บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. เชื้อที่ใช้ในการศึกษา

1.1 ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระไก่ในฟาร์มอายุประมาณ 3 – 4 สัปดาห์ ฟาร์มละ 120 ตัวอย่าง จำนวน 10 ฟาร์ม รวม 1,200 ตัวอย่าง โดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากจุลชีพ(sterile cotton swab) สอดเข้าบริเวณก้น (cloacal swab) แล้วเก็บใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ Carry Blair transport medium นำกลับมาห้องปฏิบัติการ เก็บในอุณหภูมิ 4^0 ซ ก่อนทำการทดสอบ

1.2 เก็บอุจจาระจากคนเลี้ยงไก่ 14 ตัวอย่างใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากจุลชีพป้ายอุจจาระและเติมใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 1.1

1.3 Clinical Isolates ของเชื้อ Enterococci ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจำนวน 1,854 ราย ระหว่าง พ.ศ. 2538-2542 และเก็บไว้ที่ศูนย์สเตรปโตคอกคัสแห่งชาติ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 Reference strain ที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย *E. faecalis* ATTC 29212 และ *S. aurues* ATTC 25923

2. วิธีการทดลอง[18,22,52]

2.1 การแยกแยะและพิสูจน์เชื้อ

2.1.1. ทำการถ่ายเชื้อจาก transport media ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะกับเชื้อเอ็นเตอร์โรค็อกคัส (KF Streptococcus agar) ที่มีส่วนผสมของยา vancomycin 6 ug/ml และไม่มีส่วนประกอบของยา ต่อมาใช้ลูพ(loop) streak บนวุ้นเพื่อให้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37^0 ซ นาน 48 ชั่วโมง

2.1.2. ศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อโดยการดูขนาด จำนวน และสีของโคโลนีที่โตบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ และตักเชื้อจำนวน 3 โคโลนี ที่โตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของยา 6 ug/ml มาทำการยืนยันโดยเพาะเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบน blood agar ที่มีส่วนประกอบของเลือดแกะ 5 เปอร์เซ็นต์ อบที่อุณหภูมิ 37^0 ซ นาน 24 ชม. ทำการยืนยันเชื้อ Enterococci โดยการย้อมสีแกรม (gram strain) , ปฏิกิริยา Catalase, Bile esculin, 6.5 % NaCl และปฏิกริยา PYR ดังผลการทดสอบในตารางที่ 11

2.2.3 เชื้อที่ยืนยัน genus enterococcus ทำการเก็บเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลเก็บที่อุณหภูมิ -70 ^{0}ซ เพื่อรอทำการศึกษาต่อไป

2.2. ทดสอบความไวรับของเชื้อ

2.2.1 เชื้อที่แยกได้ และ Reference strains คือ *E. faecalis* ATTC 29212 และ *S. aureus* ATTC 25923 ทำการถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar อบที่อุณหภูมิ 37^0 ซ ข้ามคืน

2.2.2 ทำการทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยาแวนโคมัยซิน โดยใช้วิธี E-test (AB-Biodisk, Solna) วิธีดังนี้

2.2.2.1 เตรียม inoculum

2.2.2.1.1. ใช้ลูพเขี่ยเชื้อที่อบข้ามคืนที่ได้ pure culture 3-5 โคโลนีใสหลอด trypticasen soy broth 5 มล.

2.2.2.1.2 นำไปอบที่อุณหภูมิ 37^0ซจนมีความขุ่นมากกว่า0.5 McFarland standard นาน 2-8 ชม.

2.2.2.1.3 ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standand ด้วย sterile normal saline

2.2.2.2. inoculation บนจานเลี้ยงเชื้อ

2.2.2.2.1 ใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อแล้วจุ่มใน inoculum ที่เตรียมไว้และกดเบา ๆกับข้างหลอดไม่ให้ swab ชุ่มเกินไป เพื่อลดจำนวนเชื้อที่มีมากเกินไป

2.2.2.2.2 inoculate เชื้อโดยใช้ swab ได้จากข้อ 2.2.2.2.1 และ streak ลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar ให้ทั่ว

2.2.2.2.3 streak ซ้ำ 2 ครั้ง โดยทำการหมุนจานเลี้ยงเชื้อให้ทำมุม 60 องศา ระหว่างการ streak แต่ละครั้ง

2.2.2.2.4 ทิ้งผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้แห้งประมาณ 3-5 นาที แต่ไม่เกิน 15 นาที

2.2.2.3. วางแผ่น E-test strip

2.2.2.3.1 ใช้ forcep คีบแผ่น E-test และวางแผ่น E-test ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ โดยหงายแผ่น E-test ให้ด้านที่อ่านได้อยู่ด้านบน ใช้ forcep กดเบา ๆให้สัมผัสกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อสนิทตลอดแผ่น

