METHICILLIN-RESISTANT GENE TRANSFERS BETWEEN STAPHYLOCOCCI

Monthon Lertcanawanichakul * ***Preeyaporn Petchkheaw***

Pattama Bootnoi Nannapas Nimwun

School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University,

Nakhon Si Thammarat 80160

Abstract

Firstly, inducing the reciepient strains (*Staphylococcus epidermidis*, *Staph. saprophyticus* and Methicillin susceptible *Staph. aureus*) lead to express Chloramphenical resistant phenomenon by heavily inoculated on surface of Mannitol Salt agar supplemented with Chloramphenical (10 μg/ml) (MSAChlo). The conjugant(s) were obtained by cultured donor cells (Methicillin resistant *Staph. aureus*) and reciepient cells in the same conditions, then examined by phenotypic characteristic (antibiotic resistant profiles), compared with donor- and reciepient-antibiotic resistant profiles. There was only one conjugant *Staph. saprophyticus* showed the antibiotic resistance profiles as like as donor cells (Penicillin G, Cephalothin, Oxacillin, Gentamicin) and reciepient cells (Chloramphenical), simultaneously. The results showed that gene-transfering among Staphylococci was occurred when culturing under the appropriated conditions. It should be controlled those events by standard method precaution for clearance the drug – resistant microorganism in the future.

Keywords: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, gene transfer

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: lmonthon@wu.ac.th

การถ่ายทอดยีนดื้อยาเมธิซิลลินระหว่างกลุ่มเชื้อแสตบฟิลโลคอกคัส

มณฑล เลิศคณาวนิชกุล ปรียาภรณ์ เพชรเขียว ปัทมา บุตร์น้อย นันท์นภัส นิ่มวุ่น*

สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80160

บทคัดย่อ

ชักนำเซลล์ตัวรับ [*Staphylococcus epidermidis, Staph. saprophyticus* และ Methicillin susceptible *Staph. aureus* (MSSA)] ให้ดื้อต่อยา Chloramphenical ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Salt agar (MSA) ที่ผสมยา Chloramphenical 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (MSAChlo) เพื่อนำมาศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยาเมธิซิลลิน โดยนำไปเลี้ยงรวมกับเชื้อตัวให้ (Methicillin resistant *Staph. aureus*: MRSA) ปรากฏว่าตรวจพบ conjugant *Staph. saprophyticus* ที่มีรูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Penicillin G, Cephalothin, Oxacillin และ Gentamicin เหมือนเชื้อ MRSA และดื้อต่อยา Chloramphenical เหมือนกับเชื้อ *Staph. saprophyticus* แสดงว่าสามารถมีการถ่ายทอดยีนดื้อยาเมธิซิลลินระหว่างกลุ่มเชื้อ Staphylococci เมื่ออยู่ร่วมกันในสภาวะที่เหมาะสม และอาจสามารถควบคุมการถ่ายทอดยีนดื้อยาได้หากมีการป้องกันสภาวะดังกล่าวด้วยวิธีที่ถูกต้องตามหลักมาตรฐานสากล

คำสำคัญ: แสตบฟิลโลคอกคัสออเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลิน, การถ่ายทอดยีน

บทนำ

Methicillin-resistant *Staphylococus aureus* (MRSA) เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในระบบสาธารณสุขทั่วโลก เพราะเป็นสาเหตุหลักของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) และสามารถก่อโรคได้ในหลายระบบของร่างกาย โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 phenotypes คือ Homogenous resistance และ Heterogenous resistance โดยมีแนวโน้มของ Homogenous resistance เพิ่มมากขึ้น[1-3] บ่งบอกถึงภาวะความรุนแรงของ MRSA ที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบัน และเป็นที่ทราบกันดีว่า MRSA ดื้อต่อยากลุ่ม Penicillin และ ยากลุ่ม Beta-lactams เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ Beta-lactamase มาทำลาย Beta-lactam ring ของยากลุ่ม Beta-lactams ทำให้ยาไม่สามารถทำลายเชื้อได้ นอกจากนี้เชื้อยังมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Penicillin Binding Protien (PBP) ไปเป็น PBP-2a ทำให้ Penicillin จับกับ PBP ได้น้อยลง เกิดกลไกการดื้อต่อยา Penicillin ขึ้น กลไกดังกล่าวถูกควบคุมโดยยีน *MecA* ซึ่งเป็น specific site บน Chromosome ของ *Staph. aureus*[4] และสามารถถ่ายทอดยีนดังกล่าวสู่เชื้อ Staphylococci ตัวอื่นได้ ดังเช่น การพบเชื้อ MRSA หรือ Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) ในแหล่งชุมชนที่

* ติดต่อได้ที่ lmonthon@wu.ac.th

ดื้อเฉพาะยา Methicillin แต่ไม่ดื้อยา Penicillin[4-5] จึงเป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อกลุ่มดังกล่าวเกิดการดื้อเฉพาะยา Methicillin ได้อย่างไร มีความเป็นไปได้หรือไม่ว่าเมื่อมีการอยู่ร่วมกันในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมระหว่าง MRSA และ CoNS แล้วจะมีการถ่ายทอดยีนดื้อยา Methicillin (*MecA*) ให้แก่กันได้ ซึ่งหากสมมติฐานดังกล่าวเกิดขึ้นจริงจะก่อให้เกิดปัญหาในหลายๆ ด้านตามมาไม่ว่าจะเป็นในด้านสาธารณสุข เศรษฐกิจ และสังคม โดยเฉพาะจะเกี่ยวข้องกับการรักษาพยาบาลผู้ป่วยโรคติดเชื้อกลุ่ม Staphylococci และการแพร่กระจายกลุ่มเชื้อดื้อยาออกสู่ชุมชน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดยีน *MecA* ในเชื้อกลุ่ม Staphylococci เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเตรียมและยืนยันเชื้อ MRSA, MSSA, *Staph. epidermidis, Staph. saprophyticus*

ขีดเชื้อแต่ละชนิดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mannitol Salt agar (MSA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการยืนยันชนิดเชื้อด้วยการย้อมสีแบบแกรมจะเห็นเชื้อติดสีแกรมบวกรูปกลมเรียงตัวคล้ายพวงองุ่น

1.1 การทดสอบทางชีวเคมี[6]

เขี่ยเชื้อที่เจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MSA มาทดสอบการผลิตเอนไซม์ catalase และการผลิตเอนไซม์ coagulase รวมไปถึงการใช้น้ำตาล mannitol และการดื้อต่อยา Novobiocin ซึ่งเชื้อทุกชนิดให้ผลบวกกับการทดสอบ catalase กล่าวคือ จะเกิดฟองก๊าซเมื่อหยดทับเชื้อบนสไลด์ด้วย 3% H_2O_2 แต่จะมีเฉพาะเชื้อ MRSA และ MSSA ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ coagulase กล่าวคือเกิดการจับตัวเป็นก้อนของพลาสมา และมีเฉพาะ *Staph. epidermidis* ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล mannitol ส่วน *Staph. saprophyticus* เป็นเชื้อเพียงชนิดเดียวที่ดื้อต่อยา Novobiocin

1.2 การทดสอบการมีอยู่ของยีน *MecA*

1.2.1 การเพิ่มขยายยีน *MecA* ในหลอดทดลอง

เลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่ได้ทำการยืนยันชนิดได้ถูกต้องแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว muller-hinton (M-H) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในเครื่องบ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าได้ (Euroscan) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAprep Miniprep kit (Qiagen) จากนั้นนำมาเพิ่มขยายเฉพาะส่วนของชิ้นยีน *MecA* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จำนวน 35 รอบ ด้วยเครื่อง GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer) โดยใช้คู่ primers[4] : Pr-mecA (5'-CCTGT ATTGGCCAATTCCAC-3') และ Pr-mecR (5'-AAT GGAATTAACGTGGAGAC-3') ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปตรวจสอบชิ้นยีน *MecA* ด้วยเทคนิคการวิ่งในวุ้น agarose

1.2.2 การตรวจสอบชิ้นยีน *MecA* ด้วยเทคนิคการวิ่งในวุ้น agarose[7]

เตรียมวุ้น agarose (1.0 %) ใน 0.5 x Tris-borate-EDTA (TBE) จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาผสมกับ loading dye (อัตราส่วน 3:1) มาโหลดในหลุมของวุ้น agarose หลุมละประมาณ 10 ไมโครลิตร ทำการวิ่งภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำวุ้น agarose ไปย้อม

ด้วย ethidium bromide ประมาณ 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำสะอาด เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15-30 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสง Ultraviolet (UV) ด้วยเครื่อง UV transilluminator (Spectronics) เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยแถบของ λ-ดีเอ็นเอ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII (Gibco BRL) โดยชิ้นยีน *MecA* ที่ได้จากเทคนิค PCR เมื่อใช้คู่ของ primers ในข้อ 1.2.1 มีขนาดเท่ากับ 748 คู่เบส (base pairs:bp)[4]

2. แบบแผนความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ[2]

เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแต่ละชนิดลงใน 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland No.0.5 (Biomerieux) แล้วป้ายสารแขวนลอยเชื้อให้ทั่วพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง M - H วางทิ้งไว้ 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นวาง disc ยามาตรฐาน (OXOID) Penicillin G, Cephalothin, Oxacillin, Chloramphenical, Gentamicin, Nitrofurantoin ลงบนจานอาหารที่ได้ป้ายเชื้อไว้แล้ว บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยนำมาวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณเชื้อที่ถูกยับยั้ง (วงใส: clear zone) เป็นมิลลิเมตร เปรียบเทียบขนาดวงใสกับตารางมาตรฐานของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)[9]

3. การเตรียมเซลล์ตัวรับ

ชักนำ MSSA, *Staph. epidermidis* และ *Staph. saprophyticus* เพื่อใช้เป็นเซลล์ตัวรับ โดยขีดเชื้อแต่ละชนิดปริมาณมากลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA ที่มีส่วนผสมของยา Chloramphenical (MSA Chlor) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการสุ่มเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญขึ้นมาได้ในจานเพาะเชื้อ MSAChlor แล้วนำเชื้อไปขีดซ้ำบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MSAChlor อีกครั้ง เพื่อทำการเพิ่มขยายจำนวนเซลล์โดยทำการบ่มเพาะเชื้อที่สภาวะเดิม ดังกล่าวข้างต้น

4. ขั้นตอนการถ่ายทอดยีนดื้อยาของเชื้อ MRSA

นำเชื้อ MRSA ทั้ง 5 สายพันธุ์ (MRSA1/5, MRSA1/10, MRSA4/1, MRSA5/2, MRSA5/7) ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร[10] มาเลี้ยงรวมกันกับเซลล์ตัวรับ (MSSA, *Staph. epidermidis, Staph. saprophyticus*) ที่ถูกชักนำให้ดื้อยา Chloramphenical (ดังรายละเอียดในข้อ 3) โดยแยกออกจากกันในแต่ละเชื้อกล่าวคือ MRSA 1 สายพันธุ์แยกเลี้ยงรวมกับเซลล์ตัวรับทั้ง 3 ชนิด ซึ่งในการทดลองมีเชื้อ MRSA 5 สายพันธุ์ ดังนั้นจะได้หลอดทดลองรวมทั้งหมด 15 หลอด โดย ทำการเลี้ยงเชื้อรวมกันในสัดส่วน 1:1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้ nutrient broth ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อเป็น negative control และเมื่อเลี้ยงเชื้อตามสภาวะดังกล่าวแล้ว ให้ทำการคัดเลือก conjugant ด้วยวิธีการ 2 วิธีได้แก่

4.1 โดยวิธีเกลี่ยเชื้อ (spread plate)

นำเชื้อ MRSA ที่เลี้ยงรวมกับเซลล์ตัวรับในแต่ละหลอดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MSA ที่ผสมยา Oxacillin (Fluka) 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Chloramphenical (Sigma-Aldrich) 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (MSAChlorOx) ด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อโดยใช้ spreader จนผิวหน้าอาหารแห้ง แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 โดยใช้ ชุดกรอง syringe filter holder

ใช้ plastic syringe ดูดเชื้อ MRSA ที่เลี้ยงรวมกับเซลล์ตัวรับในแต่ละหลอดที่เหลือจากข้อ 4.1 มากรองด้วยชุดกรอง syringe filter holder (Satorious) ผ่านกระดาษกรองขนาดรูผ่าน (pore

size) 0.45 ไมโครเมตร (Millipore) แล้วนำกระดาษกรองที่มีเชื้อวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MSAChlorOx บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. ขั้นตอนตรวจสอบการถ่ายทอดยีนดื้อยาของเชื้อ MRSA (conjugant)

คัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่เจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MSAChlorOx มาขีดเพิ่มจำนวนลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเดิม บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปเตรียมเป็นสารแขวนลอยเชื้อใน 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 จากนั้นป้ายสารแขวนลอยเชื้อให้ทั่วพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง M - H วางทิ้งไว้ 3 - 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องให้ผิวหน้าอาหารแห้ง แล้ววาง disc ยา Penicillin G (P), Cephalothin (CF), Oxacillin (OX), Chloramphenical (C), Gentamicin (G), Nitrofurantoin (F) และ Novobiocin (NB) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตแบบแผนความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะเปรียบเทียบกับเซลล์ตัวให้ (ดื้อยา Penicillin G, Cephalothin, Oxacillin และ Gentamicin) และเซลล์ตัวรับ (ดื้อยา Chloramphenical)

ผล

1. การยืนยันกลุ่มเชื้อที่นำมาใช้ในการทดสอบ

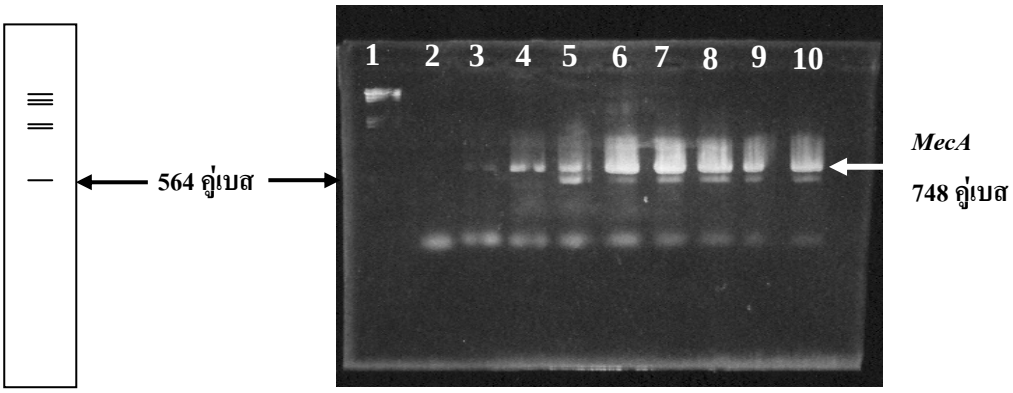
จากการทดสอบลักษณะเบื้องต้นของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Staph. saprophyticus, Staph. epidermidis,* MSSA ATCC 25923, MRSA (1/5, 1/10, 4/1, 5/2 และ 5/7) พบว่า ในกลุ่ม *Staph. aureus* และ *Staph. saprophyticus* เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA จากสีส้มแดงเป็นสีเหลือง ยกเว้น *Staph. epidermidis* และทั้งหมดจะให้โคโลนีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ และที่ชัดเจนที่สุดคือ *Staph. aureus* จะให้โคโลนีสีเหลืองทอง และเมื่อนำมาย้อมแกรมพบว่าเชื้อทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม เรียงตัวคล้ายพวงองุ่น

Staph. aureus และ MRSA ทุกสายพันธุ์ให้ผลบวกกับการทดสอบ coagulase ยกเว้น *Staph. epidermidis* และ *Staph. saprophyticus* แต่พบว่ามีเฉพาะ *Staph. saprophyticus* ดื้อต่อยา novobiocin ดังแสดงใน ตารางที่ 1 และสามารถตรวจพบแถบของยีน *MecA* จากเชื้อทุกชนิดดังแสดงในรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อ	Coagulase test[1]	Novobiocin Resistance Test	
		ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)	การแปลผล
Staph. saprophyticus	-	10	Resistant
Staph. epidermidis	-	40	Susceptible
MSSA ATCC25923	+	29	Susceptible
MRSA 1/5	+	28	Susceptible
MRSA 1/10	+	30	Susceptible
MRSA 4/1	+	28	Susceptible
MRSA 5/2	+	24	Susceptible
MRSA 5/7	+	33	Susceptible

[1] -, ไม่เกิด fibrin clot; +, เกิด fibrin clot; MSSA, Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus*; MRSA, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*; ATCC, American Type Culture Collection



รูปที่ 1 แถบดีเอ็นเอของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ. lane 1, λ DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII; lane 2, negative control; lane 3, *Staph. saprophyticus*; lane 4, *Staph. epidermidis*; lane 5, MSSA ATCC 25923; lane 6-10, MRSA 1/5, MRSA 1/10, MRSA 4/1, MRSA 5/2 และ MRSA 5/7 ตามลำดับ; negative control คือน้ำ; ภาพลายเส้นทางซ้ายมือแสดงแถบดีเอ็นเอมาตรฐานของ λ DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII มีขนาดเป็นคู่เบสเรียงลำดับจากบนลงล่างดังนี้: 23,130 9,4160 6,557 4,361 2,322 2,027 และ 564

และเมื่อนำมาทดสอบแบบแผนความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยใช้หลักของ Kirby-Bauer พบว่า *Staph. saprophyticus, Staph. epidermidis* และ MSSA ATCC 25923 ไวต่อยาทั้งหมดที่ใช้ทดสอบเชื้อกลุ่ม Staphylococci ส่วน MRSA ทั้ง 5 สายพันธุ์ดื้อต่อยา Pennicillin G, Oxacillin, Cephalothin และ Gentamicin และไวต่อยา Chloramphenical และ Nitrofurantoin ยกเว้น MRSA 1/5 และ MRSA 1/10 จะไวต่อยา Gentamicin ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แบบแผนความไวของกลุ่มเชื้อ Staphylococci ต่อยาปฏิชีวนะ

เชื้อ	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)					
	P	**CF**	**C**	**F**	**G**	**OX**
Staph. saprophyticus	29 (S)	31 (S)	25 (S)	28 (S)	40 (S)	15 (S)
Staph. epidermidis	18 (S)	25 (S)	26 (S)	24 (S)	28 (S)	21 (S)
MSSA ATCC 25923	28 (S)	25 (S)	25 (S)	24 (S)	28 (S)	25 (S)
MRSA 1/5	7 (R)	0 (R)	22 (S)	25 (S)	19 (S)	0 (R)
MRSA 1/10	9 (R)	0 (R)	25 (S)	23 (S)	16 (S)	0 (R)
MRSA 4/1	0 (R)	0 (R)	22 (S)	26 (S)	8 (R)	0 (R)
MRSA 5/2	7 (R)	0 (R)	23 (S)	25 (S)	6 (R)	0 (R)
MRSA 5/7	0 (R)	0 (R)	24 (S)	26 (S)	8 (R)	0 (R)

(R), resistance; (S), susceptibility

P, Penicillin G; CF, Cephalothin; C, Chloramphenical; F, Nitrofurantoin; G, Gentamicin; OX, Oxacillin

2. ถ่ายทอดยีนดื้อยาของเชื้อ MRSA

2.1 การใช้วิธี spread plate

นำเชื้อตัวให้กับตัวรับที่เลี้ยงรวมกันมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MSAChlOx จากนั้นบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อเจริญเป็นจำนวนมาก ทำให้ไม่สามารถคัดเลือกเชื้อมาทำการทดสอบต่อได้ จึงนำมาแยกเชื้ออีกครั้งโดยวิธี streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเดิมแล้วบ่มเพาะเชื้อต่อที่สภาวะเดิม พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว จึงไม่สามารถนำมาทดสอบ coagulase ได้ ดังแสดงในตารางที่ 3

2.2 การใช้ชุดกรอง syringe filter holder

เลี้ยงเชื้อตัวให้กับตัวรับรวมกันบนกระดาษกรองขนาดรูผ่าน 0.45 ไมโครเมตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เจริญมาเพิ่มจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MSAChlOx แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อต่อที่สภาวะเดิมพบว่า MRSA 4/1+*Staph. saprophyticus,* MRSA 4/1 +MSSA ATCC 25923, MRSA 5/2 + *Staph. epidermidis*, MRSA 5/7 + *Staph. saprophyticus* และ MRSA 5/7 + *Staph. epidermidis* สามารถเจริญได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว และให้ผลบวกกับการทดสอบ coagulase ทั้งหมด ยกเว้น MRSA 5/7 + *Staph. saprophyticus* ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ผลการคัดเลือก conjugant โดยวิธี spread plate ภายหลังจากการขีดเชื้อซ้ำ

ที่	ตัวให้ + ตัวรับ	การทดสอบ	
		ลักษณะโคโลนีบน MSAChlOx	Coagulase
1	MRSA 1/5 + *Staph. saprophyticus*	NG	ND
2	MRSA 1/5 + *Staph. epidermidis*	NG	ND
3	MRSA 1/5 + MSSA ATCC 25923	NG	ND
4	MRSA 1/10 + *Staph. saprophyticus*	NG	ND
5	MRSA 1/10 + *Staph. epidermidis*	NG	ND
6	MRSA 1/10 + MSSA ATCC 25923	NG	ND
7	MRSA 4/1 + *Staph. saprophyticus*	NG	ND
8	MRSA 4/1 + *Staph. epidermidis*	NG	ND
9	MRSA 4/1 + MSSA ATCC 25923	NG	ND
10	MRSA 5/2 + *Staph. saprophyticus*	NG	ND
11	MRSA 5/2 + *Staph. epidermidis*	NG	ND
12	MRSA 5/2 + MSSA ATCC 25923	NG	ND
13	MRSA 5/7 + *Staph. saprophyticus*	NG	ND
14	MRSA 5/7 + *Staph. epidermidis*	NG	ND
15	MRSA 5/7 + MSSA ATCC 25923	NG	ND

NG, เชื้อไม่เจริญ; ND : ไม่สามารถทำการทดสอบได้

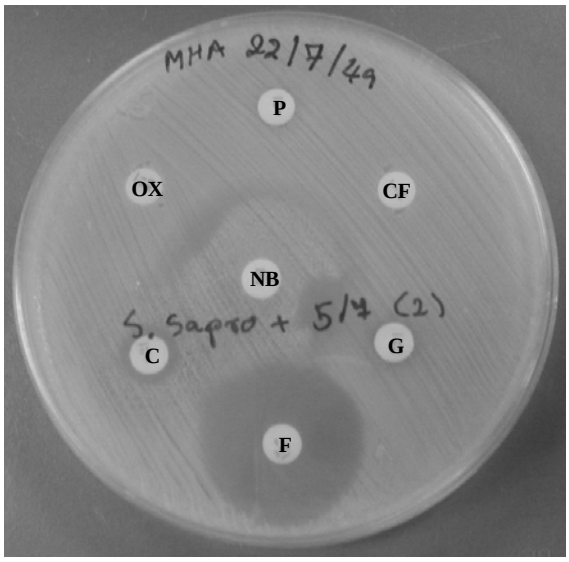
ตารางที่ 4 ผลการคัดเลือก conjugant โดยใช้ ชุดกรอง syringe filter holder ภายหลังจากการขีดเชื้อซ้ำ

ที่	ตัวให้+ ตัวรับ	การทดสอบ	
		โคโลนีบน MSAChlOx	Coagulase
1	MRSA 1/5 + *Staph. saprophyticus*	NG	ND
2	MRSA 1/5 + *Staph. epidermidis*	NG	ND
3	MRSA 1/5 + MSSA ATCC 25923	NG	ND
4	MRSA 1/10 + *Staph. saprophyticus*	NG	ND
5	MRSA 1/10 + *Staph. epidermidis*	NG	ND
6	MRSA 1/10+MSSA ATCC 25923	NG	ND
7	MRSA 4/1 + *Staph. saprophyticus*	สีเหลือง กลม มันวาว ขอบเรียบ ขนาด 1-2 มม.	+
8	MRSA 4/1 + *Staph. epidermidis*	NG	ND
9	MRSA 4/1 + MSSA ATCC 25923	สีเหลือง กลม มันวาว ขอบเรียบ ขนาด 1-2 มม.	+
10	MRSA 5/2 + *Staph. saprophyticus*	NG	ND
11	MRSA 5/2 + *Staph. epidermidis*	สีเหลือง กลม มันวาว ขอบเรียบ ขนาด 1-2 มม.	+
12	MRSA 5/2 + MSSA ATCC 25923	NG	ND
13	MRSA 5/7 + *Staph. saprophyticus*	สีเหลือง กลม มันวาว ขอบเรียบ ขนาด 2-3 มม.	-
14	MRSA 5/7 + *Staph. epidermidis*	สีเหลือง กลม มันวาว ขอบเรียบ ขนาด 1-2 มม.	+
15	MRSA 5/7 + MSSA ATCC 25923	NG	ND

NG, เชื้อไม่เจริญ; ND, ไม่ได้ทำการทดสอบ; มม., มิลลิเมตร; +, เกิด fibrin clot; -, ไม่เกิด fibrin clot

3. การยืนยันการถ่ายทอดยีน *MecA* (ทดสอบ conjugant)

นำ conjugant ที่คัดเลือกได้จากการเพิ่มจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MSAChlOx มาทดสอบแบบแผนความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้หลัก Kirby-Bauer จะพบว่ามีเฉพาะโคโลนีที่ได้จากการเลี้ยง MRSA 5/7 รวมกับ *Staph. Saprophyticus* ให้ลักษณะการดื้อต่อยาปฏิชีวนะคล้ายกันกับเซลล์ตั้งต้นทั้งตัวให้และตัวรับรวมกัน กล่าวคือดื้อต่อยา Penicillin G, Cephalothin, Oxacillin และ Gentamicin เหมือนเซลล์ตัวให้ (MRSA 5/7) และ ดื้อต่อยา Choramphinical เหมือนเซลล์ตัวรับ (*Staph. saprophyticus*) ดังแสดงในรูปที่ 2 ส่วน conjugant ตัวอื่นๆ จะพบว่าดื้อยาเหมือนกับ MRSA ทุกประการ แต่ยังคงไวต่อยา Choramphenical และ Nitrofurantoin ดังแสดงในตารางที่ 5



รูปที่ 2 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเซลล์ที่คาดว่าเป็น conjugant: P, Penicillin G; CF, Cephalothin; C, Chloramphenical; F, Nitrofurantoin; G, Gentamicin; OX, Oxacillin; NB, Novobiocin

ตารางที่ 5 แบบแผนความไวของเชื้อที่คาดว่าเป็น conjugant ต่อยาปฏิชีวนะ

เชื้อ	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)						
	P	**CF**	**C**	**F**	**G**	**OX**	**NB**
MRSA 4/1 + *Staph. saprophyticus*	0 (R)	0 (R)	26 (S)	30 (S)	0 (R)	0 (R)	31 (S)
MRSA 4/1 + MSSA ATCC 25923	0 (R)	0 (R)	25 (S)	29 (S)	0 (R)	0 (R)	30 (S)
MRSA 5/2 + *Staph. epidermidis*	0 (R)	0 (R)	24 (S)	28 (S)	0 (R)	0 (R)	28 (S)
MRSA 5/7 + *Staph. saprophyticus*	0 (R)	0 (R)	7 (R)	25 (S)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
MRSA 5/7 + *Staph. epidermidis*	0 (R)	0 (R)	26 (S)	31 (S)	0 (R)	0 (R)	30 (S)

(R), resistance; (S), susceptibility

P, Penicillin G; CF, Cephalothin; C, Chloramphenical; F, Nitrofurantoin; G, Gentamicin; OX, Oxacillin; NB, Novobiocin

วิจารณ์

เนื่องจากมีรายงานว่ามีการค้นพบเชื้อกลุ่ม Coagulase negative Staphylococci (CoNS) ที่ดื้อต่อยา methicillin ซึ่งมีรูปแบบการดื้อยาคล้ายคลึงกับ MRSA[5] ทำให้ยากต่อการรักษา จึงศึกษาการถ่ายทอดยีนดื้อยา methicillin (*MecA*) ระหว่างกลุ่ม Staphylococci โดยดูลักษณะทาง phenotype ของ conjugant ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้มาจากการเลี้ยงเชื้อรวมกันของเชื้อตัวให้ (MRSA) และเชื้อตัวรับ [*Staphylococcus epidermidis, Staph. saprophyticus* และ Methicillin susceptible *Staph. aureus* (MSSA)] ในหลอดทดลองเดียวกัน เป็นเกณฑ์บ่งชี้การถ่ายทอดยีนดื้อยา เนื่องจากพบว่า Staphylococci บางกลุ่มมีคุณสมบัติเป็น Pre-*MecA* กล่าวคือเชื้อมียีน *MecA* แต่ยังไม่แสดงออกของยีนดังกล่าว[4] ทำให้การยืนยัน conjugant ทางด้านยีนทำได้ยากเมื่อใช้คู่ primers ที่ใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดต่อไปดังนี้

1. คุณลักษณะเบื้องต้นของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการทำให้เกิด fibrin clot คือ Coagulase positive Staphylococci (CoPS) และ Coagulase negative Staphylococci (CoNS) ได้แก่ *Staph. saprophyticus*, *Staph. epidermidis*[1] และในบางสายพันธุ์ของ *Staph. aureus*[5] ซึ่งในกลุ่ม CoPS ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) คือ *Staph. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน *MecA*[4, 11] และมีรายงานการถ่ายทอดให้แก่เชื้อในสกุลเดียวกัน[12] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อกลุ่ม Staphylococci ในบางสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Pre-*MecA* ซึ่งมียีน *MecA* แต่ยังไม่ให้ลักษณะการดื้อยาเกิดขึ้น เนื่องจากยังไม่มีการผ่าเหล่าของยีน *MecI* ซึ่งเป็น promoter แต่เมื่อไหร่ก็ตามที่มีการผ่าเหล่าในตำแหน่งของยีน *MecI* เกิดขึ้น จะทำให้ยีน *MecA* แสดงลักษณะออกมา ทำให้เชื้อมีการดื้อต่อยา

methicillin[4] ทำให้เมื่อทำการทดสอบทาง genotype จะพบแถบของยีน *MecA* ในเชื้อ Staphylococci อื่นๆ ด้วยเช่นกันดังแสดงในรูปที่ 1 จึงเปลี่ยนวิธีการมาศึกษาลักษณะทาง phenotype โดยดูลักษณะการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ conjugant เปรียบเทียบกับเซลล์ตัวให้และเซลล์ตัวรับที่มีการชักนำให้ดื้อยา Chloramphenical

2. ขั้นตอนการทดสอบการถ่ายทอดยีนดื้อยาของเชื้อ MRSA

ในขั้นตอนการคัดเลือก conjugant จะใช้การคัดเลือก 2 วิธี คือ วิธีแรกโดยการ spread plate ในตอนแรกดูดเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MSAChlOx ปรากฏว่าไม่มีการเจริญของเชื้อ ดังนั้นจึงเพิ่มปริมาตรเชื้อเป็น 1 มิลลิลิตร มา spread อีกครั้ง พบว่าเชื้อมีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปริมาณมากทำให้ไม่สามารถแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว จึงไม่สามารถคัดเลือกโคโลนีมาทำการทดสอบต่อไปได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณของเชื้อมีผลต่อการคัดเลือก conjugant กล่าวคือถ้าเชื้อมีปริมาณน้อยอัตราการตรวจพบ conjugant ก็น้อยลงไปด้วย นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อรูปกลมแกรมบวกจึงมีพื้นผิวสัมผัสเพียงเล็กน้อย[6] ระหว่างตัวเชื้อที่จะถ่ายทอดยีนดื้อยาทำให้โอกาสในการพบ conjugant จึงน้อยลง ซึ่งถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนจะพบอัตราการถ่ายทอดยีนได้มากกว่า[13-14] จึงได้เพิ่มวิธีการเลือก conjugant วิธีที่สอง โดยการกรองด้วย syringe filter holder ผ่านกระดาษกรองขนาดรูผ่าน 0.45 ไมโครเมตร วิธีนี้ทำให้ได้ปริมาณเชื้อมากขึ้น จึงสามารถคัดเลือก conjugant บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MSAChlOx ได้มากขึ้น โดยจะให้คุณสมบัติของการดื้อยารวมกันระหว่างเซลล์ตัวให้และเซลล์ตัวรับ แสดงให้เห็นว่ามีการถ่ายทอดยีนดื้อยา methicillin ระหว่างเชื้อกลุ่ม Staphylococci ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยหลายฉบับที่พบว่ามีการถ่ายทอดยีน *MecA* ได้ ทำให้ได้เชื้อ Coagulase negative Staphylococci ดื้อต่อยา methicillin[4-5, 15] นอกจากนี้มีรายงานการตรวจพบเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลและนอกโรงพยาบาลที่มีรูปแบบการดื้อยาที่คล้ายคลึงกัน[15] ซึ่งอาจบอกได้ว่ามีการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาออกสู่ชุมชนและหรือมีการถ่ายทอดยีนดื้อยาระหว่างเชื้อเกิดขึ้นแล้วในชุมชน[16-17] และสาเหตุที่พบการถ่ายทอดยีนดื้อยาเฉพาะใน *Staph. saprophyticus* อาจเนื่องมาจากมีความต้องการสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน[3] เพราะมีรายงานว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการดื้อยา[18] ซึ่งอาจรวมไปถึงความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วย และถ้าหากเชื้อนี้อยู่ในร่างกายจะมีโอกาสถ่ายทอดยีนดื้อยาให้แก่กันได้เมื่อได้รับเชื้อ MRSA เข้าสู่ร่างกาย และมีการ colonize เกิดขึ้นในร่างกาย ตรงตำแหน่งเดียวกับที่มีเชื้อ *Staph. saprophyticus* มีการ colonize อยู่ ซึ่งคาดว่าน่าจะมีความเป็นไปได้ เนื่องจากทั้ง *Staph. saprophyticus* และ *Staph. aureus* เป็นเชื้อที่สามารถตรวจพบได้ในระบบสืบพันธุ์และระบบขับถ่าย จึงน่าจะเพิ่มโอกาสในการถ่ายทอดยีนดื้อยาโดยวิธี mating type (conjugation like) ซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการรักษา เนื่องจากพบว่า conjugant มีการดื้อยาแบบ multidrug resistance นอกจากนี้ยังพบ Staphylococci อื่นๆ ที่ดื้อเฉพาะยา methicillin ได้แก่ Methicillin resistant *Staph. epidermidis* (MRSE)[4, 19] และเริ่มมีการพบแพร่ระบาดของเชื้อดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น[5] จึงควรมีมาตรการในการป้องกันการติดเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลโดยปฏิบัติตามหลักการแยกผู้ป่วยแบบมาตรฐาน (standard precautions) เช่น การล้างมือ การสวมถุงมือในขณะปฏิบัติงาน การจัดการสิ่งแวดล้อมต่างๆ ให้เหมาะสม การแยกผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อ MRSA ไปยังห้องที่เหมาะสม นอกจากนี้ควรมีการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจากทาง

การแพทย์และการสาธารณสุข (Universal precaution) ออกสู่ชุมชนอีกด้วย เช่นการจัดการของเสียติดเชื้อในโรงพยาบาลอย่างถูกวิธี[20] ซึ่งจะเป็นการลดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้อีกทางหนึ่ง

สรุปและข้อเสนอแนะ

เชื้อในกลุ่ม Staphylococci มีความสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาได้ เนื่องจากมีการตรวจพบ conjugant *Staph. saprophyticus* จากการเลี้ยงเชื้อรวมกันระหว่าง MRSA 5/7 กับ *Staph. saprophyticus* จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสม ในการถ่ายทอดยีนดื้อยา เพื่อเป็นการหาแนวทางในการป้องกันการถ่ายทอดยีนดื้อยาและควบคุมไม่ให้มีการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาออกสู่ชุมชน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช และขอขอบคุณสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และวัสดุอุปกรณ์บางอย่างในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. นลินี อัศวโภคี, สุรภี เทียนกริม, ศศิธร ลิขิตนุกูล, อัษฎา วิภากุล. ประสบการณ์ด้านโรคติดเชื้อในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ มหานคร: สำนักพิมพ์โอลิสติก พับลิชชิง จำกัด, 2542: 203–214.
2. นลินี อัศวโภคี. ความก้าวหน้าในการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ. กรุงเทพ: ที.พี.พริ้นท์, 2538: 219-227.
3. ใยวรรณ ธนะมัย. 2543. การระบาดของเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): อุบัติการณ์ในหอผู้ป่วยอายุรกรรมชายโรงพยาบาลเลิดสิน. วารสารกรมการแพทย์. 25(1):30-39.
4. Nobumichi K., Koki T. and Shozo U. 1998. Analysis of Diversity of Mutations in the *mecI* Gene and *mecA* Promoter/Operator Region of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother 3: 717-720.
5. Al Obaid IA., Udo EE., Jacob LE. and Johny M. 1999. Isolation and characterization of Coagulase-negative methicillin-resistant *aureus* from patients in an intensive care unit. Med Princ Pract 8: 230-236.
6. นรีกุล สุระพัฒน์ จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ ปรีชา พุทธาวุฒิไกร สุวณี สุภเวชย์ ประมวญ เทพชัยศรี. จุลชีววิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: กรุงเทพเวชสาร, 2530: 64-71, 78-83.
7. Sambrook J., Fritsch EF. and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
8. O'Brien TF. and Stelling JM. 1995. An Information System for Monitoring Antimicrobial Resistance. Emerg Infect Dis 1(2): 66.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1984. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 3rd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, Pa.
10. จุฑามณี พูลสวัสดิ์ และ มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. 2547. การเฝ้าระวังเชื้อ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ในผู้ป่วยหอผู้ป่วยศัลยกรรมชาย โรงพยาบาลชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร. วารสารการส่งเสริมสุขภาพและอนามัยสิ่งแวดล้อม 27(1); 61-72.
11. Lan MO. and Qi-nan W. 1997. Rapid Detection of Methicillin–Resistant Staphylococci Using Polymerase Chain Reaction. Inter J Infect Dis 1: 15-20.
12. Takezo U. 2004. Dissemination of nosocomial multiple-aminoglycoside–resistant *Staphylo- coccus aureus* caused by horizontal transfer of the resistance determinant (*aacA*/*aphD*) and clonal spread of resistant stains. Am J Infect Contr 32: 215-219.
13. Thomas DJI., Morgan AWM., Whipps JM. and Saunders JR. 2000. Plasmid Transfer between the *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in Laboratory culture and Soil and Coleopteran Larvae. Appl Environ Microbiol 66(1): 118-124.

14. Thomas DJI., Morgan AWM., Whipps JM. and Saunders JR. 2001. Plasmid Transfer between *Bacillus thuringiensis* Subspecies *israelensis* Strains in Laboratory culture, River Water, and Dipteran Larvae. Appl Environ Microbiol 67(1): 330-338.
15. Draghi DC., Sheehan DF., Hogan P. and Sahm DF. 2006. Current antimicrobial resistance profiles among methicillin-resistant *Staphylo cocus aureus* encountered in the outpatient setting. Diag Microbiol Infect Dis 55: 129-133.
16. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล รุ่งฤทัย ทองแสง สกลธกฤษณ์ ฮานีซ๊ะ ลาโห๊ะยา. 2549. การตรวจหาเชื้อแสตบฟิลโลคอคคัสออเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลินในหอพักนักศึกษามหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์จังหวัดนครศรีธรรมราช. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 20(2) : 129-140.
17. Chambers HF. 2001. The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis (2):178-182.
18. Willium DW. and Paul MS. 1984. Unusual susceptibility of methicillin-resistant *Staphylo-coccus aureus* to erythromycin, clindamycin, gentamicin, and tetracycline at 30 degrees C but not at 35 degrees C. J Clin Microbiol 19: 831-833.
19. Kresken MA., Hafner DB., Schmitz FJ. and Wichelhaus TA. 2004. Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the Antimicrobial Resistance Surveillance Study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, 2001. Inter J Antimicrob Agents 23: 577 – 581
20. Center of Disease Control (CDC). 1996. Standard precaution guidelines. Infection prevention guidelines: 2-6.