บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Brain Heart Infusion (BHI) broth
- Blood agar (BA)
- Mueller-Hinton agar (MHA) + 2% NaCl
- DNase agar

1.2 การทดสอบทางชีวเคมี

- Catalase (3 % H_2O_2)
- Coagulase (0.5 ml plasma)

1.3 แผ่นยา (antimicrobial disc) : oxacillin (1 ug), erythromycin (15 ug), gentamicin (10 ug), tetracycline (30 ug), trimethroprim-sulfamethoxazone (30 ug), amikacin (30 ug), chloramphenicol (30 ug), rifampicin (5 ug), ciprofloxacin (5 ug), vancomycin (30 ug), teicoplanin (30 ug) (Oxoid)

1.4 สารเคมี

- DNA extraction reagent (DNA zol) (Invitrogen)
- 0.5 X Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer
- Absolute ethanol
- 75% Ethanol
- Sterile UltraPure water (GIBCO BRL)
- 0.8 mM NaOH
- Ethidium bromide
- Agarose gel (Seakem)
- 100-1,500 base pair ladder DNA marker (Roche Applied Science)
- Gel loading dye
- 10 mM dNTP : dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Invitrogen)
- 5 unit/ul Taq DNA polymerase (Invitrogen)

- 5 unit/ul *Alu*I (Invitrogen)
- 10 X PCR buffer (Invitrogen)
- 50 mM $MgCl_2$ (Invitrogen)

2. ตัวอย่างเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จำนวน 129 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจต่างๆ เช่น เลือด (hemoculture) ปัสสาวะ (urine) หนองที่เกิดจากการติดเชื้อบริเวณบาดแผล (wound infection) เสมหะ (sputum) จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลทั้งสิ้น 17 โรงพยาบาล จาก 4 ภาค ได้แก่ ภาคกลาง จำนวน 39 สายพันธุ์ ภาคเหนือ จำนวน 24 สายพันธุ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 24 สายพันธุ์ และภาคตะวันออก จำนวน 42 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.1) โดยทำการเก็บสิ่งส่งตรวจและวินิจฉัยแยกเชื้อ MRSA ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2546 ถึงเดือนมีนาคม 2547 และเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* เป็นสายพันธุ์ควบคุมลบ (negative control)

วิธีการวิจัย

1. การทดสอบยืนยันเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

1.1 ทำการย้อมแกรม (วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์ และคณะ. 2547)

1.2 ทดสอบ catalase

ทำการเขี่ยเชื้อลงบนสไลด์ แล้วหยด 3% H_2O_2 ผลบวกจะเกิดฟองก๊าซขึ้นทันที

1.3 ทดสอบ coagulase

ทำการเขี่ยเชื้อลงใน 0.5 ml plasma จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 4-24 ชั่วโมง ผลบวก plasma จะเกิดการแข็งตัวเป็นก้อน (clot) ภายในเวลา 4 ถึง 24 ชั่วโมง

1.4 ทดสอบ DNase

ทำการเขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DNase agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาราดทับด้วย 0.1 N HCl ผลบวกจะเกิดโซนใสรอบๆ โคโลนีเชื้อแสดงว่าเชื้อมีเอนไซม์ DNase

1.5 ทดสอบความไวของเชื้อต่อยา oxacillin (1 ug) โดยวิธี disc diffusion ตามวิธีมาตรฐาน NCCLS (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต. 2547)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน blood agar มาปรับความขุ่นใน brain-heart infusion broth ให้เชื้อมีความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland standard number 1 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1.5 X 10^8 colony forming unit/ml (CFU/ml) ใช้ swab จุ่มเชื้อแล้วนำมา spread ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar + 2% NaCl จากนั้นวางแผ่นยา oxacillin (1 ug) นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมใส (inhibition zone) รอบแผ่นยาเปรียบเทียบกับเส้นผ่าศูนย์

กลางของโซนใสมาตรฐาน (ตารางที่ 3.2) แปลผลเป็นไวต่อยา (sensitive; susceptible) ดื้อต่อยา (resistant) หรือไวปานกลาง (intermediate)

2. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ทางฟีโนทัยป์ โดยการศึกษาแบบแผนการดื้อยาของเชื้อ (antibiogram) ด้วยวิธี disc diffusion (Rossney A และคณะ. 1994, Montesinos I และคณะ. 2002, Hoefnagels-Schuermans และคณะ. 1997)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน blood agar มาปรับความขุ่นใน brain-heart infusion broth ให้เชื้อมีความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland standard number 1 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 (CFU/ml) ใช้ swab จุ่มเชื้อแล้วนำไป spread ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar + 2% NaCl จากนั้นวางแผ่นยาชนิดต่างๆ จำนวน 10 ชนิดได้แก่ erythromycin (15 ug), gentamicin (10 ug), tetracycline (30 ug), trimethoprim-sulfamethoxazone (30 ug), amikacin (30 ug), chloramphenicol (30 ug), rifampicin (5 ug), ciprofloxacin (5 ug), vancomycin (30 ug), teicoplanin (30 ug) นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar + 2% NaCl ไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) รอบแผ่นยาเปรียบเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมใสมาตรฐาน (ตารางที่ 3.2) แปลผลเป็นไวต่อยา (sensitive; susceptible) ดื้อต่อยา (resistant) หรือไวปานกลาง (intermediate)

3. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ทางจีโนทัยป์ โดยวิธี Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ของ coagulase gene (Hooky J และคณะ. 1998, Hooky J และคณะ. 1999, Goh S และคณะ. 1994, Stranden A และคณะ. 2003, Scharzkopf A และคณะ. 1994)

3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ตามวิธีมาตรฐานของ DNA zol extraction reagent (Invitrogen)

เขี่ยเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่เพาะเลี้ยงบน blood agar จำนวน 2-5 โคโลนีหรือขนาด 1 loop นำมา suspend ใน sterile normal saline ปริมาตร 100 ul ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนใส (supernatant) ทิ้งไป เติม DNA zol reagent ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากันเบาๆ (mix invert) ทิ้งไว้ 5-10 นาที เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นนำไปปั่นที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 800-1,000 ul ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ เติม absolute ethanol ลงไปปริมาตร 400-500 ul (0.5 volume) เพื่อทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75 % ethanol ปริมาตร 800-1,000 ul นำไปปั่นที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ

4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air dry) จากนั้นทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 0.8 mM NaOH ปริมาตร 100 ul เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่ใช้ในการทดสอบ

ภาค	โรงพยาบาล	จำนวนสายพันธุ์
1. กลาง	1. โรงพยาบาลปทุมธานี	6
	2. โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์	29
	3. โรงพยาบาลนครนายก	3
	4. โรงพยาบาลอ่างทอง	1
2. เหนือ	5. โรงพยาบาลนครพิงค์ เชียงใหม่	12
	6. โรงพยาบาลเพชรบูรณ์	8
	7. โรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์	4
3. ตะวันออกเฉียงเหนือ	8. โรงพยาบาลค่ายประจักษ์ศิลปาคม	2
	9.โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น	5
	10.โรงพยาบาลยโสธร	1
	11.โรงพยาบาลสกลนคร	1
	12.โรงพยาบาลศูนย์อุดรธานี	6
	13.โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อุบลราชธานี	7
	14.โรงพยาบาลนครพนม	2
4. ตะวันออก	15.โรงพยาบาลพระปกเกล้าจันทบุรี	13
	16.โรงพยาบาลศูนย์ชลบุรี	27
	17.โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร์	2
รวม		**129**

ตารางที่ 3.2 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) มาตรฐานของยา

ชนิดของยา	ดื้อ (resistant) (mm)	ไวปานกลาง (intermediate) (mm)	ไว (sensitive) (mm)
1. Oxacillin (OX) (1 ug)	≤10	11-12	≥ 13
2. Erythromycin (ERY) (15 ug)	≤13	14-22	≥ 23
3. Gentamicin (GEN) (10 ug)	≤12	13-14	≥15
4. Tetracycline (TET) (30 ug)	≤14	15-18	≥19
5. Trimethoprim-sulfamethoxazone (SXT) (30 ug)	≤10	11-15	≥10
6. Amikacin (AMK) (30 ug)	≤14	15-16	≥14
7. Chloramphenicol (CHL) (30 ug)	≤12	13-17	≥ 18
8. Rifampicin (RIF) (5 ug)	≤16	17-19	≥ 20
9. Ciprofloxacin (CIP) (5 ug)	≤15	16-20	≥ 21
10. Vancomycin (VAN) (30 ug)	≤ 9	10-11	≥12
11. Teicoplanin (TEC) (30 ug)	≤10	11-13	≥14

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ coagulase gene ในหลอดทดลอง (*in vitro* DNA amplification) โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) (Goh S และคณะ. 1992, Strander A และคณะ. 2003)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ coagulase gene โดยใช้ COA1 และ COA2 primer ที่มีลำดับเบสดังนี้

COA1 primer : 5' ATA GAG ATG CTG GTA CAG G 3'

COA2 primer : 5' GCT TCC GAT TGT TCG ATG C 3'

เติมสารละลายดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 3.3) ลงใน thin-wall plastic-tube ที่มีขนาด 0.2 ml

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการทำ PCR ของ coagulase gene

สารละลาย	ปริมาตร (ul)
1. Sterile UltraPure water (GIBGO BRL)	35
2. 10 X PCR buffer (Invitrogen)	5
3. 50 mM $MgCl_2$ (Invitrogen)	1.5
3. 10 mM dNTP (Invitrogen)	1
4. 10 uM COA1 primer	1
5. 10 uM COA2 primer	1
6. 5 unit/ul Taq DNA polymerase (Invitrogen)	0.5
7. DNA template	5
Total	**50**

จากนั้นนำ thin-wall plastic tube มาใส่ในเครื่อง Thermal cycler GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer) เพื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในสภาวะดังนี้

1. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
2. Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
3. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 30 รอบ โดยรอบแรก ทำการ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที เพื่อทำให้เกิดการแยกสายดีเอ็นเอจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ และรอบสุดท้าย (รอบที่ 30) ทำการ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อทำให้เกิดการต่อสายดีเอ็นเอเส้นใหม่อย่างสมบูรณ์

3.3 ตรวจสอบ PCR product ที่เกิดขึ้นโดยนำ PCR product มาวิ่งผ่าน agarose gel ภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

นำ PCR product ปริมาตร 10 ul มาวิ่งผ่าน 2% agarose gel (Seakem) ใน 0.5 X Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้า 50 Volts นาน 1-2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ 100-1,500 base pair (bp) ladder DNA marker นำ 2% agarose gel มาย้อมสี ethidium bromide แล้วนำมาส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet; UV) บันทึกภาพที่เกิดขึ้น

4. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ทางจีโนทัยป์ โดยวิธี Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ของ coagulase gene (Hooky J และคณะ. 1998, Hooky J และคณะ. 1999) ทำการสกัดดีเอ็นเอ

จากเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ coagulase gene โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) (ข้อ 3.1-3.2) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ปริมาตร 10 µl นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นนำมา run 2% agarose gel electrophoresis (ข้อ 3.3)