บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและชุดทดสอบทางชีวเคมี

- Blood agar
- MacConkey agar
- Mueller-Hinton agar (MHA)
- Tryptic soy agar (TSA)
- Triple sugar iron (TSI) agar
- Motile-Indole-Lysine medium (MIL)
- Urea agar
- OF glucose
- OF lactose
- Nutrient broth
- Simmon's citrate agar
- Oxidase test
- 0.85% Normal saline

1.2 แผ่นยา (antimicrobial disk)

- Imipenem disk (10 μg) (Oxoid)

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)
- $bla_{\text{IMP-1-type}}$-, $bla_{\text{VIM-2-type}}$-, $bla_{\text{OXA-23-like}}$- PCR primers (BioBasic Inc.)
- 0.5 Mc Farland standard
- 0.5 M EDTA (Vivantis)

1.4 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมืออื่นๆ

- Blank disk
- Microcentrifuge tube ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร
- Automatic pipette tip
- Automatic pipette (Gilson)
- PCR Thermocycler (Mastercycler® pro S, Eppendorf)
- Refrigerated-microcentrifuge (Hettich Mikro 22R)
- Horizontal gel electrophoresis set (Mupid EX-U)
- Gel Documentation System (Viber Lourmat Doc-Print-1000/2)

2. ตัวอย่างเชื้อ

2.1 เชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา imipenem ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2553 จำนวน 84 สายพันธุ์ จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ ได้แก่ เสมหะ บาดแผล ปัสสาวะ และเลือด ร้อยละ 73.8 (62/84), 17.9 (15/84), 7.1 (6/84) และ 1.2 (1/84) ตามลำดับ

2.2 เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและเชื้อควบคุมผลลบ

- *Escherichia coli* ATCC 25922

2.3 เชื้อควบคุมผลบวก

- *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase (KPC) และมียีน $bla_{\text{IMP-1-type}}$ (ได้รับเชื้อโดยความอนุเคราะห์ของ ดร. พิริยาภรณ์ จงตระกูล ภาควิชาพยาธิวิทยาคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล)

- *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ที่มียีน $bla_{\text{VIM-2-type}}$ และ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่มียีน $bla_{\text{OXA-23-like}}$ (ได้รับเชื้อโดยความอนุเคราะห์ของ ดร. ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ และนางสาวพรรณธิภา สมานไทย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

3. วิธีการวิจัย

3.1 การทดสอบยืนยันเชื้อ *A. baumannii*

ทดสอบยืนยันเชื้อ *A. baumannii* โดยเพาะบนอาหาร blood agar และ MacConkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ได้มาทดสอบ oxidase และพิสูจน์เชื้อโดยชุดทดสอบชีวเคมี (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีและผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *A. baumannii*

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
Blood agar	โคโลนีทึบแสง ขนาด 2-4 มิลลิเมตร ไม่มี hemolysis
MacConkey agar	late lactose fermenter
Oxidase	-
TSI	K/K
Indole	-
Motile	-
Simmon's citrate agar	+
Urea agar	+/-
OF glucose	+
OF lactose	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	+

3.2 การทดสอบการดื้อยา imipenem ของเชื้อ *A. baumannii* โดยวิธี disk diffusion

เพาะเชื้อ *A. baumannii* บน tryptic soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นใน 0.85% normal saline ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland standard (เชื้อประมาณ 1.5 X 10^8 CFU/ml) ใช้ sterile swab จุ่มเชื้อแล้วนำไปป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar จากนั้นวางแผ่นยา imipenem บนเชื้อที่เตรียมไว้ นำไป

บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) เปรียบเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสตามตารางมาตรฐานของ CLSI (CLSI. 2010) รายงานผลตามเกณฑ์ดังนี้

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ≥ 16 มิลลิเมตร รายงาน ไว (susceptible)

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14-15 มิลลิเมตร รายงาน ไวปานกลาง (intermediate)

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ≤ 13 มิลลิเมตร รายงาน ดื้อ (resistant)

3.3 การหาค่า MIC ต่อยา imipenem ของเชื้อ *A. baumannii* โดยวิธีอัตโนมัติ (VITEK® 2 Systems)

นำเชื้อ imipenem-resistant *A. baumannii* มาทดสอบยืนยันการดื้อยาโดยการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธีอัตโนมัติ (VITEK® 2 Systems) ตามวิธีมาตรฐานของบริษัทผู้ผลิต รายงานผลตามเกณฑ์ดังนี้

MIC ≥ 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รายงาน ดื้อ (resistant)

MIC = 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รายงาน ไวปานกลาง (intermediate)

MIC ≤ 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รายงาน ไว (susceptible)

3.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ class B and D carbapenem-hydrolysing β-lactamases ของเชื้อ imipenem-resistant *A. baumannii* โดยวิธี modified Hodge test (Jesudason, Kandathil and Balaji. 2005 : 780-783 ; Lee et al. 2007 : 633-639)

เพาะเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 บน tryptic soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นใน 0.85% normal saline ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland standard และเจือจางใน 0.85% normal saline อัตราส่วน 1:10 (เชื้อประมาณ 10^7 CFU/ml) ใช้ sterile swab จุ่มเชื้อที่เจือจางแล้วนำไปป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar จากนั้นวางแผ่นยา imipenem ที่บริเวณจุดศูนย์กลางของจานอาหาร ใช้ลูปลากเชื้อ imipenem-resistant *A. baumannii* จากขอบแผ่นยาไปที่ขอบจานอาหาร โดยทดสอบซ้ำเชื้อละ 2 ชุด ดังนั้น 1 จานอาหารทดสอบได้ 2 เชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลบวกโดยดูการเกิดลักษณะวงใสที่มีการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 เกิดขึ้นตามรอย streak ของเชื้อทดสอบที่สร้างเอนไซม์ได้ เรียกว่า cloverleaf shape แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ class B and D carbapenem-hydrolysing β-lactamases การทดสอบนี้ใช้ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase (KPC) และมียีน $bla_{\text{IMP-1-type}}$, *A. baumannii* สายพันธุ์ที่มียีน $bla_{\text{OXA-23-like}}$ และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่มียีน $bla_{\text{VIM-2-type}}$ เป็นเชื้อควบคุมผลบวก

3.5 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ metallo-β-lactamases ของเชื้อ imipenem-resistant *A. baumannii* โดยวิธี imipenem-EDTA double disk synergy test (Jesudason et al. 2005 : 780-783 ; Lee et al. 2007 : 633-639)

เพาะเชื้อ *A. baumannii* บน tryptic soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นใน 0.85% normal saline ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland standard และเจือจางใน 0.85% normal saline อัตราส่วน 1:10 (เชื้อประมาณ 10^7 CFU/ml) ใช้ sterile swab จุ่มเชื้อที่เจือจางแล้วนำไปป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar จากนั้นวางแผ่นยา imipenem และ blank disk ให้ขอบ disk ห่างกัน 10 มิลลิเมตร บนเชื้อที่เตรียมไว้ จากนั้นใช้ autopipette หยด 0.1 M EDTA 5 ไมโครลิตร บน blank disk นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลบวกโดยดูการเสริมฤทธิ์ของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ imipenem (enlarged zone of inhibition) ระหว่าง disk แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ metallo-β-lactamases การทดสอบนี้ใช้ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase (KPC) และมียีน $bla_{\text{IMP-1-type}}$ และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่มียีน $bla_{\text{VIM-2-type}}$ เป็นเชื้อควบคุมผลบวก

3.6 การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่ม carbapenems โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่ม carbapenems ได้แก่ ยีน $bla_{\text{IMP-1-type}}$, $bla_{\text{VIM-2-type}}$ และ $bla_{\text{OXA-23-like}}$ ในเชื้อ *A. baumannii* ทุกสายพันธุ์

1. การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *A. baumannii*

เพาะเชื้อ *A. baumannii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด (GF-1 Bacterial DNA extraction kit, Vivantis) ตามวิธีมาตรฐานของบริษัทผู้ผลิต ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Tris-EDTA (TE) buffer pH 8.0 ปริมาตร 50 µl เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบ

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อในหลอดทดลองโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) (Lee et al. 2005 : 4485-4491 ; Fiett et al. 2006 : 880-886 ; Jeon et al. 2005 : 2241-2245 ; Afzal-Shah et al. 2001 : 583-8)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR ด้วย specific primer sets ที่จำเพาะต่อยีนดื้อยาชนิด $bla_{\text{IMP-1-type}}$, $bla_{\text{VIM-2-type}}$ และ $bla_{\text{OXA-23-like}}$ (ตาราง

ที่ 3.2) โดยทำปฏิกิริยาที่ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วย 1 X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 µM ของ primer แต่ละชนิด และ 0.5 units *Taq* DNA polymerase (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.2 Oligonucleotide primers ที่ใช้ตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่ม carbapenems ในการวิจัยครั้งนี้

Class	Target β-lactamases	Primer pairs	Sequences (5'→3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature (°C)	เอกสารอ้างอิง
B	IMP-1-type (IMP-1, IMP-3, IMP-5, IMP-6, IMP-10)	*bla* IMP-1-type F *bla* IMP-1 type R	CAT GGT TTG GTG GTT CTT GT ATA ATT TGG CGG ACT TTG GC	488	60	Jeon et al. 2005 : 2241-2245
	VIM-2-type (VIM-2, 3, 6, 8, 9, 10, 11b)	*bla* VIM-2-type F *bla* VIM-2-type R	ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG CTA CTC AAC GAC TGA GCG AT	801	53	Fiett et al. 2006 : 880-886
D	OXA-23-like (OXA-23, 27, 49)	*bla* OXA-23-like F *bla* OXA-23-like R	GAT GTG TCA TAG TAT TCG TCG TCA CAA CAA CTA AAA GCA CTG	1,058	53	Afzal-Shah et al. 2001 : 583-588

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการทำ PCR

สารละลาย	ปริมาตร (µl)
1. 10X PCR buffer	2
2. 50 mM $MgCl_2$	0.6
3. 10 mM dNTPs	0.4
4. 20 µM forward primer	1
5. 20 µM reverse primer	1
6. 5 units/µl *Taq* DNA polymerase	0.5
7. Template DNA	1
8. Sterile UltraPure water	13.5
ปริมาตรรวม	20

โดยใช้สภาวะในการทำ PCR ดังนี้

1. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
2. Annealing ที่อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับแต่ละ specific primer sets (50-60 องศาเซลเซียส) แสดงดังตารางที่ 3.2 นาน 45 วินาที
3. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ โดยรอบแรกทำการ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อทำให้เกิดการแยกสายดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ และรอบสุดท้าย (รอบที่ 35) ทำการ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เพื่อทำให้เกิดการต่อสายดีเอ็นเอเส้นใหม่อย่างสมบูรณ์

การทดสอบนี้ใช้ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase (KPC) และมียีน $bla_{\text{IMP-1-type}}$, *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่มียีน $bla_{\text{VIM-2-type}}$ และ *A. baumannii* สายพันธุ์ที่มียีน $bla_{\text{OXA-23-like}}$ เป็นเชื้อควบคุมผลบวก และใช้ *Escherichia coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุมผลลบ

3. การตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยวิธี agarose gel electrophoresis

นำ PCR product ปริมาตร 5 µl ผสมกับ 6 X gel loading dye ปริมาตร 1 µl มาแยกขนาดของสายดีเอ็นเอบน 1.5% agarose gel ใน 1 X Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ นาน 90 นาที เปรียบเทียบขนาดของสายดีเอ็นเอกับ 100-1,500 base pair ladder DNA marker จากนั้นนำ 1.5% agarose gel ไปย้อมสี ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ และบันทึกภาพภายใต้เครื่อง UV-transilluminator

4. การวิเคราะห์ และแปลผลการทดลอง

ทำการจำแนกชนิดของเอนไซม์กลุ่ม metallo-β-lactamases และ carbapenem - hydrolysing class D β-lactamases ที่เชื้อสร้าง โดยแปลผลจากผลตรวจหายีนที่จำเพาะต่อเอนไซม์แต่ละชนิด โดยใช้เทคนิค PCR ด้วย specific primer ต่อยีนดื้อยาชนิดต่างๆ และให้ PCR product ขนาดที่คาดว่าจะได้รับ (expected amplicon size) แสดงดังตารางที่ 3.2

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學