2.2.2.3.2 นำไปอบที่อุณหภูมิ 37^0 ซ นาน 24 ชม.โดยการคว่ำจานเลี้ยงเชื้อ

2.2.2.3.3 การอ่านผลสามารถอ่านผล MIC ได้โดยตรงอ่านสเกลบนแผ่น E-test บริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตเป็น ug/ml

2.2.2.3.4 การตัดสิน VRE โดยการคัดเชื้อที่ให้ค่า MIC ต่อยา vancomycin $\geq$ 8 ug/ml

2.3. การทดสอบทาง genotype โดยเทคนิค Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)[70-71]

2.3.1.การเตรียมเชื้อ

2.3.1.1 นำ 1 โคโลนีของเชื้อ VRE ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion agar (BHA) เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธ์ อบที่อุณหภูมิ 37^0 ซ ข้ามคืน

2.3.1.2 นำ 1 โคโลนีของเชื้อที่เจริญบน BHA ถ่ายลงใน 0.5 มล.ของ Brain heart infusion broth (BHIB) อบที่ 37^0 ซ นาน 2-3 ชม. เพื่อให้น้ำเลี้ยงเชื้อขุ่น

2.3.1.3 ใช้ loop จุ่มเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ขุ่นแล้ว streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHA เพื่อแยกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ อบที่อุณหภูมิ 37^0 ซ ข้ามคืน

2.3.1.4 นำ 1 โคโลนีของเชื้อจาก BHA ถ่ายลงใน BHIB จำนวน 5 มล. อบที่อุณหภูมิ 37^0 ซ ข้ามคืน

2.3.1.5 ใช้ไปเปตที่ปราศจากเชื้อดูดเชื้อจำนวน 4 มล.ที่อบข้ามคืนเติมลงใน PIV หลอด buffer (1 M NaCl, 10 mM Tris pH 7.6) จำนวน 5 มล. ที่แช่ในน้ำแข็ง.

2.3.1.6 ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอด microcentrifuge จำนวน 6 หลอด เท่า ๆกัน

2.3.1.7 นำไปปั่นที่ 1,100 rpm ที่อุณหภูมิ 4^0 ซ นาน 5 นาที

2.3.1.8 ค่อยๆ ดูดน้ำใสออกให้เหลือส่วนที่ตกตะกอน แล้วเติม PIV buffer จำนวน 1 มล.ผสมให้เข้ากัน

2.3.2 การเตรียม plug mold

2.3.2.1. เตรียมเจล(low meltting agarose (Gibco.BBL, Spain) (1.6 w/v) โดยการชั่งเจล 0.16 กรัม เทใส่ flask ขนาด 20 มล.จากนั้นเติม PIV buffer จำนวน 10 มล.

2.3.2.2. ละลายเจลโดยเข้าตู้ไมโครเวฟ นานประมาณ 2 นาที เพื่อให้เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2.3.2.3. ใช้ micropipettle ดูดเจลปริมาตร 400 โมโครลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge จากนั้นแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 50^0 ซ

2.3.2.4 ใช้ micropipettle ดูดเชื้อที่เตรียมใน PIV buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรเติมลงใน 400 ไมโครลิตรของ low meltting agarose gel ในอัตราส่วน (1:1) ผสมให้เข้ากัน

2.3.2.5. ใช้ micropipeltte ดูด 300 ไมโครลิตรของ aliqeost หยดลงในหลุม (well) ซึ่งแช่ในอุณหภูมิ 4^0 ซ ก่อนใช้ 15 นาที

2.3.2.6. วางหลุม well ในอุณหภูมิ 4^0 ซ นาน 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว

2.3.3 การเตรียม buffer

2.3.3.1. เตรียม lysis buffer(6 mM Tris pH7.6, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% sodium laurly sarcosine , 0.2 % deoxycholate และ 0.5 % Brij 58) มี ปริมาตรรวม 500 มล.

2.3.3.2 ใช้ปิเปตดูด lysis buffer จำนวน 40 มล.ใส่ flask ขนาด 100 มล.

2.3.3.3 ใช้ micropipettle ดูดเอ็นไซม์ lysozyme(Ameresco,U.S.A) จำนวน 800 ไมโครลิตร (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และเอ็นไซม์ RNAase A (Ameresco,U.S.A) จำนวน 40 ไมโครลิตร(20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เติมลงใน lysis buffer ผสมให้เข้ากัน

2.3.3.4 ดูด lysis solution ใส่หลอดขนาด 15 มล.หลอดละ 4 มล. เขียนหมายเลขข้างหลอด

2.3.3.5 นำ plug ออกจากตู้เย็น ใช้แผ่นกดเพื่อดัน plug ให้ตกลงไปในหลอดที่มีส่วนผสมของ lysis solution จำนวน 4 มล.

2.3.3.6 นำหลอดเข้าอบที่อุณหภูมิ 37^0ซ ข้ามคืนโดยการใช้เครื่อง shaking incubator

2.3.3.7 ค่อย ๆ ดูด lysis buffer ออกในแต่ละหลอด แล้วเติม EDTA solution

2.3.3.8 protenase K (ESP) buffer ที่มีส่วนประกอบของ protenase K 100 ไมโครลิตร ใน 40 มิลลิลิตร(50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ ES buffer(0.5 M EDTA, 10% sodium lauroly sarcosine) ลงไปหลอดละ 4 ml

2.3.3.9 นำไปอบต่อที่อุณหภูมิ 50^0ซ ข้ามคืนโดยใช้ (shaking Incubator) ที่มีความเร็ว (speed) เท่ากับ 80 รอบ/วินาที

2.3.3.10 นำหลอดออกจากเครื่อง shaking incubator และลดอุณหภูมิจาก 50^0 ซ ให้ลดลงที่ 37^0 ซ

2.3.3.11 ใช้ micropipettle ดูด ESP solution ออกจากหลอดให้หมด ล้าง plug ด้วย 1XTE buffer (10 mM Tris pH 7.6 และ 0.1 mM EDTA) 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37^0ซ โดยใช้ shaking Incubator

2.3.3.12 ต่อมาล้าง plug ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เก็บในตู้เย็น 4^0 ซ ก่อนนำไปตัดด้วยเอ็นไซม์

2.3.4 การเตรียมเอ็นไซม์เพื่อย่อย plug mold

2.3.4.1 เตรียม restriction buffer ในอัตราส่วน (1:9) โดยการดูด restriction buffer จำนวน 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจำนวน 900 ไมโครลิตร

2.3.4.2 เติมเอ็นไซม์ *Sma* I (Gibco.BBL ,Spain) 80 U ต่อ 1 มิลลิลิตร (20 ยูนิตต่อ 1 ตัวอย่าง)

2.3.4.3 แบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 250 มิลลิลิตร

2.3.4.4 ใช้ coverslip ตัดชิ้น plug ให้มีขนาด 1 มม. ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น

2.3.4.5 ตัก plug ที่ตัดแล้วใส่ในหลอด microcentrifuge tube ที่มีส่วนประกอบของเอ็นไซม์ 20 ยูนิต *Sma* I

2.3.4.6 นำเข้าอบที่ waterbath อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง

2.3.4.7 นำ plug ออกจาก waterbath และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

2.3.4.8 เติม Tris EDTA buffer จำนวน 1 มิลลิลิตร ทุกหลอดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^0 ซ รอการ loading ต่อไป

2.3.5 การเตรียมเจลและการ loading

2.3.5.1 ชั่งเจล (Ultrapure high-melting temperature agarose USB,USA, 1 กรัม (1% w/v) USB,USA) เทลง flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 0.5×Tris-Base EDTA buffer ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

2.3.5.2 ทำให้เจลละลายโดยใช้ไมโครเวฟนานประมาณ 2 นาที เพื่อให้เนื้อเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แช่ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 50^0 ซ ก่อนเท

2.3.5.3 เตรียม moud โดยใช้ 10 well comb วางใน moud ที่มีการปรับพื้นให้เสมอกันแล้ว

2.3.5.4 นำเจลออกจาก waterbath และค่อยๆ เทลงไปใน mound ไม่ให้มีฟองอากาศ ทิ้งให้แข็งประมาณ 15 นาที แล้วจึงดึง well comb ออก

2.3.5.5 ใช้ specular ตัก slice plug ที่ย่อยแล้ว วางใน plate ที่สะอาด load ลงไปในหลุม well ตามหมายเลขที่กำหนด

2.3.5.6 ดูด 2 % low melting point agarose ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.1. หยด ปิดหลุมเพื่อป้องกันการหลุดของ plug ออกจากหลุม well ในช่วงการ run

2.3.5.7 ค่อย ๆ ดึงเจลออกจาก moud และวางใน PFGE Tank (CHEF-DRIII System Biorad, USA) ที่มี 0.5× Tris-Base EDTA buffer และทำการ Electrophoresis โดยใช้ condition ดังนี้ V =6 v/m , initial switching time 5S, final switching time 35S ใช้อุณหภูมิ 14^0 ซ ใช้ running time 30 ชม. โดยใช้ lamda ladder marker(Bio-rad,U.S.A)

2.3.6 การย้อมเจล

2.3.6.1 นำเจลออกจาก Tank และย้อมเจลด้วย 0.025 % ethidium bromide นาน 30 นาที

2.3.6.2 ต่อมาล้างเจลด้วยน้ำกลั่น นาน 30 นาที

2.3.6.3 นำเจลไปส่องดูด้วยแสง UV ที่ Image analysis Gel Doc 1000

2.3.6.4 ถ่ายรูปภายใต้แสง UV และแปลผล

2.3.7 การแปลผล

2.3.7.1 ตัวอย่างที่ได้จากการทำ PFGE ในตัวอย่างทั้งไก่และผู้ป่วยมาแปลผลโดยใช้หลักการของ Tenover และคณะ ปี1995[73]