

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บเชื้อตัวอย่าง

1.1 Nutrient agar มีสูตรดังนี้

Beef extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
pH	± 7.0

นำส่วนผสมทั้งหมดมาใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร หลอมจนละลาย นำเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Disk diffusion

2.1 Trypticase soy broth

Tryptone	17.0 กรัม
Soytone	2.0 กรัม
Dextrose	2.5 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	2.5 กรัม
pH	7.0 ± 0.2

นำส่วนผสมทั้งหมดมาใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จนละลาย นำเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.2 Trypticase soy agar

Tryptone	17.0 กรัม
Soytone	2.0 กรัม
Dextrose	2.5 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	2.5 กรัม
Agar	15 กรัม
pH	7.3 ± 0.2

นำส่วนผสมทั้งหมดมาใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จนละลาย นำเชื้อในหม้อนี้ความ
 ดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.3 Mueller-Hinton agar มีสูตรดังนี้

Beef infusion	300.0 กรัม
Acid hydrolysate of casein	17.5 กรัม
Starch	1.5 กรัม
Agar	17.5 กรัม
pH	7.3 ± 0.1

นำส่วนผสมทั้งหมดมาใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร หลอมจนละลาย นำเชื้อในหม้อนี้
 ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ทดลอง

1. ชุดย้อมสี Gram's stain

1.1 Gram's crystal violet มีสูตรดังนี้

สารละลาย A

Crystal violet 2.0 กรัม

Ethyl alcohol (95%) 20.0 มิลลิลิตร

สารละลาย B

Ammonium oxalate 0.8 กรัม

น้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน แล้วนำไปกรอง เพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนออก

ก่อนนำไปใช้

1.2 Gram's iodine มีสูตรดังนี้

Iodine 1.0 กรัม

Potassium iodine 2.0 กรัม

น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกัน โดยละลาย Potassium iodine กับน้ำกลั่นก่อน

จากนั้นจึงเติม Iodine

1.3 Gram's safranin มีสูตรดังนี้

Safranin (2.5% solution in 95% ethyl alcohol) 10 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายกับน้ำกลั่นให้เข้ากันแล้วจึงนำไปใช้

1.4 Gram's alcohol มีสูตรดังนี้

Ethyl alcohol 98 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร

ผสมสารกับน้ำกลั่นให้เข้ากันแล้วจึงนำไปใช้

2. ทดสอบทางชีวเคมี

Hydrogen peroxide (H_2O_2) 3% สำหรับการทดสอบเอนไซม์ Catalase

การทดสอบเอนไซม์ Catalase

ใช้ Loop เขี่ยเชื้อวางลงบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยดน้ำยา Hydrogen peroxide (H_2O_2) เข้มข้น 3% ถ้าเป็นเชื้อ Staphylococci จะให้ผลบวก คือ เกิดฟองก๊าซขึ้นทันทีเป็นจำนวนมาก

Human plasma สำหรับการทดสอบเอนไซม์ Coagulase

การทดสอบเอนไซม์ Coagulase

นำพลาสมาที่ได้จากการปั่นแยกแล้ว แบ่งใส่หลอดทดลองขนาดเล็กที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยแบ่งใส่หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ Loop เขี่ยเชื้อ 1-2 โคโลนี ใส่ลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เชื้อที่เป็น *S. aureus* จะทำให้พลาสมาแข็งตัว เมื่อเอียงหลอดทดลองของเหลวในหลอดจะจับตัวกันเป็นก้อนวุ้นอยู่ที่ก้นหลอด

3. สารเคมีสำหรับ PCR

3.1 0.5 โมลาร์ Ethylene diamine tetraacetic (EDTA; pH 8.0)

EDTA (Dissodium salt, MW = 372.24) 18.6 กรัม

น้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร

กวนสารละลายด้วย Magnetic stirrer แล้วค่อย ๆ คอยเติมเกล็ด NaOH ลงจนกระทั่งได้ pH เท่ากับ 8.0 ซึ่งเป็น pH ที่ EDTA ละลายหมดพอดี ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2 10X Tris / EDTA (TE) buffer

2 โมลาร์ Tris-Cl, pH 8.0	25	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ EDTA	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	465	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.3 50X Tris-acetate-electrophoresis (TAE) buffer

Tris-base	242	กรัม
Glycyl acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.4 6X Gel loading-buffer

Bromophenol blue (MW=533.60)	0.25	กรัม
Xylene cyanol (MW=342.20)	0.25	กรัม
Sucrose ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร	40	กรัม

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5 Ethidium bromide stock solution (5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง Ethidium bromide 250 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนด้วย Magnetic stirrer จนกว่าจะละลาย เก็บสารไว้ในขวดที่ห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ค

วิธีการคำนวณจำนวนตัวอย่าง

สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่างของข้อมูลเชิงคุณภาพที่ได้จากการนับโดยฐานข้อมูลสถิติของศูนย์ฝางแห่งชาติ

$$\text{สูตร } n = Z^2 pq/d^2 \text{ (เดิมศรี, 2544)}$$

$$Z = \text{ค่า } Z \text{ จากตาราง } Z \text{ เมื่อ } \alpha = 0.5$$

$$p = \text{สัดส่วนความชุกของโรค}$$

$$q = 1 - p$$

$$d = \text{ความคลาดเคลื่อนของโอกาสที่พบโรค } 0.1 \times p$$

แสดงได้ดังนี้

1. ฐานข้อมูลสถิติของศูนย์ฝางแห่งชาติ ในปีพ.ศ. 2546 พบ *S. aureus* จำนวน 550 สายพันธุ์ แบ่งเป็น MSSA 220 สายพันธุ์ และ MRSA 330 สายพันธุ์

2. ฐานข้อมูลสถิติของศูนย์ฝางแห่งชาติ ในปีพ.ศ. 2547 พบ *S. aureus* จำนวน 312 สายพันธุ์ แบ่งเป็น MSSA 90 สายพันธุ์ และ MRSA 220 สายพันธุ์

3. นำข้อมูลทั้ง 2 ปี รวมกันได้เป็น *S. aureus* จำนวน 862 สายพันธุ์ แบ่งเป็น MSSA 440 สายพันธุ์ และ MRSA 420 สายพันธุ์

$$\text{MSSA} = \frac{440 \times 100}{862} = 49\%$$

$$\text{MRSA} = \frac{420 \times 100}{862} = 51\%$$

$$\text{สูตร } n = Z^2 pq/d^2$$

$$Z = \text{ค่า } Z \text{ จากตาราง } Z \text{ เมื่อ } \alpha = 0.5 \text{ มีค่า } 1.96$$

$$p = 0.49$$

$$q = 1 - 0.49 = 0.51$$

$$d = 0.1 \times 0.49 = 0.049$$

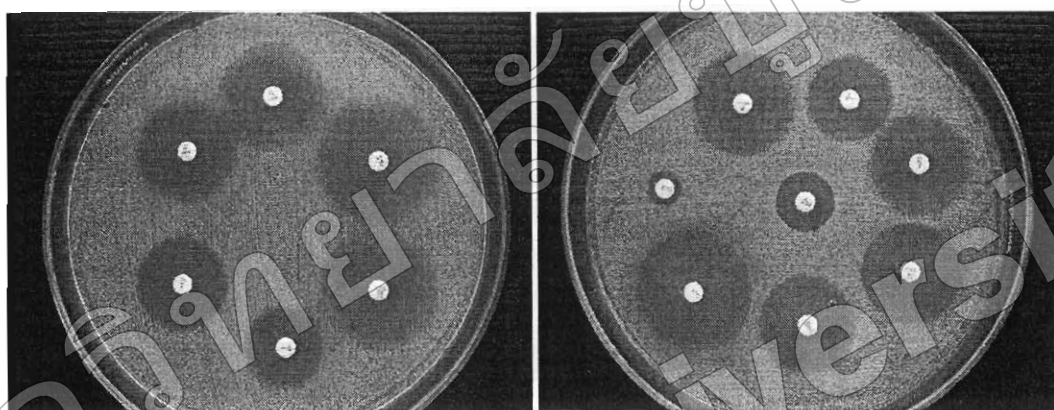
$$\text{ดังนั้น } n = \frac{(1.96)^2 \times 0.49 \times 0.51}{(0.049)^2} = 387.5 \sim 400 \text{ ตัวอย่าง}$$

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

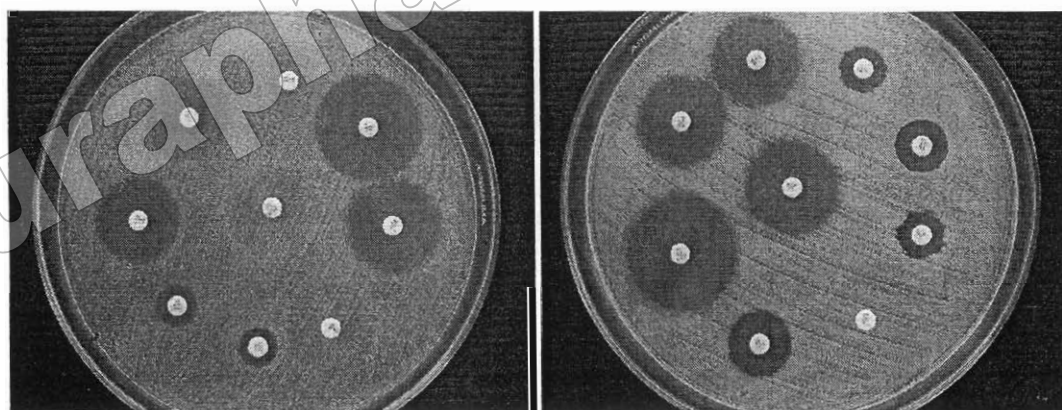
ภาคผนวก ง

วิธี Disk diffusion

วิธี Disk diffusion เป็นวิธีการทำให้ยาซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อแบคทีเรียจำนวนที่พอเหมาะไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เจริญ อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดของ Inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบๆ แผ่นยา แล้วแปลผลจากค่ามาตรฐานของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) กำหนดไว้



ภาพที่ 23ก แสดงผลของ Disk diffusion ของ MSSA ATCC 25923



ภาพที่ 23ข แสดงผลของ Disk diffusion ของ MRSA ATCC 43300

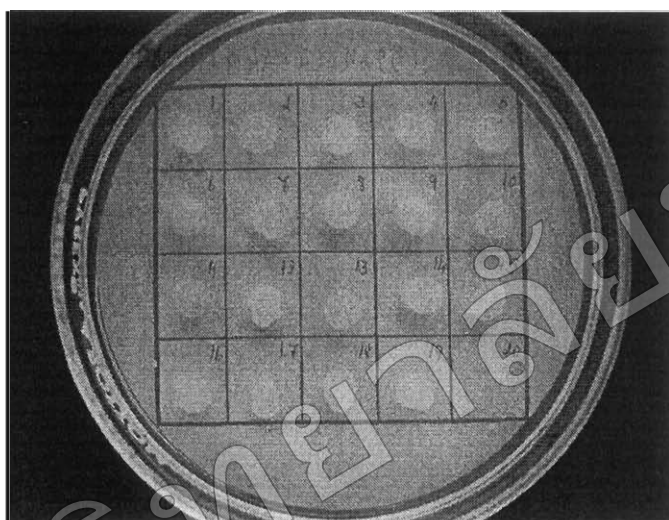
ตารางที่ 8 มาตรฐานสำหรับแปลผลความไวของเชื้อ *Staphylococcus* spp. (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2007)

Antimicrobial agent	Disk content (μ g)	Zone diameter (mm)			Control zone (<i>S. aureus</i> ATCC 25923)
		Resistant	Intermediate	Susceptible	
Ampicillin	10	≤ 28	-	≥ 29	27-35
Cefotaxime	30	≤ 14	15-22	≥ 23	25-31
Cefuroxime	30	≤ 14	15-17	≥ 18	27-35
Cephalexin	30	≤ 14	15-17	≥ 18	29-37
Chloramphenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18	19-26
Ciprofloxacin	5	≤ 15	16-20	≥ 21	22-30
Clindamycin	2	≤ 14	15-20	≥ 21	24-30
Cefoxitin	30	≤ 14	15-17	≥ 21	22-28
Erythromycin	15	≤ 13	14-22	≥ 23	22-30
Gentamicin	10	≤ 12	13-14	≥ 15	19-27
Oxacillin	1	≤ 10	-	≥ 13	18-24
Penicillin G	10	≤ 28	11-12	≥ 29	26-37
Trimethoprim- sulfamethoxazole	1.25	≤ 10	11-15	≥ 16	24-32
Vancomycin	30	≤ 9	-	≥ 15	15-19

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก จ

MICs โดยวิธี Agar dilution



ภาพที่ 24 การเจริญของ MRSA บนอาหาร MHA+ 4% NaCl
(Control)

1 ATCC 43300

2 H 33

3 H 37

4 H 41

5 H 42

6 P 1

7 P 3

8 P 4

9 P 5

10 P 6

11 P 8

12 P 9

13 P 11

14 P 36

15 P 40

16 P 63

17 P 64

18 P 65

19 P 68

20 ATCC 25923
