บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 เชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1.1.1 P. aeruginosa เป็นเชื้อที่แยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยที่เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ จากโรงพยาบาลรามาธิบดี

1.1.2 S. aureus เป็นเชื้อที่แยกได้จากหนองของผู้ป่วยที่เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนัง จากโรงพยาบาลรามาธิบดี

1.2 ยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย ยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1.2.1 ยาฆ่าเชื้อที่อยู่ในรูปสารเคมี ได้แก่

1.2.1.1 Glutaraldehyde grade II 25 % aqueous solution number G-6257 lot number 99C - 0227 (ของ Sigma chemical company)

1.2.1.2 Hexachlorophene 95 % number 213286 1279 (ของ Fluka AG, Buschs SG.)

1.2.1.3 Benzalkonium chloride 90 % number 210346 280 (ของ Fluka AG, Buschs SG.)

1.2.2 ยาฆ่าเชื้อที่เป็นผลิตภัณฑ์การค้า ได้แก่

1.2.2.1 Cidex® EPA. east number B 6126-PR-1 EPA reg. no 7078-1 (ของ Arbrook) ซึ่งประกอบด้วย glutaraldehyde 2 %

และ Cidex activator ซึ่งมี trisodium phosphate monohydrate 1.92 กรัม และ sodium bicarbonate 12.50 กรัม

1.2.2.2 Phisohex® number P134 NDC 0024-15, 35-02 (ของ Winthrop laboratories) ซึ่งประกอบด้วย hexachlorophene 3 % และ detergents

1.2.2.3 Zephirol® thai reg. no. 1692/2520 (Bayer Leverkusen Germany) ซึ่งประกอบด้วย benzalkonium chloride 50 %

1.3 สารเคมีหรือ reagents อื่น

1.3.1 Sodium hydroxide (NaOH)

1.3.2 Alcohol 95 %

1.3.3 Normal saline (NS) 0.85 % (W/V)

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.4.1 Plate count agar media (PCA)

1.4.2 Nutrient agar media (NA)

1.4.3 Blood agar media (BA)

1.5 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1.5.1 ตู้อบความร้อน (hot oven)

1.5.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

1.5.3 ตู้เพาะเชื้อ (incubator)

1.5.4 Votex mixer model K-550-GE, Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY. 11716

1.5.5 Spectronic 20 ของ Bausch and Lomb

1.5.6 pH meter ของ Radiometer รุ่น pH M61

i 18266484

1.6 เครื่องแก้ว

1.6.1 Screw cap test tube ขนาด 25 x 100 มม.

1.6.2 Petri dish ขนาด 10 x 100 มม.

1.6.3 Test tube ขนาด 25 x 100 มม.

1.6.4 Pipette ขนาด 1, 2, 5 และ 10 มล.

1.6.5 Flask ขนาด 250, 500 และ 1,000 มล.

2. วิธีการ

วิธีการทุกขั้นตอนต่อไปนี้ จะทำโดยวิธีที่สะอาดปราศจากเชื้อ เครื่องแก้วที่ทนความร้อนจะฆ่าเชื้อโดยการอบแห้งด้วย hot oven อุณหภูมิ 140 – 150° ซ. นาน 6 ชม. อาหารเลี้ยงเชื้อและ NS 0.85 % (W/V) จึงนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120° ซ. นาน 15 นาที เครื่องแก้วต่าง ๆ ที่มีการ contaminate แล้วจะไม่นำมาใช้อีก และควบคุมอุณหภูมิของห้องที่ทำการวิจัยให้เท่ากับ 25° ซ.

2.1 วิธีการเตรียมเชื้อ

2.1.1 นำ stock culture จาก nutrient agar slant ที่เก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4° ซ. มา sub culture ลงบน blood agar แล้ว incubate ไว้ในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 18 ชม.

2.1.2 เตรียม suspension ของเชื้อโดยใช้ NS 0.85 % (W/V) เก็บเชื้อไว้ใน screw cap test tube ปั่นเชื้อด้วยเครื่อง votex mixer เพื่อไม่ให้เชื้อจับกันเป็นก้อน และให้เชื้อกระจายโดยสม่ำเสมอใน tube นั้น นำไปวัดความขุ่นของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectronic 20 ที่ wave length 525 nm.

สำหรับเชื้อ S. aureus ปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.4(OD.)

สำหรับเชื้อ P. aeruginosa ปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.55(OD.)

Dilute เชื้อที่ได้ปรับความขุ่นแล้วนี้ ลงเป็น 1 : 100 ด้วย NS 0.85 % (W/V) ซึ่งจะมีจำนวนเชื้ออยู่ประมาณ $10^8 - 10^{10}$ เซลล์/มล. เชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้จะต้องเป็น fresh culture ทุกครั้ง

2.2 วิธีการเตรียมยาฆ่าเชื้อ ความเข้มข้นของยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้แสดงไว้ดังในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ยาฆ่าเชื้อที่อยู่ในรูปสารเคมี	ยาฆ่าเชื้อที่เป็นผลิตภัณฑ์การค้า	ความเข้มข้นของยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง
Benzalkonium chloride	Zephirol® (benzalkonium chloride 50%)	0.05%, 0.01 % และ 0.005 % (V/V)
Hexachlorophene	Phisohex® (hexachlorophene 3 %)	3 %, 1 % และ 0.3 % (V/V)
Glutaraldehyde	Cidex® (glutaraldehyde 2 %)	2 %, 1 % และ 0.5 % (V/V)

2.2.1 เตรียม stock solution ของ hexachlorophene 10 % (W/V) โดยมีส่วนประกอบและวิธีการเตรียมดังนี้ คือ

ส่วนที่ 1 ชั่ง hexachlorophene 100 กรัม ละลายใน alcohol 95 % จำนวน 400 มล.

ส่วนที่ 2 ชั่ง NaOH 10 กรัม ละลายใน 500 มล. ของน้ำกลั่นต้มเดือดที่ทำให้เย็นแล้ว

ผสมส่วนที่ 1 และส่วนที่ 2 เข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 1000 มล.

2.2.2 เตรียม hexachlorophene 3 % (V/V) โดย dilute จาก hexachlorophene 10 % (W/V) ด้วย NS 0.85 % (W/V)

2.2.3 เตรียม hexachlorophene 1 % และ 0.3 % (V/V) โดย dilute จาก hexachlorophene 3 % (V/V) ด้วยสารละลาย NaOH 0.3% (V/V) ใน alcohol ซึ่งสารละลายนี้มีวิธีเตรียมดังนี้ คือ ใช้ NaOH 3 กรัม ละลายใน alcohol 95 % จำนวน 120 มล. เติมน้ำกลั่นลงไปจนมีปริมาตรเป็น 1000 มล.

2.2.4 เตรียม Phisohex®, Cidex®, glutaraldehyde, Zephirol® และ benzalkonium chloride ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดย dilute ด้วย NS 0.85 % (W/V)

2.3 <u>วิธีการทดลอง</u> ในการทดลองจะนำเชื้อแต่ละชนิดมาทดสอบกับยาฆ่าเชื้อทั้ง 6 ชนิด ทุก ๆ ความเข้มข้นที่แสดงไว้ในตารางที่ 5 โดยทดสอบในสภาพ pH ที่แตกต่างกัน คือ ที่ pH 5, 7 และ 9 ด้วยการปรับ pH ของยาฆ่าเชื้อโดยใช้ 1 N.NaOH หรือ 1 N.HCl และวัด pH ให้ได้ตามต้องการด้วย pH meter และการทดลองยังแบ่งออกเป็น 2 สภาพ คือ สภาพสะอาด (clean condition) เป็นสภาพที่ไม่มีสารอินทรีย์อยู่ในยาฆ่าเชื้อ และสภาพสกปรก (dirty condition) เป็นสภาพที่มีสารอินทรีย์อยู่ในยาฆ่าเชื้อ ในที่นี้จะใช้ซีรั่มของแกะแทนสารอินทรีย์ จะนำยาฆ่าเชื้อทุกชนิดมาทดสอบประสิทธิภาพที่ทุก ๆ pH ทั้งในสภาพสะอาดและสภาพสกปรก เพื่อเปรียบเทียบผลที่ได้ในแต่ละสภาพ การทดลองจะทำซ้ำทุกครั้งในกรณีที่ผลการทดลองเกิดความคลาดเคลื่อนขึ้น

2.3.1 <u>วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อที่ pH 5</u>

2.3.1.1 <u>ในสภาพสะอาด</u> (clean condition) ใช้

pipette 1 มล. ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ 1 มล. ใส่ลงในยาฆ่าเชื้อที่ปรับ pH เป็น 5 แล้ว จำนวน 9 มล. ผสมให้ส่วนผสมเข้ากันดีด้วย votex mixer ภายหลังจากที่เชื้อสัมผัสกับยาฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1, 5, 15, 30, 60 และ 120 นาที หาจำนวนของเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่เมื่อถึงเวลาดังกล่าวด้วยวิธี pour plate count โดยใช้ pipette ดูดส่วนผสมออกมาทำ 10 fold dilution ใน NS 0.85 % (W/V)จาก dilution 10^{-1} ถึง 10^{-8} และใช้ pepette 1 มล. ดูดเชื้อในแต่ละ dilution 1 มล. (ตั้งแต่ dilution 10^{0} ถึง 10^{-8}) ใส่ลงใน petri dish 1 dilution ต่อ 1 plate พร้อมกันนั้นเท PCA. จำนวน 15 – 20 มล. ลงใน petri dish นั้น เขย่าให้เชื้อกระจายจนทั่วใน PCA. ทิ้งไว้จนแข็ง incubate ไว้ในตู้เพาะเชื้อ 37° ซ. 24 ชั่วโมง

การทดสอบประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อนี้ จะต้องทำ control เพื่อตรวจดูว่าเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลองมีจำนวนเท่าใด และต้องทำการทดสอบว่า ความเข้มข้นของยาฆ่าเชื้อที่เหลือค้างใน inoculum ในแต่ละ dilution จะมีผลในการทำลายเชื้ออยู่อีกหรือไม่

2.3.1.1.1 วิธีการทำ control ในสภาพสะอาด ที่ pH 5 ใช้ pipette 1 มล. ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ 1 มล. ใส่ลงใน NS 0.85 % (W/V) (สำหรับการทดสอบ Cidex®, glutaraldehyde, Zephirol® benzalkonium chloride และ Phisohex®) หรือใส่ลงใน NaOH 0.3 % (W/V)ใน Alcohol (สำหรับการทดสอบ hexachlorophene) ที่ปรับ pH ให้เป็น 5 แล้ว จำนวน 9 มล. ผสมให้ส่วนผสมเข้ากันดี ด้วย votex mixer ในเวลา 1, 5, 15, 30, 60 และ 120 นาที ใช้ pepette ดูดส่วนผสมออกมาครั้งละ 1 มล. เพื่อตรวจนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี pour plate count

2.3.1.1.2 วิธีการทำ control เมื่อทดสอบถึงอิทธิพลของยาฆ่าเชื้อ ซึ่งเหลือค้างใน inoculum ในแต่ละ dilution ในสภาพสะอาดที่ pH 5 นำเชื้อที่เตรียมไว้มาทำ 10 fold dilution ใน NS. 0.85 %

(W/V) ตั้งแต่ dilution 10^{-1} ถึง 10^{-7} และนำยาฆ่าเชื้อที่ปรับ pH เป็น 5 แล้วมาทำ 10 fold dilution ใน NS 0.85 % (W/V) ตั้งแต่ dilution 10^{-1} ถึง 10^{-7} เช่นเดียวกัน ใช้ pepette ดูดเชื้อจากแต่ละ dilution ตั้งแต่ dilution 10^{0} – 10^{-7} dilution ละ 0.1 มล. ลงใน petri dish (1 dilution ต่อ 1 plate) และใช้ pipette อันใหม่ดูดยาฆ่าเชื้อจากแต่ละ dilution dilution ละ 0.9 มล. ลงใน petri dish อันเดียวกัน โดยที่ทั้งเชื้อและยาฆ่าเชื้อนั้นต้องมี dilution ตรงกัน เช่น เชื้อมี dilution 10^{-1} ยาฆ่าเชื้อก็ต้องมี dilution 10^{-1} ด้วย และต้องไม่ให้เชื้อและยาฆ่าเชื้อสัมผัสกันเลยในระหว่างนี้ เท PCA จำนวน 15 – 20 มล. ลงใน petri dish เขย่าให้เชื้อและยาฆ่าเชื้อกระจายทั่วใน PCA. ทิ้งไว้จนแข็ง incubate ที่ 37° ซ. 24 ชั่วโมง การอ่านผลการทดสอบนี้โดยการตรวจดูว่าที่ dilution ใด ที่ยาฆ่าเชื้อยังสามารถทำลายเชื้อได้ แสดงว่าที่ dilution นั้น ความเข้มข้นของยาฆ่าเชื้อที่เหลือค้างใน inoculum ยังมีผลต่อเชื้อนั้นอยู่ จะสามารถคำนวณและทราบถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของยาฆ่าเชื้อที่ยังมีผลในการทำลายเชื้อนั้นอยู่

2.3.1.2 <u>ในสภาพสกปรก</u> (dirty condition) วิธีการทดลองเหมือนกับการทดลองในสภาพสะอาดทุกประการ (ข้อ 2.3.1.1) แต่ต้องเติมซีรั่มของแกะลงไปในยาฆ่าเชื้อก่อนที่จะใส่เชื้อ โดยให้มีปริมาณซีรั่มเป็น 20 % (V/V) (สำหรับการทดสอบ Cidex® และ glutaraldehyde) หรือมีปริมาณซีรั่มเป็น 10 % (V/V) (สำหรับการทดสอบ Zephirol®, benzalkonium chloride, Phisohex® และ hexachlorophene)

2.3.2 <u>วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อที่ pH 7</u> จะทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบที่ pH 5 ทุกประการ แต่ต้องปรับสภาพของการทดลองให้มี pH เป็น 7 แทน

2.3.3 <u>วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อที่ pH 9</u> จะทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบที่ pH 5 ทุกประการ แต่ต้องปรับสภาพของการทดลองให้มี pH เป็น 9 แทน

2.4 การอ่านผล การอ่านผลทำโดยการนับ colony ของเชื้อที่ทำการทดสอบ หลังจาก incubate ไว้ในตู้เพาะเชื้อ 37° ซ. 24 ชั่วโมง ซึ่งจาก colony ที่นับได้จะสามารถคำนวณกลับไปได้ว่า มีเชื้อที่มีชีวิตอยู่เป็นจำนวนเท่าไรต่อ 1 มล. โดยคูณจำนวน colony ที่นับได้กับ dilution นั้นเข้าด้วยกัน เช่น

ที่ dilution 10^{-8} สามารถนับ colony ได้ = 100

∴ จำนวนเชื้อ = 100 x 10^{8} เซลล์/มล.

dilution ที่เหมาะสมที่จะนับ colony ซึ่งมี colony ไม่มากหรือน้อยเกินไป ควรอยู่ระหว่าง 30 – 300 colony ส่วนการอ่านผลการทำ control เพื่อทดสอบถึงอิทธิพลของยาฆ่าเชื้อซึ่งเหลือค้างใน inoculum ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 2.3.1.1.2