บทที่ 3
วิธีการดำเนินการ

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่เข้าทำการรักษาในโรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลกโรงพยาบาลแม่สอด และโรงพยาบาลในแถบภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 165 ตัวอย่าง และเชื้อแบคทีเรียควบคุม ได้แก่ เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ R154 เป็น Positive control (produced AmpC β –lactamase) และเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ ATCC 700603 เป็น Negative control (no AmpC β –lactamase) และเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษายีนดื้อยาชนิด pAmpC ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. George A. Jacoby ได้แก่ เชื้อ *E. coli* J53 (pSLK54), ACC-1; *E. coli* J53 (pMG251), ACT-1; *E. coli* J53 (pMG250), CMY-2; *E. coli* J53 (pMG247), DHA-1; *E. coli* J53 (pCG1), FOX-4, and *E. coli* J53 (pMG223), MIR-1 ซึ่งใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียควบคุมผลบวกสำหรับ plasmid-mediated AmpC β-lactamase และเชื้อควบคุมผลลบได้แก่ เชื้อ *E. coli* 25922

จากนั้นนำมาศึกษา ณ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

เพื่อศึกษาเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิด pAmpC ที่ระบาดในโรงพยาบาลในแถบภาคเหนือตอนล่าง

2. เพื่อกำหนดแนวทางในการวางแผ่นยาสำหรับตรวจกรองหาเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิด pAmpC เพื่อใช้สำหรับห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก

3.2 การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ pAmpC โดยวิธี Inhibitor base

โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้จาก NA Slant มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MacConkey (MAC) Agar บ่มไว้ในตู้บ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°c เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 Mcfarland Standard จากนั้นป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน Mueller-Hinton agar ให้ทั่ว แล้วจึงวางแผ่นยา 30 µg cefotetan หรือ cefoxitin และ 30 µg cefotetan หรือ cefoxitin ที่เติม 400 µg boronic acid ลงบน Agar โดยให้ระยะห่างจากขอบถึงขอบ 15 mm นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่ 35°c 16-18 ชั่วโมง จึงทำการอ่านผลและบันทึกผล

<u>การแปลผล</u> ถ้าขนาดของ Inhibition zone ของเชื้อต่อยา cefoxitin หรือ cefotetan ที่เติม boronic acid กว้างกว่ายา cefoxitin หรือ cefotetan อย่างเดียวมากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แสดงว่า แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ AmpC beta-lactamases ได้ [12]

3.3 การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ pAmpC ด้วยวิธี multiplex PCR

เตรียม DNA Template ด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี multiplex PCR [13] โดยใช้ primers ดังตาราง 4 ด้วยเครื่อง Thermal cycler (ยี่ห้อ TERKIN ELNER รุ่น GENEAMP PCR SYSTEM 2400) โดยเริ่มจาก initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วต่อด้วย denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาทีและ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 25 รอบ จากนั้นนำ PRC products ที่ได้มาแยกตามขนาดของ DNA โดยใช้กระแสไฟฟ้าบน 2.5% agarose gel แล้วย้อมชิ้นส่วนของ DNA ด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปส่องดูผ่านแสงอุลตร้าไวโอเลต

เชื้อที่ใช้ควบคุม ได้แก่เชื้อ *K. pneumoniae* (CMY-1), *K. pneumoniae* (DHA-1), *K. pneumoniae* (ACC-1), *K. pneumoniae* (ACT-1), *K. pneumoniae* (MIR-1), *E. aerogenes* (FOX-R) เป็น positive control และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC 25922 เป็น negative control

ตารางที่ 2 แสดง Primers ที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนยีนของเอนไซม์ AmpC beta-lactamases [13]

Gene	Accession number[a]	Primer	Sequence	Nucleotide positions	Target(s)	Product size (bp)
MOXM	D13304	forward	5'-GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT-3'	358–378	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 to CMY-11	520
		reverse	5'CACATTGACATAGGTGTGGTGC-3'	877–856		
CITM	X78117	forward	5'-TGGCCAGAACTGACAGGCAAA-3'	478–498	LAT-1 to LAT-4, CMY-2 to CMY-7, BIL-1	462
		reverse	5'-TTTCTCCTG AACGTGGCTGGC-3'	939–919		
DHAM	Y16410	forward	5'-AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT-3'	1,244–1,265	DHA-1, DHA-2	405
		reverse	5'-CCGTACGCATACTGGCTTTGC-3'	1,648–1,628		
ACCM	AJ133121	forward	5'-AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA-3'	861–881	ACC	346
		reverse	5'-TTCGCCGCA ATCATCCCTAGC-3'	1,206–1,186		
EBCM	M37839	forward	5'-TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG-3'	1,115–1,135	MIR-1T, ACT-1	302
		reverse	5'-CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT-3'	1,416–1,396		
FOXM	X77455	forward	5'-AACATGGGGTATCAGGGAGATG-3'	1,475–1,496	FOX-1 to FOX-5b	190
		reverse	5'-CAAAGCGCGTAACCGGATTGG-3'	1,664–1,644		

3.4 การกำหนดแนวทางในการตรวจกรองหาเอนไซม์ pAmpC โดยวิธี Disk susceptibility testing

ทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion ในยากลุ่ม Cephalosporin ได้แก่ ยา Ceftazidime, Cefotaxime, Ceftriaxone, Cefpodoxime, Cefoperazone และ Cefoxitin โดย A) ทำการศึกษาโดยปรับเปลี่ยนระยะห่างของแผ่นยา และ B) การเพิ่มสารที่ใช้เป็นตัวยับยั้งการสร้างเอนไซม์ AmpC β –lactamase ในเชื้อควบคุม ได้แก่ เชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ R154 เป็น Positive control (produced AmpC β –lactamase) และเชื้อ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ ATCC 700603 เป็น Negative control (no AmpC β –lactamase) และเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษายีนดื้อยาชนิด pAmpC ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. George A. Jacoby ได้แก่ เชื้อ *E. coli* J53 (pSLK54), ACC-1*; E. coli* J53 (pMG251), ACT-1; *E. coli* J53 (pMG250), CMY-2; *E. coli* J53 (pMG247), DHA-1; *E. coli* J53 (pCG1), FOX-4, and *E. coli* J53 (pMG223), MIR-1 ซึ่งใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียควบคุมผลบวกสำหรับ plasmid-mediated AmpC β-lactamase และเชื้อควบคุมผลลบได้แก่ เชื้อ *E. coli* 25922

3.4.1 การกำหนดระยะห่างระหว่างแผ่นยา Cefoxitin (Fox) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ AmpC β –lactamase และตัวอื่นในกลุ่มนี้ (Ceftazidime, Cefotaxime, Ceftriaxone, Cefpodoxime, Cefoperazone) ที่ 2 ระยะคือ 1) 15 มิลลิเมตร และ 2) 20 มิลลิเมตร จากนั้นอ่านผลการเปลี่ยนแปลงของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่นยา

3.4.2 การใส่สารยับยั้งการสร้างเอนไซม์ AmpC β –lactamase ได้แก่ Boronic acid ร่วมกับการทดสอบความไวต่อยาตัวอื่นในกลุ่มนี้ (Ceftazidime, Cefotaxime, Ceftriaxone, Cefpodoxime, Cefoperazone)