ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจหาเชื้อ *Legionella pneumophila* เซโรกรุปหนึ่งโดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

ผู้เขียน นางสาวนงลักษณ์ ใจโต

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤมล ทองไว

บทคัดย่อ

Legionella pneumophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งอาศัยอยู่ในหอหล่อเย็นของระบบปรับอากาศและระบบน้ำในอาคาร สามารถแพร่กระจายมาตามละอองฝอยของน้ำ เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อ Legionellosis หรือ Legionaires ในระบบทางเดินหายใจของคน การก่อโรคส่วนใหญ่เกิดจาก *L. pneumophila* serogroup 1 ในประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อในนักท่องเที่ยวชาวต่างประเทศที่เข้าพักอาศัยในโรงแรม ทำให้มีการตื่นตัวกันมากขึ้นในการตรวจหาเชื้อจากแหล่งน้ำในโรงแรม ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัย *Legionella* sp. กระทำโดยวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหาร BCYE มาตรฐาน ซึ่งใช้เวลานานในการตรวจสอบ งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาการตรวจหา *L. pneumophila* serogroup 1 ในตัวอย่างน้ำจากโรงแรมภายในจังหวัดเชียงใหม่ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยตรวจหาส่วนของยีน *mip* ที่ทำหน้าที่ส่งเสริมการติดเชื้อและทำลายเซลล์ macrophage ในเนื้อเยื่อปอด เป็นยีนที่มีการอนุรักษ์รหัสพันธุกรรมไว้สูง ด้วย primer mip F และ mip R ได้ PCR product ขนาด 901 bp ซึ่งจะถูกนำไปตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RII and *Pvu*II โดยเทคนิค Restriction Fragment Length- Polymorphism (RFLP) เพื่อแยกความแตกต่างของเชื้อในระดับ serogroup จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* ในจำนวน 67 ตัวอย่างน้ำและ swab จาก 5 โรงแรม โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร BCYE มาตรฐานและตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ ต่อมาได้เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเพิ่มเติมจำนวน 106 ตัวอย่างจาก 6 โรงแรม เมื่อตรวจหา *L. pneumophila* โดยตรงจากน้ำด้วยเทคนิค PCR พบว่าไม่มีการปนเปื้อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของแบคทีเรียดังกล่าว แต่เมื่อนำตัวอย่างไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร BCYE ดัดแปลงซึ่งมีส่วนประกอบของ glycine, vancomycin และ polymycin B กลับตรวจพบโคโลนีของ *Legionella* sp. ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าเป็น *L. pneumophila* serogroup 6 และ *L. pneumophila* ในกลุ่ม serogroup 2, 3 และ 10 ซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ปริมาณเชื้อ *L. pneumophila* น้อยที่สุดซึ่งสามารถตรวจหาได้โดยเทคนิค PCR เมื่อแหล่งน้ำผ่านและไม่ผ่านการกรองเพื่อกำจัดอนินทรีย์สารคือ 6.00×10^4 และ 8.87×10^4 เซลล์/ml ตามลำดับ เทคนิค PCR-RFLPที่พัฒนาเพื่อตรวจหา *L. pneumophila* นี้จะช่วยให้การตรวจหาเชื้อจากแหล่งน้ำเป็นไปได้รวดเร็วขึ้น ซึ่งจะช่วยลดการระบาดของ *L. pneumophila* แต่อย่างไรก็ตามวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างยังคงความสำคัญ จึงควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาต้นทุนลดต่ำลง แต่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูงขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Detection of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 by PCR-RFLP Technique

Author Miss Nongluck Jaito

Degree Master of Science (Applied Microbiology)

Thesis Advisor

Assistant Professor Dr. Narumol Thongwai

ABSTRACT

Legionella is Gram negative bacteria inhabitable in cooling tower of air conditioning system and in water system of buildings. The bacteria can spread via disperse aerosols to infect human respiratory tract and cause Legionellosis or Legionnaires'' disease. The disease outbreaks were caused by *L. pneumophila* serogroup 1. In Thailand, there have been reports the infection among foreigner tourists checking-in some hotels. Hence, there has been an urge to detect *L. pneumophila* in hotel water system. Nowadays, *Legionella* is detected by cultivation on BCYE standard medium which takes a long time. Therefore, this research was aimed to investigate *L. pneumophila* serogroup 1 in water samples collected from hotels around Chiang Mai by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The *mip* gene was chosen as a target DNA due to its roles in infection enhancement and macrophage destroying in lung tissues as well as its high conserved sequence. The primers, mip F and mip R were used. The obtained 901 bp PCR product was further determined by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) as it was cut by *Eco*RII and *Pvu*II in order to distinguish between *Legionella* serogroups. Sixty seven water and swab samples collected from 5 hotels were not found the target bacteria by cultivation using BCYE standard medium and by PCR evaluation. However, when 106 water and swab samples were additionally collected from 6 other hotels for evaluation, it was found that none of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

the samples could be directly detected by PCR technique but there were *Legionella* colonies on modified BCYE medium containing glycine, vancomycin and polymycin B. Colonies on modified BCYE medium were further PCR-RFLP investigated and found that they were *L. pneumophila* serogroup 6 and *L. pneumophila* of the serogroup 2, 3 and 10 as they could not be distinguished by enzymes used in this study. The minimal cell quantities in water with and without the removal of organic matters used in this PCR technique were 6.00×10^4 and 8.87×10^4 cell/ml, respectively. This developed PCR-RFLP technique would make more rapid detection of *L. pneumophila* which help decreasing the bacterial spread while the bacterial cultivation from samples is still mattered. Therefore, further investigation of cultivating medium in aspects of how to lower its cost and to increase media sensitivity and specificity is noteworthy.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved