاخته انگلی را دارد (۱۰). در رابطه با باکتری MRSA که مهمترین عامل بیماری‌زای منتقله از طریق محیط‌های بیمارستانی و درمانی است، باید ماده ضد عفونی کننده‌ای را ایده آل دانست که قابلیت حذف کامل این باکتری را داشته باشد، از طرفی چنین ماده ضد عفونی کننده‌ای نباید مستعد مقاومت دارویی باشد. طی نتایج حاصل از مطالعه حاضر محلول Mixed Oxidant در حداقل زمان استفاده (۱ تا

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 غلظت‌های ارائه شده، در زمان مورد بررسی این مطالعه (۱ تا ۲ دقیقه) بسیار قوی عمل می‌کند. 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، دوستانه محیط زیست بودن و ماندگاری اثر آنتی باکتریال ماده ضد عفونی کننده می‌توان اشاره کرد. در ادامه بررسی‌های آزمایشگاهی این مطالعه مشخص شد که محلول Mixed Oxidant تولید شده توسط دستگاه میوکس به مراتب غلیظ‌تر از کمترین غلظت لازم جهت حذف باکتری‌های 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 باکتری‌های MRSA گردید. تأثیر محلول Mixed Oxidant در رقت‌های مذکور از این حیث به سایر محلول‌های ضد عفونی برتری دارد زیرا می‌توان 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 سیاست‌های بهداشتی کشور مبنی بر کاهش واردات و خود کفایی، استفاده از مواد تولید داخل به نمونه‌های 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 نمونه‌های خارجی دارند، لذا می‌توان این محصول را برتر از سایر محصولات مورد استفاده دانست. قابل ذکر است که اهمیت موضوع زمانی بیشتر می‌شود که بدانیم کیفیت محلول Mixed Oxidant و دستگاه مولد این محلول به مراتب بیشتر از نمونه‌های خارجی است، به طوری که این محصول تولید داخل به خوبی از عهده

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, Speck K, Jernigan JA, Robles JR, Wong ES. 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 Jun 1;37(6):1858-65. Doi: 10.1097/CCM.0b013e31819ffe6d
2. Kluytmans JA, Wertheim HF. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection*. 2005 Feb;33(1):3-8. Doi: 10.1007/s15010-005-4012-9
3. Septimus EJ, Schweizer ML. Decolonization in prevention of health care-associated infections. *Clinical microbiology reviews*. 2016 Apr;29(2):201-22.
4. Zheng S, Chung SJ, Sim HC, Chlebicka TM, Chan YH, Lim TP, Kwa LH, Chlebicki MP. 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 Dec;39(12):2397-403.
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 Aug;58(8):4404-10.
 6. Wang JT, Sheng WH, Wang JL, Chen D, Chen ML, Chen YC, Chang SC. Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008 Sep 1;62(3):514-7.
 7. Htun HL, Hon PY, Holden MT, 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 Sep 1;25(9):1154-e1.
 8. Torres-Rosales E, Rivera-Garcia A, Rosario-Perez PJ, Ramirez-Orejuel JC, Paez-Esquiliano D, Martinez-Vidal S, Guzman-Olea E, Cano-Buendia JA. Application of Neutral Electrolyzed Water on pork chops and its impact on meat quality. *Scientific reports*. 2020 Nov 16;10(1):19910.
 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*. 2021 Jan 1;21(1):1-1.
 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 Feb 1;77(2):75-82.
 11. Stewart WJ, Santillanes MR, Schwarz K, Sanchez J, Showalter GC, Lee K, inventors; Miox Corp, assignee. Electrolytic On-Site Generator. United States patent application US 13/198,276. 2012 Mar 1.
 12. Von Broembsen D, inventor; ChlorKing Inc, assignee. Mixed Oxidant Electrolytic Cell. United States patent application US 13/041,300. 2012 Mar 15.
 13. Boal AK. On-site generation of disinfectants. National Environmental Services Center. 2009;9(1):1-4.
 14. Rahman MH, Bajgai J, Fadriuela A, Lee KJ. Characteristics and Anti-bacterial Effects of Mineral Supplement-Hypochlorous Acid Water on Human Pathogenic Bacteria.. 2019 May;7(1):44-55.
 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.
 16. Vandana KE, Singh J, Chiranjay M, Bairy I. Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of global infectious diseases*. 2009 Jan 1;1(1):76-7.
 17. Sedaghat H, Esfahani BN, Mobasherizadeh S, Jazi AS, Halaji M, Sadeghi P, Emaneini M, Havaei SA. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in Isfahan, Iran. *Iranian journal of microbiology*. 2017 Oct;9(5):264. Doi: 10.18502/ijm.v9i5.1159
 18. Vitt A, Sforata A, Slizen V, Sugars RV, Gustafsson A, Gudkova EI, Kazeko LA, Ramberg P, Buhlin K. Antimicrobial activity of polyhexamethylene guanidine phosphate in comparison to chlorhexidine using the quantitative suspension method. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2015 Jul 17;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 Mar 17;10:107. Doi: 10.3389/fcimb.2020.00107
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 Oct 12;15:Doc25.
21. Aljamali NM, Jawad AM, Alfatlawi IO, Jawd SM. Review on Hospital Bacteria (Causes, Infections, Prevention). *infection*. 2020;11:16.
22. Lu MC, Chen PL, Huang DJ, Liang CK, Hsu CS, Liu WT. Disinfection efficiency of hospital infectious disease wards with chlorine dioxide and hypochlorous acid. *Aerobiologia*. 2021 Mar;37(1):29-38.
23. Maillard JY, Bloomfield SF, Courvalin P, Essack SY, Gandra S, Gerba CP, Rubino JR, Scott EA. 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 Sep 1;48(9):1090-9.
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 Jul 1;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. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2002 Dec;23(S12):S3-40. Doi: 10.1086/503164
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 Feb 1;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 Aug 1;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 Jun 1;110(4):541-6.
29. Stewart M, Bogusz A, Hunter J, Devanny I, Yip B, Reid D, Robertson C, Dancer SJ. Evaluating use of neutral electrolyzed water for cleaning near-patient surfaces. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2014 Dec;35(12):1505-10.
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 Mar;159(3):405-12.