مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به روغن کاج (pine oil) با استفاده از تست آنتی بیوگرام و مشاهده باند ژن های sigB وmecA در PCR

جمیله نوروزی[1]، کامیار متواضع[2]، طیبه اعلارحیمی[3*]

1. استاد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
2. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
3. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

*** نشانی برای مکاتبه:** تهران، چهار راه کامرانیه، بلوار شهید اندرزگو، خیابان سلیمی شمالی، کوی اشکستانپور شمالی، پلاک 32، واحد 4،
تلفن 09371662118- 22678621، tayebealarahimi@yahoo.com

دریافت مقاله: آبان نود و یک پذیرش برای چاپ: دی نود و یک

چکیده

سابقه و هدف: *مصرف روز افزون آنتی بیوتیک ها و مواد بیوسایدی و استفاده از ترکیبات گوناگون از جمله روغن کاج در مواد بیوسایدی منجر به پیدایش سویه های استافیلوکوکسی مقاوم به روغن کاج (Pine oil) شده است. هدف از این مطالعه تعیین مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به روغن کاج (Pine oil) و اثبات آن به وسیله تست آنتی بیوگرام و مشاهده باند ژن های sigB و mecA در PCR بود.*

روش کار: *صد نمونه استافیلوکوکوس اورئوس از منابع کلینیکی جمع آوری شد. حساسیت و مقاومت آنها به ماده بیوسایدی روغن کاج (Pine oil) و دو آنتی بیوتیک موثر بر روی دیواره مانند اگزاسیلین و ونکومایسین به روش فنوتیپی بررسی شد. برای اثبات نتایج فنوتیپی بدست آمده، حضور ژنهای مقاومت mecA و sigB از طریق PCR سنجیده شد.*

یافته ها: *از میان 100 نمونه جمع آوری شده، 90٪ به آنتی بیوتیک اگزاسیلین و60٪ به ماده بیوسایدی روغن کاج (Pine oil) مقاوم بودند و کلیه نمونه ها به آنتی بیوتیک ونکومایسین حساس بودند. 80%از استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به Pine oil، به اگزاسیلین نیز مقاوم بودند.*

نتیجه گیری: *ژن mecA القاکننده مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های موثر بر روی دیواره مانند اگزاسیلین و مواد بیوسایدی نظیر Pine oil می باشد. رابطه بین مقاومت آنتی بیوتیکی و مصرف مواد بیوسایدی که از طریق حضور این ژن اثبات شد نشانه اهمیت توجه به مصرف آنتی بیوتیک ها و مواد بیوسایدی در مراکز درمانی و خانگی می باشد.*

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، ژن mecA و ژن sigB، روغن کاج (Pine oil).*

مقدمه

مقاومت آنتی بیوتیکی در میان باکتری ها به خصوص استافیلوکوکوس اورئوس های از اهمیت قابل توجهی برخوردار می‌باشد. مقاومت بالای آنتی بیوتیکی در این باکتری ها و بسیاری از باکتری های دیگر در اکثر موارد منجر به شکست درمان شده و در برخی بیماران به خصوص بیماران بستری در بیمارستان، دارای عواقب خطرناکی می‌باشد. در چند دهه اخیر استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین و اگزاسیلین و به تازگی نیز استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به مقدار متوسط ونکومایسین از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی محسوب می‌شوند(4-1). استفاده از آنتی بیوتیک ها و بیوساید ها به منظور کنترل و پیش گیری از عفونت ها موجب کاهش قابل ملاحظه ابتلا به بیماری ها و مرگ و میر ناشی از عفونت ها شده است.

روغن کاج (Pine oil) نوعی ضدعفونی کننده فنولی است که به عنوان خوش بو کننده و هم چنین عاملی ضد عفونی کننده در ترکیب شوینده ها به کار می‌رود(8-5). این روغن بر روی بسیاری از قارچ ها مانند کاندیدا آلبیکنز (candida albicans) و بر روی بسیاری از ویروس ها مانند هرپس سیمپلکس تایپ 2 و ویروس آنفلوانزا و بر روی برخی از باکتری ها مانند استافیلوکوکوس اورئوس، سراشیا، سالمونلا، شیگلا، استرپتوکوکوس پایوژنز اثر کشندگی دارد. هم چنین گزارش هایی مبنی براستفاده از روغن کاج در اسپری های پاک کننده و تمیز کننده، بخارشو های خانگی، شوینده های سرامیک ها و موزاییک ها ، کف پوش های طبقات و سطل های زباله و در تمیز و ضد عفونی کردن موسسات و دفاتر و آشپزخانه ها و بیمارستان ها و مراکز درمانی وجود دارد(12-9).

در این بین، مساله پیدایش مقاومت متقاطع و متقابل بین ضدعفونی کننده ها و آنتی بیوتیک ها که به طور وسیعی درحال مصرف هستند خود نمایی می‌کند، طبق گزارش ها، کاهش حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک های موثر بر روی دیواره سلولی مانند ونکومایسین و اگزاسیلین با مصرف ضدعفونی کننده های حاوی روغن کاج گزارش شده است(16-13). برخی از مکانیزم های مقاومت برای آنتی بیوتیک ها و مواد بیوسایدی مشترک هستند. بنابراین احتمال دارد که شوینده های حاوی روغن کاج باعث ایجاد جهش و در نهایت مقاومت باکتری ها از جمله استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک ها شود(17). این مساله از نظر اقتصادی حائز اهمیت است چرا که اخیرا در ایالات متحده هزینه عفونت های ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به چندین آنتی بیوتیک، بین 24 تا 36 میلیون دلار تخمین زده شده است (18).

درحال حاضر دو ژن sigB و mecA عامل مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به روغن کاج و در نهایت به آنتی بیوتیک های ونکومایسین و اگزاسیلین گزارش شده است(2، 3، 19، 20). چندین ژن ایجاد کننده مقاومت به مواد بیوسایدی در استافیلوکوک ها شناسایی شده است. این ژن ها کد کننده پمپ های دفعی وابسته به نیروی محرکه پروتونی هستند(21). وجود سلول های فعال در محصولات بیوسایدی ممکن است در افزایش بروز باکتری های مقاوم به مواد آنتی بیوتیکی دخیل باشد. از آنجایی که عفونت های استافیلوکوکی از انواع رایج عفونت ها به خصوص عفونت های بیمارستانی هستند و با توجه به مقاومت چند دارویی این باکتری ها از جمله مقاومت به متی سیلین که تا چندی پیش داروی انتخابی برای درمان عفونت های استافیلوکوکی بود و هم چنین ظهور استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به مقدار متوسط ونکومایسین، امروزه عفونت های استافیلوکوکی، مشکل عمده ای در امر درمان بیماران می باشد(22، 23). از آنجایی که مکانیزم های مقاومت در آنتی بیوتیک ها و بیوساید ها مشابه گزارش شده است، بنابراین بررسی مکانیزم های مقاومت، امر مهمی در روند بهبود درمان و پیشگیری می‌باشد. از این رو جهت درک بهتر این مطلب، پژوهش حاضر با هدف اصلی یافتن ژن های sigB، mecA (ژن های ایجاد کننده مقاومت به مواد بیوسایدی) در جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس ها صورت گرفت.

روش کار

در این بررسی، 100 استافیلوکوکوس اورئوس ، که با رنگ‌آمیزی گرم، کشت بر روی محیط مانیتول سالت اگار، مشاهده مثبت بودن تست کاتالاز و کوآگولاز مورد تایید قرار گرفت، از نمونه های کلینیکی زخم، خلط و ادرار بیماران مبتلا به سوختگی بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری و بیماران بستری در بیمارستان شهدای تجریش تهران با استفاده از سوآب استریل جمع‌آوری شد.

برای بررسی میزان حساسیت به ماده بیوسایدی به روش ماکرودیلوشن براث و میکرودیلوشن براث در هر دو روش، رقت های پی‌درپی دو برابر از ماده بیوسایدی در محیط کشت مولر هینتون براث با غلظت نهایی 4٪ از ماده بیوسایدی تهیه شد. سنجش حساسیت سویه های مورد آزمایش به روش میکرودیلوشن براث در حضور ماده 2و3و5 ـ تری فینل تترازولیوم کلراید انجام شد. MIC و MBC ماده بیوسایدی، برروی استافیلوکوکوس اورئوس های مورد مطالعه تعیین گردید.

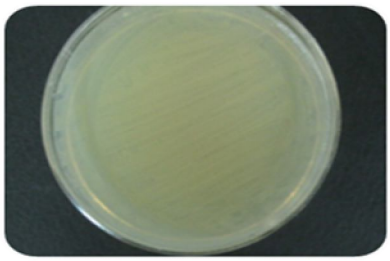
جهت تعیین MIC و MBC آنتی بیوتیک ها، سری 13 تایی از لوله‌های حاوی 1 میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث استریل تهیه گردید. رقت های پی‌درپی دو برابر از آنتی بیوتیک مورد نظر با غلظت نهایی محاسبه شده در لوله ها فراهم شد و به لوله های شماره 1 تا 11، 0/1 میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی برای 0/5 مک فارلند اضافه شد. لوله های 12 و 13 به ترتیب به عنوان لوله های کنترل عدم رشد و کنترل رشد تعیین شد. لوله ها به مدت 24-18 ساعت در دمای 37-35 درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جهت استخراج ژنوم باکتریایی از کیت MBST DNA Extraction استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر (18 میکرولیتر آب، 2/5 میکرولیتر بافر PCR، 1 میکرولیتر dNTP، 1 میکرولیتر پرایمر Forward، 1 میکرولیتر پرایمر Reverse، 1 میکرولیتر از DNA ژنوم و در انتها 0/5 میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase) انجام شد (جدول1). واکنش دناتوراسیون اولیه DNA به مدت ''300 (برای هر دو) در دمای 95^{oC} (mecA) و 94^{oC} (sigB) ، دناتوراسیون ثانویه به مدت ''45 (برای هر دو) با قراردادن در دمای 95^{oC} (mecA) و 94^{oC} (sigB)، الحاق پرایمرها به DNA هدف در دماهای 67^{oC} (mecA) و 55^{oC} (sigB) به مدت ''45 (برای هر دو) و توسعه پرایمرها در دمای 72^{oC} (برای هر دو) به مدت ''45 (mecA) و ''60 در 30 چرخه تکرار و سرانجام ''300 (برای هر دو) واکنش در 72^{oC} (برای هر دو) صورت گرفت.

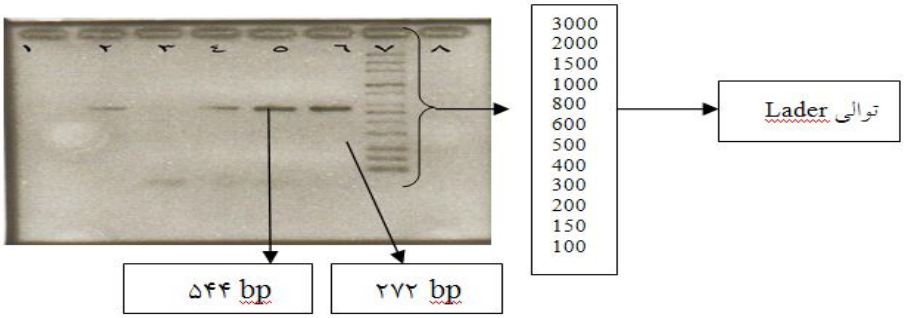
یافته ها

از میان 100 باکتری ایزوله شده، 90٪ به اگزاسیلین و60٪ به ماده بیوسایدی روغن کاج (Pine oil) مقاوم بودند و کلیه باکتری ها به ونکومایسین حساس بودند. 80% از استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به Pine oil، به اگزاسیلین نیز مقاوم بودند. MIC سویه های مقاوم به ماده بیوسایدی حاوی روغن کاج 3/9 -1/95 میکروگرم در میلی لیتر و در خصوص سویه های حساس 1-0/5 میکروگرم در میلی لیتر بود.

همه نمونه های مقاوم فوق دارای MBC کمتر از 0/06 W/V٪ (یعنی کمتر از رقت توصیه شده توسط کمپانی تولیدکننده) بودند. در حضور روغن کاج 4% (غلظت مصرفی بیان شده توسط کمپانی تولید کننده)، 60% از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس رشد کردند و 40% در غلظت های پایین تر قادر به رشد بودند(شکل1). فراوانی ژن mecA در نمونه های بررسی 90% درصد بود و کلیه نمونه ها فاقد ژن sigB بودند(شکل2 و جدول 2).



شکل1. رشد در حضور ماده بیو سایدی حل شده در محیط کشت



شکل2. حضورباند ژن mecA در وزن (544 bp) در ستون های 2 و 4 و 5 و 6 و عدم حضور باند ژن sigB در وزن (272 bp) در ستون های 1 و 3 و 8 بر روی ژل الکتروفورز

جدول1. توالی پرایمر های استفاده شده

نام پرایمر	توالی پرایمر(5'⟵3')
mecA F	GTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGC
mecA R	GTCAACGATTGTGACACGATAGC
sigB F	CCTTTGAACGGAAGTTTCAAGC
sigB R	TGACACACCATCATTTCTA

جدول2. توزیع استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس نتیجه آنتی بیوگرام و PCR

ماده ضد میکروبی مصرفی	روش دیسک گذاری	باکتری های واجد ژن mecA یا SigB		باکتری های فاقد ژن mec A یا Sig B	
	هاله ممانعت از رشد بر حسب mm	تعداد باکتری	درصد باکتری	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Pine oil (mecA)	(R)0-5	60	60	48	80	12	20
	(I) 5-15	30	20	28	93/3	2	6/7
	(S) >15	10	10	5	50	5	50
اگزاسیلین (mecA)	(R)≤10	90	90	90	100	0	0
	(I)11-12	8	8	5	62/5	3	37/5
	(s)≥13	2	2	0	0	2	100
ونکومایسین (SigB)	(R) 0-5	0	0	0	0	0	0
	(I)5-14	0	0	0	0	0	0
	(S)≥15	100	100	0	0	100	100

S= حساس، R= مقاوم، I= مقاومت نسبی

بحث

امروزه به دلیل استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها، مقاومت آنتی بیوتیکی در حال افزایش است. آنچه که باعث تمایز مطالعه حاضر از مطالعات سایر محققان شده است، بررسی حضور ژن های مقاومت نسبت به ماده بیوسایدی روغن کاج (Pine oil) در جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس ها و بدنبال آن بررسی ارتباط سویه های مقاوم به روغن کاج با آنتی بیوتیک های اگزاسیلین و ونکومایسین بوده است. در مطالعه اخیر، کیفیت اثر بیوساید حاوی روغن کاج بر علیه 100 استافیلوکوکوس اورئوس سنجیده شد. سویه هایی از استافیلوکوکوس اورئوس که دارای MIC در محدوده 1/95-3/9 میکروگرم در میلی لیتر بودند، به عنوان سویه های مقاوم با حساسیت کاهش یافته به ماده بیوسایدی و با MIC 0/5-1 میکروگرم در میلی لیتر نیز حساس به روغن کاج گزارش شدند. در سال2002، Price و هم کاران، تحقیق مشابهی را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس های ایزوله شده از منابع کلینیکی انجام دادند و حساسیت آن ها را نسبت به روغن کاج سنجیدند و سویه هایی با MIC بین 1/95-3/9 میکروگرم در میلی لیتر(48%) را مقاوم به روغن کاج گزارش کردند(1). هم چنین Noguchi و هم کاران در سال 1999، 13% استافیلوکوک های ایزوله شده از منابع کلینیکی با محدوده MIC بین 1-3 میکروگرم در میلی لیتر را مقاوم به روغن کاج گزارش کردند (24). نتایج حاصل از مطالعات Noguchi و Price تاحدودی با نتایج به دست آمده از این بررسی هم خوانی دارد.

در مطالعه حاضر، MBC سویه های مقاوم کمتر از 0/06% (W/V) بود. Rutala و هم کاران در سال 2000 ، MBC 94 سویه از استافیلوکوکوس اورئوس ها را نسبت به ماده بیوسایدی روغن کاج سنجیدند. بر طبق آزمایشات آنها مشخص شد که تمامی نمونه های مورد مطالعه آنها، MBC کمتر از 0/05% (W/V) نسبت به ماده بیوسایدی داشتند. نتایج به دست آمده از مطالعات Rutala با نتایج به دست آمده از این بررسی تا حدودی هم خوانی دارد(6). تمامی نمونه های مورد مطالعه در این بررسی دارای MBC کمتر از غلظت مصرفی توصیه شده توسط تولید کننده بودند. این بدین معناست که چنان چه این بیوساید مطابق با دستورالعمل تولید کننده مصرف گردد، 100% باکتری ها می بایست کشته شوند.

در بررسی حاضر فراوانی ژن mecA در میان استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین 90% بود. در سال 2008، Vail و هم کارانش، وجود ژن های ایجاد کننده مقاومت (از جمله mecA) به مواد ضد میکروبی نظیر روغن کاج را در میان 120 سویه کلینیکی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین(MRSA) بررسی کردند. نتایج تحقیق آنها حاکی از حضور ژنهای sigB و mecA به ترتیب 15% و 85% در استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین بود(19). این نتایج، با فراوانی 90% ژن mecA در استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین که از بررسی حاضر به دست آمده تا حدودی مطابقت دارد. در سال 2003، Cole و هم کاران، میزان رخ داد ژن mecA را در 98 استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، 74% گزارش کردند که با فراوانی 90% ژن mecA به دست آمده از این بررسی تا حدودی مطابقت داشت(2).

در مطاله حاضر هیچ یک از نمونه های جمع آوری شده به آنتی بیوتیک ونکومایسین مقاوم نبودند و چه به صورت فنوتیپی و چه به صورت ژنوتیپی، سویه ی مقاوم (VRSA) و یا حتی مقاوم به مقدار متوسط ونکومایسین (VISA) مشاهده نشد. در سال 1996در 195 بیمارستان آموزشی ژاپن یک برنامه غربال گری برای شناسایی انواع MRSA ، که هم راه با کاهش حساسیت نسبت به ونکومایسین بود، انجام شد. از 970 مورد MRSA، 13 مورد (1/3%) کاهش مقاومت نسبت به ونکومایسین تشخیص داده شد(25). در مطالعه نادری نسب و هم کاران در سال 1383، از بیماران سوختگی بیمارستان امام رضا (ع) چهار مورد و در بیمارستان حضرت قائم (عج) مشهد یک مورد MIC معادل 12/5 $\mu g / ml$ مشاهده شده است(26). در مطالعه Tiwari و هم کاران در سال 2006، شش سویه VISA گزارش گردید(27). نتایج فوق با نتایج ما هم خوانی ندارد از این رو میتوان استنباط کرد که خوش بختانه در ایران هنوز مقاومت به ونکومایسین مشاهده نشده است.

در مطالعه Sancak در سال 2005 در ترکیه مقادیر MIC نسبت به ونکومایسین 0/12-4 $\mu g / ml$ گزارش گردید و همه سویه ها نسبت به ونکومایسین حساس بودند(28). در مطالعه Leonard و هم کاران در آمریکا در سال 2007، MIC ونکومایسین 0/25-2 $\mu g / ml$ گزارش گردید(29). در مطالعه دیگری در تبریز در سال 1385 نیز هیچ مورد مقاوم و یا دارای حساسیت متوسط نسبت به ونکومایسین یافت نشد و MIC ونکومایسین حدود 1/5-3 $\mu g / ml$ گزارش گردید(30). در مطالعه صفاری و هم کاران در سال 1388 در کاشان، MIC ونکومایسین بین 0/5 تا 4 $\mu g / ml$ گزارش گردیده است(31). نتایج فوق با نتایج ما یکسان می باشد. در بررسی حاضر، 3 نمونه (16/6%) نیز یافت شدند که اگرچه حامل ژن mecA بودند ولی به اگزاسیلین (MIC 2 < میکروگرم در میلی لیتر) حساس بودند. این چنین سویه هایی از استافیلوکوکوس اورئوس که حامل ژن mecA هستند اما از نظر فنوتیپی به اگزاسیلین حساس می باشند در کل جهان در حال افزایش هستند. به طوری که مطالعات انجام شده در سال 2007 توسط Hososaka و در سال 2008 توسط Ikonomidis از فراوانی 15/5% و 11/8% این دسته از استافیلوکوکوس اورئوس ها حکایت دارند(32، 33). نظر بر این است که چنین سویه هایی از استافیلوکوکوس اورئوس تحت عنوان MRSA حساس به اگزاسیلین (OS-MRSA) نام گذاری شوند. این سویه های باکتریایی ممکن است طی آزمایش های معمول سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی در آزمایشگاه ها به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس های حساس به اگزاسیلین (MRSA) گزارش شوند. اهمیت موضوع از آن جهت است که چنان چه این دسته از استافیلوکوکوس اورئوس ها به درستی شناسایی نشوند، درمان عفونت های ناشی از آنها با آنتی بیوتیک های بتا لاکتام می تواند به ایجاد سویه های بسیار مقاوم تر MRSA که به علت حضور ژن mecA است منجر گردد.

در مطالعه حاضر سویه هایی که حامل ژن mecA بودند و در برابر غلظت های رو به افزایش از ماده بیوسایدی قرار گرفتند، توانستند بدنبال مجاورت با ماده بیوسایدی قدرت تحمل خود را افزایش دهند. نتایج به دست آمده از مطالعات مشابه توسط Davis، Price نیز نشان داده است که مجاورت مکرر سویه های باکتریایی با غلظت های بیشتر از حد بهینه از ماده بیوسایدی حاوی روغن کاج می تواند به افزایش در MIC و در نتیجه افزایش مقاومت سویه های باکتریایی به مواد بیوسایدی منجر گردد (1، 9). نتایج مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده از مطالعات این دو محقق هم خوانی داشت.

نتیجه گیری

سویه های باکتریایی قادرند میزان تحمل خود را نسبت به عوامل بیوسایدی توسعه دهند و موجب بروز مقاومت متقاطع با آنتی بیوتیک ها شوند. از این رو این بررسی از طریق اثبات حضور ژن mecA در میان استافیلوکوکوس اورئوس هایی که هم نسبت به بیوساید ها و هم نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند اهمیت استراتژی های کنترل عفونت موثر و استفاده از مواد بیوسایدی در غلظت توصیه شده را تاکید می نماید.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

REFERENCES

1. Price CT, Singh VK, Jayaswal RK, Wilkinson BJ, Gustafson JE. Pine oil cleaner-resistant Staphylococcus aureus . reduced susceptibility to vancomycin and oxacillin and involvement of sigB. Appl Environ Microbiol. 2002; 68:5417-5421

2. Cole EC, Addison RM, Rubino JR., Leese KE, Dulaney PD, Newell MS, Wilkins J, Gaber DJ. Investigation of antibioic and antibacterial agent cross-resistance in target bacteria from homes of antibacterial product users and nonusers. J Appl Microbiol. 2003; 95:664-676.

3. Fridkin S K. Vancomycin-intermediate and -resistant Staphylococcus aureus. what the infectious disease specialist needs to know. Clin. Infect, Dis. 2001; 32:108–115.

4. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus. a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect. Dis. 2000; 1:147–155.

5. Moken M. C, McMurry L. M, and Levy S. B. Selection of multipleantibiotic-resistant (mar) mutants of Escherichia coli by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and acrAB loci. Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41:2770–2772.

6. Rutala WA, Barbee SL, Aguiar NC, Sobsey MD, Weber DJ. Antimicrobial activity of home disinfectants and natural products against potential human pathogens. Infect Control Hosp Epidemiol. 2000; 21:33-38.

7. Akimitsu N, Hamamoto H, Inoue R, Shoji M, Akamine A, Takemori K, Hamasaki N, and Sekimizu K. Increase in resistance or methicillin resistant Staphylococcus aureus to beta-lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43:3042–3043.

8. Kullik I, Giachino P, and Fuchs T. Deletion of the alternative sigma factor -B in Staphylococcus aureus reveals its function as a global regulator of virulence genes. J. Bacteriol. 1998; 180:4814-4820.

9. Davis AO, O'Leary JO, Muthaiyan A, Langevin MJ, Delgado A, Abalos AT, Fajardo AR, Marek J, et al. Characterization of Staphylococcus aureus mutants expressing reduced susceptibility to common house-cleaners. J Appl Microbiol. 2005; 98:364–372. [PubMed:15659191]

10. Lamichhane-Khadka R, Riordan J.T, Delgado A, Muthaiyan A, Reynolds T.D, Wilkinson B.J, and Gustafson J.E. Genetic changes that correlate with the pine-oil disinfectant reduced susceptibility mechanism of Staphylococcus aureus. J Appl Microbiol. 2008; 105(6):1973–1981.

11. Centers for Disease Control (1999) Four pediatric deaths from community-aquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus Minnesota and North DakotaT 1997-1999. Morbidity and Motality Weekly Report. 48:707-710.

12. Manian F.A. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin resistant, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts, Clinical Infectious Disease. 2003; 36:26-28

13. Bischoff M, Entenza J. M, and Giachino P. Influence of a functional sigB operon on the global regulators sar and agr in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 2001; 183:5171–5179.

14. Chan P.F, Foster S.J, Ingham E, and Clements M. O. The Staphylococcus aureus alternative sigma factor -B controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. J. Bacteriol. 1998; 180:6082–6089.

15. Wu S, Lencastre H. de, and Tomasz A. Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of Staphylococcus aureus RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. J. Bacteriol. 1996; 178:6036–6042.

16. Singh VK, Schmidt RK. Jayaswal, Wilkinson. Impact of sigB mutation on Staphylococcus aureus oxacillin and vancomycin resistance background and method of assessment. Int. J. Antimicrob. Agents. in press.

17. Levy S. B. Antibacterial household products. cause for concern. Emerg. Infect. Dis. 2001; 7:512–515.

18. Palumbi S. R. Humans as the world's greatest evolutionary force. Science. 2001; 293:1786–1790.

19. Vali L, Davies SE, Lai LL, Dave J, Amyes SG. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicilin-sesistant Staphylococcus aureus isolates. J Antimicrob Chemother. 2008; 61:524-32.

20 . Rachid S, Ohlsen K, Wallner U, Hacker J, Hecker M, and Ziebuhr W. Alternative transcription factor -B is involved in regulation of biofilm expression in a Staphylococcus aureus mucosal isolate. J. Bacteriol. 2000; 182:6824-6826.

21. Riordan JT, O'Leary JO, Gustafson JE. Contributions of sigB and sarA to distinct multiple antimicrobial resistance mechanisms of Staphylococcus aureus. Int J Antimicrob Agents. 2006; 28:54–61. [PubMed:16777384]

22. Cheung A. L, Chien Y. T, and Bayer A. S. Hyperproduction of alpha-hemolysin in a sigB mutant is associated with elevated SarA expression in Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 1999; 67:1331–1337.
23. McDonnell G, and Russell A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin. Microbiol. Rev. 1999; 12:147–179.

24. Noguchi N, Hase M., Kita M, Sasatsu M, Deguchi K, & Kono M. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic – resistance genes in methicillin – resistant Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett. 1999; 172:247-253.

25. Centers for Disease control and Preventation. Redused susceptibility of Staphylococcus aureus to vancomycin-Japan 1996. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1997; 46:624-626

26. Naderi nasab M, Fateh Manesh P, Shahnavazi B. Staphylococcus aureus resistant agent vancomycin, Rahavard danesh. Ark Medical University Journal. 2004; 6:51-55

27. Tiwari HK, Sen MR. Emergence of vancomycin resistance Staphylococcus aureus (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. BNC Infect Dis. 2006; 6:156

28. Sancak B., Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, H ascelik G. Methicillin resistant heteroge Staphylococcus aureus hetrogenously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. J Antimicrob chemother. 2005; 56:519-523

29. Leonard SN, Cheung CM, Raybak MJ. Activities of ceftobiprole, linzolid, vancomycin, and daptomycin against community-Associated and Hospital-associated methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52:2974-2976

30. Ahmadishoar SH, Nahaei MR, Amirmozafari N. Sensivity of Staphylococcus aureus strains isolated fron clinical specimensainst vancomycin by usingE-test in Tabriz. Medical Journal of Tabriz University of Medical Science of Health Services. 2008; 30:17-23

31. Saffari M, Jokar M, Shajari GH, Piroozmand A, Moosavi GR. Minimum inhibitory concentration of vancomycin in Staphylococcus aureus isolates collected from clinical samples. Feyz, Kashan University of Medical Sciences of Health Services. 2010; 14:234:-241

32. Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, Suzuki Y, NMagasawa Z, Otsuka Y, Nakae T, Sunakawa K. Characterization of oxacillin – susceptible mecA-positive Staphylococcus aureus: a new type of MRSA. J Infect Chemother. 2007; 13:79-86.

33. Ikonomidis A, Michail g, Vadeki A, et al. In vitro and in vivo evaluations of oxacillin efficiency against mecA – positive oxacilin susceptible Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52:3905-8.