บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและชุดทดสอบทางชีวเคมี

- Thiosulfate citrate bile salt (TCBS) agar
- Tryptic soy agar (TSA) + 2% NaCl
- Tryptic soy broth (TSB) + 2% NaCl
- Mueller-Hinton agar (MHA) + 2% NaCl
- Triple sugar iron (TSI) agar
- Motile-Indole-Lysine medium (MIL) + 1% NaCl
- Urea agar
- Methyl red (MR)-Voges-Proskauer (VP) broth + 1% NaCl
- Ornithine decarboxylase medium (OD) + 1% NaCl
- Arginine decarboxylase medium (AD) + 1% NaCl
- Lysine decarboxylase medium (LD) + 1% NaCl
- Nutrient broth + 0% NaCl
- Nutrient broth + 1% NaCl
- Nutrient broth + 8% NaCl
- Nutrient broth + 10% NaCl
- Citrate utilization test
- Oxidase test
- 0.5 Mc Farland No. 1
- 0.85% Normal saline

1.2 แผ่นยา (antimicrobial disc)

- Ampicillin (10 μg)
- Ceftriaxone (30 μg)

- Cephalothin (30 μg)
- Chloramphenicol (30 μg)
- Ciprofloxacin (5 μg)
- Gentamicin (10 μg)
- Nitrofurantoin (300 μg)
- Norfloxacin (10 μg)
- Oxytetracycline (30 μg)
- Sulfisoxazole (250 μg)
- Tetracycline (30 μg)
- Trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 μg)

1.3 สารเคมี

- GF-1 Bacterial DNA extraction kit (Vivantis)
- 1 X Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer
- Absolute ethanol
- 70% Ethanol
- Sterile UltraPure water (GIBCO BRL)
- 10 mg/ml Ethidium bromide (Vivantis)
- Agarose gel (Vivantis)
- 100-1,500 base pair ladder DNA marker (Vivantis)
- 6 X Gel loading dye (Vivantis)
- 10 mM dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (Vivantis)
- 5 units/μl *Taq* DNA polymerase (Vivantis)
- ERIC-PCR primers (ERIC 1R/ERIC 2)
- AP-PCR primer (random primer2)

1.4 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมืออื่นๆ

- Microcentrifuge tube ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร
- Automatic pipette tip
- Thermal cycler machine (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400)

- Refrigerated-microcentrifuge (Hettich Mikro 22R)
- Horizontal gel electrophoresis set (Mupid EX-U)
- Gel Documentation System (Viber Lourmat Doc-Print-1000/2)

2. ตัวอย่าง

V. parahaemolyticus ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนมิถุนายน 2551 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2552 จำนวนทั้งสิ้น 70 ไอโซเลท

3. วิธีการวิจัย

3.1 การทดสอบยืนยัน *V. parahaemolyticus*

ทดสอบยืนยัน *V. parahaemolyticus* โดยทำการย้อมสีแกรม ทดสอบ oxidase และพิสูจน์เชื้อโดยชุดทดสอบชีวเคมี TSI, MIL + 1% NaCl, Simmon's Citrate agar, Urea agar, MR - VP broth + 1% NaCl, OD + 1% NaCl, AD + 1% NaCl, LD + 1% NaCl, Nutrient broth + 0% NaCl, Nutrient broth + 1% NaCl, Nutrient broth + 8% NaCl, Nutrient broth + 10% NaCl

3.2 การจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ทางฟีโนทัยป์ โดยการศึกษาแบบแผนการดื้อยาของเชื้อ (antibiotyping) ด้วยวิธี disc diffusion (CLSI. 2009 ; Quintoil et al. 2007 ; Tjaniadi et al. 2003 : 666–667)

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน Tryptic soy agar (TSA) + 2% NaCl มาปรับความขุ่นใน 0.85% normal saline ให้เชื้อมีความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 colony forming unit/ml (CFU/ml) ใช้ sterile swab จุ่มเชื้อแล้วนำไปป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) + 2% NaCl จากนั้นวางแผ่นยาที่ต้องการทดสอบทั้ง 12 ชนิด ได้แก่ ampicillin (10 μg), ceftriaxone (30 μg), cephalothin (30 μg), chloramphenicol (30 μg), ciprofloxacin (5 μg), gentamicin (10 μg), nitrofurantoin (300 μg), norfloxacin (10 μg), oxytetracycline (30 μg), sulfisoxazole (250 μg), tetracycline (30 μg) และ trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 μg) บนเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) ที่ได้เปรียบเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสมาตรฐาน แปลผลเป็นไวต่อยา (susceptible) ไวต่อยาปานกลาง (intermediate) หรือ ดื้อต่อยา

(resistant) และทำการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* เป็นสายพันธุ์ต่างๆ ตามแบบแผนการดื้อยา ทั้ง 12 ชนิด

3.3 การจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ทางจีโนทัยป์ โดยวิธี arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) และ enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR)

1. การสกัดดีเอ็นเอจาก *V. parahaemolyticus*

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) + 2% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด (GF-1 Bacterial DNA extraction kit, Vivantis) ตามวิธีมาตรฐานของบริษัทผู้ผลิต ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Tris-EDTA (TE) buffer pH 8.0 ปริมาตร 50 µl วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm เจือจางดีเอ็นเอของเชื้อที่ได้ให้มีความเข้มข้น 25 ng/µl และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบ

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อในหลอดทดลองโดยวิธี arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) (Matsumoto et al. 2000 : 578-585 ; Okura et al. 2003 : 4676-4682 ; Okura et al. 2004 : 787-790)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของเชื้อแต่ละตัวอย่างตรวจมาเพิ่มจำนวนโดยวิธี AP-PCR ด้วย random primer2 (5'-GTT TCG CTC C-3') โดยทำปฏิกิริยาที่ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 20 µl ประกอบด้วย 1 X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 µM random primer2, 0.5 units *Taq* DNA polymerase และ 25 ng template DNA (ตารางที่ 3.1) โดยใช้สภาวะในการทำ PCR ดังนี้

1. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
2. Annealing ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
3. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 45 รอบ โดยรอบแรกทำการ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เพื่อทำให้เกิดการแยกสายดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ และรอบสุดท้าย

(รอบที่ 45) ทำการ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อทำให้เกิดการต่อสายดีเอ็นเอเส้นใหม่อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบในการทำ AP-PCR

สารละลาย	ปริมาตร (µl)
1. 10 X PCR buffer (Vivantis)	2
2. 50 mM $MgCl_2$ (Vivantis)	0.6
3. 10 mM dNTPs (Vivantis)	0.4
4. 10 µM random primer2	2
5. 5 units/µl *Taq* DNA polymerase (Vivantis)	0.1
6. 25 ng/µl template DNA	1
7. Sterile UltraPure water (GIBGO BRL)	13.9
ปริมาตรรวม	**20**

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อในหลอดทดลองโดยวิธี enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) (Versalovic, Koeuth and Lupski. 1999 : 6823-6831 ; Marshall et al. 1999 : 2473-2478 ; Khan et al. 2002 : 209-214 ; Maluping et al. 2005 : 383-391 ; Wilson and Sharp. 2006 : 1156-1168)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของเชื้อแต่ละตัวอย่างตรวจมาเพิ่มจำนวนโดยวิธี ERIC-PCR โดยใช้ ERIC 1R และ ERIC 2 primer ที่มีลำดับเบสดังนี้

ERIC 1R primer: 5’-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3’

ERIC 2 primer: 5’-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G -3’

โดยทำปฏิกิริยาที่ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 20 µl ประกอบด้วย 1 X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0.5 µM ERIC 1R primer,

0.5 μM ERIC 2 primer, 0.5 units *Taq* DNA polymerase และ 25 ng template DNA (ตารางที่ 3.2) โดยใช้สภาวะในการทำ PCR ดังนี้

1. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
2. Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที
3. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 30 รอบ โดยรอบแรกทำการ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เพื่อทำให้เกิดการแยกสายดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ และรอบสุดท้าย (รอบที่ 30) ทำการ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อทำให้เกิดการต่อสายดีเอ็นเอเส้นใหม่อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบในการทำ ERIC-PCR

สารละลาย	**ปริมาตร (μl)**
1. 10 X PCR buffer (Vivantis)	2
2. 50 mM $MgCl_2$ (Vivantis)	0.6
3. 10 mM dNTPs (Vivantis)	0.4
4. 10 μM ERIC 1R primer	1
5. 10 μM ERIC 2 primer	1
6. 5 units/μl *Taq* DNA polymerase (Vivantis)	0.1
7. 25 ng/μl template DNA	1
8. Sterile UltraPure water (GIBGO BRL)	13.9
ปริมาตรรวม	**20**

4. การตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยวิธี agarose gel electrophoresis

นำ PCR product ปริมาตร 10 µl ผสมกับ 6 X gel loading dye ปริมาตร 2 µl มาแยกขนาดของสายดีเอ็นเอบน 1.5% agarose gel ใน 1 X Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ นาน 45-60 นาที เปรียบเทียบขนาดของสายดีเอ็นเอกับ 100-1,500 base pair ladder DNA marker จากนั้นนำ 1.5% agarose gel ไปย้อมสี ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ และบันทึกภาพภายใต้เครื่อง UV-transilluminator

ทำการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ทางจีโนทัยป์ เป็นสายพันธุ์ต่างๆ โดยการวิเคราะห์ผลของขนาดและจำนวนของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค AP-PCR (AP-PCR genotyping) และเทคนิค ERIC-PCR (ERIC-PCR genotyping)

3.3 การประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ (discriminatory power) ของแต่ละวิธี

การประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ (discriminatory power) ทำโดยการคำนวณหาค่าดัชนีของความหลากหลาย (diversity index) ตามวิธีของ Hunter and Gaston (Hunter and Gaston. 1988 : 1903-1905 ; Hunter. 1990 : 2465-2466) ซึ่งคำนวณค่า Simpson's index of diversity ตามสูตร ดังนี้

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{s} x_j(x_j - 1)$$

เมื่อ D = index of discriminatory power

N = จำนวนเชื้อทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ

S = จำนวนสายพันธุ์ (types) ที่จำแนกได้ทั้งหมด

x_j = จำนวนไอโซเลทที่พบในสายพันธุ์ (types) นั้นๆ (j^{th} type)

ในงานวิจัยนี้คำนวณค่า discriminatory power (D) โดยใช้เครื่องมือคำนวณ discriminatory power calculator ออนไลน์ http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/?show=formula