บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

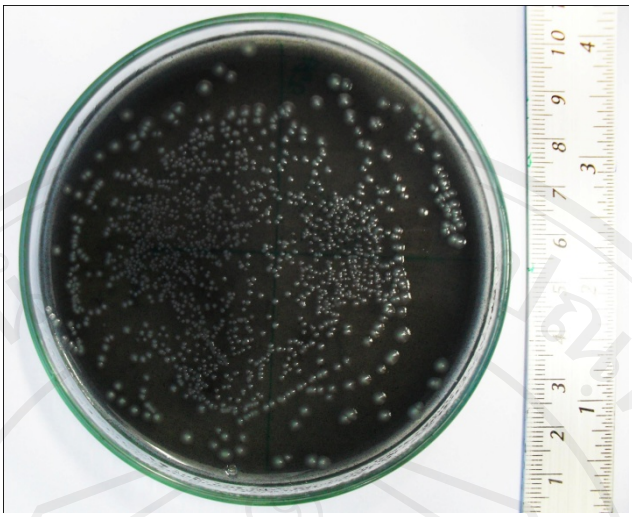
Legionella pneumophila

Legionella pneumophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ใน Phylum Proteobacteria, Class Gamma Proteobacteria, Order *Legionellales*, Family *Legionellaceae*, Genus *Legionella* *L. pneumophila* มีรูปร่างแท่ง (ภาพ 1) ไม่ติดสี acid fast ไม่สร้างสปอร์ เอนโดสปอร์ และแคปซูล ไม่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส มีการหายใจแบบใช้ออกซิเจนโดยต้องการ L-cysteine hydrochloride และ iron salt เพื่อสนับสนุนการเจริญ นอกจากนั้นแบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยเจลลาตินได้ ไม่มีกระบวนการทางชีวเคมีแบบการหมัก (fermentation) สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase, catalase และ β-lactamase (Heuner and Swanson, 2008; Holt *et al*., 1994) นอกจากนั้น *L. pneumophila* จัดเป็น fastidious growth requirement bacteria ต้องเพาะเลี้ยงในอาหารเฉพาะ คือ Buffer Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE agar) (Behets *et al*., 2006) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37°C ในสภาวะที่มีความชื้นสูง ในที่ไร้แสง โคโลนีมีรูปร่างกลม สีขาวขุ่น ผิวเรียบ ขอบเรียบ (ภาพ 2)

ภาพ 1 รูปร่างของ *L. pneumophila* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ที่มา : Jamie, 2010

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2 ลักษณะโคโลนีของ *L. pneumophila* บนอาหาร BCYE

L. pneumophila สามารถเจริญได้บนอาหารเพียงชนิดเดียวคือ BCYE (buffer charcoal yeast extract agar) แต่แบคทีเรียชนิดอื่นสามารถเจริญบนอาหาร BCYE ได้ ดังนั้นจึงแก้ปัญหาโดยทำการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น เช่นการเติม anisomycin หรือ α-ketoglutarate (MY medium) ลงไปในอาหาร BCYE เพื่อยับยั้บการเจริญของยีสต์และส่งเสริมการเจริญของ *Legionella* (Edelstein, 1981) นอกจากนั้นยังมีอาหาร CCV คือ อาหาร BCYE ที่ประกอบด้วย cephalothin, colistin, vancomycin และเติม cycloheximide เพื่อยับยั้งการเจริญของรา มีรายงานการเติม cephalothin, colistin หรือ vancomycin (MWY medium) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ผลการทดลองพบ 92% ของ *L. pneumophila* สามารถเจริญได้บนอาหารชนิดนี้ (Bopp *et al*., 1980) ในขณะที่กลุ่มวิจัยหนึ่งมีการเติม glycine, vancomycin หรือ polymyxin B (DGVP medium) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Stout *et al*., 1982)

อีกทางเลือกหนึ่งคือ การเลือกหาวิธีกำจัดแบคทีเรียชนิดอื่นก่อนการเพาะเลี้ยงสารละลายตัวอย่างบนอาหาร BCYE โดยการล้างเซลล์ในกรด pH 2.2 HCl-KCl จากผลการทดลองพบ *L. pneumophila* มาตรฐานที่เพาะเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ สามารถทนกรดได้นานถึง 60 นาที แต่ปริมาณเซลล์ลดลงตามเวลาที่เพิ่มมากขึ้น โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กำจัด microbial flora หรือแบคทีเรียชนิดอื่นที่ปะปนอยู่กับ *L. pneumophila* เพราะเมื่อแบคทีเรียชนิดอื่นอยู่ในสารละลาย HCl-KCl buffer pH 2.2 จะไม่สามารถเจริญได้ อีกทั้งยังทำลายเซลล์ ซึ่งวิธีนี้สามารถลดปริมาณเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่นได้ภายในระยะเวลา 5 นาทีของการล้างเซลล์ในกรด (Bopp *et al*., 1980)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัญหาในการเพาะเลี้ยง *Legionella* sp. คือ ความต้องการอาหารที่เหมาะสม แม้ว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงในปัจจุบันจะสามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ได้ แต่ความไวต่อการเจริญ (sensitivity) เพียง 50-60% (Engleberg *et al*., 1989) อีกทั้งแบคทีเรียชนิดอื่นก็สามารถเจริญบนอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง *Legionella* ได้เช่นกัน การตรวจหา *Legionella* โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อสามารถกระทำได้ แต่พบว่า 25% ของผู้ป่วยด้วยโรค Legionnaire ไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้โดยวิธีการนี้ (Pasculle *et al*., 1980) หากตรวจสอบโดยใช้ urinary antigen test เช่นเดียวกัน ไม่สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยระบุลงในระดับ serogroup ได้ 100% จะตรวจได้เฉพาะ antigen ของ *L. pneumophila* serogroup 1 เท่านั้น (Engleberg *et al*., 1989) ด้วยข้อจำกัดในการตรวจวินิจฉัย ทำให้เทคโนโลยีด้านอณูชีววิทยาเข้ามามีบทบาทอย่างสูง เนื่องจากเป็นเทคนิคที่รวดเร็ว และมีความจำเพาะเจาะจงสูง

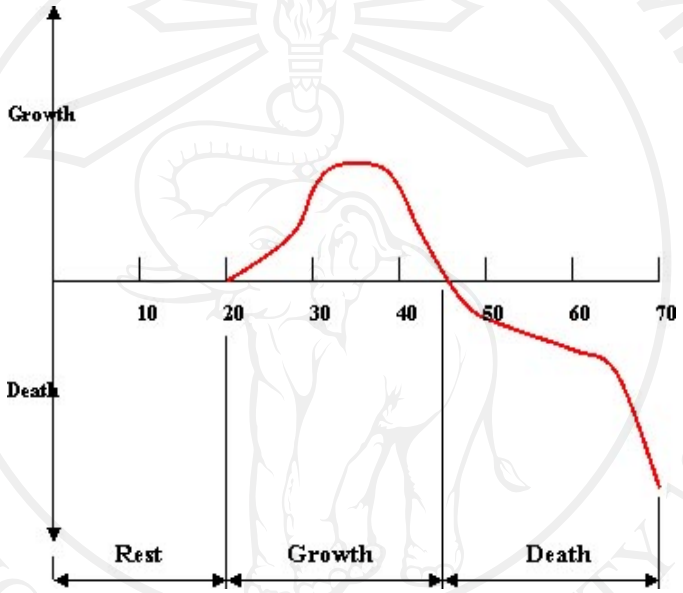
Legionella ถูกค้นพบและระบุเป็นจีนัสและสปีชีส์ใหม่เมื่อ ค.ศ. 1977 (MaDade *et al*., 1977; Brenner *et al*., 1979) ประกอบด้วย 47 สปีชีส์ (Delgado-Viscogliosi *et al*., 2005) ประมาณ 64 serogroups (Cloud *et al*., 2000) สำหรับ *L. pneumophila* ประกอบด้วย 16 serogroup ประมาณ 90% ของสปีชีส์นี้เป็นสาเหตุของการก่อโรค Legionellosis หรือ Legionnaire เมื่อจำเพาะเจาะจงลงไปถึง serogroup พบว่า 85% ของโรคเกิดจาก serogroup 1 ส่วน serogroup อื่นและ *Legionella* สปีชีส์อื่นพบ 5 -10% ที่ก่อโรค ได้แก่ *L. longbeachae* 4%, *L. bozemanii* 2.4% (Helbig *et al*., 2002; Yu *et al*., 2002)

L. pneumophila พบได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น แม่น้ำ คลอง บึง น้ำพุร้อน และทะเลสาบ เป็นต้น และแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น ถังเก็บน้ำสำรอง น้ำพุ ฝักบัวอาบน้ำ และก๊อกน้ำ เป็นต้น (Stout and Yu, 1997) เชื้อสามารถอาศัยอยู่ในดินแต่พบเป็นส่วนน้อย มีการดำรงชีวิตเป็นพาราไซต์ โดยพบว่าเป็นพาราไซต์ในเซลล์อมีบา และเป็นพาราไซต์ใน macrophage เนื้อเยื่อปอด (Fields, 1996)

L. pneumophila สามารถดำรงชีพอย่างอิสระ มักพบอยู่ในสภาพเกาะกลุ่มสร้าง biofilm เพื่อกำบังแสงแดด กักตุนอาหาร และเพิ่มประสิทธิภาพการอยู่รอดเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์โดยปราศจากเซลล์เจ้าบ้านได้ พบเชื้ออาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดและดินเปียก ดินโคลน แต่แหล่งที่อยู่หลักของเชื้อคือ แหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น โดยเฉพาะระบบน้ำต่างๆที่ใช้สำหรับอุปโภคและบริโภค รวมถึงระบบน้ำที่ใช้ประดับตกแต่งเพื่อความสวยงาม (Mampel *et al*., 2006; Borella *et al*., 2005; Kuiper *et al*., 2004) การดำรงชีพเป็นแบบพาราไซต์ภายในเซลล์อื่น เช่น อมีบาหรือโปรโตซัว (Desia *et al*., 1999; Pond, 2005) ตัวเซลล์มีขนาดเล็กกว่า 5 μm และแพร่กระจายได้ไกลถึง 3.2 กิโลเมตร (Sartory *et al*., 2002) เมื่อปนเปื้อนกับละอองฝอยของน้ำ จึงสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ลึกและซอกซอนใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

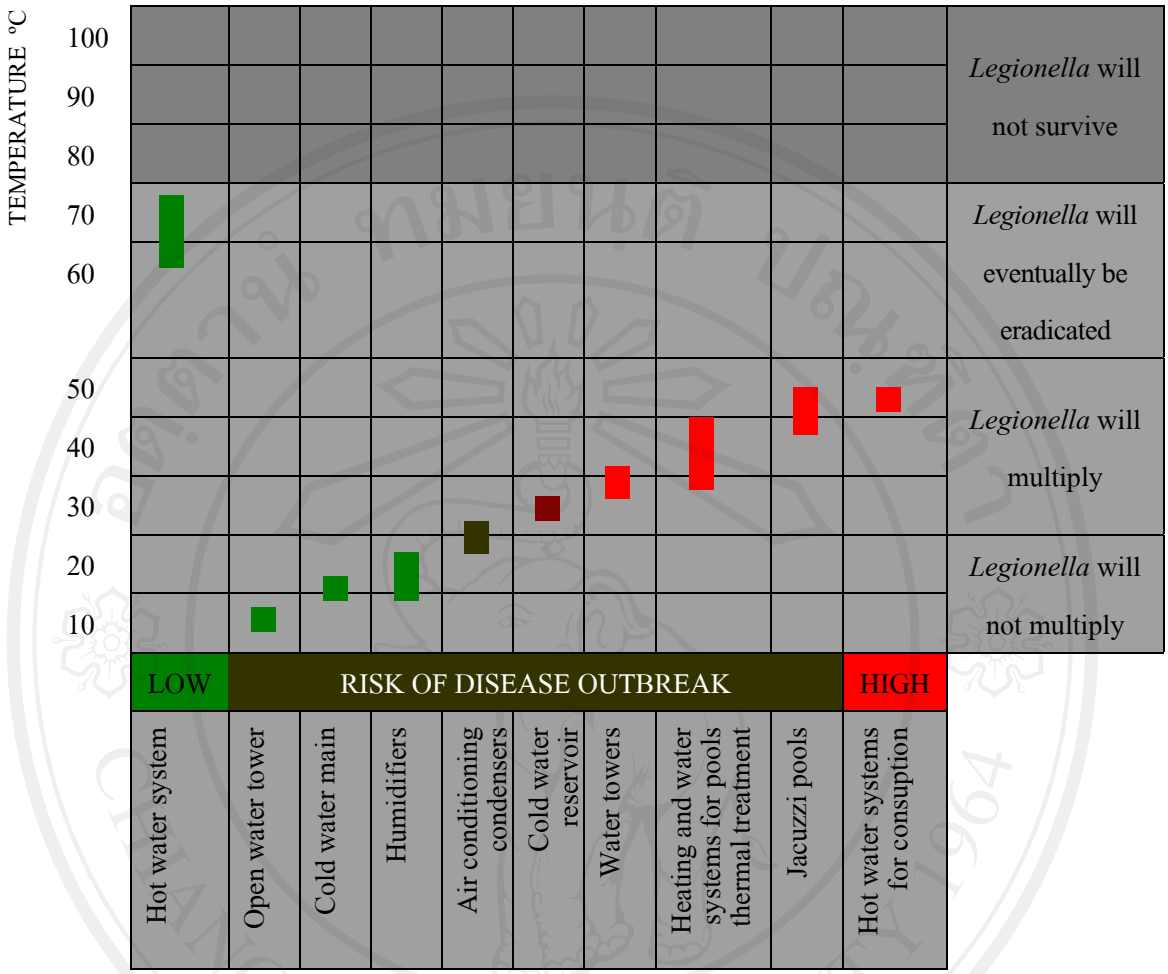
ระบบทางเดินหายใจ ซึ่งร่างกายสามารถรับเซลล์แบคทีเรียมากกว่า 1,000 เซลล์ต่อครั้งที่หายใจเข้า (Broadbent, 2003) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 20-45ºC แต่เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 20ºC แบคทีเรียยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้แต่ไม่เกิดการเจริญ พออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ แบคทีเรียจะเกิดการแบ่งเซลล์ได้ต่อไป (Bartram *et al*., 2007) แต่เมื่อแบคทีเรียอยู่ในอุณหภูมิสูงถึง 50ºC นาน 2 ชั่วโมง จะถูกทำลาย 90% และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 60ºC แบคทีเรียจะถูกทำลาย 90% ภายใน 2 นาที (Cooke, 2004) (ภาพ 3)



ภาพ 3 อิทธิพลของความแตกต่างของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของ *Legionella* sp.
ที่มา : Altorkmany and Nordell, 2010

ในการตรวจแยก *Legionella* sp. ส่วนใหญ่พบแบคทีเรียจากระบบน้ำที่มีอุณหภูมิระหว่าง 40-45ºC ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของ *Legionella* sp. เมื่ออุณหภูมิมากกว่า 55ºC พบแบคทีเรีย *Legionella* sp. ในปริมาณน้อย แต่บางผลการสำรวจสามารถพบ *Legionella* sp. ได้ในระบบทำความร้อนที่มีอุณหภูมิสูงถึง 60ºC อย่างไรก็ตามอุณหภูมิเหนือกว่า 70ºC เซลล์แบคทีเรียจะถูกทำลายจนหมด (Kima *et al*., 2002; Bartram *et al*., 2007) ส่วนตำแหน่งที่พบแบคทีเรีย *Legionella* sp. ในปริมาณมากทำให้เกิดความเสี่ยงสูงในการแพร่เชื้อก่อโรค พบในหอหล่อเย็น ระบบทำความร้อน ระบบน้ำสำหรับสระน้ำ สระน้ำ Jacuzzi และระบบน้ำร้อนสำหรับการบริโภค ซึ่งระบบที่กล่าวมามีอุณหภูมิของน้ำตั้งแต่ 20-50ºC (Altorkmany and Nordell, 2010) (ภาพ 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4 อิทธิพลของความแตกต่างของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของ *Legionella* sp. ในระบบน้ำต่างๆ

ที่มา : Altorkmany and Nordell, 2010

ระดับความรุนแรงของ *Legionella* sp. อ้างอิงจากเอกสารประกอบรายงานการประชุมสัมมนาเรื่อง "*Legionella* และอันตรายที่มองไม่เห็นในโรงแรม" พบว่า จำนวนเซลล์ 10-99 CFU/ml จากน้ำหอหล่อเย็น, 1-9 CFU/ml จากน้ำอุปโภคหรือบริโภค และ <1 CFU/ml จากเครื่องทำความชื้นหรือเครื่องทำให้เกิดหมอก เป็นระดับเสี่ยงต่อการติดเชื้อ จึงมีมาตรการให้ตรวจสอบลักษณะของอาคาร เพราะอาจมีแหล่งก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อขึ้นได้ หากพบปริมาณเซลล์สูงกว่านี้ในแหล่งที่กล่าวมาข้างต้น ความเสี่ยงต่อการติดเชื้อจะเพิ่มสูงมากขึ้น และมาตรการในการป้องกันและกำจัดเชื้อจะเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน (วันทนา, 2553) (ตาราง 1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 ระดับความรุนแรงของ *Legionella* sp. ภายในอาคาร

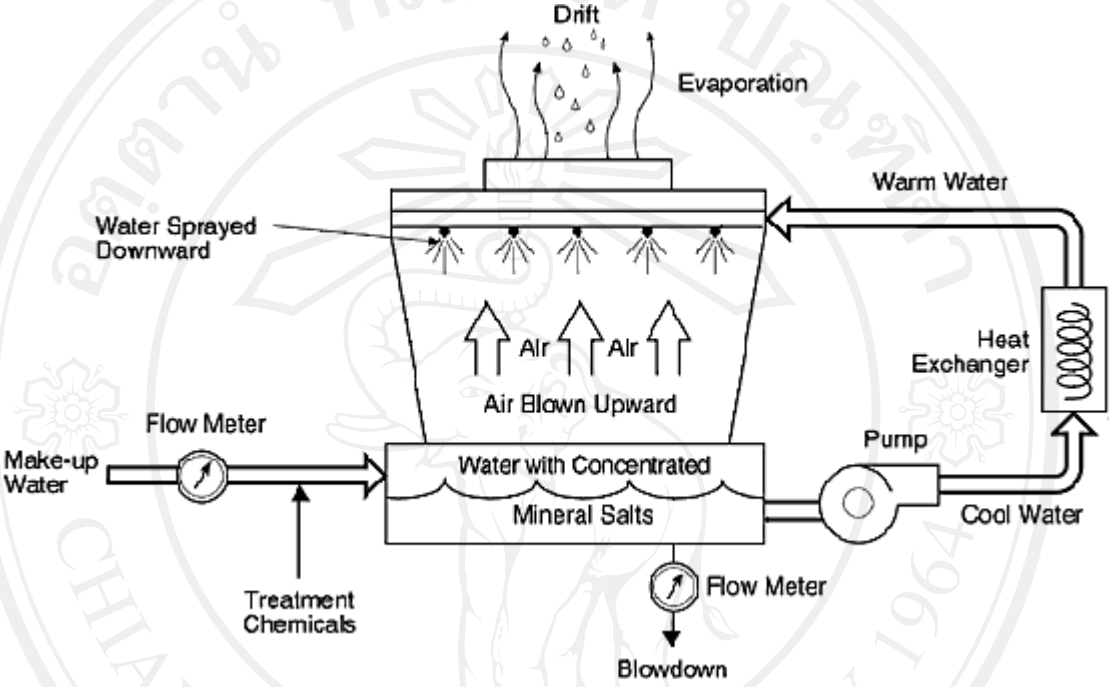
ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)			ระดับความน่ากังวล	สิ่งที่ควรปฏิบัติ
น้ำจากหอหล่อเย็น (Cooling tower)	น้ำสำหรับอุปโภคหรือบริโภค	เครื่องทำความชื้นหรือเครื่องทำให้เกิดหมอก		
<1	-	-	ต่ำ	ทบทวนแผนการบำรุงรักษาให้มีการปฏิบัติอยู่เป็นประจำสม่ำเสมอ
1-9	<1	-	น้อย	วิเคราะห์ติดตามผลอย่างต่อเนื่อง
10-99	1-9	<1	เพิ่มขึ้น	ทบทวนและตรวจลักษณะของอาคารที่อาจเสี่ยงต่อการติดเชื้อ
100-999	10-99	1-9	ค่อนข้างสูง	ทำความสะอาดระบบโดยใช้สารเคมีซึ่งมีความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้
>1,000	>100	>10	มีความรุนแรง	ใช้สารเคมีซึ่งมีความสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ในกระบวนการทำความสะอาดโดยทันที

การแพร่กระจายของ *Legionella* ในสภาพแวดล้อมภายในอาคาร

หอหล่อเย็นเป็นอุปกรณ์หลักในระบบปรับอากาศสมัยใหม่ มีไว้เพื่อทำให้น้ำเย็นและกระจายความร้อนที่ไม่ต้องการออกสู่บรรยากาศโดยผ่านทางการระเหยของน้ำ น้ำอุ่นจากตัวอาคารจะไหลไปยังส่วนบนสุดของตัวถังผ่านทางหัวฉีด ขณะที่น้ำผ่านหัวฉีด หยดน้ำเล็กหรือละอองฝอยของน้ำที่ผ่านลงมาในอากาศก่อตัวขึ้นจำนวนมาก ทำให้น้ำมีพื้นผิวสัมผัสกับอากาศมากที่สุด เพื่อแลกเปลี่ยนความร้อน อากาศที่มีอุณหภูมิต่ำเคลื่อนที่สวนทางกับน้ำที่มีอุณหภูมิสูงโดยการใช้พัดลม ทั้งนี้จะมีละอองน้ำบางส่วนเกิดการระเหยออกสู่ภายนอกเนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้น สำหรับน้ำที่ผ่านอากาศตกลงมาด้านล่างจะมีอุณหภูมิต่ำหรือน้ำเย็นเก็บไว้ด้านล่างของถัง ต่อมาถูกไหลเวียนส่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเย็นไปยังตัวอาคาร เมื่อแลกเปลี่ยนถ่ายเทความเย็นยังตัวอาคารแล้ว จะมีอุณหภูมิสูงขึ้นและไหลเวียนกลับมายังหอหล่อเย็น ถูกสูบกลับเข้ามาอีก ก่อนไหลไปยังส่วนบนสุดของตัวถังผ่านทางหัวฉีด วนเวียนเช่นนี้เรื่อยไปเพื่อทำความเย็นส่งไปยังตัวอาคาร (ภาพ 5)



ภาพ 5 การทำงานของหอหล่อเย็น

ที่มา : นิรนาม 2, 2554

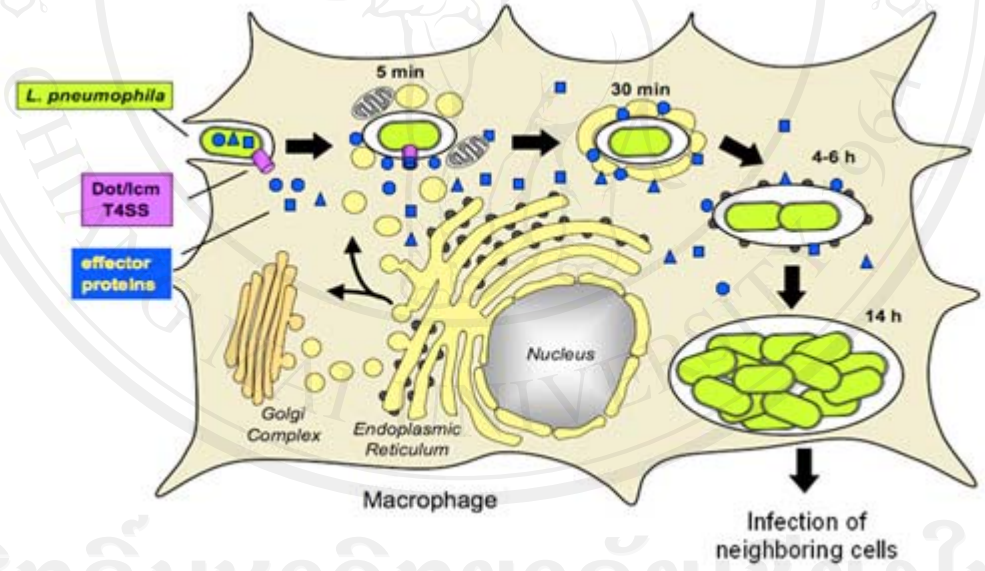
หอหล่อเย็นอาจมี *Legionella* sp. และเชื้อก่อโรคอื่นอยู่ เพราะอากาศที่ถูกดันเข้ามาในตัวหอหล่อเย็นมาจากอากาศธรรมชาติ ไม่ได้เกิดการกรองหรือฟอกอากาศให้บริสุทธิ์ก่อน เพราะฉะนั้นอากาศธรรมชาติภายนอกอาจปนเปื้อนไปด้วยแบคทีเรียหลายชนิดรวมถึง *Legionella* ด้วย สำหรับน้ำเป็นการไหลเวียนน้ำใช้ซ้ำ ยิ่งเมื่อเกิดการระเหยของน้ำ ปริมาณของน้ำจะลดลงทำให้เพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารที่มีในหอหล่อเย็น เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียมากขึ้น สามารถแพร่กระจายเข้าสู่ระบบปรับอากาศภายในตัวอาคารได้ หากท่อมีรอยแตกรั่ว ทำให้ละอองน้ำที่ปนเปื้อนแบคทีเรียเล็ดลอดเข้าไปในตัวอาคาร ก่อโรคในคนได้ (นิรนาม 2, 2553)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการรุกรานของ *Legionella pneumophila* ต่อเซลล์เนื้อเยื่อปอด

ถึงแม้ว่า *Legionella* จะสามารถดำรงชีพได้อย่างอิสระ แต่มีหลักฐานมากมายบ่งชี้ว่า *L. pneumophila* เป็นพาราไซต์ในโปรโตซัว (Rowbotham, 1986) นอกจากนั้น *L. pneumophila* ยังสามารถเจริญภายในอมีบาหลายชนิด อาทิเช่น *Acanthamoeba*, *Echiramoeba*, *Hartmanella*, *Naegloria* และ *Valkampfia* ซึ่งสามารถอาศัยอยู่ในละอองฝอยของน้ำ เมื่อร่างกายรับเชื้อที่ปนเปื้อนเข้าไปทางทางเดินหายใจ จะเกิดการรุกรานและเพิ่มจำนวนภายใน macrophage ของเนื้อเยื่อปอด (Rowbotham, 1986; Fields *et al*., 1989) ดังขั้นตอนต่อไปนี้ (ภาพ 6)

1. การจับของจุลชีพกับ receptor บนผิวเซลล์ของ eukaryote
2. การเข้ารวมของจุลชีพสู่ macrophage
3. การหลบหนีการโจมตีของเซลล์เจ้าบ้าน
4. การเพิ่มจำนวนภายในเซลล์เจ้าบ้านและทำลายเซลล์เจ้าบ้าน



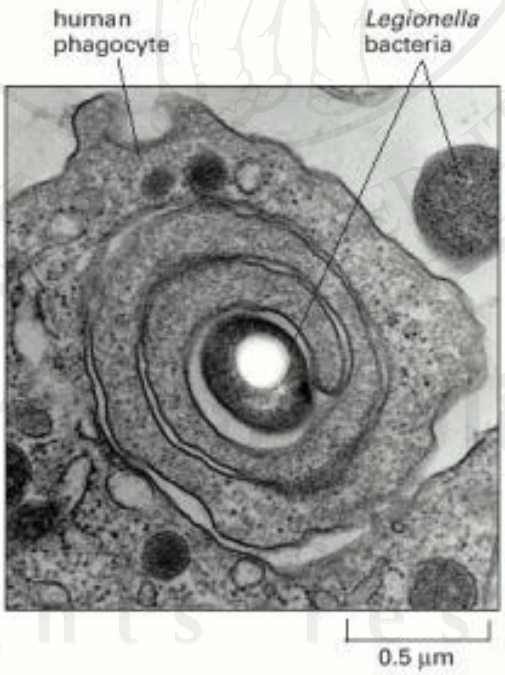
ภาพ 6 วงจรชีวิตของ *L. pneumophila* เมื่อเข้าสู่ macrophage จะอยู่ภายในถุง phagosome ประมาณ 5 นาที จากนั้น mitochondria จะเคลื่อนที่เข้าเกาะติด ตามด้วย smooth vesicle เข้ามาล้อมรอบถุง phagosome ประมาณ 30 นาที ต่อมาประมาณ 4-6 ชั่วโมง จะถูกล้อมด้วย ribosome เมื่อเกิดสภาวะเหมาะสม เซลล์แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนเซลล์ macrophage แตก และปลดปล่อยเซลล์แบคทีเรียติดเชื้อยังเซลล์ใหม่ต่อไป

ที่มา : Machner and Isberg, 2006

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นแรกเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายจะเกิด host-parasite interaction เป็นการจับกันระหว่างบริเวณผิวหน้าของแบคทีเรียกับ C3 component receptor ของเซลล์เจ้าบ้าน (Payne and Horwitz, 1987) ซึ่งโปรตีน major outer membrane (MOMP) บริเวณที่มีโมเลกุลโปรตีน P29 ของแบคทีเรียทำหน้าที่ช่วยจับอย่างจำเพาะ จากนั้นส่วน porin ของ *L. pneumophila* จะช่วยเพิ่มการยึดเกาะกับ C3 component receptor เกิดกระบวนการ phagocytosis พาเซลล์เข้าไปใน liposome ต่อมาเกิด MOMP ประกอบขึ้นมาใหม่ใน liposome เรียกว่า MOMP-liposome เกาะติดแน่นกับ C3 component (Bellinger-Kawahara and Horwitz, 1990) การเข้าเกาะติดของแบคทีเรียที่โครงสร้างของเซลล์เจ้าบ้าน นำไปสู่การเข้าอาศัยภายใน macrophage ที่เนื้อเยื่อปอด *Legionella* สามารถเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยกระบวนการ phagocytosis ซึ่งมี 2 กลไก คือ

1. coiling phagocytosis mechanism เกิดขดม้วนของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน และมีความยาวเพิ่มมากขึ้น จนโอบรอบแบคทีเรีย แบคทีเรียจะอยู่กลางขดม้วน เกิดเป็นถุง phagosome ภายในเซลล์ macrophage เพื่อเริ่มกระบวนการทำลายเซลล์ macrophage ต่อไป ทั้งนี้การเกิด coiling phagocytosis mechanism ยังไม่ชัดเจน (Finlay and Cossart, 1997) (ภาพ 7)

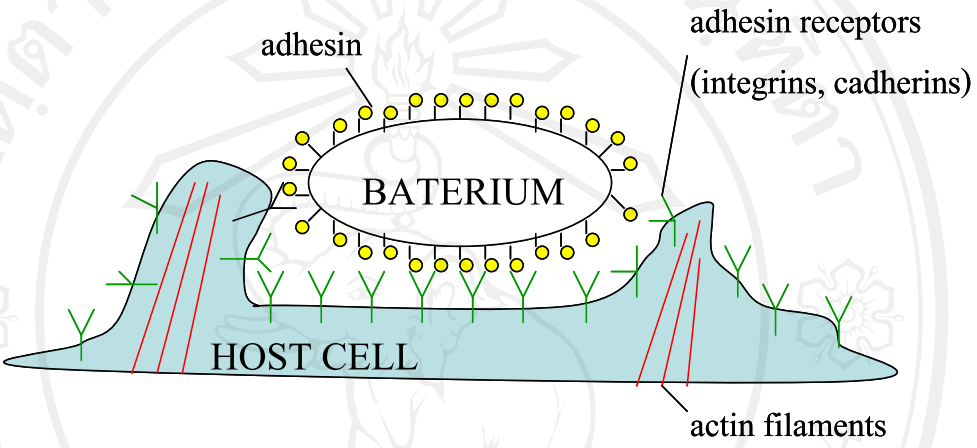


ภาพ 7 coiling phagocytosis mechanism

ที่มา : Horwitz and Maxfield, 1984

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. zipper phagocytosis mechanism เกิดการจับกันระหว่างโปรตีน transmembrane adhesion ของเซลล์แบคทีเรียกับบริเวณผิวหน้าของเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อเซลล์เชื่อมต่อกันเกิดการเคลื่อนของ actin filaments และสารประกอบของ cytoskeleton อื่นๆ ไปยังบริเวณที่แบคทีเรียมาเกาะติด จากนั้นเซลล์เจ้าบ้านจะแผ่ล้อมรอบเซลล์แบคทีเรีย เกิดเป็นถุง phagosome ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Rittig *et al*., 1998) (ภาพ 8)



ภาพ 8 zipper phagocytosis mechanism

ที่มา : Horwitz and Maxfield, 1984

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยบ่งชี้ว่า การเข้าสู่ภายในเซลล์เจ้าบ้านของ *Legionella* อาศัย complement-independent ligands ที่อยู่ใน flagella และ pili ซึ่ง flagella ของ *Legionella* ประกอบด้วยหน่วยของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 47 kDa สามารถตรวจสอบพบในหลายจีนัสของแบคทีเรีย ซึ่งยีน *fil* มีรหัสสร้าง flagella หลังจากทำให้เกิด insertion mutation ไม่ปรากฏการสร้าง flagella และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญกับเซลล์ปกติ (wild type) พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ *L. pneumophila* ใน macrophage-like cell สายพันธุ์ U937 ได้เช่นเดียวกัน จึงสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ของยีนนี้ไม่รบกวนต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ผลการทดลองสันนิษฐานว่า flagella ไม่ช่วยในการเกาะติดเซลล์เจ้าบ้านและไม่มีบทบาทในการก่อโรค อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวเป็นเพียงการทดลองเฉพาะใน macrophage-like cell line เท่านั้น เป็นไปได้ว่าเซลล์อื่น เช่น macrophage ของเนื้อเยื่อปอด, เซลล์ epithelial และโปรโตซัวจะมี receptor พิเศษในการเกาะติดกับ flagella ของ *L. pneumophila* (Merriam *et al*., 1997) สำหรับ pili ผลิตจากยีน *pil* ซึ่งหนึ่งในกลุ่มยีนนี้คือ ยีน $pilE_L$ เมื่อถูกทำให้กลายพันธุ์พบว่า ความยาวของ pili ของ *L. pneumophila* ลดลงและการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดสอบการเกาะติดกับเซลล์ epithelial ของคนและเซลล์อมีบา พบว่าการเกาะติดลดลงถึง 50% (Stone and Abu Kwaik, 1998)

เมื่อเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดขาวได้สำเร็จ *Legionella* จะมีวิธีการหลบหนีจากการถูกทำลายในกระบวนการ phagocytosis เช่น การยับยั้งการหลอมรวมระหว่าง phagosome และ lysosome, การลดความเป็นกรดใน phagosome (Horwitz, 1983; Horwitz and Maxfield, 1984; Horwitz, 1989) และการป้องกัน oxidative burst (Horwitz, 1989; Cianciotto *et al*., 1989b) ซึ่งการยับยั้งการหลอมรวมของ phagosome และ lysosome อาศัยการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ของ phagosome ทั้งนี้ยีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการหลอมรวมของ phagosome และ lysosome คือ *dotA* (Berger and Isberg, 1993) และ *mip* สร้างโปรตีน DotA และ Mip ตามลำดับ สันนิษฐานว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่าง *Legionella* และเซลล์เจ้าบ้านในธรรมชาติ อาทิเช่น อมีบาและโปรโตซัว (Fields *et al*., 1989; Fliermans, 1996) โปรตีนทั้งสองชนิดมีบทบาทสำคัญในการเข้าติดเชื้อในเซลล์เจ้าบ้าน อาจเป็นกุญแจสำคัญ สำหรับการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะภายในเซลล์เจ้าบ้าน และเกิดวิวัฒนาการในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่อยู่อาศัยเพื่อความอยู่รอด (Bumbaugh *et al*., 2001)

โปรตีน Mip (Macrophage Infectivity Potentiator) มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kDa เป็นโปรตีนที่ช่วยก่อความรุนแรงของโรค (Cianciotto *et al*., 1989a) โดยช่วยนำแบคทีเรียเข้าติดเชื้อภายใน macrophage ในระยะเริ่มต้น ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Mip (Engleberg *et al*., 1989) มีความเหมือนกับโปรตีน FK 506-binding (FKBPs) ที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไป (Standaert *et al*., 1990; Maki *et al*., 1990; Wiederrecht *et al*., 1991) ซึ่งโปรตีน FKBPs สามารถจับกับ immunosuppressant macrolide และ cyclophilin รวมกันเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า immunophilin (Schreiber, 1991) ซึ่ง immunophilin มีความสามารถจับกับ cyclosporine A (Fischer *et al*., 1989; Price *et al*., 1991) กระตุ้น peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPlase) activity ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการพับตัวของโปรตีน (protein folding) ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียมีโปรตีน Mip ทำหน้าที่เหมือนโปรตีน FKBPs จะทำให้เกิดเป็นพาราไซด์ภายในเซลล์ (Lundemose, 1993) จากการศึกษาโปรตีนในหลอดทดลองพบว่า PPlase จำเป็นต่อ *Legionella* ในกระบวนการติดเชื้อและกระตุ้น isomerization (Lang *et al*., 1987; Fischer and Schmid, 1990; Tropschug *et al*., 1990) นอกจากนี้ immunophilin กับ FK 506/ cyclosporine A อาจมีบทบาทใน signal-transduction pathway ของ T-cell (Fischer *et al*., 1992)

ยีน *mip* ถูกใช้เป็น genetic marker เพื่อตรวจหา *L. pneumophila* (Fry *et al*., 2005; Gaia *et al*., 2005) เพราะมีการอนุรักษ์ลำดับรหัสพันธุกรรมสูง มีความเสถียรมากกว่ายีนอื่น และไม่มีหลักฐานลำดับรหัสพันธุกรรมเหมือนกับสิ่งมีชีวิตสปีชีส์อื่น เมื่อทำการกลายพันธุ์หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับรหัสพันธุกรรมในบริเวณยีน *mip* จะมีผลต่อการยับยั้งการสร้างโปรตีน Mip ทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้ความสามารถในการติดเชื้อใน macrophage บริเวณเนื้อเยื่อปอดลดลง จากการทดลองเลี้ยงเชื้อภายในหลอดลมของสัตว์ทดลอง (Cianciotto *et al*., 1989b; Cianciotto *et al*., 1990; Engleberg *et al*., 1989) ทั้งนี้เมื่อทดลองเปลี่ยนแปลงลำดับรหัสพันธุกรรมในบริเวณยีน *mip* และสังเกตการติดเชื้อในอมีบา พบว่า ความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ภายในอมีบาลดลง แตกต่างกับการทดลองที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับรหัสพันธุกรรมในบริเวณยีน *mip* (wild type) ถึง 1,000 เท่า ผลการทดลองนี้จึงยืนยันได้ว่ายีน *mip* จำเป็นต่อการติดเชื้อภายในเซลล์อมีบาเท่ากับ macrophage ในคน (Cianciotto and Fields, 1992)

โปรตีน Dot (Defect Inorganelle Trafficking) เป็นผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นจากยีน *dot* พบยีน *dotA* เป็นยีนแรก อยู่ใกล้กับกลุ่มยีน *icmWXYZ* คาดว่ายีน *dotA* ผลิตโปรตีน inner membrane (Roy and Isberg, 1997) มีหน้าที่ฟื้นฟู organelle ของเซลล์แบคทีเรียที่ถูกทำลายและป้องกันการหลอมรวมของ phagosome และ lysosome ใน macrophage (Berger and Isberg, 1993; Roy *et al*., 1998) นอกจากนั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำลาย macrophage และการอยู่รอดภายในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Andrews *et al*., 1998; Brand *et al*., 1994) สำหรับยีน *dot* อื่นจำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *L. pneumophila* และพบหลายผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นจากยีน *dot* มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีนในระบบ conjugation ของแบคทีเรียชนิดอื่น (Segal and Shuman, 1998; Segal and Shuman, 1999; Vogel *et al*., 1998) นอกจากนั้นโปรตีน DotA ยังมีความคล้ายคลึงกันกับโครงสร้างของโปรตีน ABC-transport ของ *E. coli* จึงสันนิษฐานอีกหนึ่งหน้าที่ คือ directing phagosome trafficking (Roy and Isberg, 1997) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบการส่งถ่ายโปรตีน (secretion system) (Vogel *et al*., 1998) เมื่อเปรียบเทียบ DNA polymorphism ของยีน *mip* และ *dotA* พบว่ามีความแตกต่างระดับ polymorphism โดยยีน *dotA* มีความผันแปรมาก ตรงกันข้ามกับยีน *mip* ที่มีการอนุรักษ์ลำดับรหัสพันธุกรรมสูง เมื่อเปรียบเทียบใน strain เดียวกัน (Bumbaugh *et al*., 2001) ด้วยเหตุนี้จึงมีการวิจัยเกี่ยวกับ *mip* มากกว่า *dotA* แม้ว่าทั้งสองยีนต่างเป็น genetic marker ในการก่อโรคเหมือนกัน

เมื่อหลบหลีกจากการถูกทำลายภายในเซลล์ macrophage ได้ *L. pneumophila* จะเกิดการเพิ่มจำนวนมากขึ้น และทำลายเซลล์เจ้าบ้าน ยีนที่มีหน้าที่สำคัญคือ ยีน *icm* จำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของ *L. pneumophila* ภายในและทำลายเซลล์ macrophage พบ 1 locus ประกอบด้วย 18 allele เมื่อศึกษาการกลายพันธุ์ เปลี่ยนแปลงลำดับรหัสพันธุกรรมใน 16 allele พบว่ามีผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์ และไม่สามารถทำลาย macrophage ได้ เมื่อศึกษาลำดับรหัสพันธุกรรมของยีน *icm* พบว่ามี 4 operons โปรตีน Icm ส่วนใหญ่มีตำแหน่งบน inner/outer membrane หรือใน periplasm การศึกษาเพิ่มเติมใน *icmE*, *icmL*, *icmO* และ *icmP* พบว่ามีลำดับรหัสพันธุกรรมที่เกี่ยวเนื่องกันอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และมีความคล้ายคลึงกับยีนของ plasmid ที่ใช้ในกระบวนการ conjugation ในการศึกษายีน *icmWXYZ* พบว่า *L. pneumophila* มีความต้องการใช้ยีนนี้สำหรับการเจริญภายใน macrophage นอกจากนั้นยังพบว่ายีน *icmW* มีลำดับรหัสพันธุกรรมคล้ายกับยีนในกระบวนการ conjugation แต่ในปริมาณน้อย ส่วนการศึกษาใน *icmT* และ *icmR* พบว่า เมื่อเปลี่ยนแปลงลำดับรหัสพันธุกรรมภายในยีน จะมีผลต่อประสิทธิภาพการเกิด conjugation ลดลงถึง 1/1,000 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับรหัสพันธุกรรมของ wild type ส่วนการเปลี่ยนแปลงลำดับรหัสพันธุกรรมภายในยีน *icmF*, *icmE* และ *icmC* พบว่ามีความถี่ของการเกิด conjugation ลดลง 1/10 - 1/100 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ wild type และการศึกษาในส่วนของยีน *icmL*, *icmO* และ *icmP* พบว่าไม่มีผลต่อการเกิด conjugation (Brand *et al*., 1994; Purcell and Shuman, 1998; Sadosky *et al*., 1993; Segal *et al*., 1998)

เมื่อภายใน macrophage มีจำนวนเซลล์ *L. pneumophila* เพิ่มขึ้นจนกระทั่งเกิดการทำลายเซลล์เจ้าบ้านและเกิด apoptosis ในเซลล์ macrophage มากขึ้นจนทำให้เซลล์เจ้าบ้านแตก *L. pneumophila* จะถูกปลดปล่อยออกมาและติดเชื้อเซลล์ถัดไป การทำลาย macrophage ของ *L. pneumophila* มี 2 ระยะ คือ

1. ระยะแรก ถุง phagosome ที่ภายในบรรจุแน่นไปด้วย *L. pneumophila* ถูกเหนี่ยวนำโดย caspase-3-mediated เคลื่อนตัวไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ (Gao and Abu Kwaik, 1999)
2. ระยะที่ 2 เป็นการทำให้เซลล์แตกโดยการเกิดช่องเปิด (pore-formation mediated lysis) และปลดปล่อยเซลล์แบคทีเรียออกมาจากเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มากขึ้น (Alli *et al*., 2000; Molmeret and Abu Kwaik, 2002)

ในงานวิจัยของ Alli *et al.* ในปี ค.ศ. 2003 สนับสนุนสมมติฐานของการที่ *L. pneumophila* serogroup 1 strain AA100, SG1-62, SG1-66 และ GR159, *L. spiritensis* และ *L. moravica* ชักนำให้เกิด apoptosis มากกว่า 50% จากการทดลองในเซลล์ macrophage U937 และแสดง pore-forming activity สูงถึง 63% จากการสังเกตลักษณะทางธรรมชาติที่พบส่วนใหญ่ *L. pneumophila* มีการเจริญภายในเซลล์เจ้าบ้านได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาใน *L. pneumophila* serogroup 1 strain SG1-64, SG1-65 และ GR159 ที่พบว่ามีการเจริญได้ดีหลังการติดเชื้อใน macrophage 72 ชั่วโมง ลักษณะที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ *L. pneumophila* serogroup 1 สามารถเพิ่มจำนวนใน macrophage ได้รวดเร็ว เพราะมี pore-forming activity สูง และชักนำให้เกิด apoptosis

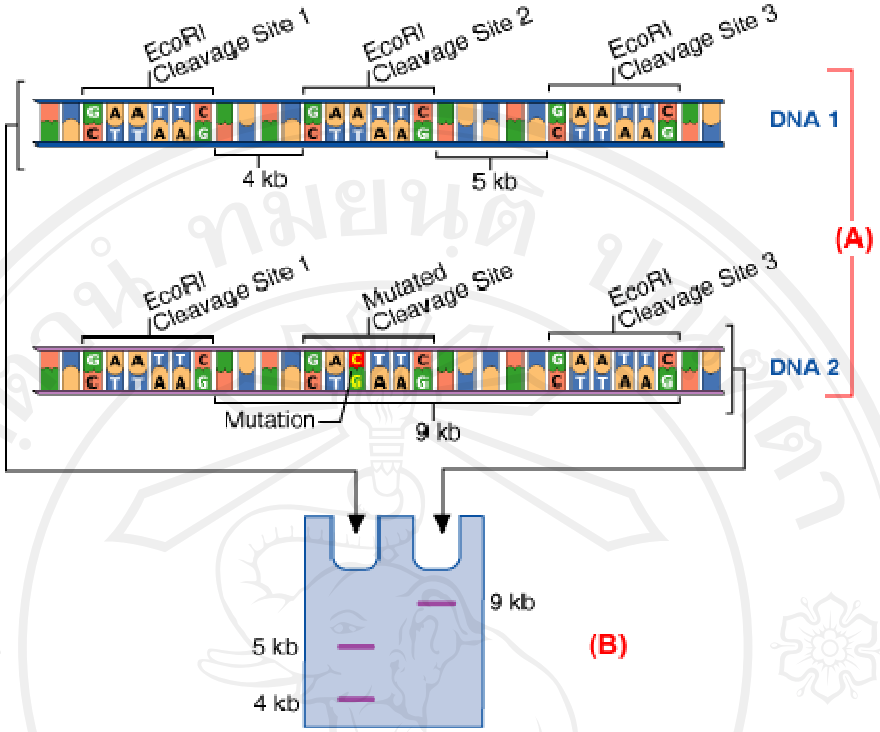
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

RFLP (สุรินทร์, 2548)

RFLP มาจากคำว่า Restriction Fragment Length Polymorphism หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดรหัสพันธุกรรมที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเก็บอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์บางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์ และไมโตคอนเดรีย ในรูปของ DNA ซึ่งมีความสามารถในการจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับรหัสพันธุกรรมภายในได้ เนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง เช่น มีชิ้นส่วนของรหัสพันธุกรรมหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนรหัสพันธุกรรมบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (duplication) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนของรหัสพันธุกรรมภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement หรือ inversion) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของรหัสพันธุกรรมบางส่วนภายในโครโมโซมหรือต่างโครโมโซม (transposition) โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จนสามารถกล่าวได้ว่าไม่มีสิ่งมีชีวิตคู่ใดมีลำดับรหัสพันธุกรรมที่เหมือนกัน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) หรือพืชที่เกิดจากการสืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ ความหลากหลายดังกล่าวสามารถพบได้โดยหาลำดับรหัสพันธุกรรมแล้วนำมาเปรียบเทียบกัน แต่เป็นวิธีที่ทำได้ยากและใช้เวลามาก วิธีที่ง่ายคือ นำลำดับรหัสพันธุกรรมที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์นั้น

เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย และจะตัดรหัสพันธุกรรมที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสแบบจำเพาะ เรียกว่า ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่ ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดรหัสพันธุกรรมเป้าหมายโมเลกุลหนึ่ง จะได้ชิ้นรหัสพันธุกรรมที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้ารหัสพันธุกรรมเป้าหมายมาจากต่างแหล่งกันและมีลำดับรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป หรือมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่ง เมื่อทำการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาดและจำนวนของรหัสพันธุกรรมที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่า เกิด polymorphism หรือมี RFLP (ภาพ 9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 9 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

ที่มา : Anonymous 1, 2011

การออกแบบ primer (สุรินทร์, 2548)

การออกแบบและเลือกใช้ primer ที่ถูกต้องเป็นกุญแจสำคัญของการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR, nucleotide sequencing และ hybridization โดยทั่วไปแล้ว PCR primer, sequencing primer และ hybridization probe ที่ดีควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. มีความจำเพาะกับลำดับรหัสพันธุกรรมเป้าหมาย และไม่สามารถจับกับรหัสพันธุกรรมบริเวณอื่นได้ในจีโนมเดียวกันและต่างจีโนม
2. สามารถจับกับลำดับรหัสพันธุกรรมเป้าหมาย และทำให้เกิดความเสถียรในสภาวะที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิ
3. ต้องไม่สามารถจับภายในลำดับรหัสพันธุกรรมที่ทำการออกแบบ (primer) เกิดเป็น hair-pin loop หรือเกิดการเพิ่มปริมาณเฉพาะลำดับรหัสพันธุกรรมที่ทำการออกแบบ (primer) เท่านั้น และสายรหัสพันธุกรรมที่ทำการออกแบบ (primer) ต้องไม่จับกับสายรหัสพันธุกรรมที่ทำการออกแบบ (primer) อีกสายหนึ่ง (heterodimer) ที่ออกแบบมาคู่กัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ต้องคำนึงถึง เช่น ความยาวของ primer, ปริมาณและสัดส่วนของเบส G-C, melting temperature (Tm) ของ primer ซึ่งจะมีผลต่อ annealing temperature ที่ใช้และความยาวของรหัสพันธุกรรมเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มจำนวน ปัจจุบันคอมพิวเตอร์มีบทบาทอย่างสูงในการช่วยอำนวยความสะดวก, ลดเวลาในการออกแบบและเลือก primer ที่ต้องการ โดยทั่วไปสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. ผู้ออกแบบเป็นผู้เลือก primer ด้วยตนเองโดยอาศัยหลักการที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นใช้คอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ เช่น Tm, โอกาสเกิด hair-pin loop หรือ primer-dimer, โอกาสการจับกับรหัสพันธุกรรมบริเวณอื่นภายในจีโนมเดียวกัน หลังจากนั้นจึงพิจารณาข้อมูลที่ได้ว่าสมควรใช้ primer สายนั้นหรือชุดนั้นหรือไม่
2. การใช้ automatic primer design program ทำหน้าที่เลือกบริเวณที่จะใช้เป็น primer เมื่อกำหนดตำแหน่ง primer แล้วจากนั้นดำเนินการโดยอัตโนมัติ โดยผู้ออกแบบป้อนข้อมูลของลำดับรหัสพันธุกรรมบริเวณที่ต้องการออกแบบ primer กำหนดช่วงอุณหภูมิของ Tm ความยาวของ primer และความยาวของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ซึ่งปัจจุบันมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์จำนวนมากที่สามารถใช้ออกแบบ primer

การเลือกลำดับรหัสพันธุกรรมเพื่อใช้เป็น primer มักใช้ข้อมูลจาก database เช่น GenBank เป็นต้น อาจเป็นลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโนก็ได้

การกำหนดเกณฑ์ในการเลือก primer ซึ่งโปรแกรมมักจะอนุญาตให้เลือกได้ดังนี้

1. เลือกตามความยาวของผลิตภัณฑ์โดยกำหนดบริเวณที่ต้องการให้โปรแกรมหา
2. เลือกจาก flanking region (เป็นบริเวณของ DNA ที่อยู่ใกล้กับปลาย 5′ ของยีน ประกอบด้วย promoter และเป็นบริเวณที่ไม่นำไปสังเคราะห์เป็น RNA) ในกรณีที่ไม่ทราบรหัสพันธุกรรมที่แน่นอนในส่วนกลาง แต่ทราบรหัสพันธุกรรมส่วนปลายทั้งสองด้าน ให้กำหนดบริเวณที่ต้องการให้โปรแกรมเลือก primer ในแต่ละด้าน หลังจากนั้นจึงเลือกสิ่งต่อไปนี้
   - ความยาว primer ควรมีความยาวประมาณ 18-30 bp ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้
   - เปอร์เซนต์ G+C ควรเลือก primer ที่มีปริมาณ CG อยู่ระหว่าง 50-60 %
   - Tm (melting temperature) ของแต่ละ primer ควรใกล้เคียงกัน ไม่ควรเกิน 5°C
   - Primer ต้องไม่จับกับลำดับรหัสพันธุกรรมของตนเองจนทำให้เกิด hair-pin loop และควรหลีกเลี่ยงลำดับรหัสพันธุกรรมของแต่ละ primer ไม่ควรเป็นคู่สมกันเอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- primer ต้องมีความจำเพาะกับลำดับรหัสพันธุกรรมเป้าหมายเพียงแห่งเดียว

เมื่อได้ตั้งเกณฑ์ที่ต้องการแล้ว คอมพิวเตอร์จะคำนวณโดยเลือก oligonucleotide primer แต่ละด้าน และคัดเลือกสายที่ไม่ต้องการออกโดยอาศัยเกณฑ์ที่ตั้งไว้ เมื่อได้ primer ในแต่ละด้านแล้วจะมีการคำนวณร่วมกันคือ primer แต่ละด้านจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับ primer ทุกตัวของอีกด้านหนึ่ง เปรียบเทียบทีละคู่ จากนั้นจึงทำการแจ้งผล

คอมพิวเตอร์จะแสดงผลที่ได้โดยจะแจ้งว่ารหัสพันธุกรรมที่สามารถใช้เป็น primer ได้ในแต่ละข้างมีจำนวนเท่าใด และสาเหตุใดเป็นเหตุหลักที่ทำให้รหัสพันธุกรรมอื่นไม่เข้าตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ หลังจากนั้นจะแจ้งผลว่า มี primer จำนวนเท่าใดที่เหมาะสมใช้ เป็น PCR primer ได้ นอกจากนั้นผู้ใช้สามารถเลือกใช้ได้อีกว่าจะให้ Tm ของ primer แต่ละตัวในคู่นั้นมีความแตกต่างกันไม่เกินกี่องศา เพื่อเป็นประโยชน์ในการทำ PCR ต่อไป

การแสดงผลที่ได้สามารถทำได้ 2 แบบ คือ

1. list of pairs จะแสดงรายละเอียดของแต่ละคู่ ดังนี้
   - ลำดับรหัสพันธุกรรมและความยาว
   - Tm ของแต่ละ primer
   - ปริมาณ G+C
   - ตำแหน่งในสายรหัสพันธุกรรม
   - ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้
   - Annealing temperature ที่แนะนำ
2. graphical map of pairs แสดงรูปภาพตำแหน่งของ primer ทั้งคู่แต่ละสายในรหัสพันธุกรรมเป้าหมายที่นำมาหาตำแหน่งของ primer

นอกจากนี้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ยังสามารถให้ผู้ใช้ได้กำหนดคุณสมบัติอื่นเพิ่มเติม เช่น การให้มี recognition site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่ต้องการใน primer ในบางกรณีที่ไม่สามารถหา primer ได้โดยใช้โปรแกรมออกแบบ primer อัตโนมัติ ควรดูผลข้อมูลทางสถิติที่โปรแกรมเก็บไว้ว่าสามารถใช้เป็นสาเหตุสำคัญของการไม่เลือก primer จากนั้นจึงเปลี่ยนแปลงเกณฑ์นั้นขยายให้ครอบคลุมโอกาสเลือกมากขึ้น โดยทั่วไปแล้วเมื่อเปลี่ยนแปลงเกณฑ์ดังต่อไปนี้ มักจะได้ primer ที่ต้องการ เช่น

1. เปลี่ยนแปลงลำดับของ 3′-dinucleotide ให้เป็น 5′-NN-3′
2. เปลี่ยนแปลงช่วงความยาวของ primer ให้สั้นลงหรือยาวขึ้น
3. เปลี่ยนแปลงข้อจำกัดและปริมาณ G+C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เพิ่มช่วงความยาวของผลิตภัณฑ์ที่จะได้

DNA sequence databank (สุรินทร์, 2548)

ที่รู้จักกันดีในปัจจุบันประกอบด้วย

1. GenBank ปัจจุบันรวบรวมโดย National Center for Biotechnology information (NCBI) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็น database ที่มีผู้รู้จักกันมากที่สุด อยู่ในรูปของ CD-ROM ของ GenBank มี 3 ชนิด คือ
   1.1 Entraz-Sequence เป็นข้อมูลซึ่งรวบรวมลำดับรหัสพันธุกรรมของ DNA, protein และข้อมูล Medline เข้าด้วยกัน รวมทั้งมีโปรแกรมในการค้นหาอยู่ในตัว ใช้ง่าย เหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการทราบว่ามีผู้ sequence ส่วนนั้นหรือไม่ และมี sequence เป็นอย่างไร แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้มากกว่านั้น จำเป็นต้องใช้โปรแกรมพิเศษ
   1.2 NCBI-GenBank เป็นข้อมูลในรูปของ flat file ซึ่ง GenBank ใช้อยู่เดิม และไม่มีโปรแกรมค้นหาในตัว จำเป็นต้องใช้โปรแกรมพิเศษซึ่งมีราคาสูงมาก เหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการวิเคราะห์ข้อมูล sequence โดยละเอียด
   1.3 NCBI-sequence และข้อมูลในรูป ISO ASN.1 เหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการพัฒนาและเขียนโปรแกรมในการวิเคราะห์ sequence
2. EMBL (European Molecular Biology Laboratory) มีสำนักงานอยู่ที่ EMBL Data Library เมือง Heidelberg ประเทศเยอรมัน
3. DDBJ (DNA Database of Japan) สำนักงานอยู่ที่เมือง Mishima ประเทศญี่ปุ่น

หลักการและขั้นตอนของ PCR (วัชรีและมนตรี, 2536)

การเพิ่มปริมาณรหัสพันธุกรรมในหลอดทดลองโดยวิธี PCR เริ่มต้นจากรหัสพันธุกรรมต้นแบบ (template DNA) ซึ่งเป็นรหัสพันธุกรรมสายคู่ (double stranded DNA) สังเคราะห์รหัสพันธุกรรมสายใหม่จากการแยกสายของรหัสพันธุกรรมต้นแบบที่เป็นสายคู่ออกจากกัน เป็นรหัสพันธุกรรมสายเดี่ยว (single stranded DNA) ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นโดยอาศัยความร้อน ต่อมาสายรหัสพันธุกรรมที่ถูกแยกออกจากกันทั้งสองสาย จะเป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์รหัสพันธุกรรมสายใหม่ที่เป็นคู่สมกัน (complementary strands) และเป็นลำดับรหัสพันธุกรรมตรงกันข้าม ที่สามารถจะจับเข้าคู่กับสายเดิมได้ การสังเคราะห์รหัสพันธุกรรมสายใหม่จำเป็นต้องอาศัยส่วนประกอบที่สำคัญ 3 อย่างคือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

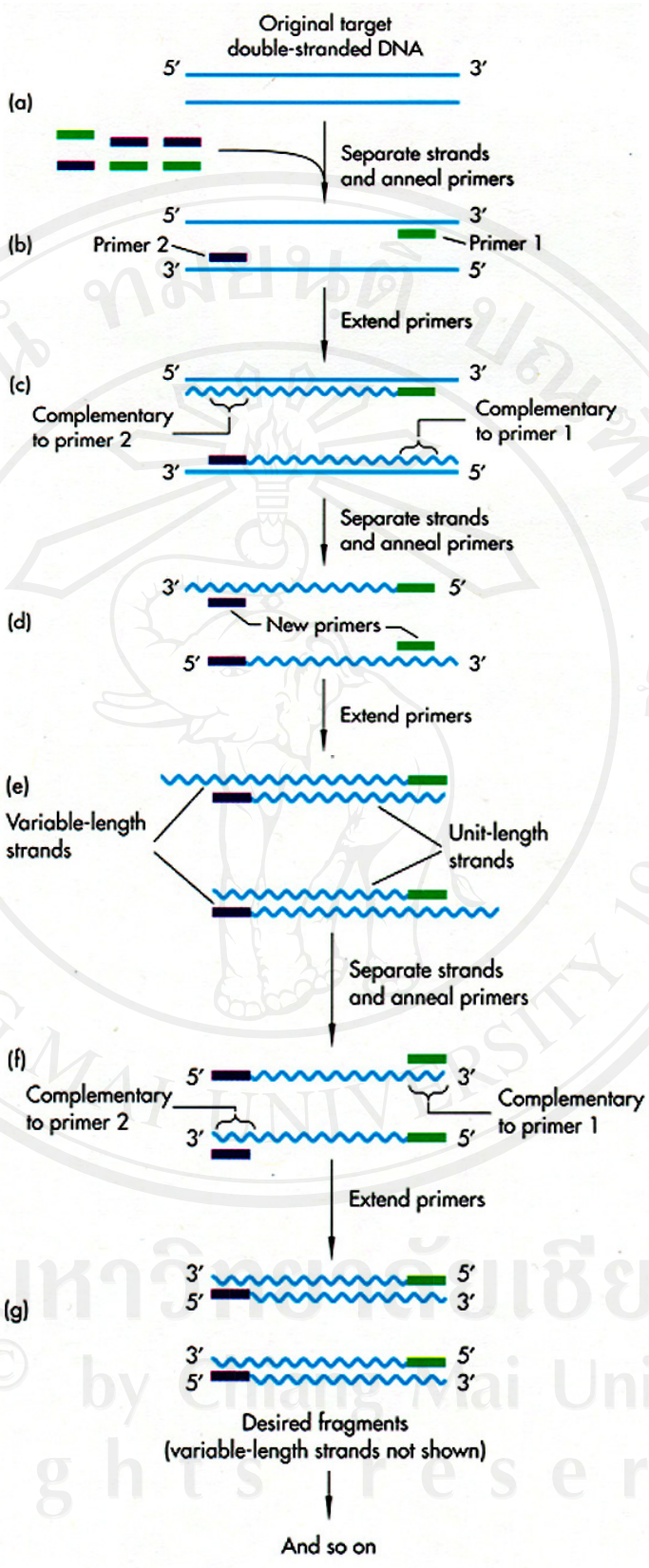
1. oligonucleotide primers สองสายซึ่งใช้สำหรับตั้งต้นการสังเคราะห์รหัสพันธุกรรมสายใหม่ primer จะจับได้อย่างจำเพาะกับปลาย 3′ ของรหัสพันธุกรรมต้นแบบที่เป็นคู่สมกัน
2. เอนไซม์ DNA polymerase
3. nucleotide ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP ใช้สร้างรหัสพันธุกรรมสายใหม่

นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบที่จำเป็นอื่นๆอีก เช่น เกลือ $MgCl_2$, KCl และ buffer เมื่อมีองค์ประกอบทั้งหมด ปฏิกิริยาสังเคราะห์รหัสพันธุกรรมจะเกิดขึ้นเมื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหมุนเวียน 3 ระดับ เพื่อเพิ่มจำนวนรหัสพันธุกรรมเป็น 2 เท่า (ภาพ 10) คือ

1. Denaturation เกิดที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95ºC ทำให้รหัสพันธุกรรมต้นแบบที่เป็นเกลียวคู่แยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยวอยู่เป็นอิสระ ทำหน้าที่เป็นต้นแบบให้เกิดการเพิ่มจำนวนรหัสพันธุกรรมต่อไป (DNA replication)
2. Primer annealing คู่สาย primer ที่ถูกสังเคราะห์ให้มีลำดับรหัสพันธุกรรมเป็นคู่สมกับปลาย 3′-end ของรหัสพันธุกรรมต้นแบบแต่ละสาย เข้าไปจับตรงลำดับรหัสพันธุกรรมที่เป็นคู่สมบนสาย รหัสพันธุกรรมต้นแบบจะเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิเหมาะสมในช่วง 40-60ºC
3. Primer extention (amplification step) ขั้นตอนการเพิ่มขยายจำนวนรหัสพันธุกรรมเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ DNA polymerase ทำหน้าที่เพิ่มลำดับรหัสพันธุกรรม (5′-3′ extention) ที่ปลาย 3′ ของ primers ทั้งสอง โดยสังเคราะห์ในทิศทาง 5′-3′ และสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่เลือกใช้ ในกรณีของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ต้องการสภาวะเหมาะสมที่อุณหภูมิ 72ºC โดยเติมเอนไซม์เมื่อเริ่มปฏิกิริยาเท่านั้น ไม่ต้องการเอนไซม์ใหม่ในทุกรอบเหมือน Klenow fragment ของเอนไซม์ *E. coli* DNA polymerase I

ทุกรอบของปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน โดยปกติปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นซ้ำจำนวน 20-30 รอบ ทำให้เกิด PCR product จำนวนมาก ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้มากคือ ผลิตภัณฑ์สายสั้น (short product) มีขนาดความยาวกำหนดจากปลาย 5′ ของ primers ทั้งสองสาย จากการคำนวณตามทฤษฎีจำนวนของผลิตภัณฑ์สายสั้นจะเพิ่ม 2 เท่าในทุกรอบเป็นการเพิ่มแบบทวีคูณ ส่วนผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์น้อย คือ ผลิตภัณฑ์สายยาว (long product) ซึ่งสังเคราะห์โดยตรงจากรหัสพันธุกรรมต้นแบบ จำนวนสายของผลิตภัณฑ์สายยาวจะเพิ่มตามจำนวนรอบ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ จำนวนของผลิตภัณฑ์สายสั้นจะเพิ่มขยายสูงกว่าผลิตภัณฑ์สายยาวมาก จึงไม่มีความจำเป็นต้องมีขั้นตอนการแยกให้บริสุทธิ์ออกจากกัน แต่ทั้งนี้ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวิธี PCR ไปใช้ต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 10 Polymerase Chain Reaction (PCR)

ที่มา : Griffiths *et al*., 1996

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หลายงานวิจัยสนใจศึกษากลไกการอยู่รอดและกลไกการก่อโรคของ *L. pneumophila* โดยศึกษาในส่วนของผนังเซลล์ พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างของ peptidoglycan ระหว่าง *L. pneumophila* กับ intraparasite ชนิดอื่น อาจเป็นไปได้ว่า cell surface เป็นปัจจัยหนึ่งที่จำเป็นต่อการอยู่รอดของเซลล์และทำลายเซลล์สิ่งมีชีวิตอื่น ดังนั้นการมุ่งศึกษาในส่วนของโปรตีน outer membrane จึงน่าสนใจ และมีงานวิจัยหลากหลายที่ทำการศึกษา เช่น ศึกษาการสกัดแยก outer membrane และวิเคราะห์โดย SDS-PAGE พบว่า โปรตีนที่ได้มีขนาด 29,000-30,000 dalton ซึ่งพบใน *L. pneumophila* ทุก serogroup และ *L. micdadei* เท่านั้น ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *L. pneumophila* และ *L. micdadei* และไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง serogroup ของ *L. pneumophila* ได้ (Hindahl and Iglewski, 1985) จากข้อมูลมากมายทำให้นักวิจัยส่วนมากเล็งเห็นความสำคัญของ *L. pneumophila* serogroup 1 ที่พบเป็นแบคทีเรียก่อโรคมากที่สุด ดังนั้นการวิเคราะห์ลงถึงระดับ serogroup ได้ จะมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคและการตรวจสอบการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

วิธีหนึ่งที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง serogroup ของ *L. pneummophila* ได้นั้น คือ การใช้ antisera rabbit antibody ต่อ *L. pneumohila* serogroup 5 (Jürgens and Fehrenbach, 1995) และ *L. pneumophila* serogroup 1 (Nolte *et al*., 1986) ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง serogroup 1-14 ได้อย่างชัดเจน โดยการวิเคราะห์ immunoblot ของ *Legionella* lipopolysaccharide สามารถแยก serogroup 1 ออกจาก serogroup อื่นได้ ในปี ค.ศ. 1985 Ciesielski *et al*. ทำ western blot ของ proteinase-K-whole cell lysate จาก *L. pneumophila* serogroup 1-6 โดยใช้ monkey sera สามารถแยกความแตกต่างระดับ serotype ได้ชัดเจนเช่นกัน ในปี ค.ศ. 2010 Chinsembu *et al.* นำตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำ Goreangab Dam ซึ่งอยู่ทางตะวันตกของเมือง Windhock และฝักบัวจากที่พักนักศึกษามหาวิทยาลัยนามิเบีย ประเทศนามิเบีย ตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาและทดสอบทางชีวเคมี เช่น การสร้างเอนไซม์ catalase, การหมักกลูโคส และ methyl red-voges proskauer เป็นต้น จากนั้นทดสอบในระดับ serogroup ด้วย latex agglutination พบ *L. pneumophila* ทั้งสองแหล่ง โดยน้ำจากแม่น้ำ Goreangab Dam อยู่ใน serogroup 1-15 และน้ำฝักบัวจากที่พักนักศึกษามหาวิทยาลัยนามิเบียอยู่ใน serogroup 2-15 ซึ่งการทดสอบในระดับ serogroup ด้วย agglutination พบว่า *L. pneumophila* serogroup 1 ปรากฏผลบวกภายใน 1 นาที ส่วน *L. pneumophila* serogroup 2-15 ให้ผลบวกภายใน 4 นาที ดังนั้นวิธี latex agglutination จึงไม่สามารถแยก serogroup 2-15 ออกจากกันได้ อย่างไรก็ตาม การตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* โดยใช้ antibody นั้น ถึงแม้จะแยกความแตกต่างของ serogroup ได้ แต่มีราคาแพงและหายาก นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ real-time PCR ซึ่งเป็นเทคนิค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่รวดเร็ว และความจำเพาะเจาะจงสูง ในการตรวจหา ยีน *mip* ของ *Legionella* สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ในระดับสปีชีส์และ serogroup (Behet *et al*., 2006) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีราคาค่อนข้างสูง

ยีน *mip* ผลิตโปรตีน Mip บน cell surface ของแบคทีเรีย (Bumbaugh *et al*., 2001) โปรตีนนี้มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์โดยป้องกันการหลอมรวมของ phagosome กับ lysosome (Heuner and Swanson, 2008) การกลายพันธุ์ของยีน *mip* ทำให้ความสามารถของแบคทีเรียในการเข้าสู่เซลล์ลดลง (Cianciotto *et al*., 1990) อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR สามารถแยกความแตกต่างได้ในระดับจีนัสและสปีชีส์เท่านั้น ส่วนระดับ serogroup ยังแยกไม่ได้ ดังนั้นจึงใช้เทคนิค RFLP ในการตัดเพื่อแยกความแตกต่างของสาย nucleotide ระหว่าง serotype ดังเช่นรายงานการวิจัยในส่วนของยีน *rpoB* ที่ใช้เทคนิค PCR และ RFLP แยกความแตกต่างระหว่างจีนัส, สปีชีส์และ subspecies ของ *L. pneumophila* ได้ โดยการแยกในระดับ subspecies โดยวิธี RFLP นั้น ใช้เอนไซม์ *Bam*HI แยก subsp. *pneumophila* ออกจาก subsp. *fraseri* ได้ เป็นต้น (Ko *et al*., 2003)

เทคนิค PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เป็นเทคนิคที่รวดเร็ว สามารถแก้ปัญหาในข้อจำกัดที่เกิดขึ้นกับแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ หรือใช้เวลานานในการเพาะเลี้ยง (Doust *et al*., 2008; Behet *et al*., 2006) เทคนิค PCR มีความจำเพาะ และไวต่อการตรวจพบ ในการวิเคราะห์หาเชื้อ *L. pneumophila* โดยเทคนิค PCR จากคนไข้ 39 คน พบผลบวกในคนไข้ 21 คน คิดเป็น 56.4% ในขณะที่เทคนิค enzyme immunoassay ให้ผลบวกเพียง 9 คนคิดเป็น 23.1% และวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารไม่ให้ผลบวกเลย (Poblet-Mas *et al*., 2007) ในปี ค.ศ. 2000 Cloud *et al.* ศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ *Legionella* sp. ในน้ำล้างปอด (bronchoalveolar lavage fluids) โดยเทคนิค PCR และการเพาะเลี้ยงในอาหาร BCYE ที่ผสมยาปฏิชีวนะ anisomycin, polymycin B และ vancomycin จากตัวอย่างทั้งหมด 212 ตัวอย่าง พบ 31 ตัวอย่างให้ผลบวกทั้งสองวิธี และ 12 ตัวอย่างให้ผลลบในการเพาะเลี้ยงบนจานอาหารแต่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค PCR จากนั้นทำการ sequence 12 ตัวอย่างดังกล่าว พบ 8 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกับ *Acinetobacter* sp. หรือ *Proteobacterium* sp. มากกว่า *Legionella* sp. ส่วน 4 ตัวอย่างที่เหลือระบุเป็น *Legionella* sp. โดย 3 ตัวอย่างเป็น *L. micdadei* อีกหนึ่งตัวอย่างเป็น *L. longbeachae* งานวิจัยนี้แสดงถึงความไวต่อการตรวจพบเชื้อ *Legionella* sp. โดยเทคนิค PCR มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร และลดระยะเวลาการตรวจพบเชื้อโดยใช้เวลาเพียง 6-8 ชั่วโมง ขณะที่การเพาะเลี้ยงใช้เวลามากกว่า 5 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved