บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. แบคทีเรียทดสอบและแบคทีเรียมาตรฐาน

1.1 Methicillin-resistant *S. aureus* จำนวน 16 ไอโซเลท ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์และโรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา จำนวน 11 และ 5 ไอโซเลท ตามลำดับ

1.2 Methicillin-susceptible *S. aureus* จำนวน 16 ไอโซเลท ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์และโรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา จำนวน 10 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ

1.3 *S. aureus* ATCC 25923 และ ATCC 43300 ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (ภาคผนวก ก)

2.1 Mueller-Hinton agar (MHA; Difco, USA)

2.2 Nutrient agar (NA; Merck, Germany)

2.3 Trypticase soy agar (TSA; Difco, USA)

2.4 Trypticase soy broth (TSB; Difco, USA)

2.5 Human plasma

2.6 Oxacillin powder (Sigma, Germany)

2.7 Nitrocefin (Oxoid, UK)

2.8 ชุดสำหรับการย้อมสีแกรม

3. อุปกรณ์และเครื่องมืออื่น ๆ

3.1 จานเพาะเชื้อ (Petridish)

3.2 ลูป (Inoculating loop)

3.3 บีกเกอร์ (Beaker)

3.4 หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร (Test tube)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.5 หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร (Test tube)

3.6 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask)

3.7 ขวด Duran ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (Laboratory Bottle)

3.8 กระบอกตวงขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (Cylinder)

3.9 Microcentrifuge tube

3.10 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube)

3.11 หัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Millipore-filter)

3.12 ปิเปตแก้วขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร (Pipettes)

3.13 ไมโครปิเปตขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Micro pipettes)

3.14 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance; Mettler Toledo รุ่น PM6100, Switzerland)

3.15 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance; Mettler Toledo รุ่น AT200, Switzerland)

3.16 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Chermle รุ่น Z 230 MR)

3.17 เครื่องเขย่าเชื้อรูปกรวย (Shaker; PNP รุ่น OS-2)

3.18 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope; Olympus รุ่น CH30RF200, Japan)

3.19 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Incubator; Clayson รุ่น IM 1000)

3.20 ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส (Hot air oven; Memmert, Germany)

3.21 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminarflow; Super clean รุ่น 150 VC)

3.22 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave; Tommy รุ่น SS325, Japan)

3.23 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath; Schutzart รุ่น DIN40050-IP20, Memert, Germany)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บรักษาและตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียทดสอบทุกไอโซเลทที่ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสวรรค์-ประชารักษ์ โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จะถูกนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Sub culture) ก่อนโดยแบ่งเป็น 2 ชุด

1.1 ทดสอบเพื่อยืนยันชนิดของ *S. aureus* กับแบคทีเรียทดสอบชุดที่ 1 โดยทำการทดสอบดังนี้ (Hakim, Arshed, Iqbal, & Javaid, 2007)

1.1.1 การย้อมสีแกรม (Gram's stain)

1.1.2 การทดสอบ Catalase (Catalase test)

1.1.3 การทดสอบ Oxidase (Oxidase test)

1.1.4 การทดสอบ Coagulase (Coagulase test)

1.1.5 การทดสอบการสร้าง β-lactamase enzyme

เมื่อทำการทดสอบเพื่อยืนยันชนิดของ *S. aureus* แล้วพบว่าเป็น *S. aureus* จริง จึงนำแบคทีเรียทดสอบชุดที่ 2 ที่แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ไว้แล้วมาเก็บรักษา

1.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียทดสอบ *S. aureus* (Collins et al., 2004)

1.2.1 แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ลงบนอาหาร NA โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

1.2.2 คัดเลือกแบคทีเรียทดสอบโคโลนีเดี่ยว ๆ ถ่ายลงในอาหาร TSB โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.2.3 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน Microcentrifuge tube ที่มี 40% Glycerol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส โดยเก็บรักษาไว้ 2 ชุด โดยแบ่งเป็น Stock culture ถาวรและ Stock culture ที่ใช้ทำการวิจัย (Working stock)

2. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Oxacillin, Vancomycin และ Cefoxitin ของแบคทีเรียทดสอบ (Collins et al., 2004)

2.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

2.1.1 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบจาก Working stock ที่เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ลงบนอาหาร NA หรือ TSA โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

2.1.2 คัดเลือกแบคทีเรียทดสอบโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 4 - 5 โคโลนี ลงในอาหาร TSB โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

2.1.3 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนลงในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.1.4 นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำไปเทียบความขุ่นกับ Standard McFarland No. 0.5 ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับเชื้อแบคทีเรีย 1.5×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

2.2 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและการอ่านผล

2.2.1 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดที่มีแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อที่ 2.1 แล้วบิดหมาด ๆ กับข้างหลอด นำมาป้ายลงบนอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl เป็น 3 ระนาบแต่ละระนาบทำมุม 60 องศา ตั้งทิ้งไว้ 3 - 5 นาที

2.2.2 วางดิสก์ยา Oxacillin 1 ไมโครกรัม (OX 1 ไมโครกรัมต่อดิสก์), Vancomycin 30 ไมโครกรัม (VA 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) และ Cefoxitin 30 ไมโครกรัม (FOX 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์)

2.2.3 นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ชุดการทดลอง

2.2.4 สังเกตและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่แบคทีเรียทดสอบถูกยับยั้ง (Inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตร และบันทึกผลการทดสอบ

ซึ่งการใช้ Oxacillin disk ในการทดสอบเพื่อใช้ในการวิเคราะห์แยกแบคทีเรียกลุ่ม MRSA ออกจากแบคทีเรียทดสอบทั้งหมด ส่วนการใช้ Vancomycin disk เพื่อใช้ในการวิเคราะห์แยกแบคทีเรียกลุ่ม Vancomycin-resistant *S. aureus*

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลิกชนิดใหม่ (ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

3.1 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลิกชนิดใหม่ ด้วยวิธี Disk diffusion (Collins et al., 2004)

ทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลิกชนิดใหม่ทั้งหมด 12 ชนิด กับแบคทีเรียทดสอบ *S. aureus* ทั้งกลุ่ม MRSA จำนวน 12 ไอโซเลท และ MSSA จำนวน 11 ไอโซเลท

3.1.1 การเตรียมสารสังเคราะห์ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์

3.1.1.1 เตรียม Stock ของสารสังเคราะห์แต่ละชนิดความเข้มข้น 20 เท่าของ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (10,240 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยชั่งสารสังเคราะห์แต่ละชนิด 102.4 มิลลิกรัม ละลายด้วย 95% Ethanol 10 มิลลิลิตร เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.1.2 เพื่อเตรียมดิสก์ของสารสังเคราะห์แต่ละชนิด จำนวน 40 ดิสก์ ต้องใช้สารสังเคราะห์แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 800 ไมโครลิตร

3.1.1.3 เจือจางสารสังเคราะห์แต่ละชนิดจาก Stock ที่เตรียมไว้กับ 95% Ethanol เพื่อให้ได้สารที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม (สารสังเคราะห์ 40 ไมโครลิตร ละลายด้วย 95%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Ethanol 760 ไมโครลิตร), 200 ไมโครกรัม (สารสังเคราะห์ 80 ไมโครลิตร ละลายด้วย 95% Ethanol 720 ไมโครลิตร), 300 ไมโครกรัม (สารสังเคราะห์ 120 ไมโครลิตร ละลายด้วย 95% Ethanol 680 ไมโครลิตร), 400 ไมโครกรัม (สารสังเคราะห์ 160 ไมโครลิตร ละลายด้วย 95% Ethanol 640 ไมโครลิตร) และ 500 ไมโครกรัม (สารสังเคราะห์ 200 ไมโครลิตร ละลายด้วย 95% Ethanol 600 ไมโครลิตร)

3.1.2 การเตรียมดิสก์ของสารสังเคราะห์

3.1.2.1 นับดิสก์จำนวน 40 ดิสก์ ใส่ลงในจานเพาะเชื้อจำนวน 13 ชุด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ แล้วนำมาอบให้แห้ง

3.1.2.2 หยดสารสังเคราะห์แต่ละชนิดลงบนดิสก์ไร้เชื้อ ปริมาณดิสก์ละ 20 ไมโครลิตร และหยด 95% Ethanol ลงบนดิสก์ไร้เชื้อ ปริมาณดิสก์ละ 20 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นดิสก์ควบคุมการทดลอง (Negative control) ทิ้งไว้ในตู้เขี่ยเชื้อให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2.3 ทดสอบความไร้เชื้อ (Sterility test) ของดิสก์สารสังเคราะห์ที่เตรียม โดยวางดิสก์สารสังเคราะห์ที่แห้งแล้วลงบนจานอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูจากบริเวณรอบ ๆ ดิสก์ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย

3.1.2.4 เก็บดิสก์สารสังเคราะห์ที่ไร้เชื้อใส่ใน Dessicator ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.3 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

3.1.3.1 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบจาก Working stock ที่เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ลงบนอาหาร NA หรือ TSA โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

3.1.3.2 คัดเลือกแบคทีเรียทดสอบโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 4 - 5 โคโลนี ลงในอาหาร TSB โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3.1.3.3 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนลงในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.1.3.4 นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำไปเทียบความขุ่นกับ Standard McFarland No. 0.5 ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับเชื้อแบคทีเรีย 1.5×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

3.1.4 การทดสอบและการอ่านผล

3.1.4.1 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดที่มีแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อที่ 3.1.3 แล้วบิดหมาด ๆ กับข้างหลอด นำมาป้ายลงบนอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl เป็น 3 ระนาบแต่ละระนาบทำมุม 60 องศา ตั้งทิ้งไว้ 3 - 5 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.1.4.2 ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3 - 5 นาที แต่ไม่เกิน 15 นาที ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟทิ้งไว้สักครู่ให้เย็น แล้วหยิบแผ่นดิสก์วางบนผิวหน้าอาหาร กดเบา ๆ

3.1.4.3 นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ชุดการทดลอง

3.1.4.4 อ่านผลการทดลองโดยการสังเกตและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่แบคทีเรียทดสอบถูกยับยั้ง (Inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตรและบันทึกผลการทดสอบ โดยเลือกสารสังเคราะห์ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้สูงที่สุดนำมาทำการศึกษาต่อ

3.1.5 ชุดควบคุมการทดลอง

Positive control: Cefoxitin disk (FOX 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์)

Negative control: ดิสก์ที่บรรจุ 95% Ethanol

3.2 การหาค่า MIC ของสารสังเคราะห์ IMC1026 และยาปฏิชีวนะ Oxacillin ด้วยวิธี Agar dilution (Collins et al., 2004)

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสังเคราะห์กลุ่มสารประกอบฟีนอลิกชนิดใหม่ด้วยวิธี Disk diffusion พบว่า สารสังเคราะห์ IMC1026 นั้นแสดงฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำสารสังเคราะห์ IMC1026 มาทำการหาค่า MIC เพื่อหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแต่ละไอโซเลท

3.2.1 การเตรียมสารสังเคราะห์ IMC1026 ความเข้มข้น 160, 320, 640, 1,280, 2,560 และ 5,120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการผสมกับอาหาร MHA

3.2.1.1 ถ่ายสารสังเคราะห์ IMC1026 จาก Stock ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.1.1 ลงในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 6 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 6 มิลลิลิตร ก็จะได้สังเคราะห์ IMC1026 ที่มีความเข้มข้น 5,120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 12 มิลลิลิตร

3.2.1.2 เจือจางสารสังเคราะห์ IMC1026 แบบ 2 - Fold dilution ก็จะได้สารสังเคราะห์ IMC1026 ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 5,120, 2,560, 1,280, 640, 320 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 6 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.2.2 การเตรียมอาหารสำหรับใช้ผสมกับสารสังเคราะห์ IMC1026

3.2.2.1 ชั่งอาหาร MHA ปริมาณ 19 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมเกลือลงไปร้อยละ 4 (4% NaCl เท่ากับ 20 กรัม) ต้มอาหารให้วุ้นละลายเทใส่ในขวด Duran ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2.2.2 นำขวด Duran ที่บรรจุอาหารไปใส่ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเพื่อปรับอุณหภูมิของอาหาร MHA ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 - 50 องศาเซลเซียส

3.2.2.3 ถ่ายอาหาร MHA ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 18 มิลลิลิตร หลังจากนั้นถ่ายสารสังเคราะห์ IMC1206 แต่ละความเข้มข้นลงให้หลอดอาหาร หลอดละ 2 มิลลิลิตร (เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 9) ผสมให้เข้ากัน

3.2.2.4 เทใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ติดฉลากความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ IMC1026 บนจานอาหาร วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องภายในตู้เขี่ยเชื้อ

3.2.3 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

3.2.3.1 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบจาก Working stock ที่เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ลงบนอาหาร NA หรือ TSA โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

3.2.3.2 คัดเลือกแบคทีเรียทดสอบโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 4 - 5 โคโลนี ลงในอาหาร TSB โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3.2.3.3 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนลงในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2.3.4 นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำไปเทียบความขุ่นกับ Standard McFarland No. 0.5 ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับเชื้อแบคทีเรีย 1.5 x 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

3.2.3.5 เจือจางแบคทีเรียทดสอบแบบ 10 – Fold dilution ด้วย 0.85% Normal saline เพื่อปรับปริมาณแบคทีเรียทดสอบให้มีจำนวนประมาณ 1x10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร

3.2.4 การทดสอบและการอ่านผลการทดสอบ

3.2.4.1 หยดแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.3 ลงบนอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.2 ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในช่องที่ติดฉลากชนิดของแบคทีเรียทดสอบแต่ละไอโซเลทไว้ ดังภาพที่ 11

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 11 รูปแบบการหยดแบคทีเรียทดสอบลงในจานอาหาร MHA ที่เตรียมไว้ โดยมีการติดฉลากความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่ผสมเข้าด้วยกัน และมีการกำหนดช่องที่มีตัวเลขที่กำกับไว้สำหรับแบคทีเรียทดสอบแต่ละไอโซเลท

3.2.4.2 วางจานอาหารที่หยดแบคทีเรียทดสอบแล้วไว้ในตู้เขี่ยเชื้อเพื่อให้หยดของสารละลายเชื้อซึมเข้าไปในอาหารที่อุณหภูมิห้อง

3.2.4.3 บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง

3.2.4.4 สังเกตและบันทึกผลการทดสอบ โดยอ่านค่า MIC จากจานอาหาร MHA ที่มีสารสังเคราะห์ IMC1026 ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่แบคทีเรียทดสอบสามารถเจริญได้

3.2.5 ชุดควบคุมการทดลอง

Positive control: จานอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl

Negative control: จานอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl และน้ำกลั่นที่ใช้ในการเจือจางสารสังเคราะห์ IMC1026 ในขั้นตอนการเตรียมสารสังเคราะห์ IMC1026

3.3 การหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ Oxacillin ด้วยวิธี Agar dilution

3.3.1 การเตรียมยาปฏิชีวนะ Oxacillin ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1,280, 2,560 และ 5,120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการผสมกับอาหาร MHA

3.3.1.1 เตรียม Stock ของยาปฏิชีวนะ Oxacillin ที่มีความเข้มข้น 20 เท่าของ 512

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (10,240 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยตรียมจากยา Oxacillin powder ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 9.76 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.1.2 ถ่ายยาปฏิชีวนะ Oxacillin ใส่ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 6 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 6 มิลลิลิตร ก็จะได้ยาปฏิชีวนะ Oxacillin ที่มีความเข้มข้น 5,120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 12 มิลลิลิตร

3.3.1.3 เจือจางยาปฏิชีวนะ Oxacillin แบบ 2 - Fold dilution ก็จะได้ยาปฏิชีวนะ Oxacillin ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 5,120, 2,560, 1,280, 640, 320,160, 80, 40, 20, 10, 5 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 6 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.3.2 การเตรียมอาหารสำหรับใช้ผสมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin

3.3.2.1 ชั่งอาหาร MHA ปริมาณ 38 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมเกลือลงไปร้อยละ 4 (4% NaCl เท่ากับ 40 กรัม) ต้มอาหารให้วุ้นละลายเทใส่ในขวด Duran ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ

3.3.2.2 นำขวด Duran ที่บรรจุอาหารทั้ง 2 ขวด ไปใส่ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเพื่อปรับอุณหภูมิของอาหาร MHA ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 – 50 องศาเซลเซียส

3.3.2.3 ถ่ายอาหาร MHA ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 18 มิลลิลิตร หลังจากนั้นถ่ายยาปฏิชีวนะ Oxacillin แต่ละความเข้มข้นลงในหลอดอาหาร หลอดละ 2 มิลลิลิตร (เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 9) ผสมให้เข้ากัน

3.3.2.4 เทใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ติดฉลากความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ Oxacillin บนจานอาหาร วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องภายในตู้เขี่ยเชื้อ

3.3.2.5 จะได้อาหาร MHA ที่เติมเกลือร้อยละ 4 และผสมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin ความเข้มข้น 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.3.3 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

3.3.3.1 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบจาก Working stock ที่เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ลงบนอาหาร NA หรือ TSA โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

3.3.3.2 คัดเลือกแบคทีเรียทดสอบโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 4 - 5 โคโลนี ลงในอาหาร TSB โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3.3.3.3 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนลงในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.3.3.4 นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำไปเทียบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความขุ่นกับ Standard McFarland No. 0.5 ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับเชื้อแบคทีเรีย 1.5 x 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

3.3.3.5 เจือจางแบคทีเรียทดสอบแบบ 10 – Fold dilution ด้วย 0.85% Normal saline เพื่อปรับปริมาณแบคทีเรียทดสอบให้มีจำนวนประมาณ 1x10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร

3.2.4 การทดสอบและการอ่านผลการทดสอบ

3.3.4.1 หยดแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3 ลงบนอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.2 ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในช่องที่ติดฉลากชนิดของแบคทีเรียทดสอบแต่ละไอโซเลทไว้ ดังภาพที่ 12

ภาพที่ 12 รูปแบบการหยดแบคทีเรียทดสอบลงในจานอาหาร MHA ที่เตรียมไว้ โดยมีการติดฉลากความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ Oxacillin ที่ผสมเข้าด้วยกัน และมีการกำหนดช่องที่มีตัวเลขที่กำกับไว้สำหรับแบคทีเรียทดสอบแต่ละไอโซเลท

3.3.4.2 วางจานอาหารที่หยดแบคทีเรียทดสอบแล้วไว้ในตู้เขี่ยเชื้อเพื่อให้หยดของสารละลายเชื้อซึมเข้าไปในอาหารที่อุณหภูมิห้อง

3.3.4.3 บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง

3.3.4.4 สังเกตและบันทึกผลการทดสอบ โดยอ่านค่า MIC จากจานอาหาร MHA ที่มียาปฏิชีวนะ Oxacillin ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่แบคทีเรียทดสอบสามารถเจริญได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2.5 ชุดควบคุมการทดลอง

Positive control: จานอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl

Negative control: จานอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl และน้ำกลั่นที่ใช้ในการเจือจางยาปฏิชีวนะ Oxacillin ในขั้นตอนการเตรียมยาปฏิชีวนะ Oxacillin

4. การศึกษาคุณสมบัติการใช้ยาร่วมกันในการต้านแบคทีเรียระหว่างยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* กับสารสังเคราะห์ IMC1026 โดยวิธี Double disk diffusion synergy (ดัดแปลงจาก Shah et al., 2003)

4.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

4.1.1 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบจาก Working stock ที่เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ลงบนอาหาร NA หรือ TSA โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

4.1.2 คัดเลือกแบคทีเรียทดสอบโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 4 - 5 โคโลนี ลงในอาหาร TSB โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

4.1.3 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนลงในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4.1.4 นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำไปเทียบความขุ่นกับ Standard McFarland No. 0.5 ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับเชื้อแบคทีเรีย 1.5×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

4.2 การทดสอบและการอ่านผล

4.2.1 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดที่มีแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อที่ 4.1 แล้วบิดหมาด ๆ กับข้างหลอด นำมาป้ายลงบนอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl เป็น 3 ระนาบแต่ละระนาบทำมุม 60 องศา ตั้งทิ้งไว้ 3 - 5 นาที

4.2.2 ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3 - 5 นาที แต่ไม่เกิน 15 นาที ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟทิ้งไว้สักครู่ให้เย็น แล้วหยิบแผ่นดิสก์วางบนผิวหน้าอาหาร กดเบา ๆ

4.2.3 วางดิสก์สารสังเคราะห์ IMC1026 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.2 และดิสก์ยาปฏิชีวนะได้แก่ Vancomycin (VA 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์), Cefoxitin (FOX 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) และ Oxacillin (OX 1 ไมโครกรัมต่อดิสก์) วางโดยมีระยะห่างจากจุดศูนย์กลางของดิสก์หนึ่งไปถึงจุดศูนย์กลางของอีกดิสก์หนึ่ง (Center to center) ประมาณ 20 - 25 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 13

4.2.4 นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ชุดการทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.2.5 อ่านและบันทึกผลการทดลองโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของบริเวณที่แบคทีเรียทดสอบถูกยับยั้ง (Inhibition zone) ซึ่งอาจจะมีการโค้งนูนเข้าหากันของบริเวณยับยั้งหรือไม่เกิดบริเวณยับยั้งในด้านที่ติดกับดิสก์อื่น ๆ

4.3 ชุดควบคุมการทดลอง

Positive control: Cefoxitin disk (FOX 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์)

Negative control: ดิสก์ที่บรรจุ 95% Ethanol

ภาพที่ 13 รูปแบบการวางดิสก์เพื่อทดสอบการใช้ยาร่วมกันระหว่างสารสังเคราะห์ IMC1026 กับยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี Double disk diffusion

5. การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความไวต่อยาปฏิชีวนะ Oxacillin ของ *S. aureus* ATCC43300 โดยสารสังเคราะห์ชนิดใหม่ IMC1026 ด้วยวิธี IMC1026-induction (ดัดแปลงจาก Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assays, Lai and Kirsch, 1996)

การศึกษาเปรียบเทียบผลของความไวต่อยา Oxacillin ระหว่างแบคทีเรียทดสอบที่มีการสัมผัสกับสารสังเคราะห์ IMC1026 มาก่อนกับแบคทีเรียทดสอบที่ไม่เคยสัมผัสกับสารสังเคราะห์ IMC1026 ด้วยวิธี IMC1026-induction

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำให้ *S. aureus* ATCC43300 มีความไวต่อยา Oxacillin เพิ่มขึ้น

5.1.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

5.1.1.1 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบจาก Working stock ที่เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ลงบนอาหาร NA หรือ TSA โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

5.1.1.2 คัดเลือกแบคทีเรียทดสอบโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 4 - 5 โคโลนี ลงในอาหาร TSB โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

5.1.1.3 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนลงในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5.1.1.4 นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบโดยเทียบกับ Standard McFarland No. 2 ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับเชื้อแบคทีเรีย 6×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

5.1.2 การเตรียมยาปฏิชีวนะ Oxacillin ความเข้มข้น 160, 320, 640, และ1,280 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการผสมกับอาหาร MHA

5.1.2.1 ถ่ายยาปฏิชีวนะ Oxacillin จาก Stock ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.1.1 ลงในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 10.5 มิลลิลิตร ก็จะได้ยาปฏิชีวนะ Oxacillin ที่มีความเข้มข้น 1,280 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 12 มิลลิลิตร

5.1.2.2 เจือจางยาปฏิชีวนะ Oxacillin แบบ 2 - Fold dilution ก็จะได้ยาปฏิชีวนะ Oxacillin ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1,280, 640, 320 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 6 มิลลิลิตร ตามลำดับ

5.1.3 การเตรียมอาหารสำหรับใช้ผสมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin

5.1.3.1 ชั่งอาหาร MHA ปริมาณ 19 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมเกลือลงไปร้อยละ 4 (4% NaCl เท่ากับ 20 กรัม) ต้มอาหารให้วุ้นละลายเทใส่ในขวด Duran ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ

5.1.3.2 นำขวดที่บรรจุอาหารไปใส่ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเพื่อปรับอุณหภูมิของอาหาร MHA ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 - 50 องศาเซลเซียส

5.1.3.3 ถ่ายอาหาร MHA ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 18 มิลลิลิตร หลังจากนั้นถ่ายยาปฏิชีวนะ Oxacillin แต่ละความเข้มข้นลงให้หลอดอาหาร หลอดละ 2 มิลลิลิตร (เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 9) ผสมให้เข้ากัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.1.3.4 เทใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ติดฉลากความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ Oxacillin บนจานอาหาร วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องภายในตู้เขี่ยเชื้อ

5.1.3.5 จะได้อาหาร MHA ที่เติมเกลือลงไปร้อยละ 4 แล้วผสมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin ความเข้มข้น 128, 64, 32 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

5.1.4 การเตรียมสารสังเคราะห์ IMC1026 ความเข้มข้น 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการเหนี่ยวนำ

5.1.4.1 เนื่องจากความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำมีค่าที่ต่ำมาก จึงไม่สามารถถ่ายมาจาก Stock ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.1.1 ได้โดยตรง ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียมสารสารสังเคราะห์ IMC1026 อีกความเข้มข้นหนึ่งจาก Stock คือ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.1.4.2 ถ่ายสารสังเคราะห์ IMC1026 มาจาก Stock ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.1.1 ปริมาณ 250 ไมโครลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 9,750 ไมโครลิตร ก็จะได้สังเคราะห์ IMC1026 ที่มีความเข้มข้น 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

5.1.5 การเหนี่ยวนำแบคทีเรียทดสอบด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.1.5.1 เหนี่ยวนำแบคทีเรียทดสอบ โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

หลอดที่ 1 ไม่ถูกเหนี่ยวนำ (Uninduce)

หลอดที่ 2 เหนี่ยวนำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1.4 โดยใส่สารสังเคราะห์ IMC1026 ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดแบคทีเรียทดสอบ ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เพื่อทำให้สารสังเคราะห์ IMC1026 มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.1 MIC)

หลอดที่ 3 เหนี่ยวนำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1.4 โดยใส่สารสังเคราะห์ IMC1026 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดแบคทีเรียทดสอบ ปริมาณ 9.5 มิลลิลิตร เพื่อทำให้สารสังเคราะห์ IMC1026 มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 12.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.05 MIC)

5.1.5.2 นำหลอดทดลองทุกชุดการทดสอบไปเขย่าบนเครื่องเขย่ารูปกรวย

5.1.5.3 เก็บตัวอย่างใส่ใน Microcentrifuge tube หลอดละ 1 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24, 48, 72 และ 96

5.1.5.4 ปั่นล้างเซลล์ด้วย TSB 2 - 3 ครั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.1.5.5 นำเซลล์มา Resuspend กลับด้วย 0.85% NaCl แล้วปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบให้เท่ากับหลอดที่มีความขุ่นน้อยที่สุด

5.1.6 การทดสอบและการอ่านผล

5.1.6.1 นำแบคทีเรียทดสอบที่เหนี่ยวนำในข้อ 5.1.5 มาเจือจางแบบ 10-Fold dilution ตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-6}

5.1.6.2 หยดแบคทีเรียทดสอบแต่ละความเจือจางลงบนอาหาร MHA ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1.3 ปริมาณหยดละ 10 ไมโครลิตร ดังภาพที่ 14

5.1.6.3 วางจานอาหารที่หยดแบคทีเรียทดสอบแล้วไว้ในตู้เขี่ยเชื้อเพื่อให้หยดของสารละลายเชื้อซึมเข้าไปในอาหารที่อุณหภูมิห้อง

5.1.6.4 นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส อ่านและบันทึกผลการทดลองที่ 48 ชั่วโมง

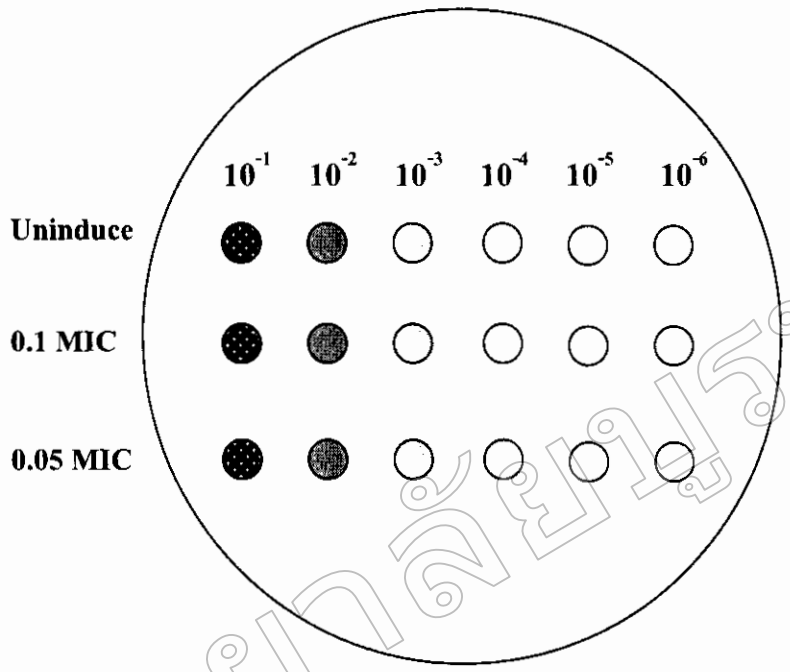
5.1.6.5 อ่านผลโดยการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทดสอบในแต่ละความเจือจางที่สามารถเจริญบนอาหารทดสอบได้ แล้วนำไปคำนวณเพื่อหาจำนวนของแบคทีเรียทดสอบเป็นค่า CFU ต่อมิลลิลิตร

5.1.7 ชุดควบคุมการทดลอง

Positive control: จานอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl

Negative control: จานอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl และและน้ำกลั่นที่ใช้ในการเจือจางสารสังเคราะห์ IMC1026 ในขั้นตอนการเตรียมสารสังเคราะห์ IMC1026

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 14 รูปแบบการหยดแบคทีเรียทดสอบที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่เวลาต่าง ๆ กัน

5.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำให้ *S. aureus* ATCC43300มีความไวต่อยา Oxacillin เพิ่มขึ้น

5.2.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

5.2.1.1 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบจาก Working stock ที่เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ลงบนอาหาร NA หรือ TSA โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

5.2.1.2 คัดเลือกแบคทีเรียทดสอบโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 4 - 5 โคโลนี ลงในอาหาร TSB โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

5.2.1.3 ถ่ายแบคทีเรียทดสอบข้ามคืนลงในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5.2.1.4 นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบโดยเทียบกับ Standard McFarland No. 2 ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับเชื้อแบคทีเรีย 6×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

5.2.2 การเตรียมยาปฏิชีวนะ Oxacillin ความเข้มข้น 160, 320, 640, และ1,280 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการผสมกับอาหาร MHA

5.2.2.1 ถ่ายยาปฏิชีวนะ Oxacillin จาก Stock ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.1.1 ลงใน

หลอดที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 10.5 มิลลิลิตร ก็จะได้ยาปฏิชีวนะ Oxacillin ที่มีความเข้มข้น 1,280 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 12 มิลลิลิตร

5.2.2.2 เจือจางยาปฏิชีวนะ Oxacillin แบบ 2 - Fold dilution ก็จะได้ยาปฏิชีวนะ Oxacillin ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1,280, 640, 320 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 6 มิลลิลิตร ตามลำดับ

5.2.3 การเตรียมอาหารสำหรับใช้ผสมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin

5.2.3.1 ชั่งอาหาร MHA ปริมาณ 19 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมเกลือลงไปร้อยละ 4 (4% NaCl เท่ากับ 20 กรัม) ต้มอาหารให้วุ้นละลายเทใส่ในขวด Duran ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ

5.2.3.2 นำขวดที่บรรจุอาหารไปใส่ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเพื่อปรับอุณหภูมิของอาหาร MHA ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 – 50 องศาเซลเซียส

5.2.3.3 ถ่ายอาหาร MHA ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 18 มิลลิลิตร หลังจากนั้นถ่ายยาปฏิชีวนะ Oxacillin แต่ละความเข้มข้นลงให้หลอดอาหาร หลอดละ 2 มิลลิลิตร (เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 9) ผสมให้เข้ากัน

5.2.3.4 เทใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ติดฉลากความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ Oxacillin บนจานอาหาร วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องภายในตู้เขี่ยเชื้อ

5.2.3.5 จะได้อาหาร MHA ที่เติมเกลือลงไปร้อยละ 4 แล้วผสมกับยาปฏิชีวนะ Oxacillin ความเข้มข้น 128, 64, 32 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

5.2.4 การเหนี่ยวนำแบคทีเรียทดสอบด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.2.4.1 เหนี่ยวนำแบคทีเรียทดสอบ โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

หลอดที่ 1 ไม่ถูกเหนี่ยวนำ (Uninduce)

หลอดที่ 2 เหนี่ยวนำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1.4 โดยใส่สารสังเคราะห์ IMC1026 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดแบคทีเรียทดสอบ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เพื่อทำให้สารสังเคราะห์ IMC1026 มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.5 MIC)

หลอดที่ 3 เหนี่ยวนำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1.4 โดยใส่สารสังเคราะห์ IMC1026 ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดแบคทีเรียทดสอบ ปริมาณ 7.5 มิลลิลิตร เพื่อทำให้สารสังเคราะห์ IMC1026 มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 51.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.2 MIC)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หลอดที่ 4 เหนี่ยวนำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1.4 โดยใส่สารสังเคราะห์ IMC1026 ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดแบคทีเรียทดสอบ ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เพื่อทำให้สารสังเคราะห์ IMC1026 มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.1 MIC)

หลอดที่ 5 เหนี่ยวนำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1.4 โดยใส่สารสังเคราะห์ IMC1026 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดแบคทีเรียทดสอบ ปริมาณ 9.5 มิลลิลิตร เพื่อทำให้สารสังเคราะห์ IMC1026 มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 12.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.05 MIC)

5.2.4.2 นำหลอดทดลองทุกชุดการทดสอบไปเขย่าบนเครื่องเขย่ารูปกรวย

5.2.4.3 เก็บตัวอย่างใส่ใน Microcentrifuge tube หลอดละ 1 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24

5.2.4.4 ปั่นล้างเซลล์ด้วย TSB 2 - 3 ครั้ง

5.2.4.5 นำเซลล์มา Resuspend กลับด้วย 0.85% NaCl แล้วปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบให้เท่ากับหลอดที่มีความขุ่นน้อยที่สุด

5.2.6 การทดสอบและการอ่านผล

5.2.6.1 นำแบคทีเรียทดสอบที่เหนี่ยวนำในข้อ 5.2.4 มาเจือจางแบบ 10-Fold dilution ตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-6}

5.2.6.2 หยดแบคทีเรียทดสอบแต่ละความเจือจางลงบนอาหาร MHA ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.2.3 ปริมาณหยดละ 10 ไมโครลิตร ดังภาพที่ 15

5.2.6.3 วางจานอาหารที่หยดแบคทีเรียทดสอบแล้วไว้ในตู้เขี่ยเชื้อเพื่อให้หยดของสารละลายเชื้อซึมเข้าไปในอาหาร ที่อุณหภูมิห้อง

5.2.6.4 นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส อ่านและบันทึกผลการทดลองที่ 48 ชั่วโมง

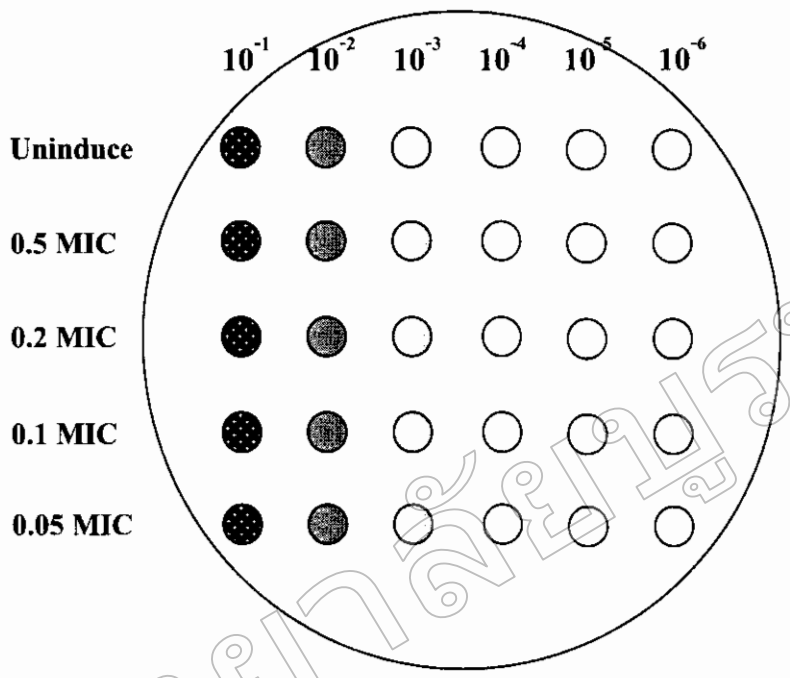
5.2.6.5 อ่านผลโดยการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทดสอบในแต่ละความเจือจางที่สามารถเจริญบนอาหารทดสอบได้ แล้วนำไปคำนวณเพื่อหาจำนวนของแบคทีเรียทดสอบเป็นค่า CFU ต่อมิลลิลิตร

5.2.7 ชุดควบคุมการทดลอง

Positive control: จานอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl

Negative control: จานอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl และและน้ำกลั่นที่ใช้ในการเจือจางสารสังเคราะห์ IMC1026 ในขั้นตอนการเตรียมสารสังเคราะห์ IMC1026

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 15 รูปแบบการหยดแบคทีเรียทดสอบที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสารสังเคราะห์ IMC1026 ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University