บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. แบคทีเรียที่ใช้

1.1 *Legionella pneumophila* serogroup 1 (DMST 12800), 2 (DMST 12801), 3 (DMST 12747), 6 (DMST 12804), 8 (DMST 17221), 10 (DMST 18015) และ 11 (DMST 24600) จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรุงเทพมหานคร

1.2 *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*), *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aeruginosa*), *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella typhi* (*Sal. typhi*), *Shigella dysenteriae* (*Shi. dtsenteriae*) และ *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) จากสาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

2.1 Buffer charcoal yeast extract (BCYE) medium

2.2 Nutrient agar (NA) และ Nutrient Broth (NB)

2.3 Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose Agar (TCBS Agar)

3. สารเคมี (ภาคผนวก ข)

3.1 ชุดย้อมสีแกรม

3.2 ชุดทดสอบชีวเคมี

3.3 สารที่ใช้ในการสกัด DNA

3.3.1 Chloroform- isoamyl alcohol

3.3.2 Ethanol, 70% และ absolute ethanol

3.3.3 Lysozyme, 10 mg/ml

3.3.4 Phenol-chloroform-isoamyl alcohol

3.3.5 Proteinase K, 25 mg/ml

3.3.6 RNase, 10 mg/ml

3.3.7 Sodium dodecyl sulfate, 25 mg/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.8 STE buffer

3.4 สารที่ใช้ทำ PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.4.1 dNTP, 0.2 mM

3.4.2 PCR buffer+Mg_2Cl, 10X (RBC)

3.4.3 Primers, forward และ reverse (mip F-mip R, 24F-1492R)

3.4.4 Reaction buffer, 10X

3.4.5 *Taq* DNA polymerase (RBC)

3.5 สารที่ใช้ทำ electrophoresis

3.5.1 Agarose

3.5.2 Ethidium bromide

3.5.3 Loading dye

3.5.4 TAE (1X) buffer

3.6 สารที่ใช้ทำ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

3.6.1 *Eco*RII, 10 U/µl

3.6.2 *Pvu*II, 10 U/µl

4. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 กระบอกตวง 100 ml

1.2 กระดาษกรองเบอร์ 1

1.3 กล่องดำพร้อมฝาปิด

1.4 ขวดแก้วขนาด 30 ml

1.5 ขวดแก้วรูปชมพู่ 250 ml

1.6 ขวดปากกว้าง ขนาด 300-500 ml

1.7 จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 mm

1.8 วัสดุอุปกรณ์อื่น เช่น ช้อนตักสาร ถ้วยชั่งสาร และถุงมือ

1.9 หลอดทดลองแก้วขนาด

1.10 หลอดทดลองพลาสติกขนาด 50 ml

1.11 ห่วงถ่ายเชื้อ

1.12 Aluminum foil

1.13 Glass slide และ cover slip

1.14 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 และ 2.0 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.15 Centrifuge tube ขนาด 50.0 ml

1.16 Micropipette ปรับปริมาตรได้ ขนาด 0.1-10, 10-100 และ 200-1,000 µl

1.17 Pipette tip ขนาด 10, 200, 1000 µl

5. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ	CX 31	Olympus
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	20S A SCS	Presica
เครื่องปั่นเหวี่ยง	EBR 12 E	-
Autocalve	SS-325	Tomy
Electrophoresis set	EPS 30	Amersham Pharmacia Bioteth
Heamacytometer	-	BOECO
Hot air oven	-	Heraeus
Incubator	-	Memmert
Thermal cycler	Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystem
UV Transluminator	VO36685	VILBEIR LOUMAT
Water bath	WB-10	Memmert

วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยง *Legionella pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11 ใน BCYE agar

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร BCYE agar วางในกล่องดำป้องกันแสงและให้ความชื้นแก่เชื้อโดยการใส่น้ำในขวดปากกว้างวางลงในกล่องดำข้างจานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่ 37°C เป็นระยะเวลา 4-7 วัน

2. การเพาะเลี้ยง *Legionella pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11 ใน BCYE broth

ถ่ายเชื้อ 1 โคโลนีที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร BCYE agar ระยะเวลา 7 วัน ลงใน BCYE broth หุ้มขวดด้วย aluminum foil เพื่อป้องกันแสง นำไปบ่มที่ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 148 rpm เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนนำไปสกัด DNA ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเพาะเลี้ยง *E. coli, K. pneumoniae*, *P. mirabilis, P. vulgaris, Ps. aeruginosa, R. solanacearum*, *S. aureus, Sal. typhi* และ *Shi. dysenteriae* ใน NA และ NB ส่วน *V. cholerae* ใน TCBS agar และ TCBS broth

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA บ่มในอุณหภูมิ 37°C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อที่อยู่ในระยะ log phase ลงใน NB นำไปบ่มที่ 37°C ในเครื่องเขย่า เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ก่อนนำไปสกัด DNA ต่อไป

4. การสกัด Genomic DNA ของ *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11, *E. coli, K. pneumoniae*, *P. mirabilis, P. vulgaris, Ps. aeruginosa, R. solanacearum*, *S. aureus, Sal. Typhi, Shi. dysenteriae* และ *V. cholerae* (Salloum *et al*., 2002)

4.1 นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวจากข้อ 2 และข้อ 3 ไปปั่นด้วยความเร็ว 6,000 rpm ที่ 4°C นาน 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวใสทิ้ง เหลือส่วนที่เป็นเซลล์ตกตะกอนอยู่ก้นหลอด

4.2 เติม STE buffer ปริมาตร 500 µl ผสมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4.3 เติม lysozyme (10 mg/ml) 100 µl เพื่อย่อยผนังเซลล์ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง

4.4 ละลายไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสโดย sodium dodecyl sulfate (25 mg/ml) 10 µl บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที

4.5 เติม proteinase K (25 mg/ml) 100 µl เพื่อย่อยโปรตีน บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที

4.6 เติม RNase (10 mg/ml) 5 µl เพื่อย่อย RNA บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง

4.7 นำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 rpm ที่ 4°C นาน 10 นาที สารละลายจะแยกชั้น ทำการดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่

4.8 สกัดโปรตีนออกด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าหลอดไปมาเป็นเวลา 1 นาที

4.9 นำไปปั่นแยกชั้นด้วยความเร็ว 12,000 rpm ที่ 4°C นาน 10 นาที

4.10 ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่

4.11 เติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าหลอดไปมา

4.12 นำไปปั่นแยกชั้นที่ 12,000 rpm ที่ 4°C นาน 10 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.13 ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่

4.14 ทำการตกตะกอน DNA โดยเติม absolute ethanol ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าหลอดไปมา จนเห็น DNA มีลักษณะเป็นก้อนสีขาว

4.15 นำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm ที่ 4°C นาน 10 นาที

4.16 ล้างตะกอน DNA โดยเติม 70% ethanol ปริมาตร 250 µl

4.17 นำไปปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4°C นาน 10 นาที

4.18 เทของเหลวใสส่วนบนทิ้ง ปล่อยให้ตะกอน DNA แห้งโดย air-dry

4.19 ละลายตะกอน DNA โดย น้ำกลั่น 100 µl

4.20 ตรวจสอบ DNA ที่แยกได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose

5. ขั้นตอนการเลือกใช้ primer

5.1 ออกแบบ primer เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *mip* จากฐานข้อมูลใน GenBank *L. pneumophila* strain Corby (NC_009494) ได้ primer ที่ทำการออกแบบดังนี้

mip F 5′-GGC AGA ATT AGT GGG CG-3′

mip R 5′-GTG GTG TTA GGC TGA CAC C-3′

5.2 ทดสอบ primer ที่ออกแบบว่าจำเพาะต่อยีน *mip* หรือไม่ โดยใช้โปรแกรม primer blastn จาก www.ncbi.nim.nih.gov/

5.3 ใส่ลำดับรหัสพันธุกรรมของ primer ลงไปตามช่องที่โปรแกรมกำหนด เมื่อโปรแกรมประมวลผลเสร็จสิ้น จะแสดงผลออกมาในรูปของภาพและตาราง แสดงตำแหน่งจับของ primer กับลำดับรหัสพันธุกรรมต้นแบบที่มีอยู่ในฐานข้อมูลใน GenBank

6. การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11

6.1 ใช้ primer ที่ได้จากข้อ 5 เพิ่มปริมาณ DNA ที่บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11

6.2 นำ DNA ของ *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11 มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของ primer และอุณหภูมิของการทำ PCR ดังนี้

6.2.1 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของ primer mip F, mip R ในขั้น annealing ตั้งแต่ 52-54°C เพื่อหาสภาวะที่ primer จับแล้วสังเคราะห์สายรหัสพันธุกรรมได้อย่างจำเพาะเจาะจง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของ primer mip F, mip R โดยใช้ความเข้มข้นของ primer ตั้งแต่ 0.5-1.0 μM เพื่อหาสภาวะที่ primer จับแล้วสังเคราะห์สายรหัสพันธุกรรมได้โดยไม่เหลือ primer-dimer

6.3 ตรวจสอบชิ้น DNA ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

6.4 เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* แต่ละ serogroup แล้ว นำ PCR product ของ *L. pneumophila* แต่ละ serogorup ส่งหาลำดับรหัสพันธุกรรมเพื่อคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะในการแยกความแตกต่างของแต่ละ serogroup ต่อไป (ภาคผนวก ค)

7. การหาความจำเพาะเจาะจงของ primer mip F และ mip R ต่อบริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* โดยเทคนิค PCR

นำ genomic DNA ในข้อที่ 4 มาตรวจสอบหาความจำเพาะของ primer mip F และ mip R ต่อการจับบริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* โดยเติม primer คู่นี้ลงในปฏิกิริยา PCR โดยมี internal control เป็น primer 27F และ primer 1492R ที่สามารถจับอย่างจำเพาะที่บริเวณยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียทุกสปีชีส์ หากมี genomic DNA ของแบคทีเรียในตัวอย่างจะปรากฏยีน *16S rRNA* ที่ 1,500 bp และหากมียีน *mip* จะปรากฏ PCR product ที่ 901 bp

8. Gel Electrophoresis

8.1 เตรียมถาดสำหรับเทเจล โดยใช้เทปกระดาษปิดหัวท้ายของถาด วางหวีซึ่งจะทำให้เกิดหลุมสำหรับหยดเจล ให้สูงกว่าพื้นถาดประมาณ 0.5-1.0 mm วางถาดบนพื้นราบที่ได้ระนาบ

8.2 เตรียมละลาย 1X TAE buffer จาก 50X stock solution ปริมาตรพอสำหรับใส่ในแทงค์และใช้เตรียม agarose

8.3 ละลาย 0.8% agarose gel สำหรับ genomic DNA, 1.0% agarose gel สำหรับ PCR product และ 2.0% agarose gel สำหรับชิ้น PCR product ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ด้วย 1X TAE buffer ด้วยความร้อนจนได้สารละลายใส ทิ้งให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 55°C เทใส่ถาดที่เตรียมไว้ 3-5 mm ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30-45 นาที

8.4 ดึงหวีและเทปกระดาษออกจากเจลอย่างระมัดระวัง ไม่ให้เจลแตก วางถาดเจลลงในแทงค์ เทบัฟเฟอร์ให้ท่วมเจลประมาณ 1 mm

8.5 ผสม loading dye กับ size marker หรือ DNA ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.6 หยด size marker ลงในหลุมแรกและ DNA ตัวอย่างในหลุมถัดมา เวลาหยดสารละลายลงในหลุมควรแน่ใจว่าปลายปิเปตอยู่ต่ำกว่าปากหลุม เพื่อให้สารละลายตกลงไปในปากหลุมให้หมด

8.7 หยดตัวอย่างลงหลุมในเจล 1 ตัวอย่าง/1 หลุม

8.8 ปิดฝาแทงค์ ให้แน่ใจว่าขั้วบวกอยู่ในทิศทางตรงกันข้ามกับทิศทางของหลุมตัวอย่าง ตั้งค่าความต่างศักย์ที่ 100 volt เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า สังเกตฟองอากาศที่ผุดขึ้นมาจากลวดนำไฟฟ้าที่ขั้วไฟฟ้าทั้ง 2 ข้าง

8.9 สังเกตทิศทางการเคลื่อนที่ของ loading dye จากขั้วลบไปหาขั้วบวก หากเคลื่อนที่ผิดทาง แสดงว่าการต่อขั้วไฟฟ้าผิดข้าง ควรปิดเครื่องและเปลี่ยนขั้วไฟฟ้าให้ถูกต้อง จากนั้นปิดเครื่องเมื่อพบว่า loading dye เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 2 ใน 3 ของแผ่นเจล

8.10 ย้อมเจลโดยแช่เจลลงในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที แล้วล้างเจลเพื่อลด background โดยการนำเจลแช่ในน้ำกลั่นนาน 10 นาที

8.11 ตรวจสอบเจลบนเครื่อง Transilluminator โดยดูลักษณะของแถบ DNA ที่เรืองแสง ultraviolet บนเจล บันทึกรูปเจลเพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

9. การหาปริมาณเซลล์ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค PCR

9.1 เพาะเลี้ยง *L. pneumophila* serogroup 1 ปริมาตร 10 ml ในขวดฝาดำ 3 ขวด ด้วย BCYE broth ที่ความเร็วรอบ 120 rpm นาน 4 วัน จากนั้นเก็บเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที

9.1.1 ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ml แล้วทำการเจือจางตั้งแต่ 1×10^{-1} - 1×10^{-10}

9.1.2 นับจำนวนเซลล์แต่ละการเจือจางด้วยวิธี haemacytometer

ก. ย้อมสีแต่ละการเจือจางด้วย crystal violet เพื่อง่ายต่อการมองเห็น

ข. หยดแต่ละการเจือจางลงไปจนเต็มช่องสี่เหลี่ยม ปิดด้วย cover slip แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40 เท่า

ค. เลือก 5 ช่องจาก 25 ช่องกลาง พื้นที่รวมคิดเป็น 0.1 mm^2 หรือ 0.0001 cm^2 หรือ 1×10^{-4} ml

ง. วิธีนับให้นับจากมุมบนสุดด้านซ้ายไล่ซิกแซกลงมา โดยนับเซลล์เดี่ยว และเซลล์ที่เป็นกลุ่มติดกันให้เป็นหนึ่ง ทั้งหมดภายในตาราง ส่วนเซลล์ทาบบนเส้นตารางเส้นในสุด ให้นับเฉพาะเซลล์ที่ทาบเส้นตารางด้านบน และด้านขวาแต่ละตารางเท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9.1.3 นำตัวอย่างน้ำแต่ละการเจือจางทำ PCR เพื่อตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* serogroup 1 เพื่อทราบปริมาณเซลล์ที่น้อยที่สุดในตัวอย่างน้ำที่สามารถตรวจสอบพบโดยเทคนิค PCR

9.2 เพาะเลี้ยง *L. pneumophila* serogroup 1 ปริมาตร 10 ml ในขวดฝาดำ 3 ขวด ด้วย BCYE broth ที่ความเร็วรอบ 120 rpm นาน 4 วัน จากนั้นกรองผงถ่านด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ออกจากอาหารเหลว นำอาหารเหลวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เพื่อเก็บเซลล์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำเช่นเดียวกับข้อ 9.1.1-9.1.3

10. PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)

10.1 ส่ง PCR product ของ *L. pneumophila* แต่ละ serogroup เพื่อหาลำดับรหัสพันธุกรรม เมื่อได้รับข้อมูลลำดับรหัสพันธุกรรมความยาว 901 bp บริเวณยีน *mip* จากนั้นหาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้ program restriction mapping version 3 ผลการตัดแยกเพื่อระบุเป็น *L. pneumophila* serogroup 1 ใช้เอนไซม์ *Eco*RII และ *Pvu*II

10.2 ทำการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11 โดยเทคนิค PCR จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ ทำการแยกความแตกต่างแต่ละ serogroup โดยวิธี RFLP (ดัดแปลงจาก Claisse *et al*., 2007)

10.3 เอนไซม์แรกที่ใช้ในการตัดแยกแต่ละ serogroup คือ *Eco*RII ซึ่งองค์ประกอบของสารต่อ 1 ปฏิกิริยา ประกอบด้วย PCR product ปริมาตร 10 µl, buffer 2 µl และเอนไซม์ 1 µl (10U/µl) ปรับปริมาตรสุดท้าย 20 µl โดยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 60ºC นาน 2 ชั่วโมง

10.4 เอนไซม์ตัวที่สองใช้ในการตัดแยกแต่ละ serogroup คือ *Pvu*II ซึ่งองค์ประกอบของสารต่อ 1 ปฏิกิริยา ประกอบด้วย PCR product ปริมาตร 10 µl, buffer 2 µl และเอนไซม์ 1 µl (10U/µl) ปรับปริมาตรสุดท้าย 20 µl โดยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 2 ชั่วโมง

10.5 ตรวจสอบ DNA ที่แยกได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel

11. การเก็บตัวอย่างน้ำ

11.1 เก็บตัวอย่างน้ำครั้งแรกช่วงเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม 2553

11.1.1 เก็บตัวอย่างน้ำ ก๊อกน้ำ ฝักบัว และหอหล่อเย็นในโรงแรม ปริมาตรตัวอย่างละ 100 ml ใส่ขวดแก้วปลอดเชื้อเก็บในกล่องน้ำแข็งก่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อทำการทดสอบ หากยังไม่ทำการเพาะเชื้อได้ทันที ให้เก็บไว้ในตู้เย็น 4ºC (มณฑล, 2546)

11.1.2 เก็บตัวอย่าง swab ภายในก๊อกน้ำและฝักบัวในโรงแรม โดยแกะหัวก๊อกน้ำและฝักบัว แล้วใช้สำลีปลอดเชื้อถูด้านข้างท่อก๊อกน้ำและฝักบัว เก็บน้ำใส่หลอดทดลองปริมาตรเล็กน้อย นำสำลีที่ swab ตัวอย่างเก็บในหลอดทดลองที่มีน้ำอยู่เล็กน้อยประมาณ 5 ml ปิดฝาเก็บในกล่องน้ำแข็งก่อนนำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อทำการทดสอบ ส่วนตัวอย่าง swab หอหล่อเย็นถูด้านข้างของตัวถัง นำสำลีที่ swab ตัวอย่างเก็บในหลอดทดลองที่มีน้ำอยู่เล็กน้อย หากยังไม่ทำการเพาะเชื้อได้ทันที ให้เก็บไว้ในตู้เย็น 4ºC (มณฑล, 2546)

11.1.3 นำตัวอย่างน้ำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำสะอาดจำนวน 1 ml จากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 เติม 0.2 M Potassiumchloride - Hydrochloride acid (KCl-HCl) buffer pH 2.2 ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน วางที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หยดสารละลายที่ได้ปริมาตร 0.1 ml ลงบน BCYE agar แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่ว (spread plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ในกล่องดำที่มีแก้วน้ำเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 10 วัน (มณฑล, 2546)

ส่วนที่ 2 ตัวอย่างน้ำไม่ผ่านกรด หยดปริมาตรน้ำ 0.1 ml ลงบน BCYE agar แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ในกล่องดำที่มีแก้วน้ำเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 10 วัน

11.1.4 นำตัวอย่าง swab จุ่มลงใน 0.2 M Potassiumchloride - Hydrochloride acid (KCl-HCl) buffer pH 2.2 วางที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ต่อมานำตัวอย่าง swab จุ่มลงในขวดฝาดำที่มีอาหาร BCYE broth ห่อด้วย aluminum foil บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นหยด BCYE broth 0.1 ml ลงบน BCYE agar แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ในกล่องดำที่มีแก้วน้ำเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 10 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11.1.5 นำตัวอย่าง swab จุ่มลงในขวดฝาดำที่มีอาหาร BCYE broth ห่อด้วย aluminum foil บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นหยด BCYE broth 0.1 ml ลงบน BCYE agar แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ในกล่องดำที่มีแก้วน้ำเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 10 วัน

11.2 เก็บตัวอย่างน้ำครั้งที่สองช่วงเดือนมีนาคม – มิถุนายน 2554

11.2.1 เก็บตัวอย่างน้ำก๊อกน้ำและฝักบัวในโรงแรม ปริมาตรตัวอย่างละ 250 ml ส่วนตัวอย่างน้ำหอหล่อเย็นในโรงแรม เก็บปริมาตรตัวอย่างละ 3,000 ml ใส่ขวดแก้วปลอดเชื้อเก็บในกล่องน้ำแข็ง ก่อนนำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อทำการทดสอบ หากยังไม่ทำการเพาะเชื้อได้ทันที ให้เก็บไว้ในตู้เย็น 4ºC

11.2.2 เก็บตัวอย่าง swab ภายในก๊อกน้ำและฝักบัวในโรงแรม โดยแกะหัวก๊อกน้ำและฝักบัว แล้วใช้สำลีปลอดเชื้อถูด้านข้างท่อก๊อกน้ำและฝักบัว เก็บน้ำใส่หลอดทดลอง นำสำลีที่ swab ตัวอย่างเก็บในหลอดทดลองที่มีน้ำอยู่เล็กน้อยปริมาตรเล็กน้อยประมาณ 5 ml ปิดฝาเก็บในกล่องน้ำแข็งก่อนนำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อทำการทดสอบ ส่วนตัวอย่าง swab หอหล่อเย็นถูสองด้านข้างของตัวถังที่อยู่ด้านตรงกันข้ามกัน นำสำลีที่ swab ตัวอย่างเก็บในหลอดทดลองที่มีน้ำอยู่เล็กน้อย หากยังไม่ทำการเพาะเชื้อได้ทันที ให้เก็บไว้ในตู้เย็น 4ºC

11.2.3 นำตัวอย่างน้ำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำสะอาดจำนวน 1 ml จากนั้นหยดปริมาตรน้ำ 0.1 ml ลงบน BCYE agar ดัดแปลง แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ในกล่องดำที่มีแก้วน้ำเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 10 วัน

11.2.4 นำตัวอย่าง swab จุ่มลง BCYE broth ดัดแปลง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ในกล่องดำที่มีแก้วน้ำเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นหยด BCYE broth 0.1 ml ลงบน BCYE agar ดัดแปลงแล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ในกล่องดำที่มีแก้วน้ำเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 10 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* ในตัวอย่างน้ำ

12.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* ในตัวอย่างน้ำโดยเทคนิค PCR

ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *L. pneumophila* ในตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากก๊อกน้ำฝักบัว และหอหล่อเย็นภายในโรงแรมในจังหวัดเชียงใหม่ โดยนำตะกอนเซลล์จากข้อ 11.1.3 มาทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่เลือกได้จากข้อ 5-7 จากนั้นตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบการมี PCR product ขนาด 901 bp ซึ่งจัดเป็น *L. pneumophila* จากนั้นนำมาแยกความแตกต่างในระดับ serogroup โดยใช้เทคนิค RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะคือ *Eco*RII และ *Pvu*II ตรวจสอบผล RFLP ด้วย 2% agarose gel electrophoresis (ดัดแปลงจาก Claisse *et al*., 2007)

12.2 ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* ในตัวอย่างน้ำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบทางชีวเคมี

12.2.1 จากข้อ 11.1.3-11.1.5 และ 11.2.3-11.2.4 เมื่อเชื้อเจริญบน BCYE agar สังเกตลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สีขาวขุ่น ผิวเรียบ ขอบเรียบ ให้ทำการตรวจสอบซ้ำอีกครั้งโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร BCYE agar ที่ขาด L-cysteine, อาหาร sheep blood agar (Doust *et al*., 2008) และ nutrient agar เพราะหากเป็นเชื้อ *Legionella* spp. จะไม่เจริญในอาหารทั้งสามชนิด

12.2.2 เมื่อคาดการณ์ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Legionella* sp. โดยแบคทีเรียโคโลนีนั้นไม่สามารถเจริญได้ในอาหารทั้ง 3 ชนิดที่กล่าวมาในข้อ 12.2.1 จากนั้นนำโคโลนีมาทดสอบทางชีวเคมีต่อโดยทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase, gelatin, urease และ nitrate test

13. การทดสอบหา selective media ของ *Legionella* sp. (ภาคผนวก ง)

13.1 ทำการผสมอาหารจากส่วนผสมมาตรฐานของ BCYE agar และสารบางชนิดเข้าด้วยกัน (glycine, methylene blue หรือ bile salt) ปรับ pH ให้ได้ 6.9 ด้วย 1N KOH ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีเมื่ออุณหภูมิของอาหารลดลงที่ระดับ 50-55°C จึงเติม L-cysteine•HCl•H_2O, $Fe_4(P_2O_7)_3$•$9H_2O$ และยาปฏิชีวนะ polymycin B และ vancomycin ผสมให้เข้ากันดีก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

13.2 เพาะเลี้ยง *L. pneumophila* แต่ละ serogroup ใน BCYE broth ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2 จากนั้นนำมาทำเจือจางแล้ว spread plate เพื่อนับจำนวนโคโลนีการเจริญบน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหาร BCYE มาตรฐานเทียบกับอาหาร BCYE สูตรดัดแปลงที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะและ glycine, methylene blue หรือ bile salt

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved