

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์

- 1.1 จานเพาะเชื้อ (Petri-Dish)
- 1.2 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 1.3 หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร และ ขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร (Test tube)
- 1.4 กระบอกตวง (Cylinder)
- 1.5 Microcentrifuge tube
- 1.6 กระบอกฉีดยาขนาด 25 มิลลิเมตร (Syringe)
- 1.7 ออโตปีเปต (Auto pipettes)
- 1.8 ลูป (Inoculating loop)
- 1.9 ถังวัด (Cuvette)

2. เครื่องมือ

- 2.1 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น PG802-S, Germany)
- 2.2 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Centra รุ่น 40, USA)
- 2.3 ตู้หมักเชื้ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Clayson รุ่น IM1000, Germany)
- 2.4 ตู้อบลมร้อน (Mettmert Mtec รุ่น 700, Germany)
- 2.5 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Tommy รุ่น SS325, Japan)
- 2.6 เครื่อง Thermocycler (Biometra รุ่น T Gradient, Germany)
- 2.7 เครื่อง Electrophoresis (Enduro Labnet รุ่น E0303-1, Taiwan)
- 2.8 เครื่อง UV-transilluminator (Spectrolite รุ่น TVC-313A, USA)
- 2.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Eppendorf รุ่น 5804R, Germany)
- 2.10 ตู้แช่แข็ง (Super Clean รุ่น 150 VC, USA)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 3.1 Nutrient Agar (NA; Difco, USA)
- 3.2 Trypticase Soy Agar (TSA; Difco, USA)
- 3.3 Trypticase Soy Broth (TSB; Difco, USA)

3.4 Muller-Hinton Agar (MHA; Difco, USA)

4. สารเคมี (ภาคผนวก ข)

4.1 สารเคมีสำหรับย้อมแกรม

4.2 Human plasma

4.3 Catalase reagent

4.5 ยาด้านจุลชีพ (Oxoid, UK)

4.6 Oxacillin powder (Zigma, Germany)

4.6 Nitrocefin (Oxoid, UK)

4.7 Ethidium Bromide (Labchem, Australia)

4.8 สำหรับสกัดดีเอ็นเอแม่แบบ

4.8.1 1% Triton X-100 (Merck, Germany)

4.8.2 10mM Tris-HCl (Amresco, USA)

4.8.3 100mM NaCl (Univar, New Zealand)

4.8.4 1mM EDTA (Vivantis, Malaysia)

4.8.5 แอลกอฮอล์ 70% และ 95% (Fisher Scientific, UK)

4.9 สารเคมีและเอนไซม์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.9.1 Taq DNA Polymerase (Vivantis, Malaysia)

4.9.2 10x Amplification buffer (Vivantis, Malaysia)

4.9.3 10mM dNTP Mixture (Invitrogen, USA)

4.9.4 Forward primer และ Reverse primer (Vivantis, Malaysia)

4.9.5 10x Loading Dry (Vivantis, Malaysia)

4.9.6 Agarose Gel (Seakcm, USA)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการทำวิจัย

ตัวอย่างเชื้อ *S. aureus* จำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็น *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยา Methicillin (MRSA) และกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ไวต่อยา Methicillin (MSSA) เชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้แยกได้จากส่งตรวจของผู้ป่วย เช่น หนอง ปัสสาวะ เสมหะ ส่งตรวจ

จากถ้ำคอ ช้องคลอด สาย cut down และสิ่งส่งตรวจอื่น ๆ ในผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสมเด็จพระศรีราชา จังหวัดชลบุรี โรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี และโรงพยาบาลฉะเชิงเทรา จังหวัดฉะเชิงเทรา ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2550 จำนวน 400 ตัวอย่าง คำนวณจากภาคผนวก ก

2. การทดสอบเพื่อยืนยันเชื้อ *S. aureus* (Kenneth, 2008)

2.1 การย้อมแกรม (Grams' stain)

เขี่ยเชื้อลงบนสไลด์ที่หยดด้วยน้ำกลั่น กลิ้งเป็นวงกว้างทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นนำไปย้อมสีแกรม แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เชื้อ *S. aureus* จะมีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก มีการเรียงตัวคล้ายพวงองุ่น

2.2 การทดสอบ Catalase

เขี่ยเชื้อลงบนสไลด์ แล้วหยด 3% H_2O_2 1 หยด เชื้อ *S. aureus* จะให้ผลบวกต่อการทดสอบ Catalase โดยจะเกิดฟองแก๊สขึ้นทันที

2.3 การทดสอบ Coagulase

เขี่ยเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีพลาสมา 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เชื้อ *S. aureus* จะให้ผลบวกต่อการทดสอบ Coagulase โดยพลาสมาจะเกิดการแข็งตัว

3. การศึกษาแบบแผนความไวต่อด้านจุลชีพ

การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพใช้วิธี Disk diffusion (NCCLS, 2004) และมีการควบคุมโดยใช้ Methicillin-susceptibility *Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 25923 และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 โดยยาที่นำมาทดสอบมีดังนี้

3.1 Ampicillin	10	ไม่โครกรัม
3.2 Cefotaxime	30	ไม่โครกรัม
3.3 Cefuroxime	30	ไม่โครกรัม
3.4 Cephalothin	30	ไม่โครกรัม
3.5 Chloramphenicol	30	ไม่โครกรัม
3.6 Ciprofloxacin	5	ไม่โครกรัม
3.7 Clindamycin	2	ไม่โครกรัม

3.8 Cefoxitin	30	ไมโครกรัม
3.9 Erythromycin	15	ไมโครกรัม
3.10 Gentamicin	10	ไมโครกรัม
3.11 Oxacillin	1	ไมโครกรัม
3.12 Penicillin G	10	ไมโครกรัม
3.13 Trimethoprim – sulfamethoxazole	1.25	ไมโครกรัม
3.14 Vancomycin	30	ไมโครกรัม

วิธีการทดสอบ

3.15 เชื้อเชื้อ *S. aureus* อย่างน้อย 5-6 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นของเชื้อกับ McFarland 0.5 ซึ่งเทียบเท่าได้กับปริมาณเชื้อ 1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร

3.17 ใช้ไม้ปั่นสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มในหลอดที่ผ่านการปรับความขุ่นแล้ว บิดไม้ปั่นสำลีให้หมาด ๆ กับข้างหลอด แล้วนำมาป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่เติม NaCl 4% โดยป้ายเป็น 3 ระบาย ทิ้งไว้นาน 3-5 นาที แล้วนำ Disk ยาววางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.18 การอ่านผลทำโดย วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสแล้วนำไปแปรผลเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานในตารางที่ 8 ภาคผนวก ฉ

4. การทดสอบ Minimum Inhibitory Concentration (MICs) ด้วยวิธี Agar dilution (Brown & Ngeno, 2007)

4.1 การเตรียม Stock solution ของยา Oxacillin โดยทำการเจือจางยา Oxacillin 100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเป็น 20 เท่า ของความเข้มข้นที่ต้องการใช้ในการทดสอบ แล้วจึงใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) เติม NaCl 4% โดยใช้ยา Oxacillin 1 ส่วน ต่อ อาหารเลี้ยงเชื้อ 9 ส่วน จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 19 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นตั้งทิ้งให้แข็งแล้วเก็บใส่ถุงพลาสติกปิดสนิท แล้วสามารถเก็บใส่ตู้เย็นได้ประมาณ 1 อาทิตย์ โดยจะเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยา Oxacillin ที่มีเข้มข้น 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีเชื้อ Methicillin-susceptibility

Staphylococcus aureus (MSSA) ATCC 25923 และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 เป็นเชื้อที่ใช้ในการควบคุมการทดลอง

4.2 การเตรียมเชื้อ *S. aureus* ที่นำมาทดสอบ โดยเลี้ยงเชื้อ TSA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นเลือกโคโลนีอย่างน้อยประมาณ 5-6 โคโลนี ขึ้นไปใส่ลงในอาหาร TSB นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นของเชื้อกับ McFarland 0.5 ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณเชื้อ 1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร แล้วเจือจางเชื้อให้ได้เชื้อประมาณ 1×10^4 CFU/มิลลิลิตร แล้วหยดบนอาหาร MHA ที่เติม NaCl 4% ปริมาตร 10 ไมโครลิตร รอให้แห้งแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. การทดสอบเอนไซม์เบต้าแลคแทมเมส (Sakoulas et al., 2002)

นำ MRSA ที่ผ่านการทดสอบความไวของยา Oxacillin มาตรวจหาการผลิตเอนไซม์เบต้าแลคแทมเมส โดยใช้ Nitrocefin (Oxoid, UK)

6. การสกัดดีเอ็นเอแม่แบบ (ดัดแปลงจาก Fusun et al., 2007)

ทำการเพาะเลี้ยง MRSA ทั้งหมด 150 ไอโซเลต และ MSSA 30 ไอโซเลต ในอาหาร TSA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีด้วยอย่างน้อยประมาณ 5-6 โคโลนี ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 $\times$ g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ ปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วดูดออกใส่ในหลอด Microcentrifuge tube แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอแม่แบบ โดยใช้ 2 วิธีคือ

6.1. Lysis solution (1% Triton X-100, 10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

6.2. เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดดีเอ็นเอแม่แบบ จากนั้นนำหลอดในข้อที่ 6.1 และ 6.2 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 $\times$ g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วดูด Supernatant ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube จากนั้นเติม 3M Sodium acetate pH 8 ปริมาตร 8 ไมโครลิตร (1:10 V), Ice-cold absolute ethanol ปริมาตร 48 ไมโครลิตร (6:10 volume) เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอแม่แบบ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 $\times$ g เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม Ice-cold ethanol 70% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 $\times$ g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้ง

ให้แห้ง แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 20 ไมโครลิตร และใช้ 2 ไมโครลิตร สำหรับเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำ PCR หรือเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

7. Oligonucleotides (Ryffel et al., 1990)

ในการตรวจหา ยีน *mecA* โดยวิธี PCR จะใช้ primer *mecA1* (5'- TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG-3' *mecA2* (5'- CTG GAA CTT GTT GAG CAG AG -3')

8. Polymerase Chain Reaction (PCR; Fusun et al., 2007)

เตรียมสารละลายใส่ใน Microcentrifuge tube ซึ่งมีส่วนผสมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x buffer 5 ไมโครลิตร (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl pH 9.0) dNTP mix (250 mM), forward primer (10 µM), reverse primer (10 µM), ดีเอ็นเอแม่แบบ 2 ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase (2.5 U/มิลลิลิตร) และน้ำกลั่น ปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากัน ปิดหลอดปฏิกิริยาให้สนิท นำไปเข้าเครื่อง Thermocycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ โดยยีน *mecA* ที่ทำการเพิ่มจำนวนจะมีแถบ ดีเอ็นเอขนาด 310 bp

Initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตามขั้นตอนต่อไปนี้ จำนวน 35 รอบ

Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที
Annealing	50 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที
Elongation	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที
Final extention	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	10 นาที

9. Visualization

นำสารละลายจากปฏิกิริยาปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Bromophenol blue (0.25% Bromophenol blue, 30% glycerol) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำ Load บน 2% Agarose gel ใน TAE buffer (0.04 M Tris-Acetate, 0.01 M EDTA) Run gel ด้วยเครื่อง Electrophoresis เป็นเวลา 60 นาที ที่ กำลังไฟฟ้า 80 V จากนั้นตรวจสอบโดยใช้ UV-transilluminator พร้อมบันทึกภาพ