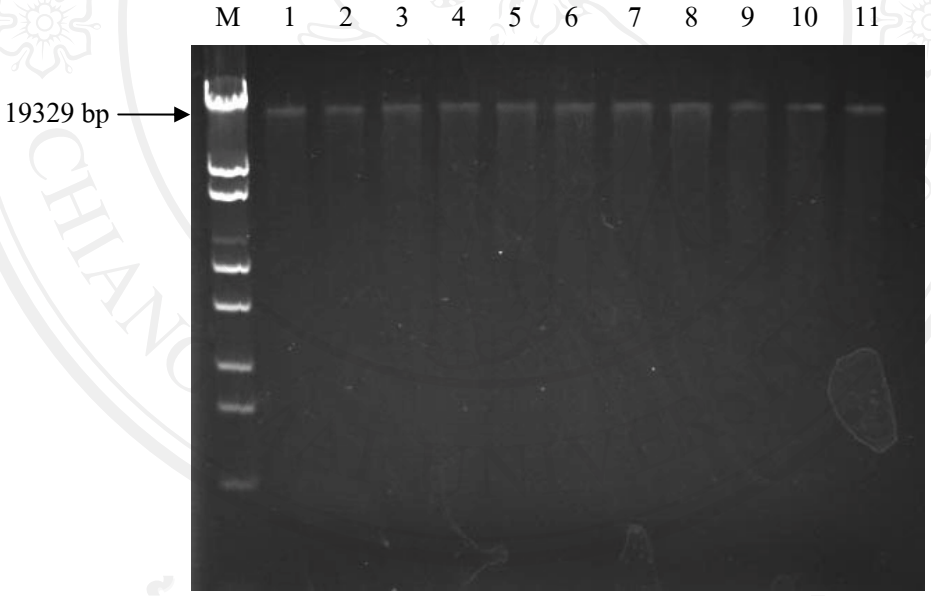
บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การสกัด DNA

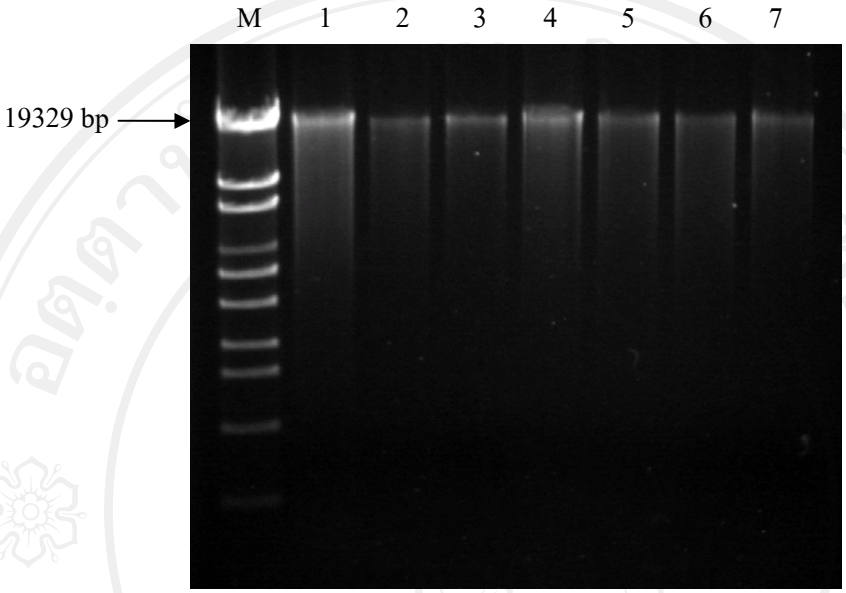
ในการสกัด DNA ของ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. pneumophila* serogroup 1, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *R. solanacearum, S. aureus*, *Sal. typhi Shi. dysenteriae*, และ *V. cholerae* (Salloum *et al*., 2002) พบว่า สามารถสกัด genomic DNA ของแบคทีเรียได้ทั้งหมด โดย genomic DNA มีขนาดใหญ่กว่า 19,329 bp (ภาพ 11)



ภาพ 11 Genomic DNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ; Lane 1: *Ps. aeruginosa* (0.05 µg/µl), Lane 2: *E. coli* (0.05 µg/µl), Lane 3:*Shi. dysenteriae* (0.05 µg/µl), Lane 4: *Sal. typhi* (0.05 µg/µl), Lane 5: *P. vulgaris* (0.05 µg/µl), Lane 6: *S. aureus* (0.05 µg/µl), Lane 7: *R. solanacearurum* (0.05 µg/µl), Lane 8: *K. pneumoniae* (0.05 µg/µl), Lane 9: *P. mirabilis* (0.05 µg/µl), Lane 10: *V. cholerae* (0.05 µg/µl), Lane 11: *L. pneumophila* serogroup 1 (0.05 µg/µl), M: Marker λ DNA/*Eco*130I (0.5 µg/µl)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อสกัด DNA ของ *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11 (Salloum *et al*., 2002) พบว่าสามารถสกัด genomic DNA ได้ทั้งหมด (ภาพ 12)



ภาพ 12 Genomic DNA ของ *L. pneumophila* แต่ละ serogroup; Lane 1: *L. pneumophila* serogroup 1 (0.250 µg/µl), Lane 2: *L. pneumophila* serogroup 2 (0.1 µg/µl), Lane 3: *L. pneumophila* serogroup 3 (0.1 µg/µl), Lane 4: *L. pneumophila* serogroup 6 (0.2 µg/µl), Lane 5: *L. pneumophila* serogroup 8 (0.1 µg/µl), Lane 6: *L. pneumophila* serogroup 10 (0.1 µg/µl), Lane 7: *L. pneumophila* serogroup 11 (0.1 µg/µl), M: Marker λ DNA/*Eco*130I (0.5 µg/µl)

2. การออกแบบ primer บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila*

primer ที่ออกแบบคือ mip F 5′-GGC AGA ATT AGT GGG CG-3′

mip R 5′-GTG GTG TTA GGC TGA CAC C-3′

ความยาวของ PCR product = 901 bp โดยแบคทีเรียต้นแบบที่ทำการออกแบบ primer คู่นี้คือ *L. pneumophila* strain Corby (NC_009494) ทำการ blast โดยโปรแกรม primer-blast (www.ncbi.nim.nih.gov) แสดงความจำเพาะเจาะจงเฉพาะบริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* strain Corby, *L. pneumophila* strain Philadelphia และ *L. pneumophila* strain Paris

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 และ 11

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11 โดยใช้ primer mip F และ mip R (ตาราง 3) องค์ประกอบของสารต่อ 1 ปฏิกิริยา ประกอบด้วย

Buffer, 10X	5 µl
Mg_2Cl	5 µl
dNTPs	1 µl
Template DNA	2 µl
Forward primer (mip F)	0.5 µl
Reverse primer (mip R)	0.5 µl
Taq DNA polymerase	0.5 µl
Distilled water	35.5 µl
Total volume	50 µl

ตาราง 3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila*

ขั้นตอน	สภาวะ			
	1	2	3	4
1. Initial denaturation				
- อุณหภูมิ (°C)	95	95	95	95
- เวลา (นาที)	5	5	5	5
2. Denaturation				
- อุณหภูมิ (°C)	95	95	95	95
- เวลา (นาที)	0.30	0.30	0.30	0.30
3. Annealing				
- อุณหภูมิ (°C)	52	53	54	54
- เวลา (นาที)	0.30	0.30	0.30	0.30

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 (ต่อ) การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila*

ขั้นตอน	สภาวะ			
	1	2	3	4
4. Extension				
- อุณหภูมิ (°C)	72	72	72	72
- เวลา (นาที)	1	1	1	1
5. Final extention				
- อุณหภูมิ (°C)	72	72	72	72
- เวลา (นาที)	10	10	10	10
จำนวนรอบของปฏิกิริยา (รอบ)	30	30	30	30
ความเข้มข้นของ primer ที่ใช้ (mM)	1	1	1	0.5

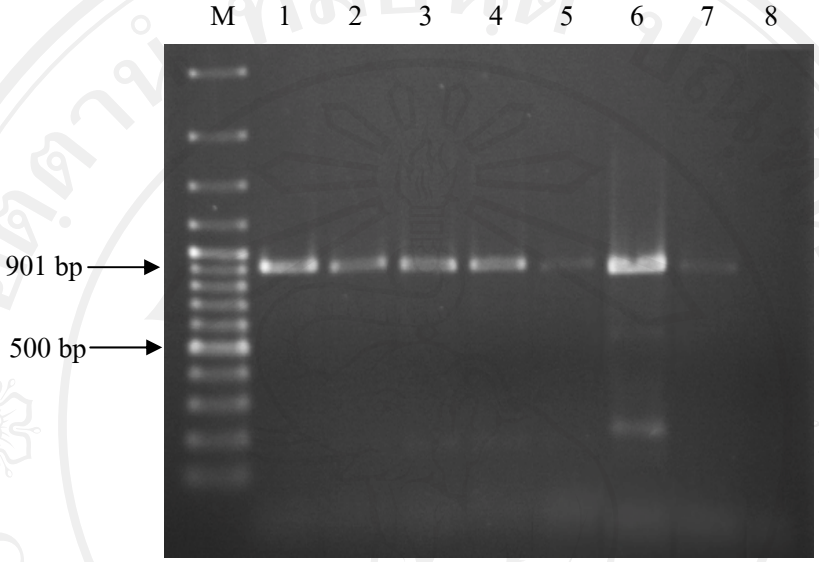
สภาวะที่ 1 พบ PCR product มีความยาว 200, 250, 600 และ 901 bp ผลการทดลองที่ได้รับแสดงถึงขั้นตอน annealing ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการเข้าจับของ primer ในการทดลองอุณหภูมิที่ 52°C ทำให้ primer mip F และ mip R เข้าจับกับลำดับรหัสพันธุกรรมและสังเคราะห์สายรหัสพันธุกรรมอย่างไม่จำเพาะเจาะจง จึงปรากฏชิ้นส่วนการสังเคราะห์มากกว่าหนึ่งชิ้น (ภาพ 13) จึงทำการปรับสภาวะที่ 2 ต่อไป

ในสภาวะที่ 2 พบ PCR product มีความยาว 200 bp แบบจางบริเวณ Lane 5: *L. pneumophila* serogroup 8 และ Lane 6: *L. pneumophila* serogroup 10 และ PCR product ขนาด 901 bp ในทุกช่องของแบคทีเรีย *L. pneumophila* ผลการทดลองบ่งบอกว่าในขั้นตอน annealing นั้น อุณหภูมิ 53°C ยังเป็นอุณหภูมิที่ไม่สูงพอที่จะทำให้ primer mip F และ mip R เข้าจับกับลำดับรหัสพันธุกรรมและสังเคราะห์สายรหัสพันธุกรรมอย่างจำเพาะเจาะจง จึงปรากฏชิ้นส่วนการสังเคราะห์มากกว่าหนึ่งชิ้น (ภาพ 14) จึงทำการปรับสภาวะที่ 3 ต่อไป

