The Mutagenic Effect of Antiseptics and Disinfectants onThe Sensitivity of Methicillin SensitiveStaphylococcus aureus(MSSA)

ألتأثيرالتطفيري للمواد المطهرة في حساسية بكتريا المكوراتالعنقودية الذهبية الحساسة للمثسلين (MSSA)

م .م . زهراء عبد الرزاق عبد الأمير الخفاجي
جامعة كربلاء / كلية التربية / قسم علوم الحياة
التخصص الدقيق أحياء مجهرية
zahraazz@ymail.com

الخلاصــة

تضمنت الدراسـة تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimal inhibitory concentration (MIC)و التركيز القاتـل الأدنى Minimal bactericidal concentration (MBC) لعـدد من المـواد المطهـرة المستعملـةفي مستشفيات مدينـة كـربلاء و التحـري عن التأثير التطفيري للتركيز تحت المثبـط لهذه المـواد في تحويل بكتريا المكورات العنقوديـة الذهبية الحساسـة للمضاد الحيـوي المثسلينالـ (MSSA)Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* إلـى بكتريا مقاومـــة لــه Methicillin Resistant*Staphylococcus aureus*(MRSA).

كانت نتائج اختبار التركيز المثبط الأدنى الـ MIC و التركيز القاتل الأدنى الـ MBC لبعض المواد المطهرة المستعملة في المستشفيات مثل (Formalin،Chlorine،Ethyl Iodide،Povidon- Iodine،Ethanol،Chlorhexidingluconate) على التـــوالي(782.63,24.45) ،(731.2، 1462.5)،(625 ، 1250) ، (6250 ، 12500)، (6130، 24520)،(0.15 ، 39.06) مايكروغرام / مليلتر.

إن للتركيز تحت المثبط للمواد المطهرة المستعملة في المستشفيات دوراً في تحويل بكتريا المكورات العنقودية الذهبية الحساسة للمضاد الحيوي المثسلين الـ (MSSA) إلى بكتريا مقاومة له (MRSA) .

ABSTRACT

The minimal inhibitory concentration(MIC) and Minimal bactericidal concentration(MBC) of some antiseptics and disinfectants that used in Karbala hospitals was detected. The mutagenic effect of sub-inhibitory concentration of these chemicals on the conversion of methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* was studied.

The results of The minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC) of some antiseptics and disinfectants that used in hospitals such as (Formalin ،Chlorine،Ethyl-Iodide،Povidon-Iodine ،Ethanol،Chlorhexidingluconate) were, ،782.63) (24.45,(731.25 ،1462.5),(625 ،1250) ,(6250 ،12500),(6130 ،24520),) (0.15، 39.06µg /ml respectively. The sub-inhibitory concentration of antiseptics and disinfectants that used in hospitals had a mutagenic effect on the conversion of MSSA to MRSA.

المقدمــة

تسبب بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثسلين MRSA العديد من الأمراض للإنسان في المستشفيات (1). فمنذ أن أصبحت سلالاتها ذات مقاومة مرتفعه لعدة مـجاميع من المضادات الحيوية أصـبح هنالك تزايد في مـعدل الامـراضية و الوفيات في كل أنحاء العالم ، ذلك يعود لقدرتها على إحداث إصابات انتهازية Opportunistic infections خطرة و قاتلة عند المرضى الراقدين و خصوصاً في وحـدات العنايـة المركـــزة (2). تكمن خطورة هذه الاصابات في صعوبـة إيجاد العلاج المناسب لها (3). و بعد ظهور المقاومة للمضاد الحيوي الـ Methicillin أصبح المضاد الحيوي الـ Vancomycin الدواء الوحيد لعلاج الإصابات الحادة التي تسببها هذه البكتريا إذ يعد الـدواء الذي تم اختياره مـنذ 30 سنـة (4). لكن في سنـة 1997 سـجلـت أول حـالـة مـقاومـة لهذا المـضاد من قبل بكتريا *Staphylococcus aureus* الأمـر الـذي يـنذر بكارثـة صحيـة خـطيـرة (5).

أن خطورة جرثومة الـ MRSA لا تكمن في مقاومتها لكل مضادات الـβ-lactam فحسبل في مقاومتها للعوامل الأخرى المهمة من مضادات الميكروبات مثل العوامل المطهرة و المعقمة Disinfectant and antiseptic agents المستعملة في المستشفيات (6). اذ أن الاستعمال الواسع و العشوائي لمنتجات التعقيم و التطهير الكيميائية ساهم في تطور و ظهور سلالات مقاومة للمطهرات و المعقمات و المضادات الحيوية في العديد من الأنواع البكتيرية و بآليات مقاومة متعددة (8،7). إذ إن للمواد المطهرة أكثر من موقع هدف في الخلية البكتيرية (9). و إن حدوث الطفرات الوراثية في هذه المواقع قد يؤدي إلى ظهور صفة المقاومة في هذه الخلايا (10)،فضلا على أن البلازميدات الحاملة للمحددات الوراثية المسؤولة عن تلك المقاومة لها القابلية على الانتقال بين سلالات النوع الواحد أو الأنواع المختلفة للجنس المذكور (11).

و لكي نوضح علاقة التأثير التطفيريالذي يحدث بسبب المطهرات والذي يؤدي الاكتساب بكتريا *Staphylococcus aureus*الحساسة للمضاد الحيوي المشلين صفة المقاومة لهذا المضاد و بالتالي ازدياد نسب انتشار بكتريا الـ MRSA في المستشفيات أجريت هذه الدراسة لتكون مرحلة من مراحل دراسة أسباب انتشار بكتريا الـ MRSA في مستشفيات العراق على أن تتبعها دراسات أخرىأكثر تفصيلا ،يتضمن البحث الخطوتين التاليتين :

1. تحديد التركيز المثبط الأدنى الـ MIC و التركيز القاتل الأدنى الـ MBC لعدد من المواد المطهرة المستعملة في المستشفيات ضد عزلات بكتريا الـ MRSA.
2. دراسة تأثير التراكيز تحت المثبطة للمواد المطهرة في تحويل بكتريا المكورات العنقودية الذهبية الحساسة للمضاد الحيوي المشلين الـ MSSA إلى بكتريا مقاومة له MRSA .

المواد و طرائق العمل

1. جمع العينات:

تم عزل بكتريا الـ MRSA من مسحات الأنف Nasal swab لبعض المرضى الراقدين في مستشفى الحسين العام في مدينة كربلاء و عزلة واحدة من بكتريا الـ MSSAتم الحصول عليها من الإصابات الجلدية لأحد المرضى المراجعين لاستشارية الأمراض الجلدية في المستشفى نفسها و للفترة ما بين آذار و أيار 2009.

تم استعمال القطيلات القطنية المعقمة Sterile cotton swab (Sterlin,UK)و المرطبة بالمحلول الملحي الفسلجي في اخذ المسحات من المنخرين الاماميين(12). اما المسحة الجلدية اخذت بمسح موقع الاصابة الجلديةثم نقلت المسحات خلال ساعة إلى المختبر وزرعت على وسط اكار المانتول الملحيMannitol Salt Agar (Himedia ,India) و حضنت المستنبتات بظروف هوائية بدرجة حرارة 37 °م و لمدة 24-48 ساعة (13) ، و بعد ظهور النمو أخذت المستعمرات المنفردة و المخمرة للمانتول و التي بدت بلون اصفر ذهبي لغرض التشخيص.

2. التشخيص ألمختبري :

شخصت العينات أوليا بملاحظة الصفات المزرعية للمستعمرات النامية و تم تنقيتها بإعادة زرعها على وسط الاكار المغذي Nutrient Agarثم حضنت بدرجة حرارة 37 °م و لمدة24 ساعة بعد ذلك عمل منها مسحات رقيقة Smears و صبغت بصبغة كرام (15,14)و أجريت الاختبارات الكيموحيوية مثل اختبار أنزيمالكاتاليزCatalase test، اختبار الاوكسيديزOxidase test، اختبار أنزيم مخثر البلازما Coagulase test بنوعيه الحر و المرتبط ، اختبار تحلل الدمBlood hemolysis و اختبار القابلية على إنتاج الأنزيم المحلل للحامض النووي الـ DNADNase test و ذلك حسب ما ذكره كل من (17,16) و تم التأكد من التشخيص باستخدام نظام Api Staph system (Bio-merieux,France) على وفق تعليمات الشركة المجهزة.

3. اختبار حساسية بكتريا المكورات العنقودية الذهبية للمضاد الحيوي المشلين:

أتبعت طريقة (18) في اختبار حساسية عزلاتبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*للمضاد الحيوي المشلين(Bioanlys ,Turkey) أذ تم جمع مجموعة من عزلات البكتريا السابقة من انوف المرضى و من الاصابات الجلديةوأختبرت حساسيتهاباستعمال أقراص المضاد الحيوي المشلين(5µg) Methicillinو استعمال وسط مولر هنتون الصلبMueller Hinton Agarالحاوي على 4 % من كلوريد الصوديوم NaClو سجلت النتائج بقياس اقطار مناطق التثبيط حول كل قرص بوحدة المليمتر و قورنت مع المعدلات القياسية لأقطار مناطق التثبيطللضاد الحيوي المشلين و ذلك حسب ما ورد في (19).و تم أختيار عزلتين فقط أحدهما MRSA و الاخرى MSSA لغرض تحديد MIC و MBC و دراسة التأثير التطفيري للمواد المطهرة على البكتريا الحساسة .

4. تحديد التركيز المثبط الأدنى الـ MIC و التركيز القاتل الأدنى الـ MBC للمواد المطهرة و المعقمة

اتبعت تقنية التخفيف بالوسط السائل Broth Dilution Technique في تحضير سلسلة من التخافيف النصفية للمواد المعقمة و المطهرة(الفورمالينFormalin ، الكلور السائل Chlorine ، اليود الكحولي Ethyl-iodide ، اليود Povidon-iodine ، الكحول الاثيليEthanol ، الهكساتانHexatan) باستعمالوسطالمرقالمغذيNutrient brothلغرض تحديد الـ MIC و الـ MBC،إذحدد التركيز المثبط الأدنى الـ MIC بملاحظة عكورة النمو البكتيري في الأنابيب بالعين المجردة ، إذ يمثل الـ MIC اقل تركيز من المادة المعقمة أو المطهرة الذي يمنع نمو البكتريا . اما التركيز القاتل الأدنى MBC فحدد بإعادة زرع الأنابيب التي لم تظهر النمو البكتيري ابتداء من أنبوبة الـ MIC و ذلك بأخذ نقلة من كل أنبوب باستعمال Loop معقم و زرعها

على وسط Nutrient agar الخالي من المواد المعقمة و المطهرة ، حضنت الأطباق بدرجة 37ºم لمدة 48 ساعة و بعد عملية الحضن فأن اقل تركيز من المادة المعقمة أو المطهرة الذي يؤدي إلى قتل البكتريا يمثل التركيز القاتل الأدنى الـ MBC(عدم وجود نمو على سطح الوسط)(20).

المواد المطهرة و المعقمة	MIC (µg / ml)	MBC (µg / ml)
الفورمالين Formalin *(37%)	24.45	782.63
الكلور السائل Chlorine *(6%)	731.25	1462.5
اليود الكحولي Ethyl-iodide *(2%)	625	1250
اليود Povidon-iodine *(10%)	6250	12500
الكحول الاثيلي Ethanol *(99.7%)	6130	24520
الهكساتان Hexatan *(4%)	0.15	39.06

جدول [1] قيمة التركيز المثبط الادنى الـ MIC و التركيز القاتل الادنى الـ MBC للمواد المطهرة ضد بكتريا الـ MRSA
*** التركيز الأصلي لعبوة المادة المطهرة.**

5. اختبار التطبيق المكرر Replicate Platting Technique

استعملت تقنية التطبيق المكرر لغرض الكشف عن البكتريا الطافرة المقاومة للمضاد الحيوي المثسلين و استعمل مسحوق المضاد الحيوي الـ Cloxacillin بدلاً من الـ Methicillin لعدم توفره(21) و بعد أن حدد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمواد المطهرة ضد بكتريا المكورات العنقودية الحساسة للمضاد الحيوي المثسلين (MSSA) اختيرت الأنبوبة الأولى التي تسبق أنبوبة الـ MIC و الحاوية على أقل تخفيف من المادة المطهرة الغير مؤثرعلى النمو البكتيري (التركيز تحت المثبط) و اتبعت طريقة (22)و تم حضن الأطباق بدرجة 37ºم لمدة 24 ساعة و بعد انتهاء مدة الحضن تم حساب أعداد المستعمرات المتواجدة على الأطباق الخالية و المحتوية على المضاد و حسبت النسبة المئوية للمستعمرات الطافرة المقاومة للمضاد الحيوي المثسلين .

تم عزل مستعمرة من المستعمرات النامية على الاطباق الحاوية على المضاد و للمكررات الثلاث و تكثيرها لغرض التأكد من مقاومتها للمضاد الحيوي المثسلين بالطريقة المذكورة في الفقرة (3).

6. التحليلالإحصائي Statistical Analysis

تم حساب الانحراف القياسي Standrard deviationللمكررات الثلاث للمستعمرات النامية على الوسط بوجود و عدم وجود المضاد الحيوي الـ Cloxacillinلأختبار التطبيق المكرر Replica Platting Technique (23).

النتائج و المناقشة

تحديد التركيز المثبط الأدنى الـ MIC و التركيز القاتل الأدنى الـ MBC للمواد المطهرة

حدد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للعزلة البكتيرية الحساسة للمضاد الحيوي المثسلين(MSSA) التي تم الحصول عليها من الإصابات الجلدية لأحد المرضى المراجعين لاستشارية الأمراض الجلدية في مستشفى الحسين العالم لغرض الكشف عن البكتريا الطافرة المقاومة للمضاد الحيوي المثسلين(MRSA) الناتجة عن التأثير التطفيري للتراكيز تحت المثبطة للمواد المطهرة على

بكتريا المكورات العنقودية الذهبية الحساسة للمضاد الحيوي المشلينMSSA() كما مبين في الجدول [2]في حين تم تحديد الـ MIC و الـ MBC للعزلة البكتيرية المقاومة للمضاد الحيوي المشلين(MRSA) التي تم الحصول عليها من مسحات الأنف(Nasal Swab) لأحد المرضى الراقدين في نفس المستشفى.

أوضحت النتائج المبينة في الجدول [1] أن قيمة الـ MIC و MBCلمطهرالفورمالينكانت (24.4µg/ml، 782.6µg/ml) اما قيمة الـ MIC لمطهر الـ Chlorine كانت (731.25 µg/ml) و هذه النتيجة تعد أعلى مما توصل إليه (24) (512µg/ml)، في حين كانت قيمة الـ MBC (1462.5 µg/ml)، أما بالنسبة لمطهر اليود الكحولي فقد كانت قيمة الـ MIC و الـ MBC على التوالي (625 µg/ml ، 1250 µg/ml)، و لمطهر اليود Povidone-iodine (6250 µg/ml ، 12500 µg/ml) و هذه النتيجة تعد أعلى بكثير مما توصل إليه (25) (0.077 µg/ml ، 7.7 µg/ml) و (24) إذ بين إن قيمة الـ MIC لمطهر اليود Povidone-iodine كانت (128 µg/ml) ، و من جهة أخرى كانت قيمة الـ MIC للكحول الاثيلي (6130µg/ml) و هذه النتيجة تعد أعلى بكثير مما توصل إليه (25) (700 µg/ml) و (26) (600 µg/ml) في حين أظهرت النتائج إن قيمة الـ MBC كانت (24520µg/ml) و هذه النتيجة تعد أعلى بكثير مما توصل إليه (25) (7000 µg/ml). إن المقاومة المتنامية اتجاه مطهر الكلور و اليود و الكحول الاثيلي ربما تعود إلىكثرةاستعمالها في المستشفيات (27)إذ إن الاستعمال الواسع لمنتجات التطهير يساهم في تطور مقاومة البكتريا لهذه المواد (28)و يقصد بتنامي المقاومة إلى الزيادة التدريجية و بمرور الوقت لقيمة التركيز المثبط الأدنى(MIC) للأحياء المجهرية تجاه مبيدات الجراثيم (29).

من جانب آخر كانت بكتريا الـ MRSA اكثر مقاومة لمطهر الكحول الاثيليمقارنة مع مطهر اليود الكحولي إذ بينت النتائج ارتفاع قيمة الـ MIC و الـ MBC لمطهر الكحول الاثيلي إذ تضاعفت قيمة الـ MICله بمقدار 10 مرات و الـ MBC بمقدار 20 مرة مقارنة مع مطهر اليود الكحولي ، مما قد يدل على أن مطهر اليود الكحولي كان اكفأ من الكحول الاثيلي ضد هذه البكتريا، إذ إن ارتفاع قيمة الـ MIC و الـ MBC لمطهر الكحول الاثيلي يشار لهبالزيادة في مقاومة البكتريا لهذه المادة (29) و قد يعود ازدياد حساسية البكتريا لليود الكحولي إلىقلة استعماله في المستشفيات.

أما بالنسبة لمطهر الهكساتانChlorhexidingluconate (Hexatan)كانت قيمة الـ MIC و MBCله (0.15 µg/ml ، 39.06 µg/ml) و هذه النتيجة كانت مقاربة لما توصل إليه (25) (0.4 µg/ml ، 40 µg/ml) بينما كانت قيمة الـ MIC اقل مما توصل إليه (30) (4 µg/ml – 8 µg/ml) و (24) (32 µg/ml). إن انخفاض قيمة التركيز المثبط و القاتل الأدنى قد يدل على حساسية البكتريا لهذه المادة.

يظهر من خلال هذه النتائج إن الضغط الانتخابي الناجم من التعرض المستمر للتراكيز غير القاتلة للمواد المطهرة بسبب التخفيف العشوائي ربما أدى إلى استحداث البكتريا لآليات تمكنها من تحمل أو مقاومة هذه المطهرات أذ وجدت الدراسة ارتفاع في قيمة الـ MIC و الـ MBCللمواد المطهرة المستعملة في هذه الدراسة بالمقارنة مع الدراسات الأخرىإذ إن ارتفاع هذهالقيميشار لها بالزيادة في مقاومة البكتريا لهذه المواد (29). إذ إن لبعض المطهرات مواقع هدف محددة في الخلايا البكتيرية و إن حدوث الطفرات في هذه المواقع يؤدي إلى اكتساب البكتريا المقاومة لهذه المواد.

التأثير التطفيري للمواد المطهرة The Mutagenic Effect of Antiseptic and Disinfectant

تم التحري عن دور التركيز تحت المثبط لبعض المواد المطهرة المستعملة في المستشفيات في تحويل بكتريا المكورات العنقودية الذهبية الحساسة للمضاد الحيوي المشلين(MSSA) إلى بكتريا مقاومة له (MRSA) إذ أظهرت العزلة الحساسة للمشلين و التي سبق و أن عرضت للتركيز تحت المثبط للمواد المطهرة نمواً على الوسط الحاوي على المضاد الحيوي Cloxacillin الذي استخدم بدلاً من المضاد الحيوي الـ Methicillin و بعد إجراء فحص الحساسية للمضاد الحيوي المشلين لمستعمرة مفردة عزلت من المستعمرات النامية على الوسط الحاوي على المضاد الحيوي الـ Cloxacillin و للمكررات الثلاث وجد بأنها كانت مقاومة للمضاد الحيوي المشلين.

اظهرت النتائج المبينة في الجدول [2] نسبة مستعمرات الـ MRSA الناتجة من تعريض البكتريا الحساسة للمشلين للتركيز تحت المثبط لمطهر الفورمالين (12.22) مايكروغرام / مللتر إذ كانت (68%) ذلك ربما يدل على أن للتركيز تحت المثبط لمطهر الفورمالين دوراً في تحويل البكتريا الحساسة للمضاد الحيوي المشلين الـ MSSA إلى بكتريا مقاومة له MRSA، ففي دراسة قام بها (31) بينت إن تعريض بكتريا الـ *E. coli* إلى 4mM من مطهر الفورمالديهايد لمدة ساعة أدت إلى حدوث طفرات نقطية Point mutations بنسبة 41% و طفرات إضافة Insertion mutations بنسبة 41% فضلاً على طفرات الحذف Deletion mutations بنسبة 18% و إن زيادة التركيز إلى 40mM أدى إلى إحداث طفرات نقطية بنسبة 92% و طفراتاستبدال بنسبة 62%.

أما بالنسبة للتراكيز تحت المثبطة للمواد المطهرة (Chlorine ، Ethyl - iodide ، Povidon-iodin ، Ethanol ، Hexatan) و التي كانت على التوالي (365.6 ، 312.5 ، 3125 ، 12260 ، 4.88) مايكروغرام / مللتر كانت نسبة مستعمرات الـ MRSA (68% ، 72% ، 81% ، 57% ، 82%) على التوالي.

إن نمو بكتريا الـ MSSA على الوسط الحاوي على المضاد ربما يدل على اكتسابها المقاومة للمضاد الحيوي المشلين بتأثير التركيز تحت المثبط للمواد المطهرة عن طريق حدوث طفرات في الجينات الكروموسومية التي تشفر لتخليق البروتينات المرتبطة بالبنسلين ذات الألفة الواطئة للارتباط بالمضاد ، مما قد يدل على أن للتراكيز تحت المثبطة للمواد المطهرة المستعملة في المستشفيات دوراً في الحث على المقاومة لمضاد المشلين . و في دراسة قامت بها (32) بينت ان تعريض بكتريا المكورات العنقودية الذهبية الحساسة لمضاد المشلين(MSSA) *Staphylococcus aureus* Methicillin-resistant الى التخفيف

10^{2-}لمطهر اليود (المستعمل في المستشفيات بتركيز اصلي قدره 20%) ادى الى تحول العزلة الحساسة للمثسلين الى متوسطة الحساسية له و اصبحت مقاومة لكل من المضاد الحيوي Oxacillin و Vancomycin في حين لم يؤثر مطهر برمنكنات البوتاسيوم بتركيز 1% في اكسابها صفة المقاومة . وفي دراسة أخرى قام بها (33) بينت دور التراكيز تحت المثبطة للمادة المطهرة الـ Triclosan في إحداث الطفرات في بكتريا الـ *Salmonella entreica* تؤدي إلى ارتفاع المقاومةللمضادات الحيوية (Ampicillin ، Ciprofloxacin ، Tetracyclin). و وجد أن التراكيز المنخفضة من زيت الصنوبر Pine oil المستعمل كمادة مطهرة في مستشفيات اليابان يؤدي إلى انتقاء بكتريا الـ *E. coli* الطافرة (34). و في دراسة أخرى وجد أن تعريض بكتريا الـ MRSA إلى تراكيز منخفضة من المطهر OctenidineDihydrochlorideلم يؤثر على المقاومة (35).

جدول[2]تعريض البكتريا الحساسة للمثسلين الـ MSSA إلى التركيز تحت المثبط لبعض المواد المطهرة المستعملة في المستشفيات

المواد المطهرة	التركيز المثبط الأدنى MIC (µg /ml)	التركيز تحت المثبط (µg /ml)	معدل عدد المستعمرات بعدم وجود المضاد ± الانحراف القياسي	معدل عدد المستعمرات بوجود المضاد ± الانحراف القياسي	نسبة المستعمرات المقاومة للمثسلين (%)
الفورمالين Formalin	24.45	12.22	95±420	84±289	68%
الكلور السائل Chlorine	731.25	365.6	183±768	145±523	68%
اليود الكحولي Ethyl Iodid	625	312.5	159±1211	181±884	72%
اليود PovidonIodin	6250	3125	50±286	25±233	81%
الكحول الاثيلي Ethanol	24520	12260	130±1250	92±717	57%
الهكساتان Hexatan	9.76	4.88	5±126	4±104	82%

المصادر

(1) Vinodhkumaradithyaa,A. ;Uma,A. ;Shirivasan,M. ;Ananthalakshmi,I. ; Nallasivam,P. and Thirumalaikolundusubramanian,P. (2009). Nasal carriage of Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* among surgical unit staff .J. Jpn. Infect. Dis. ,*62*(3) :228-229.

(2) Shanmugam,J. ;Gopal,R. and Kumar,S.S. (2008). The Prevalence,antibiogram and Characteristion of *Staphylococcus aureus*incloding MRSA among the healthy staff , Medical students and patients from Sir ManakulaVinagagarMedicall College and Hospital (SMVMCH) ,Kalitheerthalkuppam ,Madagadipet, Puducherry. pp: 1-26.

(3) Klein,E. ;Smith,D.L. and Laxminarayam,R. (2007). Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,United States,1999-2005. J. Emerg. Infect. Dis. ,*13*(12):1840-1846.

(4) Bhateja,P. ;Pumapatre,K. ;Dube,S. ;Fatma,T. and Rattan,A. (2006). Charactterisation of laboratory - generated vancomycinintermediate resistant*Staphylococcus aureus* strains. Int. J. Antimicrob. Agents.,*27*(3): 201-211.

(5) Manfredi,R. (2007). Therapeutic perspectives of linezolid in themanagement of infections due to multiresistant Gram-positive pathogens . Recenti. Prog. Med. J. ,*98* (3): 143-154.

(6) Garner,J.S. (1996). Guideline for isolation precautions in hospitals. The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. J. Infect. Control. Hosp. Epidemiol.,*17*(1): 53-80.
(7) Russell,A.D. ;Mallard,J. and Furr,J.R. (1998). Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. Antimicrob. Agents Chemother.,*42*(8): 2151.
(8) Vaudaux,P.E. ;Lew,D.P. and Wald vogel,F.A. (1994). Infections associated with indwelling medical devices.2nd ed., ASM. Washington.
(9) Heath,R.J. ;Yu,Y. ;Shapiro,M.A. ;Olson,E. and Rock,C. (1998). Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis. J. Biol. Chem., *273*(13): 30316 – 30320.
(10) Maillard,J.Y. (2002).Bacterial target sites for biocide action. J. Apple. Microbiol.,92:16 – 27.
(11) Mazel,D. and Davies,J.(1999).Antibiotic resistance in microbes. J.Cell.Mol.Life.,*56*:742-754.
(12) Askarian,M . ;Zeinalzadeh,A. ;Japoni,A. ;Alborzi,A. and Memish,Z.A. (2009) . Prevalence of nasal carriage of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*and it`s antibiotic susceptibility pattern in health care warker at Namazihospital ,Shiraz ,Iran. J.Int.Infect. Dis.,*13*(5):241-247 .
(13) El–Sayed,S.B. ;Nasr,R.A. and Shaheen,M.A. (2005). Risk of colonization of methicillinresistante*Staphylococcus aureus* (MRSA) and vaconymycin-resistant Enterococci (VRE) in patients admitted to pediatric intensive care unit of Ain Shams University hospital . J. Egypt . Med. Lab. Sci. ,*14*(2).
(14) Looney,W.J. (2000). Small-colony variants of *Staphylococcus aureus* . Br. J. Biomed. Sci. ,*57*:317-322 .
(15) Johnson,A.G. ;Ziegler ,R.J. ;Lukasewycz,O.A. and Hawley,L.B. (2002). Board Review Series Microbiology and immunology. 4th ed., Lippincott Williams and Wikins,awalters Kluwer Com.,USA. pp: 88.
(16) Holt,J.G. ;Krieg,N.R. ;Sneath,P.H. ;Staley,J.T. and William,S.T. (1994). Broad of trustees of Berg's manual of determinative bacteriology .9th ed. ,Williams and Wilkins publication .Baltimor .pp:42-43.
(17) MacFaddin ,J.F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medial Bacteria. 3rd ed., Lippincott Williams and Wikins,awalters Kluwer Com., London. pp:484-485, 58,106-110.
(18) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).(2005).Performance standard for antimicrobial susceptibility testing .CLSI approved standard M100-S15 .,Wayne ,PA,USA .
(19) Benson,H. (2001). Microbiology applications laboratory manual in general microbiology .8 th ed. ,The McGraw Hill com. ,USA . pp:432 .
(20) Morello,J.A. ;Mizer,R.N. and Granato,P.A. (2006) . Laboratory manual and work book in microbiology : Applications to patients care . 8th ed. ,McGraw Hill com. ,New York . pp :98-99 .
(21) Mir,N. ;Sanchez,M. ;Baquero,F. ;Lopez,B. ;Calderon,C. and Canton,R. (1998). Soft-MannitolAgar-CloxacillinTest : a highly specific badside screening test for detection with methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., 36(4): 986 – 989.
(22) Aneja,K.R. (2005) .Experiments in microbiology ,plant pathology and biotechnology. New Age International Publishers . New Delhi .PP:417 .
(23) الأمام ، محمد محمد الطاهر. (2007). تصميم و تحليل التجارب. الطبعة الاولى. دار المريخ للنشر. جامعة الملك سعود. المملكة العربية السعودية. ص: 37.
(24) جاسم ، نهاد كاظم. (2006). دراسة بكتريولوجية و وراثية للعنقوديات السالبة للأنزيم المختر لبلازما الدم. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بابل.
(25) صالح ، رشا هادي .(2007). دراسة عن فعالية المطهرات و التلوث البكتيري في مستشفى الحلة التعليمي رسالة ماجستير . كلية الطب .جامعة بابل.
(26) Gilbert,P. and McBain,A.J. (2003). Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin. Microbiol. Rev., *16*(2): 189 – 208.
(27) Selvaggi,G. ;Monstery,S. ;Van Landuyt,K. ;Hamdi,M. and Blondell,P. (2003). The role of iodine in antisepsis and wound management : a reappraisal. Acta. Chir. Belg.,103(3): 241-247.

(28) Rutala,W.A. (1995). APTC guidellines for Selection and use of disinfectants. Am. J. Infect. Control., 24(4): 313 – 342.

(29) Haddadin,A.S. ;Fappiano,S.A. and Lipsett,P.A. (2002) . Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the in the intensive care unit .Postgrad . Med. J., 78 : 385-392.

(30) Cookson,B.D. ;Bolton,M.C. and Platt,J.H. (1991). Chlorhexidin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or just an elevated MIC ? An in vitro and in vivo assessment. J. Antimicrob. Agents Chemother., 35: 1997 – 2003.

(31) Crosby,R.M. ;Richardson,K.K. ;Craft,T.R. ;Benforado,K.B. ;Liber,H.L. and Skopek,T.R. (1988). Molecular analysis of formaldehyde-induced mutations in human lymphoblasts and E. coli . J. Environmental Mutagenesis., 12: 155 – 166.

(32) السعدي، كوكب عبد الله. (201). تأثير الضغط الانتخابي للمطهرات على نمط مقاومة بكتريا العنقوديات الذهبية للمضادات الحيوية. مجلة جامعة كربلاء العلمية.( ): – .

(33) Rondall,L.P. ;Cooles,S.W. ;Piddock,L.J. and Woodward,M.J. (2004). Effect of triclosan or phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic- rsistant Salmonella enterica. J. Antimicrob. Chemother., 54: 621 – 627.

(34) Moken,M.C. ;McMurry,L.M. and Levy,S.B. (1997). Selection of multiple-antibiotic-resistant(Mar) Mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pineoil : roles of the mar and acrAB loci. J. Antimicrob. Agents Chemother., 41(12): 2770 – 2772.

(35) Al-Doori,Z. ;Goroncy-Bermes,P. ;Gemmell,C.G. and Morrison,D. (2007). Low-level exposure of MRSA to octenidinedihydrochloride does not select for resistance. J. Antimicrobial Chemother.,pp: 1 – 2.