<u>ตัวชี้วัดที่ ๓.๓๕</u>

ระดับความสำเร็จของการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ Legionella spp. ในตัวอย่างน้ำ

<u>ระดับที่ ๕</u> มีผลลัพธ์ตรงเป้าหมายเป็นสัดส่วนตามระยะเวลา

๑. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (Reference culture) สำหรับการทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)
๒. ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ตัวชี้วัดที่ ๓.๓๕	ระดับความสำเร็จของการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ
	กลุ่มงานรับผิดชอบหลัก : กลุ่มงานจุลชีววิทยา

✱ ผลการดำเนินงานตามแผนปฏิบัติการการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ✱

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (Reference culture) สำหรับการทดสอบความจำเพาะของวิธี และผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity) เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงความสามารถของวิธีทางเลือกในการตรวจพบเชื้อเป้าหมาย (Target microorganism) และตรวจไม่พบเชื้อที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย (Non-target microorganism) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

๑. การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างทดสอบ/จำนวนตัวอย่าง

การศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของวิธีทดสอบครั้งนี้ ตรวจสอบโดยใช้เชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่พบได้ในน้ำจากสิ่งแวดล้อม จำนวน ๘ สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Legionella pneumophila, Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella* Typhimurium

๒. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (Reference culture) สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)

๒.๑ <u>การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้นสำหรับเป็นเชื้อเป้าหมาย (Target microorganism)</u>

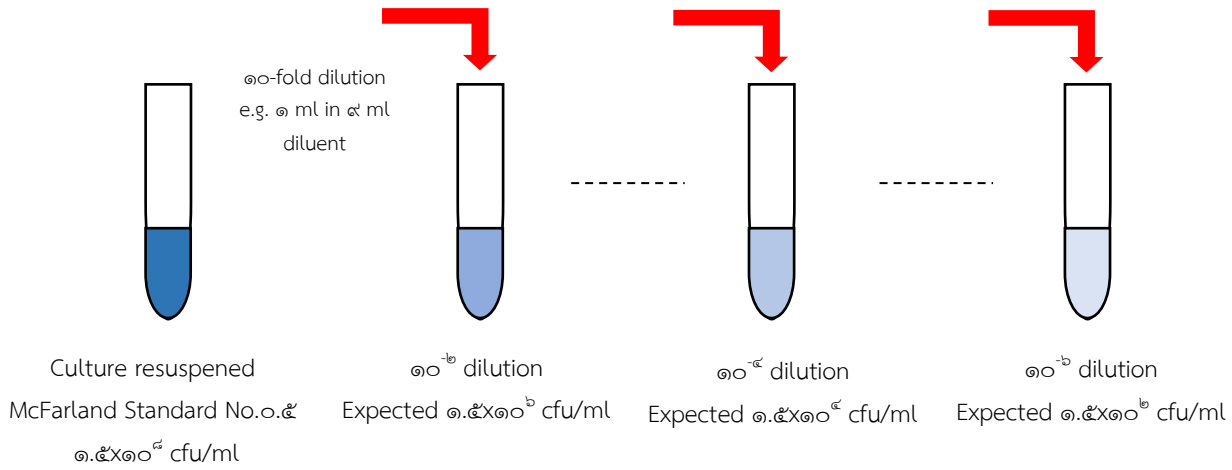
๒.๑.๑ นำเชื้อ *L. pneumophila* (DMST ๑๒๘๐๐) จาก stock culture มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ buffered charcoal yeast extract agar (BCYE agar) ที่มีส่วนประกอบของ L-cysteine นำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๕ ±๑ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓-๗ วัน

๒.๑.๒ นำโคโลนีเชื้อ *L.pneumophila* ละลาย (resuspened) ในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland Standard No.๐.๕ ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ ๑.๕ x ๑๐^{๘} cfu/ml

๒.๑.๓ ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial ๑๐-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จนถึงระดับความเข้มข้น ๑๐^{๒} cfu/ml (ปริมาณเชื้อสำหรับใช้งาน คือ ประมาณ ๑.๕ x ๑๐^{๒} cfu/ml) ดังภาพที่ ๑

๒.๑.๔ ทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจาง ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar บ่มที่อุณหภูมิ ๓๕ ±๑ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓-๗ วัน

๒.๑.๕ นับจำนวนโคโลนีบน BCYE agar plate ทราบปริมาณเชื้อตั้งต้นจริง (cfu/ml)



ภาพที่ ๑ การเจือจางเชื้อ *L. pneumophila* สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)

๒.๒ <u>การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้นสำหรับเป็นเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย (Non-target microorganism)</u>

๒.๒.๑ เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะ จำนวน ๗ สายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะ

การทดสอบ	เชื้อทดสอบ	รหัสเชื้อจุลินทรีย์	ปริมาณเชื้อ
ความจำเพาะ (specificity)	*Escherichia coli*	DMST ๔๒๑๒	๑๐^๔ cfu/ml
	Klebsiella pneumoniae	DMST ๗๕๙๒	
	Klebsiella aerogenes	DMST ๘๘๔๑	
	Staphylococcus aureus	DMST ๘๐๑๓	
	Staphylococcus epidermidis	DMST ๕๘๖๘	
	Pseudomonas aeruginosa	DMST ๔๗๓๙	
	Salmonella Typhimurium	DMST ๕๖๒	

๒.๒.๒ นำเชื้อทดสอบตามสายพันธุ์ข้างต้น จาก stock culture มา streak ลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ ๓๕±๑ °C เป็นเวลา ๒๔±๒ ชั่วโมง

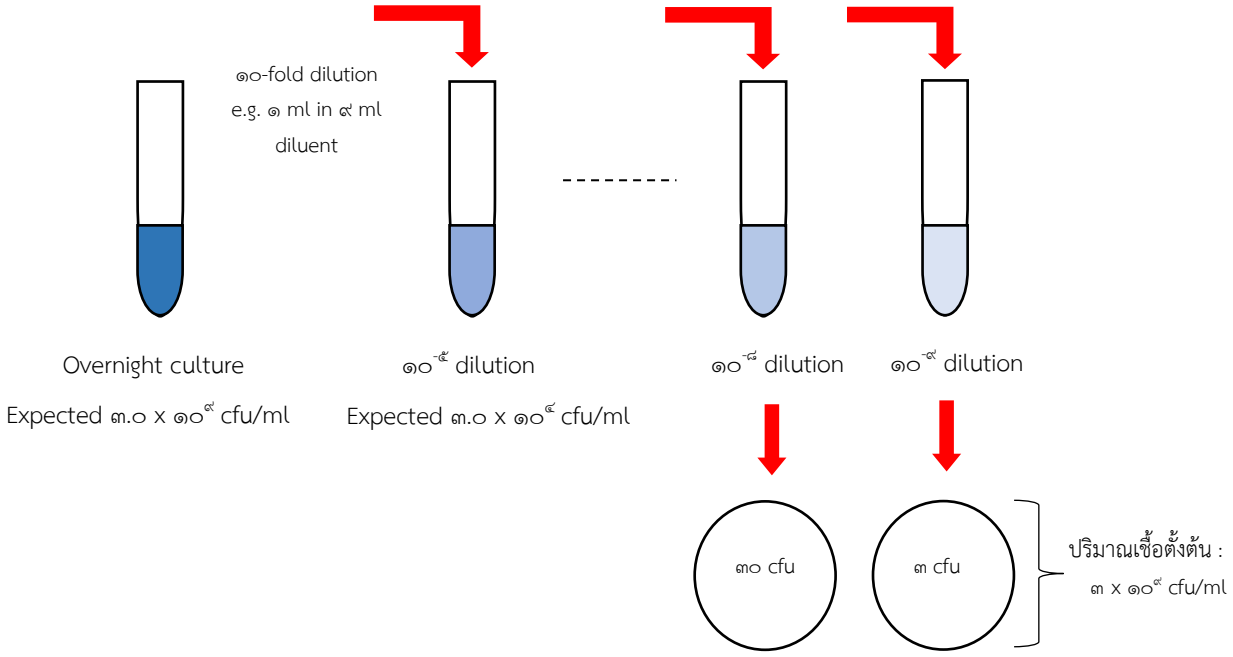
๒.๒.๓ เลือกโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเพาะเลี้ยงลงใน Tryptic Soy Broth (TSB) ๑๐ มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๕±๑ °C เป็นเวลา ๒๔±๒ ชั่วโมง

๒.๒.๔ ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial ๑๐-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ตั้งแต่ $๑๐^{-๑}$ จนถึง $๑๐^{-๙}$

๒.๒.๕ ทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจาง ด้วยเทคนิค pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) นำไปบ่มที่ ๓๕±๑°C เป็นเวลา ๒๔±๒ ชั่วโมง ดังภาพที่ ๒

๒.๒.๖ นับจำนวนโคโลนีบน PCA จะทราบปริมาณเชื้อตั้งต้น (cfu/ml)

๒.๒.๗ ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial ๑๐-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ให้ได้เชื้ออยู่ในระดับที่ต้องการ คือ $๑๐^{๔}$ cfu/ml



ภาพที่ ๒ การเจือจางเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)

๓. ขั้นตอนการทดสอบ

นำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน ตามปริมาณที่คาดหวังมาทดสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR

๔. การแปลผลการทดสอบ

เชื้อเป้าหมาย (Target microorganism) สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีที่ทดสอบ และเชื้อที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย (Non-target microorganism) ต้องตรวจไม่พบด้วยวิธีดังกล่าว

ตัวชี้วัดที่ ๓.๓๕	ระดับความสำเร็จของการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ
	กลุ่มงานรับผิดชอบหลัก : กลุ่มงานจุลชีววิทยา

๕. ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของวิธี Real-time PCR

ผลการศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของวิธี Real-time PCR พบผล positive จากสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* spp. ทั้งหมดที่ทำการทดสอบ ซึ่งเป็นเชื้อเป้าหมายของการทดสอบ และตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของแบคทีเรียอื่นๆ ที่นำมาทดสอบ แสดงดังตารางที่ ๒

ตารางที่ ๒ ผลการศึกษาความจำเพาะ (specificity)

การทดสอบ	เชื้อทดสอบ	Culture method	PCR method
Target microorganism	*Legionella pneumophila* (DMST ๑๒๘๐๐)	Detect	Detect
Non-target microorganism	*Escherichia coli* (DMST ๔๒๑๒)	Partial inhibition	Not detect
	Klebsiella pneumoniae (DMST ๗๕๙๒)	Partial inhibition	Not detect
	Klebsiella aerogenes (DMST ๘๘๔๑)	Partial inhibition	Not detect
	Staphylococcus aureus (DMST ๘๐๑๓)	Partial inhibition	Not detect
	Staphylococcus epidermidis (DMST ๕๘๖๘)	Partial inhibition	Not detect
	Pseudomonas aeruginosa (DMST ๔๗๓๙)	Partial inhibition	Not detect
	Salmonella Typhimurium (DMST ๕๖๒)	Partial inhibition	Not detect

หมายเหตุ : Detect คือ ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ/พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
Not detect คือ ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อเป้าหมาย
Partial inhibition คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้บางส่วน

๖. สรุปผลการศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของวิธี Real-time PCR

จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น เพื่อทดสอบความจำเพาะ (Specificity) พบว่าวิธี Real-time PCR มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Legionella* spp. ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่พบได้บ่อยในแหล่งน้ำที่นำมาทดสอบ จำนวน ๗ ชนิด โดยพบว่าวิธี Real-time PCR มีความจำเพาะต่อเชื้อเป้าหมายและเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายมากกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ (เชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย) ได้บางส่วน (partial inhibition) เชื้อยังสามารถเจริญได้บ้าง แต่จะให้ลักษณะโคโลนีที่แตกต่างจากโคโลนีของเชื้อ *Legionella* spp.