ในสภาวะที่ 3 พบ PCR product มีความยาว 901 เพียงความยาวเดียว ถือเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่ม DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* ซึ่งใช้ความเข้มข้นของ primer เท่ากับ 1 mM สังเกตเห็น primer-dimer ชัดเจนด้านล่างของเจลบ่งบอกถึงความเข้มข้นที่มากเกินไปของ primer จึงทำให้ primer เหลือไม่จับกับสายรหัสพันธุกรรม (ภาพ 15) จึงทำการปรับสภาวะที่ 4 ต่อไป เพื่อลด primer-dimer ลง ซึ่งใช้ความเข้มข้นของ primer เท่ากับ 0.5 mM พบ PCR product มี

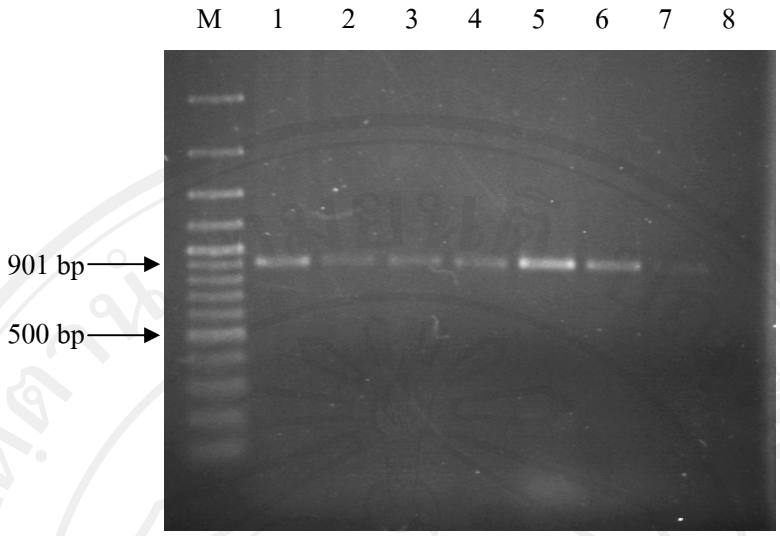
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความยาว 901 bp เพียงขนาดเดียว และไม่สังเกตเห็น primer-dimer บริเวณด้านล่างของเจล ดังนั้น สภาวะที่ 4 จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* (ภาพ 16)

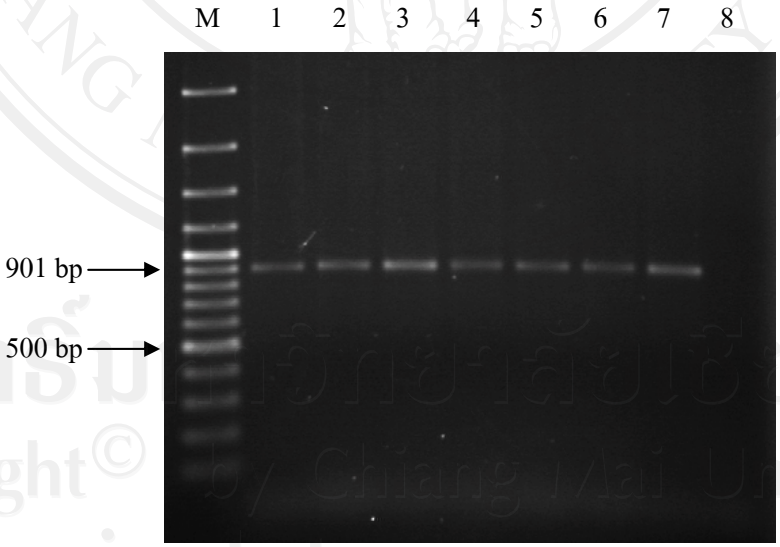


ภาพ 13 อุณหภูมิ annealing ที่ 52°C ของเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila*, M : Marker 100 bp DNA Ladder Plus, Lane 1: *L. pneumophila* serogroup 1, Lane 2: *L. pneumophila* serogroup 2, Lane 3: *L. pneumophila* serogroup 3, Lane 4: *L. pneumophila* serogroup 6, Lane 5: *L. pneumophila* serogroup 8, Lane 6: *L. pneumophila* serogroup 10, Lane 7: *L. pneumophila* serogroup 11, Lane 8: distilled water (control)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

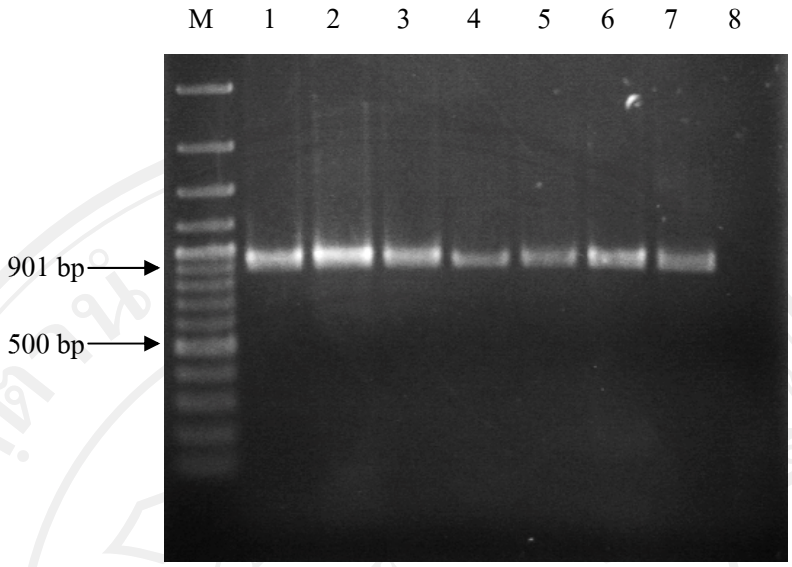


ภาพ 14 อุณหภูมิ annealing ที่ 53°C ของเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila*, M : Marker 100 bp DNA Ladder Plus, Lane 1: *L. pneumophila* serogroup 1, Lane 2: *L. pneumophila* serogroup 2, Lane 3: *L. pneumophila* serogroup 3, Lane 4: *L. pneumophila* serogroup 6, Lane 5: *L. pneumophila* serogroup 8, Lane 6: *L. pneumophila* serogroup 10, Lane 7: *L. pneumophila* serogroup 11, Lane 8: distilled water (control)



ภาพ 15 อุณหภูมิ annealing ที่ 54°C ของเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila*, M : Marker 100 bp DNA Ladder Plus, Lane 1: *L. pneumophila* serogroup 1, Lane 2: *L. pneumophila* serogroup 2, Lane 3: *L. pneumophila* serogroup 3, Lane 4: *L. pneumophila* serogroup 6, Lane 5: *L. pneumophila* serogroup 8, Lane 6: *L. pneumophila* serogroup 10, Lane 7: *L. pneumophila* serogroup 11, Lane 8: distilled water (control)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

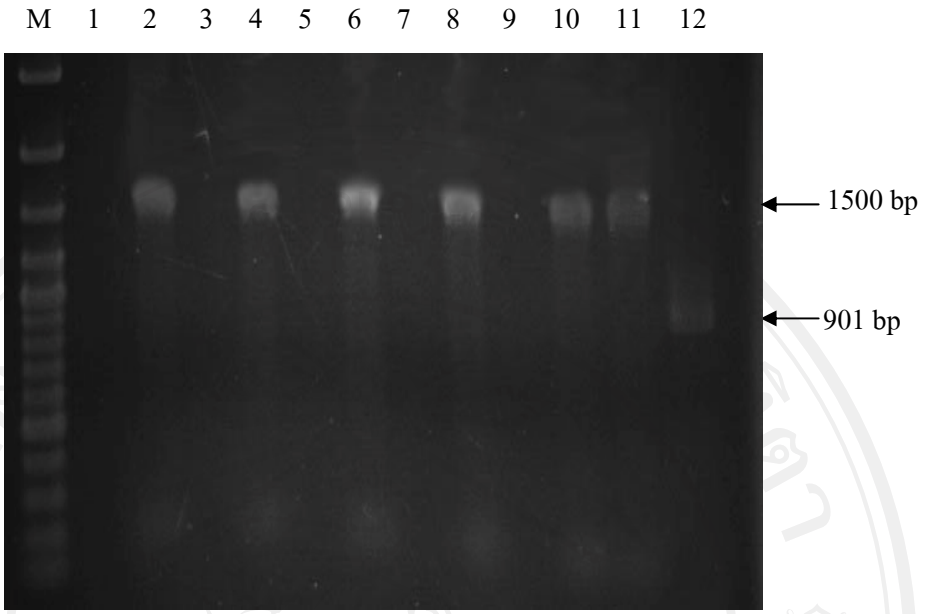


ภาพ 16 อุณหภูมิ annealing ที่ 54°C และ primer mip F และ primer mip R ความเข้มข้น 0.5 mM ของเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila*, M : Marker 100 bp DNA Ladder Plus, Lane 1: *L. pneumophila* serogroup 1, Lane 2: *L. pneumophila* serogroup 2, Lane 3: *L. pneumophila* serogroup 3, Lane 4: *L. pneumophila* serogroup 6, Lane 5: *L. pneumophila* serogroup 8, Lane 6: *L. pneumophila* serogroup 10, Lane 7: *L. pneumophila* serogroup 11, Lane 8: distilled water (control)

4. การศึกษาความจำเพาะของ primer mip R และ mip F

ตรวจสอบการจับอย่างจำเพาะของ primer mip F และ mip R บนยีน *mip* ของ *L. pneumophila* serogroup 1 กับแบคทีเรียเปรียบเทียบ คือ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *R. solanacearum, S. aureus*, *Sal. typhi Shi. dysenteriae*, และ *V. cholerae* โดยเทคนิค PCR สภาวะที่ 4 พบว่า PCR product ที่ได้ ขนาด 901 bp ปรากฏใน *L. pneumophila* serogroup 1 เท่านั้น (ภาพ 17)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ก

ภาพ 17 ความจำเพาะเจาะจงของ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip* โดยเทคนิค PCR

Lane 1: *Ps. aeruginosa* กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

Lane 2: *Ps. aeruginosa* กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 3: *E. coli* กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

Lane 4: *E. coli* กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 5: *Shi. dysenteriae* กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

Lane 6: *Shi. dysenteriae* กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 7: *Sal. typhi* กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

Lane 8: *Sal. typhi* กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 9: *P. vulgaris* กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

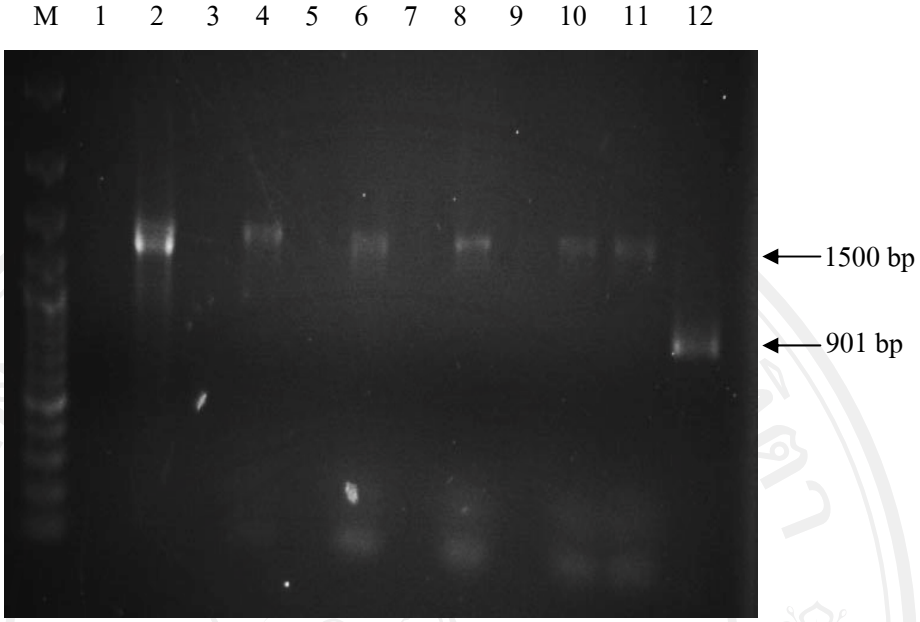
Lane 10: *P. vulgaris* กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 11: *L. pneumophila* serogroup 1 กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 12: *L. pneumophila* serogroup 1 กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

Lane M: Marker 100 bp DNA Ladder Plus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ข

ภาพ 17 ความจำเพาะเจาะจงของ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip* โดยเทคนิค PCR (ต่อ)

Lane 1: *S. aureus* กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

Lane 2: *S. aureus* กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 3: *R. solanacearum* กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

Lane 4: *R. solanacearum* กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 5: *K. pneumonia* กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

Lane 6: *K. pneumonia* กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 7: *P. mirabilis* กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

Lane 8: *P. mirabilis* กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 9: *V. cholerae* กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

Lane 10: *V. cholera* กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 11: *L. pneumophila* serogroup 1 กับ primer 27F, 1492R ต่อยีน *16S rRNA*

Lane 12: *L. pneumophila* serogroup 1 กับ primer mip F, mip R ต่อยีน *mip*

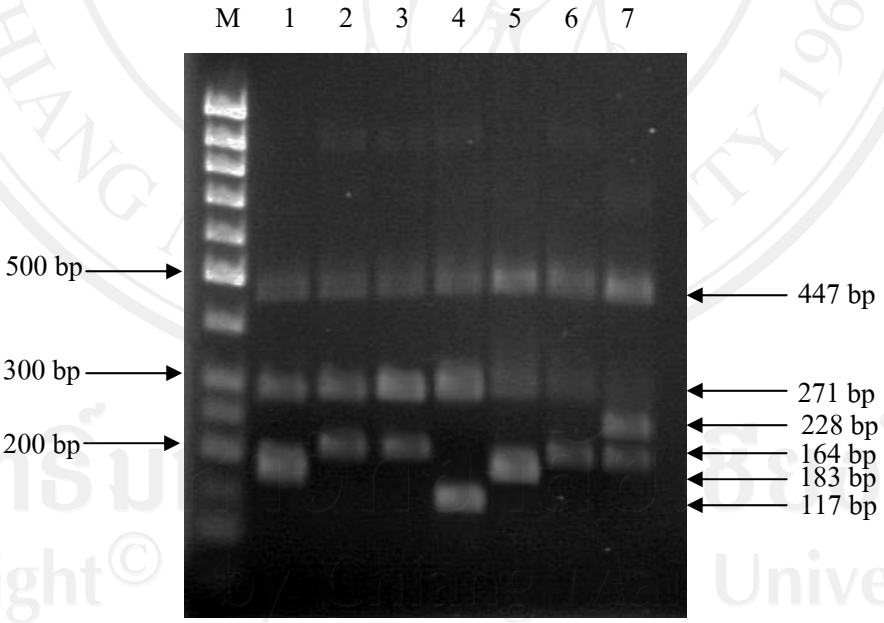
Lane M: Marker 100 bp DNA Ladder Plus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

PCR product ของ *L. pneumophila* แต่ละ serogroup ถูกนำไปตรวจสอบลำดับรหัสพันธุกรรมด้วย program restriction mapping version 3 (www.restrictionmapper.org) เพื่อหาเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า เอนไซม์ *Eco*RII และ *Pvu*II สามารถตัดแยก *L. pneumophila* serogroup 1 ออกจาก serogroup อื่นได้ เมื่อทำการทดลอง RFLP ตัด PCR product ขนาดความยาว 901 bp ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อแยกความแตกต่างของ *L. pneumophila* แต่ละ serogroup ด้วยเอนไซม์ *Eco*RII พบว่า สามารถแยก *L. pneumophila* serogroup 1 และ 8 ออกจาก serogroup 2, 3, 6, 10 และ 11 ด้วยความยาวของรหัสพันธุกรรมเท่ากับ 164 bp

L. pneumophila serogroup 2, 3 และ 10 ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ เนื่องจากมีความยาวของรหัสพันธุกรรม 3 ชิ้น คือ 183, 271 และ 447 bp แต่ทั้ง 3 serogroup นี้สามารถแยกออกจาก serogroup 6 ได้ด้วยความยาวของรหัสพันธุกรรม 117 bp และสามารถแยกออกจาก serogroup 11 ได้ด้วยความยาวของรหัสพันธุกรรมขนาด 228 bp (ภาพ 18)



ภาพ 18 การตัดชิ้น PCR product ขนาด 901 bp ด้วยเอนไซม์ *Eco*RII

Lane 1: *L. pneumophila* serogroup 1, Lane 2: *L. pneumophila* serogroup 2,

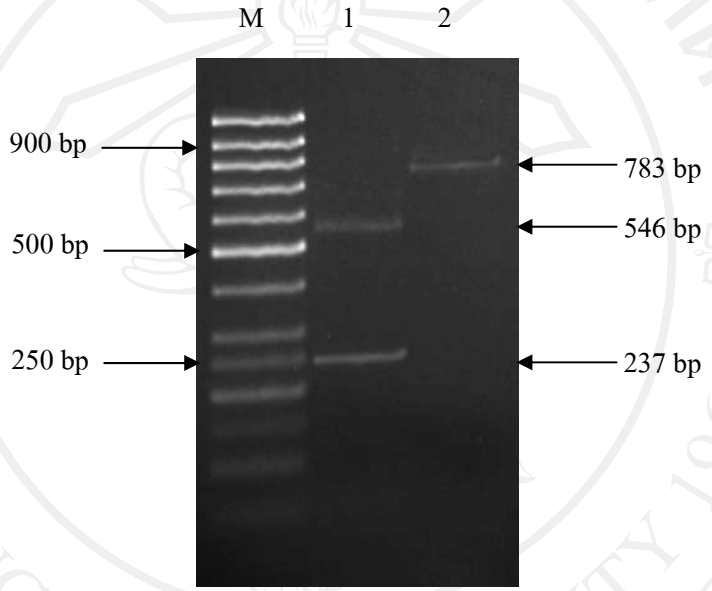
Lane 3: *L. pneumophila* serogroup 3, Lane 4*: L. pneumophila* serogroup 6,

Lane 5: *L. pneumophila* serogroup 8, Lane 6: *L. pneumophila* serogroup 10,

Lane 7: *L. pneumophila* serogroup 11, Lane M: Marker 50 bp DNA Ladder Plus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัด PCR product ขนาดความยาว 901 bp เพื่อแยกความแตกต่างระหว่าง *L. pneumophila* serogroup 1 และ 8 ด้วยเอนไซม์ *Pvu*II พบว่า *L. pneumophila* serogroup 1 สามารถตัดได้ 2 ตำแหน่ง ได้ความยาวของรหัสพันธุกรรมที่เห็นชัดเจนประมาณ 546 bp และ 237 bp แต่ serogroup 8 ได้ความยาวของรหัสพันธุกรรม 783 bp ตำแหน่งเดียวที่เห็นได้ชัด ดังนั้น การตัด PCR product ขนาด 901 bp ด้วยเอนไซม์ *Pvu*II จึงสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง *L. pneumophila* serogroup 1 และ 8 ได้ (ภาพ 19)



ภาพ 19 การตัดสายรหัสพันธุกรรมขนาด 901 bp ด้วยเอนไซม์ *Pvu*II; Lane 1: *L. pneumophila* serogroup 1, Lane 2: *L. pneumophila* serogroup 8, Lane M: Marker 50 bp DNA Ladder Plus

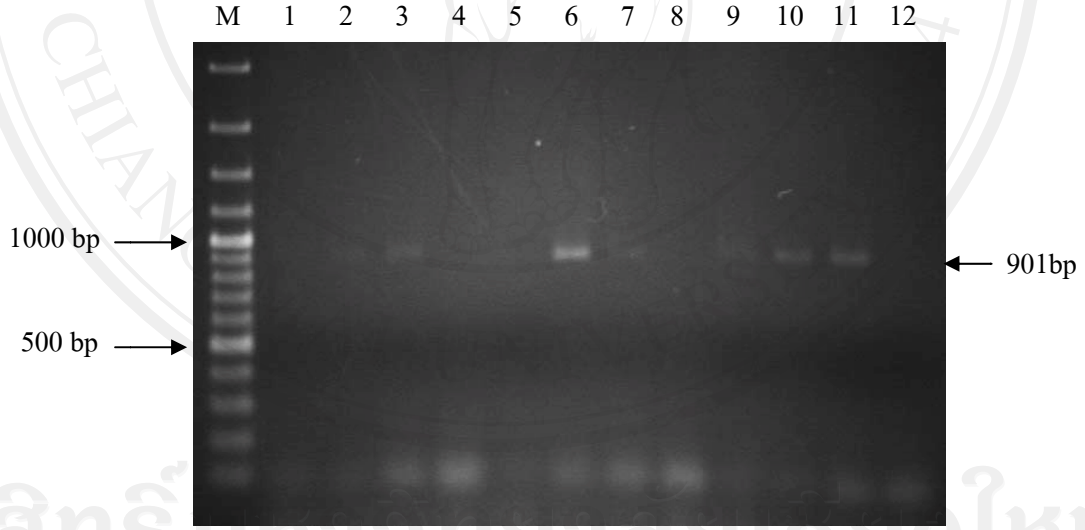
6. การหาปริมาณเซลล์ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค PCR และการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer (ภาคผนวก จ)

เมื่อเพาะเลี้ยง *L. pneumophila* ในอาหารเหลว BCYE มาตรฐาน จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปเจือจางแบบ 10 เท่าลำดับส่วน ก่อนนำไปนับปริมาณเซลล์ด้วย Haemacytometer แล้วตรวจหาแบคทีเรียโดย PCR พบว่า ที่ความเข้มข้น 1×10^{-4} ซึ่งมีปริมาณเซลล์ 6.00×10^{4} เซลล์/ml สามารถตรวจพบ PCR product ขนาด 901 bp (ภาพ 21) สำหรับส่วนที่ 2 ถูกนำไปกรองเมื่อกำจัดผงถ่าน และนำไปเจือจางแบบ 10 เท่าลำดับส่วน ก่อนนำไปนับปริมาณเซลล์ด้วย Haemacytometer แล้วตรวจหาแบคทีเรียโดย PCR พบว่า ที่ความเข้มข้น 1×10^{-3} ซึ่งมีปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์ 8.87 × 10^4 เซลล์/ml สามารถตรวจพบ PCR product ขนาด 901 bp (ภาพ 20) ดังนั้นจึงไม่มีความแตกต่างกันระหว่างปฏิกริยาที่กำจัดผงถ่านออกจากปฏิกิริยา และไม่กำจัดผงถ่านออกจากปฏิกิริยา สรุปได้ว่าปริมาณเซลล์ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค PCR คือ 10^4 เซลล์/ml

เมื่อมุ่งศึกษาถึงสิ่งรบกวนของปฏิกิริยาพบว่า ผงถ่านที่มีความเข้มข้นสูง รบกวนปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณ DNA อย่างชัดเจน จากการทดลอง *L. pneumophila* serogroup 1 ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BCYE มาตรฐานและไม่มีการกำจัดผงถ่านออกจากปฏิกิริยาก่อนตรวจหาการปนเปื้อนด้วยเทคนิค PCR จะไม่ปรากฏ PCR product ที่ความเข้มข้นของผงถ่านที่ความเข้มข้นของเซลล์ 1×10^{-1} แต่จะปรากฏ PCR product เมื่อความเข้มข้นของผงถ่านลดลง นั่นคือที่ความเข้มข้นของเซลล์ 1×10^{-2} และ 1×10^{-3} (ภาพ 20) สำหรับการทดลองที่กำจัดผงถ่านอกจากปฏิกิริยา สามารถตรวจสอบหาการปนเปื้อนของเชื้อได้ตั้งแต่ความเข้มข้นของเซลล์ 1×10^{-1} (ภาพ 21) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การเจือจางที่มากขึ้นทำให้ผงถ่านลดความเข้มข้นลง เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค PCR ผงถ่านจึงไม่รบกวนปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย



ภาพ 20 ปริมาณการเจือจางของเซลล์ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ *L. pneumophila* serogroup 1 ได้ด้วยเทคนิค PCR โดยมีผงถ่านปนเปื้อนในปฏิกิริยา

Lane 1, 5, 9: *L. pneumophila* serogroup 1 ความเข้มข้น 1×10^{-1}

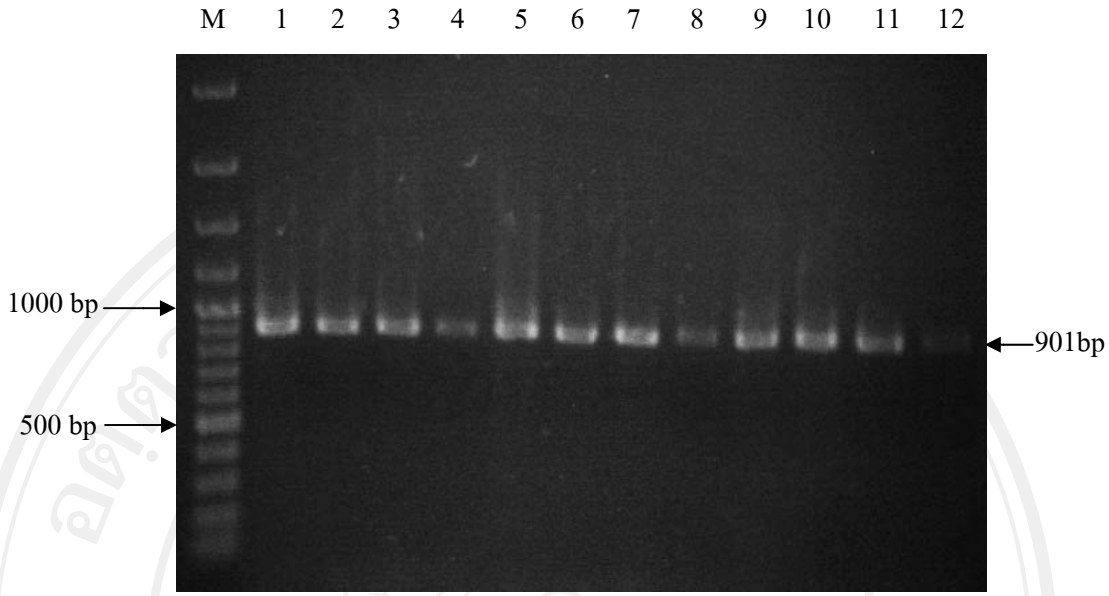
Lane 2, 6, 10: *L. pneumophila* serogroup 1 ความเข้มข้น 1×10^{-2}

Lane 3, 7, 11: *L. pneumophila* serogroup 1 ความเข้มข้น 1×10^{-3}

Lane 4, 8, 12: *L. pneumophila* serogroup 1 ความเข้มข้น 1×10^{-4}

Lane M: Marker 100 bp DNA Ladder Plus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 21 ปริมาณการเจือจางของเซลล์ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ *L. pneumophila* serogroup 1 ได้ด้วยเทคนิค PCR โดยกำจัดผงถ่านออกจากปฏิกิริยา

Lane 1, 5, 9: *L. pneumophila* serogroup 1 ความเข้มข้น 1×10^{-1}

Lane 2, 6, 10: *L. pneumophila* serogroup 1 ความเข้มข้น 1×10^{-2}

Lane 3, 7, 11: *L. pneumophila* serogroup 1 ความเข้มข้น 1×10^{-3}

Lane 4, 8, 12: *L. pneumophila* serogroup 1 ความเข้มข้น 1×10^{-4}

Lane M: Marker 100 bp DNA Ladder Plus

7. การสร้างสูตร selective media ของเชื้อ *Legionella* sp.

เมื่อดัดแปลงสูตรอาหาร BCYE มาตรฐานซึ่งประกอบด้วย Yeast extract, ACES, Charcoal, α-Ketoglutarate, L-cysteine และ Ferric-pyrophosphate โดยการเพิ่มสารบางชนิดและยาปฏิชีวนะเข้าไป (ตาราง 4) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีอยู่ในแหล่งน้ำแต่ไม่ยับยั้งการเจริญของ *L. pneumophila* พบว่า อาหาร BCYE ดัดแปลงสูตร 1 ที่มีการเติม bile salt, vancomycin และ glycine และอาหาร BCYE ดัดแปลงสูตร 4 ซึ่งเติม methylene blue นั้นยับยั้งการเจริญของ *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11 ส่วนอาหารสูตร 3 เป็นการดัดแปลงอาหาร Muller-Hinton โดยเพิ่ม L-cysteine และ Ferric-pyrophosphate เพื่อกระตุ้นการเจริญเของ *L. pneumophila* พบว่ายับยั้งการเจริญของ *L. pneumophila* ทุก serogroup สำหรับอาหารสูตร 2 ที่ดัดแปลงจากอาหาร BCYE มาตรฐานโดยเติม glycine, vancomycin และ polymycin B พบว่า *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3, 6, 8, 10 และ 11 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^{-7} สามารถเจริญได้ไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต่างกับอาหาร BCYE มาตรฐาน และอาหารดัดแปลงสูตร 2 นี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเปรียบเทียบ ได้แก่ *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *Shi. dysenteriae*, *Sal. typhi*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *R. solanacearum*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis, V. cholerae* และ *Bacillus* sp. ดังนั้นอาหารสูตร 2 จึงเหมาะสมเป็นอาหารในการเพาะเลี้ยง *L. pneumophila* serogroup 1 เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ (ภาคผนวก ฉ)

ตาราง 4 อาหาร 4 สูตรที่ทำการดัดแปลงเพื่อส่งเสริมการเจริญของ *Legionella* sp.

องค์ประกอบ	BCYE มาตรฐาน	อาหารดัดแปลงสูตรที่			
		1	2	3	4
ACES (g/l)	10.0	10.0	10.0	-	10.0
Beef extract (g/l)	-	-	-	2	-
Bile salt (g/l)	-	1.5	-	-	-
Casein-hydrolysate (g/l)	-	-	-	7.5	-
Charcoal (g/l)	2.0	2.0	2.0	-	2.0
Ferric-pyro phosphate (g/l)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Glycine (g/l)	-	3.0	3.0	-	-
α-Ketoglutarate (g/l)	1.0	1.0	1.0	-	1.0
L-cysteine (g/l)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Methylene blue (g/l)	-	-	-	-	0.065
Polymycin B (U/l)	-	-	50.0	-	-
Starch (g/l)	-	-	-	1.5	-
Vancomycin (μg/ml)	-	1.0	5.0	-	-
Yeast extract (g/l)	10.0	10.0	10.0	-	10.0

8. การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* ในตัวอย่างน้ำโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร BCYE และตรวจสอบโดยเทคนิค PCR

8.1 เก็บตัวอย่างน้ำครั้งแรกช่วงเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม 2553

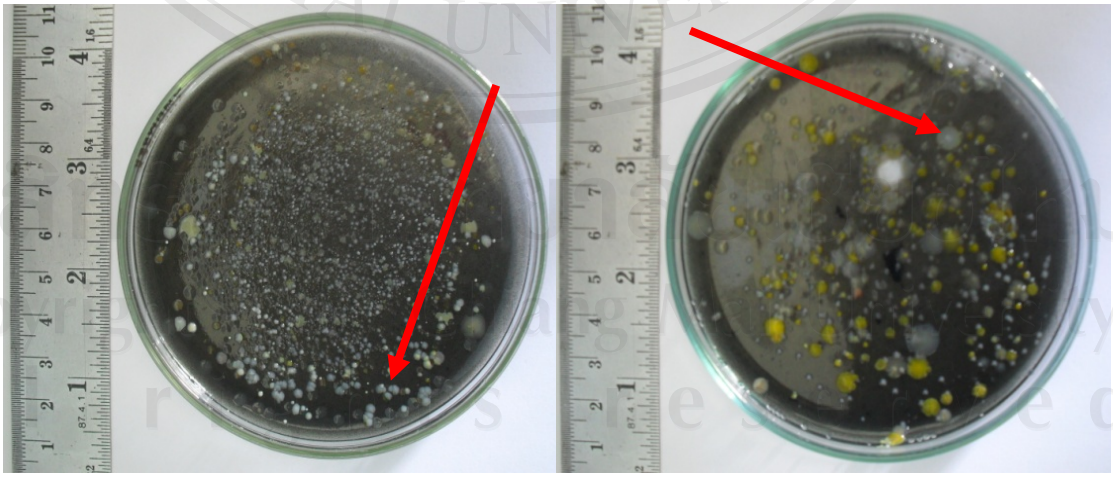
8.1.1 นำตัวอย่างน้ำผ่าน 0.2 M Potassiumchloride - Hydrochloride acid (KCl-HCl) buffer pH 2.2 ก่อนเพาะเลี้ยงในอาหาร BCYE มาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เก็บตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำ ฝักบัว และหอหล่อเย็น จากโรงแรมจำนวน 5 แห่ง ตัวอย่างละ 100 ml นำมาปั่นเหวี่ยง และละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำสะอาด ล้างเซลล์ด้วย 0.2 M Potassiumchloride - Hydrochloride acid (KCl-HCl) buffer pH 2.2 นาน 10 นาที จากนั้น spread plate ลงบนอาหาร BCYE มาตรฐาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ในกล่องดำที่มีแก้วน้ำเพื่อให้ความชื้น นาน 10 วัน พบว่าตัวอย่างน้ำทั้งหมด 67 ตัวอย่างจาก 5 โรงแรมในจังหวัดเชียงใหม่ ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียที่มีลักษณะคาดว่าเป็น *Legionella* เมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumphila* โดยเทคนิค PCR ไม่พบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* ทั้ง 67 ตัวอย่างน้ำ

8.1.2 นำตัวอย่างน้ำเพาะเลี้ยงบนอาหาร BCYE มาตรฐานโดยไม่ผ่านกรดและทดสอบเฉพาะโคโลนีที่คล้าย *Legionella* sp.

นำตัวอย่างน้ำและตัวอย่าง swab (ก๊อกน้ำ ฝักบัว และหอหล่อเย็น) ตัวอย่างละ 100 ml ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำสะอาด จากนั้น spread plate ลงบนอาหาร BCYE มาตรฐาน บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ในกล่องดำที่มีแก้วน้ำเพื่อให้ความชื้น นาน 10 วัน พบว่าตัวอย่างน้ำ 67 ตัวอย่างและตัวอย่าง swab 67 ตัวอย่างจาก 5 โรงแรมในจังหวัดเชียงใหม่ ปรากฏโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Legionella* sp. คือ รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ผิวเรียบ ขอบเรียบ แกรมลบ และเพาะเลี้ยงในอาหาร BCYE ที่ไม่มี L-cysteine, NA และ blood agar พบว่ามีการเจริญของแบคทีเรียในอาหารทุกชนิด จึงสรุปได้ว่า โคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้าย *Legionella* sp. แต่ไม่ใช่ *Legionella* sp. เพราะแบคทีเรียชนิดนี้ไม่เจริญในอาหารทั้ง 3 ชนิดข้างต้น (ภาพ 22)

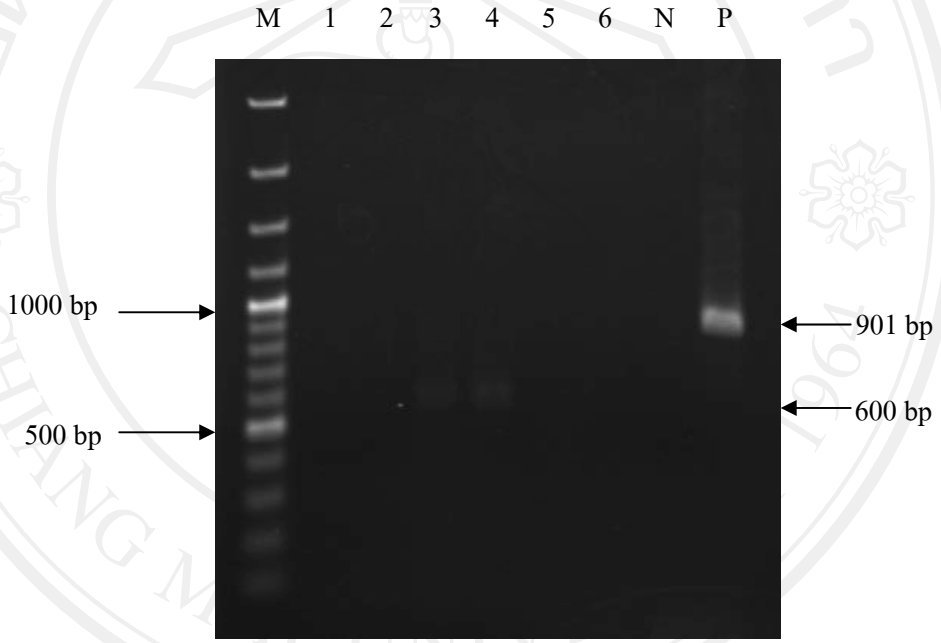


ภาพ 22 ตัวอย่างโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้าย *Legionella* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.1.3 ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* โดยเทคนิค PCR

ในการตรวจสอบหา *L. pneumphila* serogroup 1 จากการสุ่มเก็บตัวอย่างฝักบัว, ก๊อกน้ำ และหอหล่อเย็น เป็นตัวอย่างน้ำ 67 ตัวอย่างและตัวอย่าง swab 67 ตัวอย่างจาก 5 โรงแรม ผลการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR ไม่พบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* แม้ว่าจะพบ PCR product ขนาด 600 bp จากตัวอย่าง swab ของหอหล่อเย็น 1 ภายในโรงแรม ค แต่ไม่ใช่ *L. pneumophila* เพราะขนาด PCR product ของ *L. pneumophila* ที่ทำการออกแบบจะต้องมีขนาดความยาวเท่ากับ 901 bp (ภาพ 23)



ภาพ 23 การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* จากหอหล่อเย็น โดยเทคนิค PCR, Lane 1: น้ำหอหล่อเย็น 1, Lane 2: น้ำหอหล่อเย็น 2, Lane 3: swab หอหล่อเย็น 1 ครั้งที่ 1, Lane 4: swab หอหล่อเย็น 1 ครั้งที่ 2, Lane 5: swab หอหล่อเย็น 2 ครั้งที่ 1, Lane 6: swab หอหล่อเย็น 2 ครั้งที่ 2, Lane N: distilled water (negative control), Lane P: *L. pneumophila* serogroup 1 (positive control), Lane M: Marker 100 bp DNA Ladder Plus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

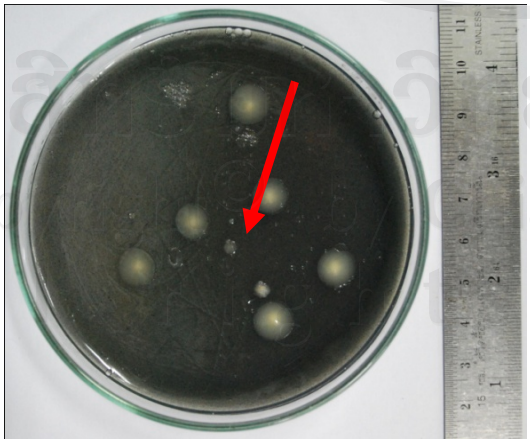
8.2 เก็บตัวอย่างน้ำครั้งที่สองช่วงเดือนมีนาคม – มิถุนายน 2554

8.2.1 การเพาะเลี้ยงบนอาหาร BCYE ดัดแปลงสูตร 2

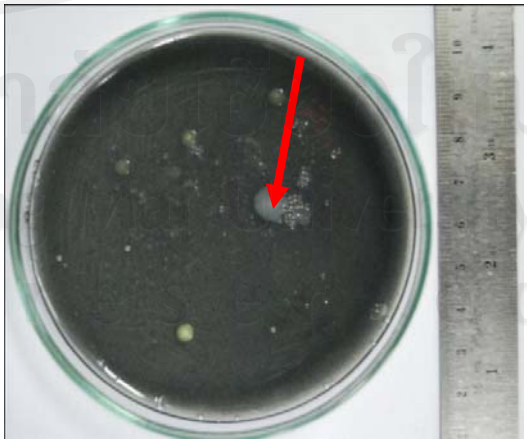
นำตัวอย่างน้ำและตัวอย่าง swab จากก๊อกน้ำ ฝักบัว ตัวอย่างละ 250 ml ตัวอย่างน้ำจากแอร์และหอหล่อเย็น ตัวอย่างละ 3,000 ml หลังจากปั่นเหวี่ยง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำสะอาด จากนั้น spread plate บนอาหาร BCYE ดัดแปลงสูตร 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ในกล่องดำที่มีแก้วน้ำเพื่อให้ความชื้น นาน 10 วัน พบว่าตัวอย่างน้ำ 70 ตัวอย่างและตัวอย่าง swab 66 ตัวอย่างจาก 6 โรงแรมในจังหวัดเชียงใหม่ ปรากฏ 67 โคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Legionella* sp. คือ รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ผิวเรียบ ขอบเรียบ แกรมลบ และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BCYE ที่ไม่มี L-cysteine, NA และ blood agar พบว่า 11 โคโลนีไม่ปรากฏการเจริญในอาหารทุกชนิด (ภาพ 24-34) ดังนั้นสรุปได้ว่าอาจเป็นโคโลนีของ *Legionella* sp. จึงทำการตรวจสอบทางชีวเคมี (ตาราง 5-10) และทำการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR ต่อไป

นำ 11 โคโลนีตรวจสอบทางชีวเคมี พบว่า 6 โคโลนีเป็น *Legionella* sp. คือ ผลิตเอนไซม์ catalase, เกิดการย่อยเจลาติน, การทดสอบ nitrate และ urea ให้ผลเป็นลบ ส่วน 5 โคโลนีให้ผลต่างตรงที่ไม่เกิดการย่อยเจลลาตินจึงไม่ใช่ *Legionella* sp.

ตรวจสอบ 11 โคโลนีด้วยเทคนิค PCR พบ PCR product ขนาด 600 bp ของโคโลนีน้ำก๊อกน้ำ 1 ตัวอย่าง และโคโลนีน้ำฝักบัว 2 ตัวอย่าง ภายในโรงแรม ก แต่ไม่ใช่ *L. pneumophila* เพราะขนาด PCR product ของ *L. pneumophila* ที่ทำการออกแบบจะต้องมีขนาดความยาวเท่ากับ 901 bp โคโลนีที่เหลือ 8 โคโลนีจากน้ำก๊อกน้ำ 5 ตัวอย่าง ภายในโรงแรม ข และโรงแรม ฉ, น้ำฝักบัว 3 ตัวอย่าง ภายในโรงแรม ก และโรงแรม ฉ พบ PCR product ขนาด 901 bp จึงสรุปว่าเป็น *L. pneumophila* (ภาพ 35-37) และทำการแยกความแตกต่างระดับ serogroup ต่อไป

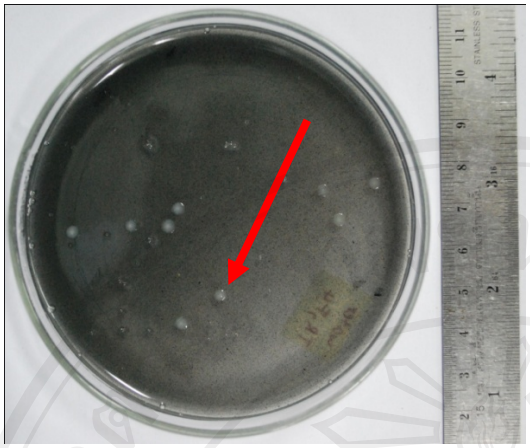


ภาพ 24 ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับ *Legionella* sp. จากตัวอย่าง น้ำฝักบัว 2 ภายในโรงแรม ก

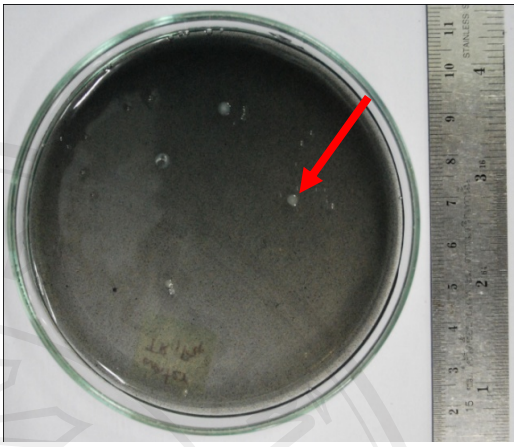


ภาพ 25 ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับ *Legionella* sp. จากตัวอย่างน้ำฝักบัว 5 ภายในโรงแรม ก

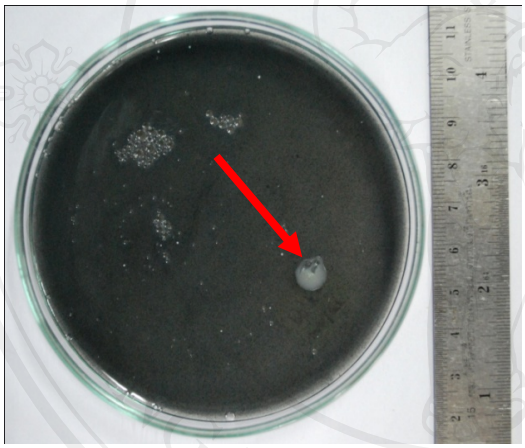
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 26 ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับ *Legionella* sp. จากตัวอย่างน้ำฝักบัว 4 ภายในโรงแรม ก

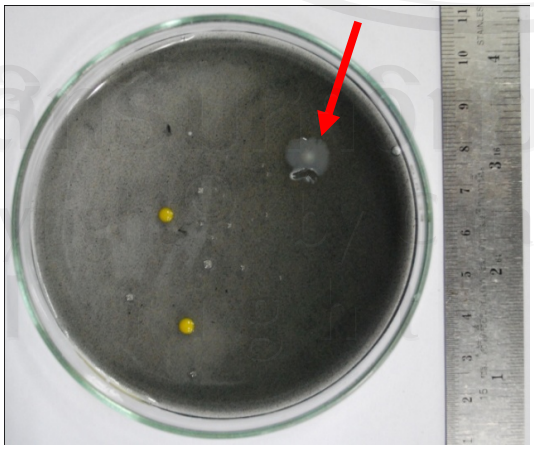


ภาพ 27 ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับ *Legionella* sp. จากตัวอย่าง น้ำก๊อกน้ำ 3 ภายในโรงแรม ก

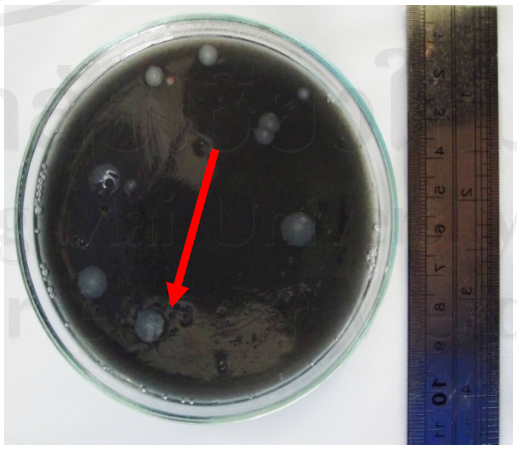


ภาพ 28 ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับ *Legionella* sp. จากตัวอย่างน้ำก๊อกน้ำ 4 ภายในโรงแรม ข

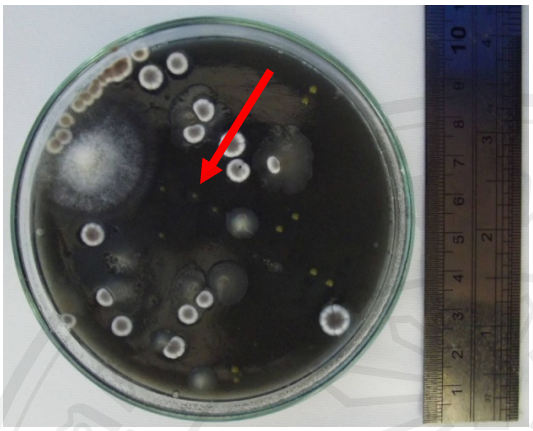
ภาพ 29 ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับ *Legionella* sp. จากตัวอย่างน้ำก๊อกน้ำ 2 ภายในโรงแรม ข



ภาพ 30 ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับ *Legionella* sp. จากตัวอย่าง น้ำก๊อกน้ำ 5 ภายในโรงแรม ข



ภาพ 31 ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับ *Legionella* sp. จากตัวอย่าง น้ำฝักบัว 1 ภายในโรงแรม ฉ



ภาพ 32 ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับ *Legionella* sp. จากตัวอย่างน้ำฝักบัว 3 ภายในโรงแรม ฉ

ภาพ 33 ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับ *Legionella* sp. จากตัวอย่างน้ำก๊อกน้ำ 1 ภายในโรงแรม ฉ

ภาพ 34 ลักษณะโคโลนีที่คล้ายกับ *Legionella* sp. จากตัวอย่างน้ำก๊อกน้ำ 2 ภายในโรงแรม ฉ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 การตรวจสอบโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Legionella* sp. ด้วยอาหารทดสอบและทดสอบทางชีวเคมีของตัวอย่างน้ำจากโรงแรม ก

ตัวอย่าง	ทดสอบด้วยอาหาร			ทดสอบทางชีวเคมี			
	Blood agar	NA	BCYE non L-cysteine	catalase	nitrate	gelatin	urease
1. น้ำก๊อกน้ำ 1	+	+	+				
2. น้ำก๊อกน้ำ 2	+	+	+				
3. น้ำก๊อกน้ำ 3	-	-	-	+	-	-	-
4. น้ำฝักบัว 2	-	-	-	+	-	-	-
5. น้ำฝักบัว 3 โคโลนีที่ 1	+	+	+				
6. น้ำฝักบัว 3 โคโลนีที่ 2	+	+	+				
7. น้ำฝักบัว 4	-	-	-	+	-	-	-
8. น้ำฝักบัว 5	-	-	-	+	-	+	-
9. Swab ก๊อกน้ำ 1	+	+	+				
10. Swab ฝักบัว 1	+	+	+				
11. Swab ฝักบัว 2	+	+	+				
12. Swab หอหล่อเย็น 1 โคโลนีที่ 1	+	+	+				
13. Swab หอหล่อเย็น 1 โคโลนีที่ 2	+	+	+				
14. Swab หอหล่อเย็น 2	+	+	+				

หมายเหตุ = ไม่ทำการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อระบุเป็น *Legionella* sp. ต่อ เพราะทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด Blood agar, NA และ BCYE non L-cysteine หากแบคมีเรียเจริญเติบโตบนอาหารดังกล่าวยืนยันได้ว่าไม่เป็น *Legionella* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 การตรวจสอบโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Legionella* sp. ด้วยอาหารทดสอบและทดสอบทางชีวเคมีของตัวอย่างน้ำจากโรงแรม ข

ตัวอย่าง	ทดสอบด้วยอาหาร			ทดสอบทางชีวเคมี			
	Blood agar	NA	BCYE non L-cysteine	catalase	nitrate	gelatin	urease
1. น้ำก๊อกน้ำ 1 โคโลนีที่ 1	+	+	+				
2 น้ำก๊อกน้ำ 1 โคโลนีที่ 2	+	+	+				
3. น้ำก๊อกน้ำ 2	-	-	-	+	-	+	-
4. น้ำก๊อกน้ำ 3	+	+	+				
5. น้ำก๊อกน้ำ 4	-	-	-	+	-	-	-
6. น้ำก๊อกน้ำ 5	-	-	-	+	-	-	-
7. น้ำฝักบัว 1	+	+	+				
8. น้ำฝักบัว 2 โคโลนีที่ 1	+	+	+				
9. น้ำฝักบัว 2 โคโลนีที่ 2	+	+	+				
10. น้ำฝักบัว 3 โคโลนีที่ 1	+	+	+				
11. น้ำฝักบัว 3 โคโลนีที่ 2	+	+	+				
13. Swab ก๊อกน้ำ 1 โคโลนีที่ 1	+	+	+				
14. Swab ก๊อกน้ำ 1 โคโลนีที่ 2	+	+	+				
15. Swab ก๊อกน้ำ 2	+	+	+				
16. Swab ก๊อกน้ำ 3	+	+	+				
17. Swab ก๊อกน้ำ 4	+	+	+				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 (ต่อ) การตรวจสอบโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Legionella* sp. ด้วยอาหารทดสอบและทดสอบทางชีวเคมีของตัวอย่างน้ำจากโรงแรม ข

ตัวอย่าง	ทดสอบด้วยอาหาร			ทดสอบทางชีวเคมี			
	Blood agar	NA	BCYE non L-cysteine	catalase	nitrate	gelatin	ureas
18. Swab ก๊อกน้ำ 5	+	+	+				
19. Swab หอหล่อเย็น 1 โคโลนีที่ 1	+	+	+				
20. Swab หอหล่อเย็น 1 โคโลนีที่ 2	+	+	+				

หมายเหตุ = ไม่ทำการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อระบุเป็น *Legionella* sp. ต่อ เพราะทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร3 ชนิด Blood agar, NA และ BCYE non L-cysteine หากแบคมีเรียเจริญเติบโตบนอาหารดังกล่าวยืนยันได้ว่าไม่เป็น *Legionella* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 7 การตรวจสอบโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Legionella* sp. ด้วยอาหารทดสอบและทดสอบทางชีวเคมีของตัวอย่างน้ำจากโรงแรม ค

ตัวอย่าง	ทดสอบด้วยอาหาร			ทดสอบทางชีวเคมี			
	Blood agar	NA	BCYE non L-cysteine	catalase	nitrate	gelatin	ureas
1. น้ำฝักบัว 2	+	+	+				
2. น้ำแอร์ 2	+	+	+				
3. Swab ก๊อกน้ำ 1	+	+	+				
4. Swab ก๊อกน้ำ 2 โคโลนีที่ 1	+	+	+				
5. Swab ก๊อกน้ำ 2 โคโลนีที่ 2	+	+	+				
6. Swab ก๊อกน้ำ 3	+	+	+				
7. Swab ก๊อกน้ำ 4	+	+	+				
8. Swab ก๊อกน้ำ 5	+	+	+				
9. Swab ก๊อกน้ำ 1	+	+	+				
10. Swab ก๊อกน้ำ 2	+	+	+				

หมายเหตุ = ไม่ทำการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อระบุเป็น *Legionella* sp. ต่อ เพราะทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร3 ชนิด Blood agar, NA และ BCYE non L-cysteine หากแบคมีเรียเจริญเติบโตบนอาหารดังกล่าวยืนยันได้ว่าไม่เป็น *Legionella* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 8 การตรวจสอบโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Legionella* sp. ด้วยอาหารทดสอบและทดสอบทางชีวเคมีของตัวอย่างน้ำจากโรงแรม ง

ตัวอย่าง	ทดสอบด้วยอาหาร			ทดสอบทางชีวเคมี			
	Blood agar	NA	BCYE non L-cysteine	catalase	nitrate	gelatin	urease
1. น้ำฝักบัว 2	+	+	+				
2. น้ำฝักบัว 3	+	+	+				
3. น้ำฝักบัว 5	+	+	+				
4. น้ำแอร์ 1	+	+	+				
5. น้ำแอร์ 2	+	+	+				
6. Swab ก๊อกน้ำ 1	+	+	+				
7. Swab ก๊อกน้ำ 3	+	+	+				
8. Swab ฝักบัว 1	+	+	+				
9. Swab ฝักบัว 3	+	+	+				
10. Swab ฝักบัว 4	+	+	+				
11. Swab ฝักบัว 5	+	+	+				

หมายเหตุ = ไม่ทำการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อระบุเป็น *Legionella* sp. ต่อ เพราะทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด Blood agar, NA และ BCYE non L-cysteine หากแบคมีเรียเจริญเติบโตบนอาหารดังกล่าวยืนยันได้ว่าไม่เป็น *Legionella* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 9 การตรวจสอบโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Legionella* sp. ด้วยอาหารทดสอบและทดสอบทางชีวเคมีของตัวอย่างน้ำจากโรงแรม จ

ตัวอย่าง	ทดสอบด้วยอาหาร			ทดสอบทางชีวเคมี			
	Blood agar	NA	BCYE non L-cysteine	catalase	nitrate	gelatin	ureas
1. น้ำฝักบัว 1	+	+	+				
2. น้ำฝักบัว 3	+	+	+				
3. Swab ก๊อกน้ำ 3	+	+	+				
4. Swab ฝักบัว 2	+	+	+				

หมายเหตุ = ไม่ทำการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อระบุเป็น *Legionella* sp. ต่อ เพราะทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร3 ชนิด Blood agar, NA และ BCYE non L-cysteine หากแบคมีเรียเจริญเติบโตบนอาหารดังกล่าวยืนยันได้ว่าไม่เป็น *Legionella* sp.

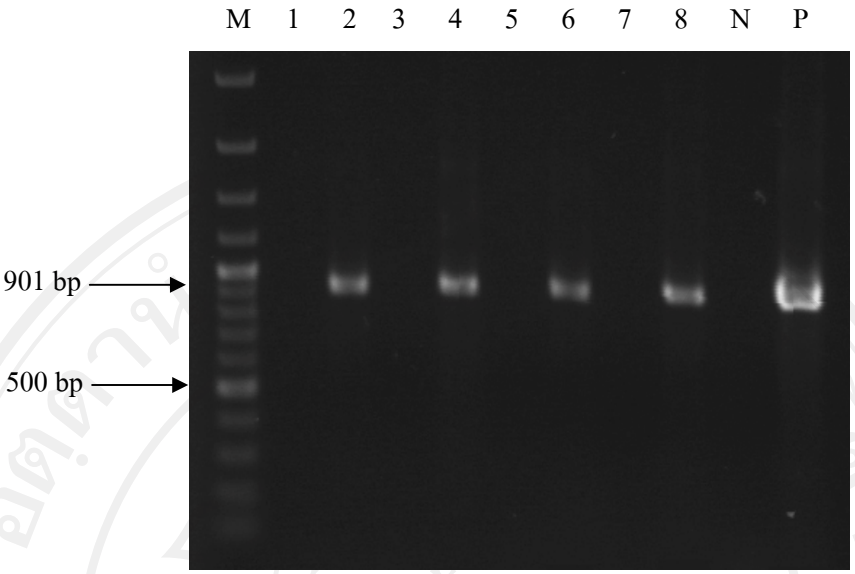
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 10 การตรวจสอบโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Legionella* sp. ด้วยอาหารทดสอบและทดสอบทางชีวเคมีของตัวอย่างน้ำจากโรงแรม ฉ

ตัวอย่าง	ทดสอบด้วยอาหาร			ทดสอบทางชีวเคมี			
	Blood agar	NA	BCYE non L-cysteine	catalase	nitrate	gelatin	urease
1. น้ำก๊อกน้ำ 1	-	-	-	+	-	+	-
2. น้ำก๊อกน้ำ 2	-	-	-	+	-	+	-
3. น้ำฝักบัว 1	-	-	-	+	-	+	-
4. น้ำฝักบัว 3	-	-	-	+	-	+	-
5. น้ำฝักบัว 4	+	+	+				
6. น้ำฝักบัว 5	+	+	+				
7. Swab ก๊อกน้ำ 3	+	+	+				
8. Swab ฝักบัว 3	+	+	+				

หมายเหตุ = ไม่ทำการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อระบุเป็น *Legionella* sp. ต่อ เพราะทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด Blood agar, NA และ BCYE non L-cysteine หากแบคมีเรียเจริญเติบโตบนอาหารดังกล่าวยืนยันได้ว่าไม่เป็น *Legionella* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 35 การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* จากน้ำก๊อกน้ำและฝักบัว ภายในโรงแรม ก และ ข โดยเทคนิค PCR

Lane 1: น้ำก๊อกน้ำ 2 ภายในโรงแรม ข

Lane 2: โคโลนีจากก๊อกน้ำ 2 ภายในโรงแรม ข

Lane 3: น้ำก๊อกน้ำ 4 ภายในโรงแรม ข

Lane 4: โคโลนีจากก๊อกน้ำ 4 ภายในโรงแรม ข

Lane 5: น้ำก๊อกน้ำ 5 ภายในโรงแรม ข

Lane 6: โคโลนีจากก๊อกน้ำ 5 ภายในโรงแรม ข

Lane 7: น้ำฝักบัว 5 ภายในโรงแรม ก

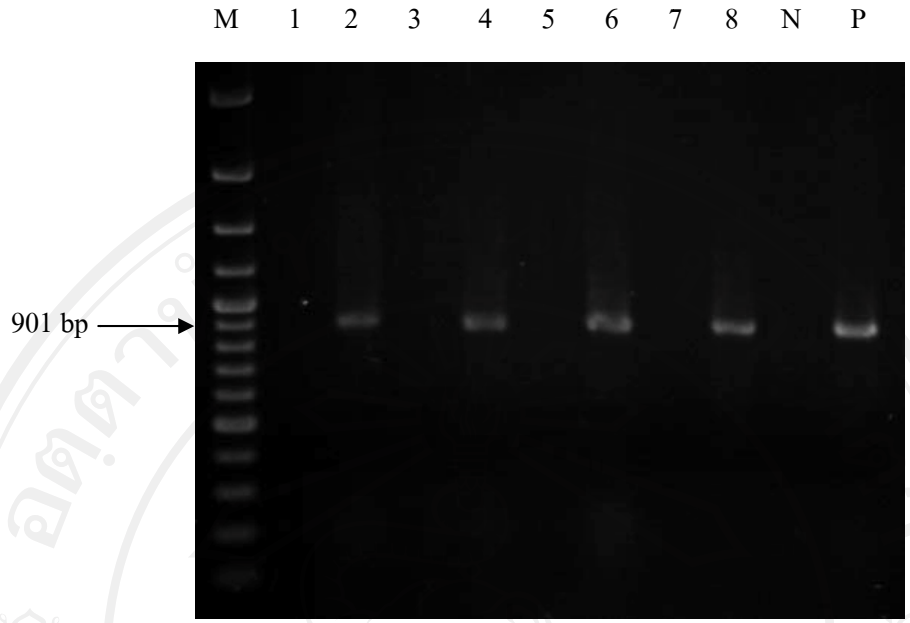
Lane 8: โคโลนีจากฝักบัว 5 ภายในโรงแรม ก

Lane N: distilled water (negative control)

Lane P: *L. pneumophila* serogroup 1 (positive control)

Lane M: Marker 100 bp DNA Ladder Plus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 36 การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* จากน้ำก๊อกน้ำและฝักบัวภายในโรงแรม ฉ โดยเทคนิค PCR

Lane 1: น้ำก๊อกน้ำ 1 ภายในโรงแรม ฉ

Lane 2: โคโลนีจากก๊อกน้ำ 1 ภายในโรงแรม ฉ

Lane 3: น้ำก๊อกน้ำ 2 ภายในโรงแรม ฉ

Lane 4: โคโลนีจากก๊อกน้ำ 2 ภายในโรงแรม ฉ

Lane 5: น้ำฝักบัว 1 ภายในโรงแรม ฉ

Lane 6: โคโลนีจากฝักบัว 1 ภายในโรงแรม ฉ

Lane 7: น้ำฝักบัว 3 ภายในโรงแรม ฉ

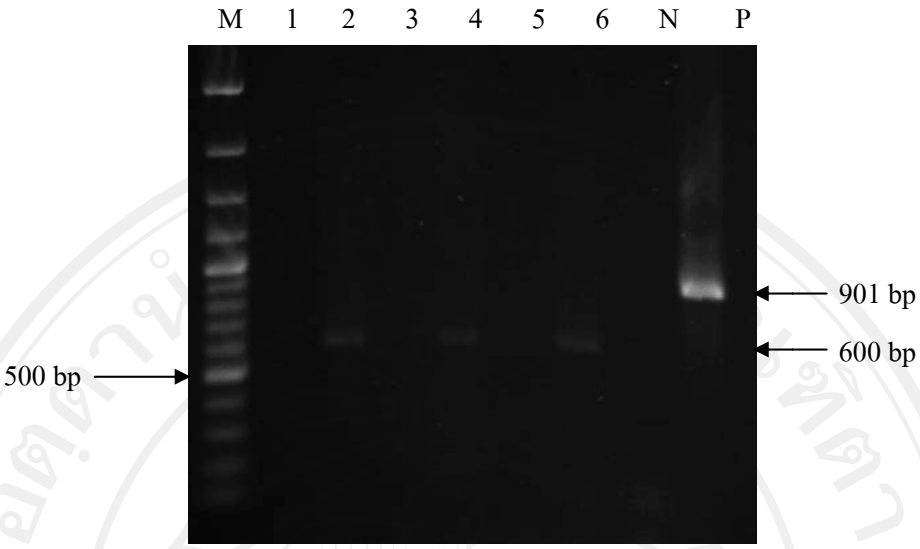
Lane 8: โคโลนีจากฝักบัว 3 ภายในโรงแรม ฉ

Lane N: distilled water (negative control)

Lane P: *L. pneumophila* serogroup 1 (positive control)

Lane M: Marker 100 bp DNA Ladder Plus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 37 การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* จากน้ำก็อกน้ำและฝักบัวภายในโรงแรม ก โดยเทคนิค PCR พบ PCR product ขนาด 600 bp

Lane 1: น้ำก็อกน้ำ 3 ภายในโรงแรม ก

Lane 2: โคโลนีจากก็อกน้ำ 3 ภายในโรงแรม ก

Lane 3: น้ำฝักบัว 2 ภายในโรงแรม ก

Lane 4: โคโลนีจากฝักบัว 2 ภายในโรงแรม ก

Lane 5: น้ำฝักบัว 4 ภายในโรงแรม ก

Lane 6: โคโลนีจากฝักบัว 4 ภายในโรงแรม ก

Lane N: distilled water (negative control)

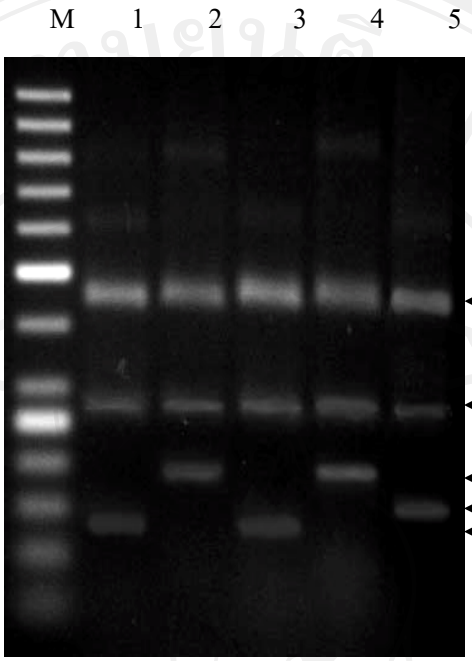
Lane P: *L. pneumophila* serogroup 1 (positive control)

Lane M: Marker 100 bp DNA Ladder

จาก 8 โคโลนีที่ระบุเป็น *L. pneumophila* โดยการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR มาจากตัวอย่างน้ำก๊อกน้ำ 2,น้ำก๊อกน้ำ 4 และน้ำก๊อกน้ำ 5 ภายในโรงแรม ข น้ำก๊อกน้ำ 1, น้ำก๊อกน้ำ 2, น้ำฝักบัว 1 และน้ำฝักบัว 3 ภายในโรงแรม ฉ และน้ำฝักบัว 5 โรงแรม ก นำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RII เพื่อแยกความแตกต่างในระดับ serogroup พบว่า 6 โคโลนีจากน้ำก๊อกน้ำและน้ำฝักบัว ภายในโรงแรม ข และ ฉ ระบุเป็น *L. pneumophila* serogroup 6 ซึ่งมีความยาวของลำดับรหัสพันธุกรรมที่ 117, 271 และ 447 bp และ 2 โคโลนีจากน้ำก๊อกน้ำและน้ำฝักบัว ภายในโรงแรม ก และ ข ระบุเป็น *L. pneumophila* ในกลุ่มของ serogroup 2, 3 และ 10 ซึ่งมีความยาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

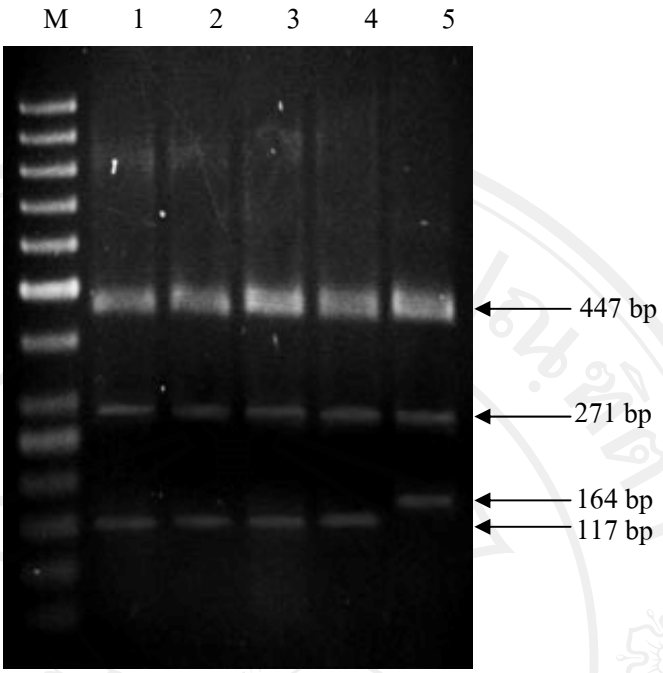
เท่ากับ 183, 271 และ 447 bp ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าทั้ง 8 โคโลนีหลังจากทำการตรวจสอบลงถึง serogroup ไม่พบ *L. pneumophila* serogroup 1 (ภาพ 38)



ก

ภาพ 38 การตัดรหัสพันธุกรรมขนาด 901 bp ด้วยเอนไซม์ *Eco*RII จากตัวอย่างโรงแรม ก และ ข; Lane 1: น้ำก๊อกน้ำ 2 โรงแรม ข, Lane 2: น้ำก๊อกน้ำ 4 โรงแรม ข, Lane 3: น้ำก๊อกน้ำ 5 โรงแรม ข, Lane 4: น้ำฝักบัว 5 โรงแรม ก, Lane 5: *L. pneumophila* serogroup 1, Lane M: Marker 50 bp DNA Ladder Plus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ข

ภาพ 38 การตัดรหัสพันธุกรรมขนาด 901 bp ด้วยเอนไซม์ *Eco*RII จากตัวอย่างโรงแรม ฉ; Lane 1: น้ำก๊อกน้ำ 1 โรงแรม ฉ, Lane 2: น้ำก๊อกน้ำ 2 โรงแรม ฉ, Lane 3: น้ำฝักบัว 1 โรงแรม ฉ, Lane 4*:* น้ำฝักบัว 5 โรงแรม ฉ, Lane 5: *L. pneumophila* serogroup 1, Lane M: Marker 50 bp DNA Ladder Plus

8.2.2 การตรวจสอบหา *L. pneumophila* โดยตรงจากตัวอย่างน้ำโดยเทคนิค PCR

ตรวจสอบหา *L. pneumphila* จากการสุ่มเก็บตัวอย่างฝักบัว 5 จุด, ก๊อกน้ำ 5 จุด และหอหล่อเย็น 2 หอ ภายในห้องพักโรงแรม ก, ตัวอย่างฝักบัว 5 จุด, ก๊อกน้ำ 5 จุด และหอหล่อเย็น 1 หอ ภายในห้องพักโรงแรม ข, ตัวอย่างฝักบัว 5 จุด, ก๊อกน้ำ 5 จุด และแอร์ 2 เครื่อง ภายในห้องพักโรงแรม ค, ตัวอย่างฝักบัว 5 จุด, ก๊อกน้ำ 5 จุด และแอร์ 3 เครื่อง ภายในห้องพัก โรงแรม ง, ตัวอย่างฝักบัว 5 จุดและก๊อกน้ำ 5 จุด ภายในห้องพักโรงแรม จ และตัวอย่างฝักบัว 5 จุดและก๊อกน้ำ 5 จุด ภายในห้องพักโรงแรม ฉ รวมตัวอย่างน้ำทั้งหมด 70 ตัวอย่าง และตัวอย่าง swab 66 ตัวอย่าง หลังจากการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำสะอาด และตรวจสอบการปนเปื้อน *L. pneumophila* โดยเทคนิค PCR ผลการตรวจสอบไม่พบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved