บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

ในการออกแบบ primer 1 คู่ตั้งชื่อเป็น mip F และ mip R เพื่อเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *mip* ของ *Legionella pneumophila* ซึ่งเป็นยีนหนึ่งในหกที่สำคัญสำหรับตรวจหาการระบาดถือเป็น genetic marker (Fry *et al*., 2005; Gaia *et al*., 2005) ผลการวิจัยของ Bumbaugh *et al*., 2001 สนับสนุนการเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์สารพันธุกรรมไว้ได้สูงของยีน *mip* จากการทำการทดสอบหาความแปรผันในระดับ polymorphism บริเวณยีน *mip* ในแต่ละสายพันธุ์ มีปัจจัยสนับสนุนและอธิบายการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมน้อยภายในยีนนี้ (Swanson and Hammer, 2000) จึงทำให้เกิดความจำเพาะเจาะจงลงถึงระดับสปีชีส์ พบยีนนี้เฉพาะใน *L. pneumophila* เท่านั้น (Achtman, 2002) เมื่อทำการออกแบบ primer จากสายรหัสพันธุกรรมภายในยีนนี้สามารถตรวจพบ *L. pneumophila* โดยเทคนิค PCR และเพิ่มจำนวนสายรหัสพันธุกรรมที่ต้องการซึ่งมีความยาวของ PCR product เท่ากับ 901 bp โดยต้นแบบที่ทำการออกแบบ primer คู่นี้ คือ *L. pneumophila* strain Corby (NC_009494) จากนั้นทำการ blast โดยโปรแกรม primer-blast ของ www.ncbi.nim.nih.gov เพื่อหาความจำเพาะเจาะจงในการจับเพื่อเพิ่มจำนวนว่ามีลำดับรหัสพันธุกรรมในฐานข้อมูล GenBank ใดบ้างที่สามารถจับได้กับ primer คู่นี้ จากการตรวจสอบพบว่า บริเวณยีน *mip* ในสปีชีส์ *L. pneumophila* เท่านั้นที่สามารถจับกับ primer คู่นี้ได้ คือ ยีน *mip* ของ *L. pneumophila* strain Corby, ยีน *mip* ของ *L. pneumophila* strain Philadelphia และยีน *mip* ของ *L. pneumophila* strain Paris เมื่อนำ primer mip F, mip R ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *mip* ของ *L. pneumophila* ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR เปรียบเทียบกับ *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *Shi. dysenteriae*, *Sal. typhi*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *R. solanacearum*, *K. pneumoniae*, *P. milabilis* และ *V. cholerae* เพื่อทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่า primer mip F, mip R มีความจำเพาะกับ *L. pneumophila* เท่านั้น

ในการเก็บตัวอย่างน้ำและตัวอย่าง swab ช่วงเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม 2553 จากก๊อกน้ำ, ฝักบัวและหอหล่อเย็นในโรงแรม หลังจากทำการเพาะเชื้อ พบว่าตัวอย่างน้ำทั้งหมด 67 ตัวอย่างจาก 5 โรงแรมในจังหวัดเชียงใหม่ ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียที่มีลักษณะคาดว่าเป็น *Legionella* พบเพียงการเจริญของ *Bacillus* sp. เท่านั้น คาดว่าน่าจะเกิดจากการล้างตะกอนเซลล์ด้วย KCl-HCl ซึ่งมี pH 2.2 ทั้งนี้ จากผลการวิจัยของ Bopp *et al*., 1980 เมื่อนำตัวอย่างผ่านกรดก่อน spread plate เชื้อ *L. pneumophila* สามารถทนกรดได้ประมาณ 5 นาทีและนานถึง 30 นาที เมื่อนับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร พบ 6.3×10^{8} colony-forming เมื่อเวลา 0 นาที เมื่อผ่านไป 30 นาที เหลือจำนวนโคโลนี 6.1×10^{8} และเหลือ 6.8×10^{7} โคโลนีเมื่อเวลาผ่านไปนานมากกว่า 30 นาที การลดลงของเซลล์เป็นไปอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Bartie *et al*., 2001 ศึกษาการผ่านตัวอย่างน้ำที่เก็บจากสิ่งแวดล้อมด้วยกรด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร BCYE พบการเจริญลดลง (64.3%) เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงโดยไม่ผ่านการแช่ในกรด (71.4%) ซึ่งเป็นเหตุผลของผลการทดลองเบื้องต้นที่ไม่พบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* ในตัวอย่างน้ำที่เก็บมาการที่มีปริมาณเซลล์น้อย สภาวะที่อาหารไม่สมบูรณ์เท่าการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เมื่อนำมาผ่านกรดจึงทำให้เซลล์ต้านทานสภาวะความรุนแรงได้ต่ำ เซลล์จึงตายไปในที่สุด

เมื่อวิธีการผ่านตัวอย่างด้วยกรดเพื่อกำจัดแบคทีเรียปนเปื้อนชนิดอื่นไม่ได้ผลจึงทำการเพาะเลี้ยงตัวอย่างโดยตรงลงในอาหาร จากปัญหาที่พบของอาหารเพาะเลี้ยง *Legionella* ถึงแม้จะมีความไวต่อการเจริญ แต่การวิจัยพบว่าความไวของการสนับสนุนการเจริญเพียง 50-60% (Engleberg *et al*., 1989) และแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Legionella* สามารถเจริญได้เร็ว และมีปริมาณมาก อาจเป็นสาเหตุของการขัดขวางการเจริญของ *Legionella* เนื่องจากมีปริมาณเซลล์ในสิ่งแวดล้อมน้อย งานวิจัยของ Behets *et al*., 2006 ระบุว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารควรมีปริมาณเซลล์อย่างน้อย 50 CFU/l ในก๊อกน้ำ และ100 CFU/l ในหอหล่อเย็น หากตรวจสอบการปนเปื้อนไม่พบอาจเนื่องมาจากปริมาณเซลล์น้อยเกินไป อีกทั้งต้องการสภาวะในการเพาะเลี้ยงจำเพาะและใช้เวลายาวนานในการเจริญ แบคทีเรียชนิดอื่นสามารถเจริญได้รวดเร็วกว่า แย่งอาหารในช่วง log phase ของการเจริญ จึงทำให้ *Legionella* ไม่มีโอกาสได้ใช้อาหารและเจริญไม่ทัน ดังนั้นอาหารจึงควรเป็น selective media ที่ดีที่สามารถสนับสนุนการเจริญของ *Legionella* ได้ แต่ไปขัดขวางการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น จึงทำการทดลองหา selective media ที่เหมาะสมของต่อ *Legionella* ซึ่งสนับสนุนการเจริญและยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่พบมากที่สุดจากการเก็บตัวอย่างน้ำ เนื่องจากในตัวอย่างน้ำที่เก็บได้ พบแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนมาก ส่วนประกอบที่ผสมลงไปเพิ่มเติมจากอาหาร BCYE มาตรฐานเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกคือ bile salt, glycine, methylene blue ส่วนยาปฏิชีวนะ (vancomycin และ polymycin B) ยับยั้งการเจริญเติบโตของราและแบคทีเรียแกรมบวก-แกรมลบชนิดอื่นที่พบเจอทั่วไป (Bopp *et al*., 1980) จากการทดลองที่ดีที่สุดเมื่อทำการปรับปรุงอาหาร BCYE มาตรฐาน โดยเพิ่ม glycine และยาปฏิชีวนะ (vancomycin และ polymycin B) สองชนิดลงไป พบว่ายับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น และไม่มีผลต่อการเจริญของ *L. pneumophila* จากนั้นใช้อาหาร BCYE ที่ทำการดัดแปลงนี้เพาะเลี้ยงเชื้อ *L. pneumophila* ที่อาจปนเปื้อนมากับตัวอย่างน้ำ 106 ตัวอย่างจาก 6 โรงแรม ช่วงเดือนมีนาคม – มิถุนายน 2554 ปรากฏ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โคโลนี *L. pneumophila* ใน 11 ตัวอย่างจาก 3 โรงแรม ซึ่งแสดงประสิทธิภาพการสนับสนุนการเจริญของ *L. pneumophila* และยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นในแหล่งน้ำ

ตัวอย่างน้ำและตัวอย่าง swab ที่เก็บทั้งหมดจากโรงแรมภายในจังหวัดเชียงใหม่ 11 โรงแรม 187 ตัวอย่าง ไม่พบผลบวกจากการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* ด้วยเทคนิค PCR เลย เนื่องจากระบบน้ำที่โรงแรมสะอาด ปริมาณเซลล์ล่องลอยในน้ำน้อยเกินไป หรือมีสารอินทรีย์/สารอินทรีย์ในแหล่งน้ำรบกวน ขัดขวางการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR (Toze, 1999) ดังเช่นการทดลองส่วนหนึ่งในงานวิจัยเล่มนี้ ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L. pneumophila* พบว่า ผงถ่านที่มีความเข้มข้นสูง เป็นสิ่งรบกวนในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ DNA อย่างชัดเจน จากการทดลอง *L. pneumophila* serogroup 1 ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BCYE มาตรฐานโดยไม่กำจัดผงถ่านออกจากปฏิกิริยาก่อนการตรวจหาการปนเปื้อนด้วยเทคนิค PCR จะไม่ปรากฏ PCR product ที่ความเข้มข้นของผงถ่านสูง ที่ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ 1×10^{-1} แต่จะปรากฏ PCR product ที่ความเข้มข้นของผงถ่านลดลง ที่ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ 1×10^{-2} และ 1×10^{-3} และการทดลองที่กำจัดผงถ่านออกจากปฏิกิริยา สามารถตรวจสอบหาการปนเปื้อนของเชื้อได้ตั้งแต่ความเข้มข้นของเซลล์ 1×10^{-1} ดังนั้นผงถ่านจึงเป็นตัวขัดขวางการเพิ่มปริมาณ DNA ในปฏิกิริยาการตรวจสอบหาการปนเปื้อนด้วยเทคนิค PCR

ปริมาณเซลล์ที่น้อยที่สุดจากการทดลองที่ไม่กำจัดผงถ่านออกจากปฏิกิริยาและกำจัดผงถ่านออกจากปฏิกริยา สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค PCR และนับเซลล์ด้วย Haemacytometer พบปริมาณเซลล์น้อยที่สุดเท่ากับ 10^4 เซลล์/ml พบขนาดความยาวของ PCR product ที่ 901 bp ของ *L. pneumophila* serogroup 1 อย่างเจือจางที่สุด ส่วนงานวิจัยอื่นทดสอบความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยเทคนิค PCR ต่างกันออกไป คือตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบโดยเทคนิค PCR พบว่า มีค่าเท่ากับ 1.0 ng (นงลักษณ์, 2551) และผลการวิจัยของ Liu *et al*., 2003 หาปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุด ได้เท่ากับ 2.5 ng

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved