

โครงงานวิจัย

การพัฒนาวีธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp.

ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR)

ผู้รับผิดชอบ : นางสาวพัทยา พลวิชัย

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ

กลุ่มงานจุลชีววิทยา กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัยกรมอนามัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เชื้อ *Legionella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (gram-negative rod) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ขนาด 2 - 20 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา (flagella) สำหรับช่วยให้เชื้อสามารถเคลื่อนไหวได้รวดเร็ว⁽¹⁾ เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญยาก (fastidious bacteria) ไม่เจริญในอาหารเพาะเลี้ยงทั่วไป ต้องการกรดอะมิโน L-cysteine และธาตุเหล็กสำหรับการเจริญเติบโต เชื้อ *Legionella* spp. สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดินโคลน ทะเลสาบ ลำธาร และแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้นหรือที่มีความชื้น เช่น น้ำหล่อเย็น (cooling water) ของระบบระบายความร้อนที่มีตามอาคารขนาดใหญ่ต่างๆ เช่น โรงแรม โรงพยาบาล ตลอดจนเครื่องทำความร้อน ถังเก็บน้ำ ระบบกระจายน้ำ หัวฝักบัวอาบน้ำ สระว่ายน้ำ และน้ำพุประดับอาคาร หรือสถานที่ต่างๆ เป็นต้น สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานหลายเดือนในสิ่งแวดล้อมที่มีความชื้นสูง มีอุณหภูมิตั้งแต่ 20 - 50 องศาเซลเซียสและแบ่งตัวในที่มีสาหร่ายและอินทรีย์วัตถุ เชื้อจะอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นโดยเฉพาะโปรโตซัว (protozoa) โดยรวมกลุ่มกันเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) สะสมตามผิวสัมผัสต่างๆที่ไม่มีการดูแลบำรุงรักษาอย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยังสามารถดำรงชีวิตและแบ่งตัวภายในเซลล์ของโปรโตซัวได้ จึงทำให้เชื้อทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสม⁽²⁾ เชื้อ *Legionella* spp. ทำให้เกิดโรคลีเจียนเนลโลซิส (Legionellosis) โดยสปีชีส์ที่เป็นสาเหตุของโรคที่พบได้บ่อยที่สุด คือ *Legionella pneumophila* ซึ่งมีอาการทางคลินิกได้ 2 ลักษณะ คือ หากมีภาวะปอดอักเสบ อาการรุนแรงและอัตราเสียชีวิตสูง เรียกว่า โรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires disease) หากไม่มีภาวะปอดอักเสบ อาการไม่รุนแรง เรียกว่า โรคไขปอนเตียก (Pontiac fever)⁽³⁾ การระบาดของโรคไม่ได้เกิดจากการติดต่อจากคนสู่คน แต่เกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อจากแหล่งน้ำสู่คน โดยเชื้อแพร่กระจายจากแหล่งน้ำไปกับละอองฝอยของน้ำและแพร่กระจายผ่านทางอากาศ เมื่อสูดหายใจรับเอาละอองน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าสู่ร่างกายอาจก่อให้เกิดอาการของโรคได้ โดยกลุ่มคนที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อหรือเกิดโรคนี้ ได้แก่ ผู้สูงอายุ ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ หรือกำลังอยู่ระหว่างการรักษาโรคบางชนิด เช่น มะเร็ง เบาหวาน ไต HIV เป็นต้น ผู้ที่ดื่มสุราหรือสูบบุหรี่จัด และผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยยาบางชนิด รวมทั้งนักท่องเที่ยวที่ส่วนใหญ่เป็นชาวต่างชาติ⁽⁴⁾ โรคลีเจียนแนร์ถือเป็นปัญหาของนักท่องเที่ยวต่างชาติ จากข้อมูลสถานการณ์โรคลีเจียนแนร์ในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2556-2565 กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค พบผู้ป่วยสะสม 131 ราย เสียชีวิต 1 รายในปี 2563 พบผู้ป่วยรายล่าสุดเมื่อปี 2564 อายุเฉลี่ย 62 ปี (อายุน้อยสุด 23 ปี และอายุสูงสุด 85 ปี) ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเพศชายวัยกลางคนถึงสูงอายุ และเป็นนักท่องเที่ยวชาวต่างชาติที่เดินทางเข้ามาท่องเที่ยวในประเทศไทย⁽⁵⁾ และจากข้อมูลของ The European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet) ซึ่งเป็นหน่วยงานเฝ้าระวังโรคลีเจียนแนร์ในเขตเศรษฐกิจยุโรป พบจำนวนผู้ป่วยโรคลีเจียนแนร์ที่เกี่ยวข้องกับการเดินทาง (Travel-associated Legionnaires' Disease : TALD) โดยในปี 2564 พบผู้ป่วยจำนวน 895 ราย ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 38 % เมื่อเทียบกับปี 2563⁽⁶⁾ การแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ ส่งผลกระทบโดยตรงต่อธุรกิจการท่องเที่ยวของหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งมีมูลค่าสูงในแต่ละปี ในทวีปยุโรปมีการจัดตั้งหน่วยงาน ELDSNet เพื่อเฝ้าระวังโรคนี้จากการท่องเที่ยวโดยเฉพาะ ขณะที่ประเทศไทยโรคลีเจียนแนร์ยังไม่ได้เป็นโรคในระบบเฝ้าระวัง ทำให้การเฝ้าระวังอาจไม่ทันต่อสถานการณ์ได้

กรมอนามัยในฐานะหน่วยงานภาครัฐ ซึ่งมีภารกิจในการส่งเสริมให้ประชาชนมีสุขภาพดี โดยมีการศึกษา วิเคราะห์ วิจัย พัฒนาและถ่ายทอดองค์ความรู้และเทคโนโลยีด้านการส่งเสริมสุขภาพ การจัดการปัจจัยเสี่ยง ต่อสุขภาพ และการจัดการอนามัยสิ่งแวดล้อมที่เอื้อต่อการมีสุขภาพดี รวมทั้งการประเมินผลกระทบต่อ สุขภาพ เพื่อมุ่งเน้นให้ประชาชนมีความรู้และทักษะในการดูแลตนเอง ครอบครัวและชุมชน รวมตลอดจนถึง การสนับสนุนให้หน่วยงานส่วนภูมิภาค องค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น และภาคีเครือข่ายทั้งภาครัฐและ ภาคเอกชน มีส่วนร่วมในการสร้างเสริมสุขภาพและจัดการอนามัยสิ่งแวดล้อมเพื่อส่งเสริมให้คนไทยมีสุขภาพดี โดยถ้วนหน้า ได้มีการออกประกาศกรมอนามัย พ.ศ.2544 เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลีสทีโอเนลลาในหอยมั้ง เย็นของอาคารในประเทศไทย เพื่อกำกับ ควบคุมดูแล เฝ้าระวัง และสร้างความตระหนักในการป้องกันปัญหา การแพร่ระบาดของโรคลีสทีเจียนแนร์ และเป็นแนวทางสำหรับเจ้าหน้าที่ของรัฐ ผู้ประกอบการ และประชาชน ทั่วไป ได้มีความรู้ ความเข้าใจในเรื่องโรคลีสทีเจียนแนร์ รวมทั้งสามารถใช้เป็นแนวทางในการบำรุงรักษาระบบน้ำ หรือแหล่งน้ำที่ใช้ภายในอาคารสถานประกอบการต่างๆ ได้ ซึ่งถือเป็นการลดอุบัติเหตุและความเสี่ยงต่อการ ระบาดของโรคดังกล่าวในประเทศไทยได้ และยังเป็นการสร้างเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยให้แก่ประชาชน นักท่องเที่ยวทั้งภายในประเทศและต่างประเทศอีกด้วย

กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย มีภารกิจหลักในการตรวจวิเคราะห์และทดสอบคุณภาพน้ำ บริโภค/อุปโภค น้ำเสีย/น้ำทิ้งและน้ำประปาอื่นๆ โดยการตรวจวิเคราะห์และทดสอบ ประกอบด้วยการตรวจ วิเคราะห์ด้านเคมี-กายภาพ โลหะหนักและการทดสอบทางด้านจุลชีววิทยา ซึ่งรายการทดสอบทางจุลชีววิทยา ประกอบด้วย การทดสอบ coliforms, fecal coliforms, *E. coli* และเชื้อก่อโรคอื่นๆ รวมทั้ง *Legionella* spp. โดยปัจจุบันวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน (Reference standard) คือ วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method) ซึ่งต้องใช้ความชำนาญในการอ่านผลการทดสอบ ใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะและใช้เวลานานกว่า 15 วันในการดำเนินการ จากข้อจำกัดของการทดสอบด้วยวิธีการ เพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวอาจทำให้การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคลีสทีเจียนแนร์ไม่ทันต่อสถานการณ์ได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. และตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ดังกล่าว เพื่อให้ได้วิธีที่มีความรวดเร็วขึ้น มีความไว (Sensitivity) และมีความจำเพาะสูง (Specificity) สำหรับ ใช้ทดสอบทางห้องปฏิบัติการ โดยวิธีที่ศึกษาในครั้งนี้ คือ วิธี Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) ซึ่งถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม หลายชนิด เช่น *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, SARS-CoV-2, enteroviruses และ adenoviruses เป็นต้น โดย เปรียบเทียบความสอดคล้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อเป็นข้อมูลความ น่าเชื่อถือสำหรับนำไปใช้ในการเฝ้าระวังและป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR) และดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้น

1.3 เป้าหมายและตัวชี้วัดความสำเร็จ

ห้องปฏิบัติการได้วิธีทดสอบสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR) ที่มีค่าความไว (Sensitivity) และค่าความถูกต้องสัมพัทธ์ (Relative trueness) มากกว่าร้อยละ 95 มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Legionella* spp. (Specificity) และสามารถให้ผลการทดสอบได้อย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน ทำให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและภาคเอกชน สามารถนำผลการทดสอบไปใช้ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคลีสทีเจียนแนร์ได้อย่างทันท่วงที

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการพัฒนาศักยภาพการทดสอบทางห้องปฏิบัติการของกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย ในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยใช้วิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง (Relative trueness) มีความไว (Sensitivity) และมีความจำเพาะสูง (Specificity) และให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ คือ วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method) ซึ่งในกรณีฉุกเฉินหรือในสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคเลเจียนแนร์ ผลการทดสอบที่ถูกต้องและรวดเร็วจะทำให้ผู้รับบริการ หน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและภาคเอกชน สามารถนำผลการทดสอบไปใช้ประโยชน์ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคได้อย่างทันทั่วถึง เพื่อคุ้มครองและดูแลสุขภาพของประชาชนทุกกลุ่มวัย

1.5 คำศัพท์และนิยาม

- **ลิจิโอเนลลา (Legionella)** เป็นชื่อจีนัสของแบคทีเรียซึ่งพบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ และระบบน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น และอาจก่อโรคได้ โดยเฉพาะที่พบบ่อย คือ ลิจิโอเนลลา นิวโมฟิลา (*Legionella pneumophila*)

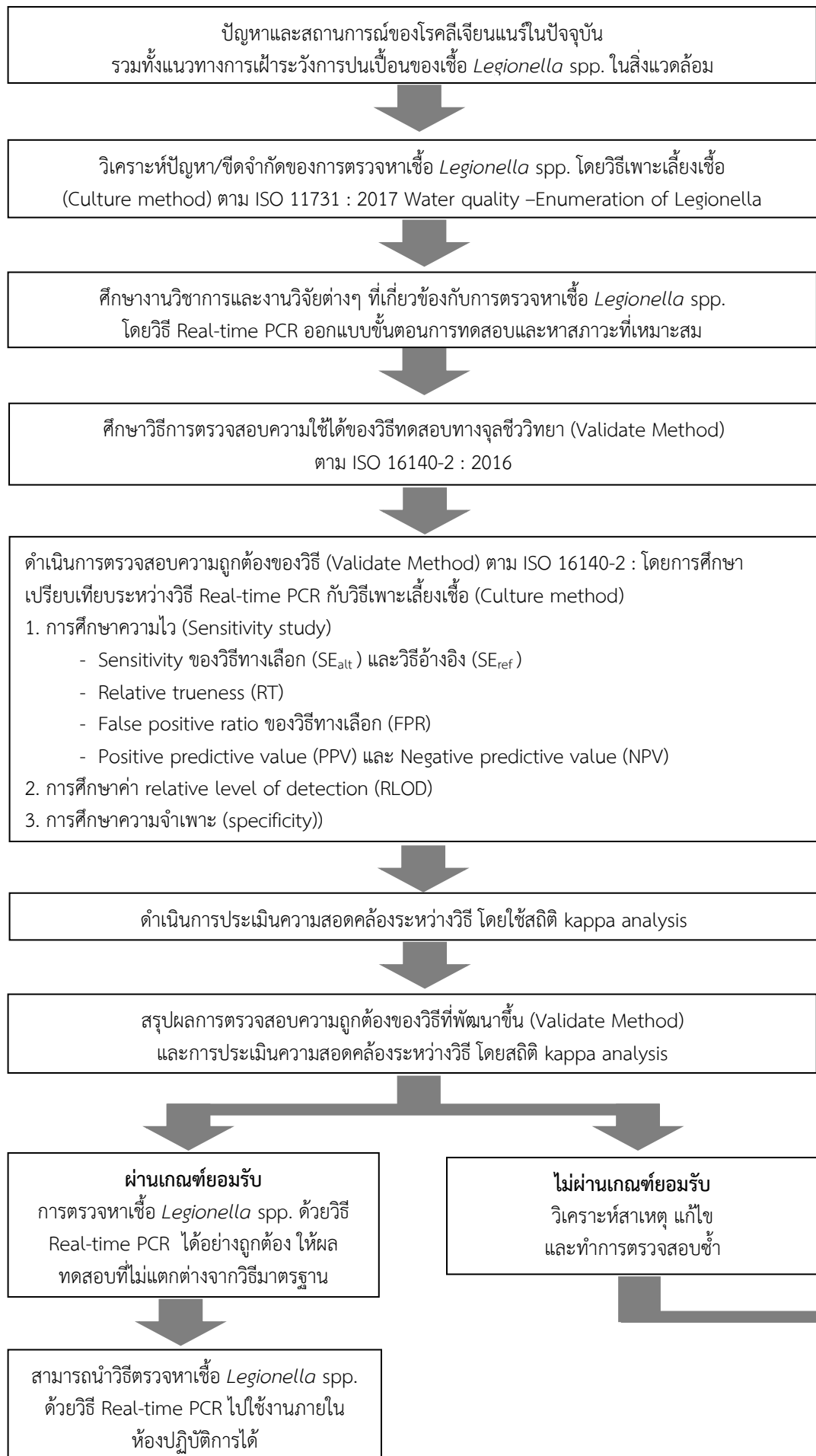
- **โรคเลเจียนแนร์ (Legionnaires' disease)** เป็นโรคติดเชื้ออย่างฉับพลันจากแบคทีเรียกลุ่มลิจิโอเนลลา สปีชีส์ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากลิจิโอเนลลา นิวโมฟิลา มักเกิดในผู้ชายสูงอายุโดยเฉพาะผู้ที่สูบบุหรี่หรือผู้ที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง เนื่องจากเป็นโรคบางชนิดหรือการใช้สารเคมี ทั้งนี้ในระยะแรกจะมีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ ได้แก่ มีไข้เล็กน้อย ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อและข้อต่อหมดแรง อ่อนเพลีย และเบื่ออาหาร ต่อมาจะมีอาการคล้ายปอดอักเสบ ได้แก่ มีไข้สูง ไอแห้งๆ หรืออาจมีเสมหะ หายใจไม่สะดวก หนาวสั่นและเจ็บหน้าอก

- **การระบาดของโรค** หมายถึง เหตุการณ์ที่มีผู้ป่วยมากผิดปกติ เช่น พบผู้ป่วยตั้งแต่ 2 รายขึ้นไปในระยะเวลาอันสั้นหลังร่วมกิจกรรมกัน พบผู้ป่วยมากกว่าค่ามัธยฐาน 5 ปีย้อนหลังในพื้นที่และช่วงเวลาเดียวกัน หรือพบผู้ป่วยโรคที่ไม่เคยพบในพื้นที่นั้นมาก่อนเพียง 1 ราย

- **Culture method (วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ)** เป็นกระบวนการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ ในสภาพห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุม การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สามารถใช้เพื่อระบุชนิดหรือจำนวนของจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษาได้

- **Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR)** เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะและสามารถติดตามวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทุกรอบของการเพิ่มจำนวน ในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (real-time detection) โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (Primer) 1 คู่ ร่วมกับตัวตรวจจับ (probe) ที่ถูกออกแบบเป็นสายสั้นๆ ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อเป้าหมายที่ต้องการตรวจ สำหรับ probe จะมีการติดสี Fluorescence เทคนิคนี้อาศัยการตรวจวัดสัญญาณแสงที่ถูกปล่อยออกมา ปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบ

1.6 กรอบแนวคิดงานวิจัย



บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

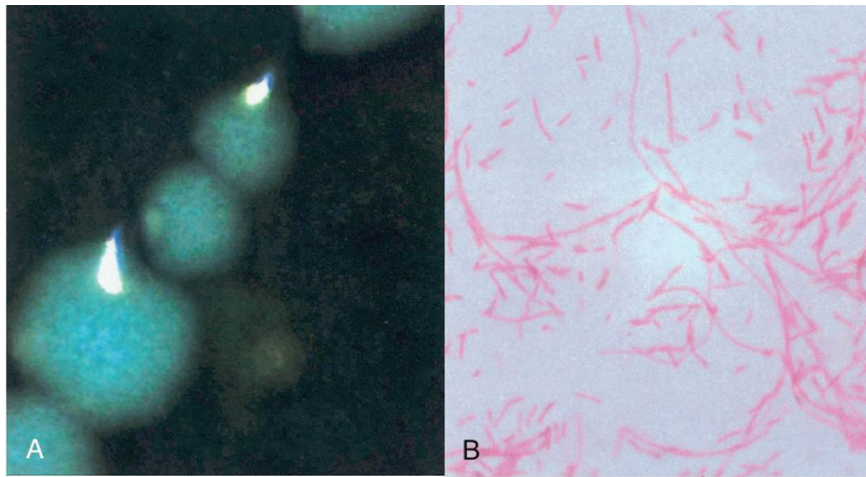
ผู้วิจัยได้ศึกษาแนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ครอบคลุมหัวข้อเอกสารงานวิชาการ เพื่อเป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษา ดังต่อไปนี้

- 2.1 เชื้อลิจิโอนัลลา (*Legionella* spp.) กับการก่อโรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires disease)
- 2.2 การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ตามมาตรฐาน ISO 11731 : 2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*
- 2.3 การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR)
- 2.4 มาตรฐานการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา
- 2.5 การประเมินความสอดคล้องของข้อมูลด้วยสถิติ kappa analysis
- 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อลิจิโอนัลลา (*Legionella* spp.) กับการก่อโรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires disease)

2.1.1 ลักษณะและวงจรชีวิตของเชื้อลิจิโอนัลลา (*Legionella* spp.)

Legionella spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (gram-negative rod) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ขนาดกว้าง 0.3–0.9 ไมโครเมตร และยาว 2 ถึงมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครเมตร อาจมีรูปร่างได้มากกว่าหนึ่งแบบ บางครั้งเปลี่ยนรูปเป็นชนิดตัวยาว มีหางตรง เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่อุดมสมบูรณ์จะเจริญเติบโตได้รวดเร็ว โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์มีสองชั้น มีขนเล็กโบกสะบัดและมีแฟลกเจลลาหนึ่งอัน ช่วยให้เชื้อสามารถเคลื่อนไหวได้รวดเร็ว⁽¹⁾



ภาพที่ 1 เชื้อลิจิโอนัลลาจากการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE with cysteine (A) และเชื้อลิจิโอนัลลาจากการย้อมสีแกรม (B)

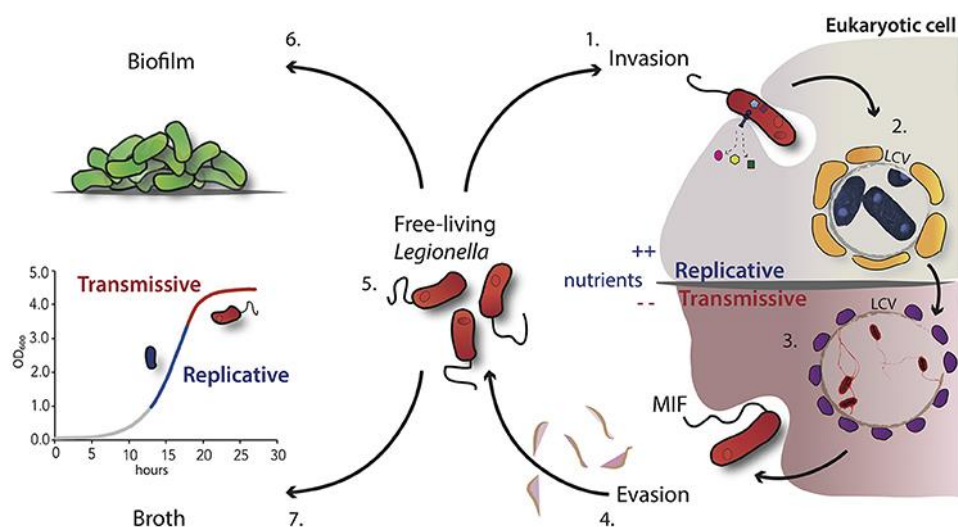
Legionella spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญยาก (fastidious bacteria) ไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป ต้องการกรดอะมิโน L-cysteine และธาตุเหล็กสำหรับเจริญเติบโต ไม่สลายคาร์โบไฮเดรต (nonsaccharolytic) มีเอนไซม์โปรติเอส (protease) คาตาเลส (catalase) และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) *Legionella* spp. ประกอบด้วย 60 สปีชีส์ และ 80 ซีโรกรุป (serogroup) โดยสปีชีส์ที่

เป็นสาเหตุของโรคลีเจียนเนอราที่พบได้บ่อยที่สุด คือ *L. pneumophila* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความทนต่อคลอรีนกว่าเชื้อกลุ่ม enteric bacteria โดยมีการศึกษาพบว่าที่ pH 7.6 ที่ 21 องศาเซลเซียส เมื่อใช้คลอรีน 0.1 mg (free chlorine residual/liter) ต้องใช้เวลา 40 นาที จึงจะสามารถฆ่าเชื้อ *L. pneumophila* ได้ร้อยละ 99 ขณะที่ *Escherichia coli* ใช้เวลาน้อยกว่า 1 นาที เชื้อ *L. pneumophila* เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20–50 องศาเซลเซียส และอยู่ในแหล่งน้ำทั่วไป ทำให้แพร่เชื้อได้ในชุมชนหรือแม้กระทั่งในสถานพยาบาล สำหรับเชื้อ *Legionella* สปีชีส์อื่นที่พบว่ามีก่อโรคได้ ได้แก่ *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* และ *L. longbeachae*⁽²⁾

Legionella spp. สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดินโคลน ทะเลสาบ ลำธาร และแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้นหรือที่ที่มีความชื้น เช่น น้ำหล่อเย็น (cooling water) หัวฝักบัวอาบน้ำ (shower) สระว่ายน้ำ เป็นต้น สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานหลายเดือนในสิ่งแวดล้อมที่มีความชื้นสูง และแบ่งตัวในที่ที่มีสาหร่ายและอินทรีย์วัตถุ เชื้อจะอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นโดยเฉพาะโปรโตซัว (protozoa) โดยรวมกลุ่มกันเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) นอกจากนี้เชื้อ *Legionella* สามารถดำรงชีวิตและแบ่งตัวภายในเซลล์ของโปรโตซัวได้ จึงทำให้เชื้อทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสม⁽²⁾

การติดเชื้อเกิดจากการหายใจเอาละอองอากาศหรือละอองน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป หรือสำลักเอาน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป เชื้อ *L. pneumophila* สามารถจับกับ complement receptor 1 (CR1) และ complement receptor 3 (CR3) ที่อยู่บนผิวของ phagocytic cells ทำให้เข้า phagocytic cells ได้ อีกกลไกหนึ่งที่เชื้อสามารถเข้าไปใน phagocytic cells ได้เรียกว่า coiling phagocytosis เกิดจาก phagocytic cells สร้าง pseudopod coil มาล้อมรอบเชื้อไว้ เชื้อสามารถยับยั้งการรวมตัวกันของ phagosome และ lysosome ทำให้ไม่ถูกทำลายจากเอนไซม์ใน lysosome จากนั้นเชื้อออกมาอยู่ใน cytoplasm แบ่งตัวเพิ่มจำนวน และออกจากเซลล์โดยการทำให้เซลล์แตก สามารถไปติดเชื้อในเซลล์อื่นๆ ต่อไป หลังจากร่างกายมีการติดเชื้อ *L. pneumophila* เชื้อแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ใน alveolar macrophage⁽⁷⁾

วงจรชีวิตของเชื้อ *Legionella* spp. ⁽⁸⁾



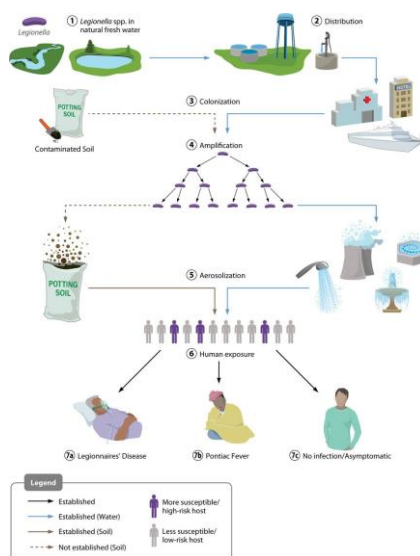
ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อ *Legionella* spp.

เชื้อ *Legionella* spp. เป็นเชื้อก่อโรคที่จำเป็นต้องอาศัยเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในการเพิ่มจำนวน โดยมีวงจรชีวิตแสดงดังภาพที่ 2 ดังนี้

- 1) เชื้อจะเข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ขึ้นสูงกว่าแบคทีเรีย เช่น โปรโตซัวหรือมีบา
- 2) เชื้อจะสร้างพื้นที่สำหรับการแบ่งเซลล์ภายในเซลล์ของโปรโตซัวหรือมีบา เรียกว่า *Legionella* containing vacuole (LCV) ซึ่งล้อมรอบด้วยถุงที่อุดมไปด้วยโปรตีนและไขมัน จากนั้นเชื้อจะเริ่มแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน
- 3) เมื่อเชื้อแบ่งเซลล์ได้จำนวนหนึ่งภายใน LCV จะเริ่มขาดสารอาหารสำหรับการแบ่งเซลล์ เชื้อที่อยู่ใน LCV จะเปลี่ยนรูปร่างและเริ่มมี flagella อยู่ในสถานะก่อให้เกิดโรคได้
- 4) เชื้อจะออกจากเซลล์ของโปรโตซัวหรือมีบา และออกมาอยู่ในสิ่งแวดล้อม
- 5) เชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมจะเรียกว่า Free living *Legionella*
- 6) เชื้อจากที่ 5 อาจเข้าสู่ขั้นที่ 6 คือ เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเริ่มจากการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน (Replicate) เมื่อแบ่งเซลล์จนอาหารเริ่มหมด เชื้อจะเข้าสู่การเปลี่ยนสถานะไปเป็นเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้
- 7) เชื้อจากขั้นที่ 5 อาจจะไปเข้าสู่วงจรขั้นที่ 1 หรือขั้นที่ 7 คือเข้าไปเจริญในไบโอฟิล์มในเส้นท่อ

2.1.2 การเกิดโรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires disease)

แหล่งรังโรค : โรคลีเจียนแนร์เป็นโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียอย่างเฉียบพลันในทางเดินหายใจส่วนล่าง สาเหตุเกิดจากเชื้อลีเจียนเนลลา (*Legionella* spp.) ซึ่งเชื่อกันว่ามักแยกได้จากระบบน้ำร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดละอองน้ำ เช่น Cooling Tower (ของเครื่องปรับอากาศแบบรวมที่ใช้ในอาคารใหญ่ ๆ เช่น ในโรงแรมหรือโรงพยาบาล) น้ำพุเทียม เครื่องเพิ่มความชื้นและถาดน้ำทิ้งของเครื่องเป่าลมเย็น เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อได้จากน้ำประปาที่ร้อนและท่อเย็น อ่างน้ำร้อน บ่อ บึง และสระน้ำ รวมถึงจากดินริมตลิ่งของแหล่งน้ำเหล่านี้ด้วย โดยเชื่อกันได้เป็นเดือนในน้ำประปาและน้ำกลั่น ในสภาวะที่เหมาะสมเชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและฟุ้งกระจายสู่สิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำได้⁽⁹⁾

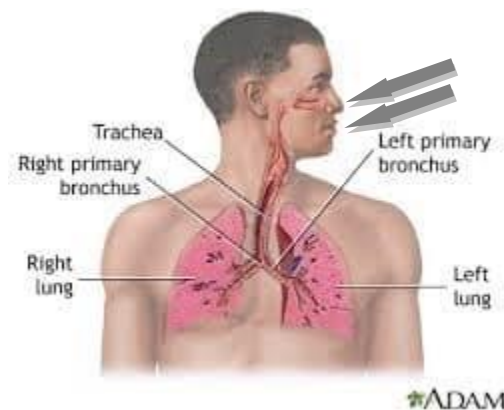


ภาพที่ 3 แหล่งรังโรคและการแพร่กระจายของเชื้อ *Legionella* spp. ในสิ่งแวดล้อม

การติดเชื้อลิจิโอเนลลาและลักษณะอาการของโรค : การติดต่อผ่านทางอากาศ (Airborne transmission) โดยการสูดหายใจเอาละอองน้ำ (อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 5 ไมครอน) หรือผ่านทาง การสำลักน้ำที่มีเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เข้าปอด ซึ่งเป็นวิธีการติดต่อที่พบได้มากที่สุด ส่วนการแพร่เชื้อจากคน ไปสู่คนยังไม่มีปรากฏ โดยผู้ที่ได้รับเชื้อดังกล่าวจะมีลักษณะอาการทางระบบทางเดินหายใจเป็น 2 แบบ คือ ในกรณีที่รับเชื้อในปริมาณน้อยจะมีลักษณะอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ เรียก ไข้ปอนติแอค หรือปอนเตียก (Pontiac fever) และบางรายที่ได้รับเชื้อในปริมาณมาก อาการจะรุนแรงถึงขั้นโรคปอดอักเสบรุนแรง หรือเป็นโรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires' Disease) ได้ ซึ่งมีลักษณะอาการและระยะฟักตัว ดังนี้

- Pontiac Fever (ไข้ปอนเตียก) เป็นโรคที่สามารถหายได้เอง โดยไม่ต้องรักษา ส่วนใหญ่จะตรวจพบเมื่อมีการระบาด แต่ 95% พบว่าหายเองได้ ลักษณะอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ คือ มีอาการไข้ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว ปวดกล้ามเนื้อและข้อต่อ ไม่มีเรื้อรัง และเหนื่อยง่าย สูญเสียความสามารถในการรับรสชาติ โดยมีระยะฟักตัว 24 - 48 ชั่วโมง

- Legionnaires' Disease (โรคปอดอักเสบชนิดรุนแรง) มีลักษณะอาการ คือ มีไข้สูงประมาณ 39 -41 องศาเซลเซียส ไอแห้ง มีเสมหะ หายใจไม่สะดวก เจ็บปวดบริเวณทรวงอก ปอดมีการอักเสบเป็นปื้นหรือจุดขาว ถ้าเป็นมากอาจพบกลุ่มน้ำในปอดทั้งสองข้าง การป่วยค่อนข้างรุนแรงและอาจจะทำให้การหายใจล้มเหลว อัตราการเสียชีวิต 15-20% โดยโรคลีเจียนแนร์จะมีช่วงเวลาฟักตัวของเชื้อประมาณ 2 - 10 วัน โดยผู้ที่ได้รับเชื้อลิจิโอเนลลาเข้าสู่ร่างกาย จะยังไม่แสดงอาการในระยะแรก ๆ จนกว่าจะล่วงเลย 2 - 10 วันไปแล้ว ซึ่งผู้ป่วยมีโอกาสเสียชีวิตประมาณ 15-20% ⁽⁹⁾



ภาพที่ 4 ช่องทางการรับเชื้อลิจิโอเนลลาเข้าสู่ร่างกาย

บุคคลที่เป็นกลุ่มเสี่ยงต่อโรคลีเจียนแนร์ ได้แก่ กลุ่มผู้สูงอายุตั้งแต่ 50 ปี ขึ้นไป กลุ่มผู้สูบบุหรี่ กลุ่มบุคคลที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ หรือเป็นโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็ง โรคปอด โรคเบาหวาน โรคติดเชื้อต่างๆ โรคเอช ไอ วี (HIV) ผู้ที่อยู่ระหว่างการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ (ไต หัวใจ) กลุ่มที่มีการดื่มสุราหรือเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ⁽⁹⁾

ปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ ได้แก่ ลักษณะและจำนวนของเชื้อในปริมาณที่มากพอ ความทนได้ของแต่ละบุคคล (susceptibility host) ระบบการจัดการคุณภาพสิ่งแวดล้อมของโรงแรมไม่เพียงพอ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ (20 – 50 องศาเซลเซียส) ค่า pH ของน้ำ (5.0 – 8.0) ปริมาณแหล่งอาหารของเชื้อ เช่น ตะกอนดิน โปรตีน สสารอินทรีย์ เป็นต้น ⁽⁹⁾

การวินิจฉัยโรค อาศัยการแยกเชื้อก่อโรคจากเนื้อเยื่อหรือน้ำมูก น้ำลาย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อเชื้อชนิดนี้ (BCYE with cysteine), การตรวจหาเชื้อ *Legionella pneumophila* จากปัสสาวะ หรือโดยการตรวจพบ immunofluorescent antibody titer ขึ้นสูงมากหรือมากกว่า 4 เท่า โดยเทียบกับผลน้ำเหลืองที่เจาะครั้งแรกกับอีกครั้งห่างกัน 3-6 สัปดาห์ วิธีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะและการตรวจหาแอนติบอดีส่วนใหญ่จะให้ผลต่อ *L. pneumophila* ดังนั้นโรคที่เกิดจาก species อื่นจะตรวจไม่พบ จึงควรเน้นความสำคัญไปที่การเพาะเชื้อจากสารคัดหลั่งในระบบทางเดินหายใจหรือส่วนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง แต่ความไวและความจำเพาะของผลที่ได้ จะมีค่าความแปรปรวนสูง ขึ้นกับประสิทธิภาพของเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ ส่วนการวินิจฉัยใช้ปอนเตียกมักจะใช้วิธีย้อมสี Direct immune fluorescent antibody stain จากเนื้อเยื่อที่อาการมีความสอดคล้องกับกลุ่มโรคทางระบบทางเดินหายใจ การทดสอบแอนติเจนจากปัสสาวะและเสมหะสามารถใช้ยืนยันผลการวินิจฉัยได้ แต่ความแม่นยำของการวินิจฉัยจะต่ำกว่า⁽¹⁰⁾

การรักษา ใช้ปอนเตียกไม่จำเป็นต้องรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ สามารถหายเองได้ สำหรับคำแนะนำในการรักษาโรคลีเจียนแนร์ คือ ใช้ยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolones) เช่น ยาเลโวฟลอกซาซิน (Levofloxacin) หรือยาแมโครไลด์ (Macrolide) ชนิดใหม่ ยาอะซิโธรไมซิน (Azithromycin) การศึกษาจากการสังเกตชี้ให้เห็นว่ายาเลโว ฟลอกซาซิน (Levofloxacin) อาจจะมีผลข้างเคียงมากกว่ายาแมโครไลด์ (Macrolide) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง ยาไรแฟมปีซิน (Rifampicin) ถูกนำมาใช้ร่วมด้วยในผู้ป่วยที่การรักษาล้มเหลว แต่ข้อมูลที่ใกล้เคียงข้อสนับสนุนนี้ยังมีไม่เพียงพอ แต่ยาในกลุ่มเพนิซิลลิน (Penicillin), ยาเซฟาโลสปอริน (Cephalosporins) และยาอะมิโนกลัยโคไซด์ (Aminoglycosides) จะใช้รักษาไม่ได้ผล⁽¹⁰⁾

มาตรการป้องกันโรค แหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างเป็นแหล่งแพร่โรคปฐมภูมิของโรคลีเจียนแนร์ ดังนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหลีกเลี่ยงสภาวะที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Legionella* โดยเมื่อไม่ได้ใช้งานหอหล่อเย็น ต้องเปิดน้ำทิ้งให้แห้ง และทำความสะอาดถังคราบโคลและตะกอนเดิม Biocides ในปริมาณที่พอเหมาะเพื่อป้องกันการก่อตัวของไบโอฟิล์ม ตั้งอุณหภูมิระบบน้ำร้อนให้สูงกว่าหรือเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส เพื่อลดความเสี่ยงต่อการแพร่เชื้อ⁽¹⁾

มาตรการควบคุมการระบาด ค้นหาปัจจัยเสี่ยงร่วมและทบทวนบันทึกการบำรุงรักษาระบบน้ำที่อาจเป็นแหล่งโรค ในการหาสาเหตุของการระบาดนั้นอาจมีความจำเป็นต้องเพาะเชื้อจากแหล่งโรค การแก้ไข/ฟื้นฟูแหล่งน้ำทำได้โดยการเติมคลอรีน และ/หรือให้ความร้อนระดับสูง ซึ่งพบว่าได้ผลดี การบำรุงรักษาและการฆ่าเชื้ออย่างเหมาะสมในอ่างน้ำวนของสปา, หอหล่อเย็น, และแหล่งน้ำดื่ม น้ำใช้ เป็นมาตรการที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการป้องกันการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ได้⁽¹⁾

2.1.3 สถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ (Legionellosis)

จากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ทั่วโลก มีบันทึกการพบผู้ป่วยรายแรกในปี พ.ศ. 2490 เกิดการระบาดครั้งแรกในปี พ.ศ. 2500 ที่รัฐมินนิโซตา และมีการระบาดครั้งใหญ่ของโรคลีเจียนแนร์ ในปี พ.ศ. 2519 เกิดขึ้นที่โรงแรม The Bellevue Stratford Hotel รัฐฟิลาเดเฟีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีสมาชิกของสมาคมทหารผ่านศึกของสหรัฐอเมริกา เข้าพักเพื่อเข้าร่วมงานรำลึกวันทหารผ่านศึกครบรอบ 200 ปี (American Legion Convention) หลังจากงานประชุมในครั้งนั้นไม่นาน มีทหารที่เข้าร่วมงานประชุมหลายคนป่วย โดยมีอาการคล้ายปอดบวม (pneumonia-like symptoms) เช่น ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ไอ ท้องเสีย เจ็บหน้าอก และมีไข้ เป็นต้น โดยมีผู้ป่วย 221 รายได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที แต่มีผู้ป่วยอีกจำนวน 34 ที่เสียชีวิต ณ เวลานั้นมีการพยายามหา

สาเหตุของโรคและแหล่งที่มาของโรค จนกระทั่งในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2519 นักจุลชีววิทยาชื่อ Joseph McDade และคณะเป็นผู้พบว่าสาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งในต่อมาให้ชื่อว่าเชื้อ *Legionella pneumophila* และให้ชื่อโรคว่า โรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires' disease) และเมื่อทำการสอบสวนโรคพบว่าสาเหตุของการติดเชื้อเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อในระบบหล่อเย็น (cooling tower system) จึงมีเชื้อแพร่กระจายผ่านทางช่องอากาศของเครื่องปรับอากาศและระบบท่อน้ำของโรงแรม หลังจากนั้นพบว่าโรคนี้เกิดขึ้นทั่วทวีปอเมริกาเหนือ ออสเตรเลีย แอฟริกา อเมริกาใต้ และยุโรป ในหลายประเทศ เช่น เนเธอร์แลนด์ สเปน นอร์เวย์ อังกฤษ ฝรั่งเศส แคนาดา ออสเตรเลีย เป็นต้น การแพร่ระบาดของโรคมักเกิดขึ้นประปรายตลอดทั้งปี แต่ส่วนใหญ่จะพบในช่วงฤดูร้อนและฤดูใบไม้ร่วง และล่าสุดในปี พ.ศ. 2565 พบการระบาดในสถานพยาบาล ประเทศอาร์เจนตินา ทำให้เกิดปอดอักเสบ จำนวน 11 ราย ในจำนวนนี้เสียชีวิต 4 ราย โรคลีเจียนแนร์เป็นโรคที่ต่างประเทศให้ความสนใจ เนื่องจากมีอัตราป่วยตายสูง โดยเฉพาะประเทศในแถบยุโรปมีระบบเฝ้าระวังและมีคณะทำงานสำหรับโรคนี้โดยเฉพาะเรียกว่า European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) Network

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการพบผู้ป่วยโรคลีเจียนแนร์ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2527 เป็นผู้ป่วยชาวไทย โดยนายแพทย์ไพรัช ศรีไสว และคณะได้มีการศึกษาในช่วง 15 เดือน (ตุลาคม 2527 - ธันวาคม 2528) ที่โรงพยาบาลชลประทาน จังหวัดนนทบุรี พบผู้ป่วยโรคลีเจียนแนร์ คิดเป็นร้อยละ 4.16 ของผู้ป่วยปอดอักเสบทั้งหมดที่รับไว้รักษาในโรงพยาบาล⁽¹¹⁾ และต่อจากนั้นก็พบนักท่องเที่ยวชาวต่างชาติป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์เกือบทุกปี แต่จำนวนไม่มาก เช่น ในปี พ.ศ. 2549 ได้รับแจ้งจากสถานกงสุลสหราชอาณาจักร ประจำกรุงเทพมหานคร และ European Union Center for Disease Control (EU CDC) ว่ามีนักท่องเที่ยวชาวต่างชาติที่เดินทางกลับจากจังหวัดภูเก็ต แล้วป่วยเป็นโรคปอดอักเสบจากการติดเชื้อโรคลีเจียนแนร์ จำนวน 6 ราย เป็นชาวสวีเดน 2 ราย ชาวฟินแลนด์ 2 ราย ชาวนอร์เวย์ 1 ราย และชาวเบลเยียม 1 ราย ทั้งนี้ไม่มีรายงานผู้เสียชีวิต เมื่อสอบสวนโรคพบว่า แหล่งการแพร่ระบาดของเชื้อเกิดขึ้นที่โรงแรมแห่งหนึ่งเนื่องจากผู้ป่วยทุกรายพักในโรงแรมเดียวกันนี้⁽¹²⁾ ปี พ.ศ. 2551 พบผู้ป่วยยืนยันโรคลีเจียนแนร์ เป็นชาวเดนมาร์ก 2 ราย ภายหลังเดินทางกลับจากตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา และเมื่อทำการสอบสวนสิ่งแวดล้อมในสถานที่เกิดโรค ผลพบเชื้อจากการเพาะเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่าง swab อุปกรณ์ในห้องพัก⁽¹³⁾ ปี พ.ศ. 2558 ทำสอบสวนการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป หมู่ที่ 5 ตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ภายหลังได้รับแจ้งจากเครือข่ายลีเจียนแนร์ของสหภาพยุโรป (European Legionnaires' Disease Surveillance Network : ELDSNet) ผ่านสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ว่ามีนักท่องเที่ยว 2 รายป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์ ผลการสอบสวนพบผู้ป่วยทั้งหมด 6 ราย เป็นผู้ป่วยยืนยัน 2 ราย ผู้ป่วยสงสัย 4 ราย ทั้งหมดเป็นชาวยุโรป รวมทั้งพบเชื้อจากการเพาะเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำและ ตัวอย่าง swab สุขอนามัยต่างๆ⁽¹⁴⁾ และในปี 2566 ภายหลังได้รับรายงานนักท่องเที่ยวชาวสวีเดนป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์หลังเดินทางมาท่องเที่ยวภายในประเทศไทย ได้มีการตรวจสอบสภาพสิ่งแวดล้อมที่มีโอกาสก่อให้เกิดความเสี่ยงในการติดเชื้อ ได้แก่ ระบบน้ำหล่อเย็น หอผึ่งเย็น โดยพบว่าคุณภาพน้ำภายในโรงแรมหลายแห่งยังไม่ได้มาตรฐาน เช่น ปริมาณคลอรีนอิสระคงเหลือไม่เพียงพอ โรงแรมไม่ได้มีการทำความสะอาดถังเก็บน้ำต่างๆ เป็นเวลา 3 ปี ตั้งแต่มีการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (โควิด 19) รวมถึงมีการตรวจพบเชื้อ *Legionella* ในน้ำจากแหล่งน้ำของโรงแรม ปริมาณ 5,000 CFU/L (มาตรฐานยุโรปควรน้อยกว่า 1,000 CFU/L) จึงมีความเป็นไปได้ที่นักท่องเที่ยวป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์จากสิ่งแวดล้อมในโรงแรมนี้⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้ยังมีข้อมูลการรายงานโรคจากหน่วยงานต่างประเทศ เช่น

European Working Group for Legionella Infection (EWGLI) Network ซึ่งเป็นเครือข่ายเฝ้าระวัง และควบคุมการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในระหว่างกลุ่มสมาชิกรวม 29 ประเทศ ซึ่งเมื่อประเทศในกลุ่ม สมาชิกพบผู้ป่วยตั้งแต่ 2 รายขึ้นไป ที่เดินทางมาท่องเที่ยวต่างประเทศและพักอยู่โรงแรมเดียวกัน (โดย พิจารณาจากระยะพักตัวของโรค) จะมีการดำเนินการแจ้งข้อมูลไปยังหน่วยงานสาธารณสุขของประเทศที่เกิดเหตุและหน่วยงานสาธารณสุขของแต่ละประเทศในเครือข่าย เพื่อแนะนำไม่ให้ประชาชนในกลุ่ม ประเทศนั้นๆ เดินทางเข้าไปท่องเที่ยวในประเทศที่เกิดเหตุ ซึ่งอาจสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจให้แก่ ประเทศไทยได้ สถานการณ์ของโรคลีเจียนแนร์โดยรวมในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556–2565 พบ ผู้ป่วยสะสมรวม 131 ราย เสียชีวิต 1 ราย ส่วนใหญ่เป็นนักท่องเที่ยว ซึ่งสถานการณ์การแพร่ระบาดของ โรคนี้อาจส่งผลกระทบต่อการเดินทางของนักท่องเที่ยวจากภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก ดังนั้นจึงได้มีมาตรการ ควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ โดยการแจ้งให้โรงแรม ผู้ประกอบการ และบริษัทธุรกิจดูแลทำความสะอาดระบบเครื่องปรับอากาศและน้ำหล่อเย็น รวมถึงการเฝ้าระวังในกลุ่มเสี่ยง โดยเฉพาะผู้สูงอายุ และ ผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ นอกจากนี้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรทบทวนเรื่องมาตรการการป้องกันควบคุมโรคอย่าง เข้มแข็งกับธุรกิจโรงแรม สป่า ให้มีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อในระบบน้ำ/ท่อส่งน้ำภายในโรงแรม อย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ⁽¹⁶⁾

2.2 การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะเจาะจงและ การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันคุณสมบัติของเชื้อ⁽¹⁷⁾

วิธีทดสอบในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. อ้างอิงตามมาตรฐาน ISO 11731 : 2017 Water quality – Enumeration of Legionella โดยก่อนการทดสอบต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้น ขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อเป้าหมาย (Concentration of sample) โดยวิธี Membrane filtration technique ใช้แผ่นกรองชนิด polycarbonate ที่มีขนาดรูกรอง (Pore size) 0.2 ไมโครเมตร กรณีที่ตัวอย่างมีตะกอนจำนวนมากไม่สามารถใช้วิธี Membrane filtration technique ได้ สามารถใช้วิธี Centrifugation technique แทน โดยปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 6,000 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดตัวอย่าง (Inoculate) ที่ผ่านการ Concentrate แล้ว (ด้วยวิธี Membrane filtration technique หรือ Centrifugation technique อย่างใดอย่างหนึ่ง) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ GVPC agar (อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered charcoal yeast extract; BCYE ที่มีส่วนผสมของ glycine, vancomycin, polymyxin B และ cycloheximide) แล้ว spread plate ให้ตัวอย่างเกลี่ยทั่ว ผิวหน้าอาหาร นำอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน หากพบโคโลนีที่ คาดว่าจะเป็น *Legionella* spp. (Typical colony) ให้เชื้อเชื้อ (sub-culture) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ BCYE ที่มีส่วนผสมของ L-cysteine (BCYE agar with L-cysteine) และ BCYE ที่ไม่มี ส่วนประกอบของ L-cysteine (BCYE agar without L-cysteine) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 2-5 วัน อ่านผลการทดสอบ หากเป็นเชื้อ *Legionella* spp. ต้องสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar with L-cysteine และ ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar without L-cysteine

2.3 การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR)⁽¹⁸⁾

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ มีขั้นตอนเริ่มจากการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นขึ้น เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อเป้าหมาย (Concentration of sample) โดยอาจใช้วิธี Membrane

filtration technique, Centrifugation technique หรือวิธีอื่นๆ ที่เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ มาสกัดเพื่อให้ได้สารพันธุกรรม (DNA/RNA) ของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายที่มีความบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เหมาะสม โดยทำตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่ระบุในชุดสกัด และสารพันธุกรรมที่สกัดได้นำไปทดสอบต่อในขั้นตอน Real-time PCR หรือกรณีที่ยังไม่นำไปทดสอบให้เก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

Real-time PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย ที่พัฒนาต่อจากเทคนิค PCR โดยตัดขั้นตอนการทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจวัด PCR product ออก แล้วใช้การติดตามวัดสัญญาณเรืองแสงที่เกิดขึ้น ขณะที่ DNA เป้าหมายเพิ่มจำนวนในทุกๆ รอบ ตั้งแต่รอบแรกจนรอบสุดท้ายของการทำปฏิกิริยา (real-time detection) ปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ PCR product ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยาแบบทวีคูณ (exponential amplification) ในลักษณะกราฟรูปตัว S (S-shape / sigmoid curve) นอกจากนี้วิธี Real-time PCR ถูกใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรม โดยการตรวจตัวอย่างเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้น DNA อ้างอิงที่ทราบปริมาณ ที่อัตราเจือจางต่างๆ (Standard curve) จึงเรียกว่า quantitative PCR (qPCR)

กรณีการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ที่มีสารพันธุกรรมชนิด RNA เช่น ไวรัส SARS-CoV-2 จะมีขั้นตอนการเปลี่ยน RNA เป็น DNA (reverse transcription; RT) จึงเรียกเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ว่า “Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real-time RT-PCR)” ก่อนการทำ real-time PCR วิธีการตรวจจึงเป็น Real-time RT-PCR หรือ RT-qPCR ชุดน้ำยาสำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมดังกล่าว ปัจจุบันมีการปรับปรุงให้ขั้นตอน RT และ PCR สามารถทำได้ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน (one-step RT-PCR) รวมทั้งสามารถตรวจ DNA/gene ได้หลายเป้าหมายพร้อมกัน โดยการเลือก reporter ที่ให้การเรืองแสงในช่วงความถี่คลื่นต่างกัน primer และ probe ถูกออกแบบให้จับกับบริเวณ conserved region ซึ่งหมายถึง บริเวณจำเพาะบนยีนที่มีลำดับเบสพบได้เฉพาะในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ แต่ไม่พบในสิ่งมีชีวิตอื่น โดยเฉพาะกลุ่มใกล้เคียงกัน โดยยีนเดียวกันอาจถูกเลือกช่วงลำดับเบสต่างบริเวณกัน มาใช้เป็น primer/probe ขึ้นกับการวิเคราะห์และออกแบบของนักวิจัยหรือบริษัทผลิตชุดตรวจ ดังนั้นจึงไม่ได้อธิบายความแม่นยำต่างกันที่ใช้น้ำยาเป้าหมายเดียวกันจะมีความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) เท่ากัน โดยส่วนประกอบหลักของปฏิกิริยา PCR (Master Mix) ได้แก่ template (ต้นฉบับของ DNA ที่เราต้องการจะเพิ่มจำนวน), primers (สาย DNA ที่เป็น single strand ที่จับคู่ได้กับปลายของ template ทั้งสองด้าน โดยจะมีด้าน 3' เป็น hydroxyl group ที่จะสามารถต่อกับ nucleotides อื่นได้), polymerase (เอนไซม์ที่จะใช้เพื่อการต่อสายของ DNA) และ nucleotides ทั้ง 4 ตัว (A-adenine, C-cytosine, G- guanine, T-thymine) ที่เอาไว้ต่อกันเป็น DNA สายใหม่

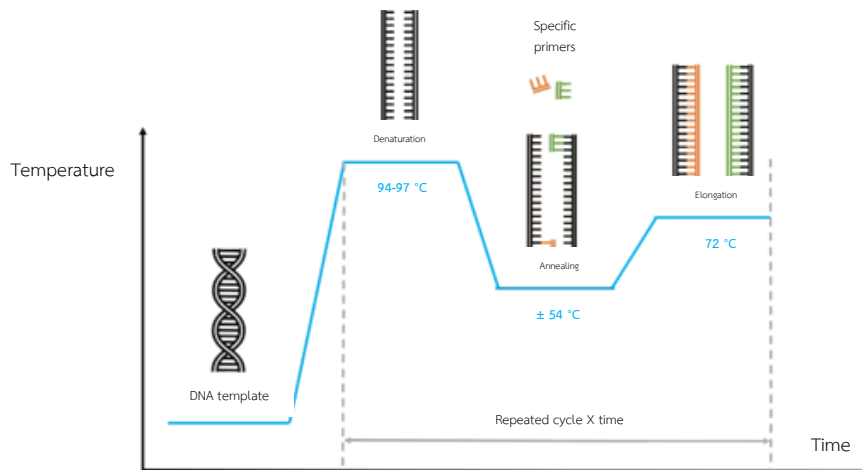
ขั้นตอนพื้นฐานของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่วนไปวนมา 30 ถึง 50 รอบ ในเครื่อง thermocycler ดังนี้

1. Denaturation: ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นการทำให้สาย DNA พังระหว่าง nucleotides ทำให้สาย DNA ที่ม้วนเกลียวอยู่เป็นคู่ แยกออกจากกันเป็นเส้นตรง 2 เส้น และที่อุณหภูมินี้ปฏิกิริยาต่างๆจากเอนไซม์ในรอบก่อนหน้านี้จะหยุดลงทั้งหมด

2. Annealing: ที่อุณหภูมิประมาณ 50 °C – 60 °C เพื่อให้ primer สามารถเกาะติดกับ template เพื่อเตรียมตัวตั้งต้นต่อสายคู่ของ template

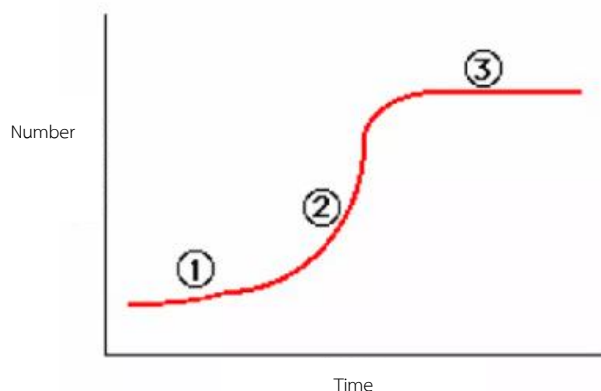
3. Extension and Elongation: ที่อุณหภูมิ 72 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ polymerase ทำให้มีการนำ nucleotides ต่างๆ มาต่อทางด้าน 3' ของ primer โดยต่อให้

complementary กับลำดับเบสบน template ที่ primer มาเกาะไว้แล้วนั่นเอง ทำให้เกิดการสร้าง DNA ต่อเนื่องได้มากเพราะเป็นการสร้างแบบเพิ่มจำนวนทวีคูณ คือถ้าเริ่มจาก DNA template สายคู่สายเดียว เมื่อถึงวงจรที่สอง จะมีจำนวน PCR product เพิ่มขึ้นเป็น 2 คู่ แต่ละคู่เมื่อผ่านขั้นตอนของ PCR ในรอบที่สามจะได้ PCR product ออกมาเป็น 2^3 คู่ การเพิ่มจะเป็นแบบ exponential ได้ product ใน n cycle เป็น 2^n คู่



ภาพที่ 5 ขั้นตอนพื้นฐานของปฏิกิริยา PCR

และเนื่องจากคุณสมบัติของส่วนประกอบข้างต้น รวมทั้งสภาวะของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละการทดสอบ ทำให้ในความเป็นจริงปฏิกิริยาของ PCR ที่เกิดขึ้นเมื่อนำปริมาณ product ที่เพิ่มขึ้นมา plot เทียบกับเวลา จะได้กราฟรูปตัว S (S-shape / sigmoid curve) ในช่วงแรก product จะเพิ่มจำนวนที่ละไม่มากนัก เรียกว่า lag phase (1) แต่เมื่อมีจำนวนมากขึ้นถึงระดับหนึ่ง จำนวน product จึงจะเพิ่มแบบทวีคูณ เรียกว่า exponential phase (2) จนกระทั่งไม่มี polymerase หรือ nucleotides เหลืออยู่ ทำให้ปริมาณคงที่เป็นระยะที่เรียกว่า plateau phase (3) ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาของ PCR ที่เกิดขึ้น เมื่อนำปริมาณ product ที่เพิ่มขึ้นมา plot เทียบกับเวลา

2.4 มาตรฐานการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา

การตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ของวิธี เพื่อทดสอบว่าวิธีนั้นเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การนำไปใช้ในขอบเขตการยอมรับว่าผลการทดสอบมีความถูกต้องน่าเชื่อถือได้ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตามมาตรฐาน ISO 16140 : 2003 - Microbiology of the food chain – Method validation เป็นมาตรฐานที่กล่าวถึงการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา เพื่อช่วยให้ห้องปฏิบัติการทดสอบอาหารผู้ผลิตชุดทดสอบ (test kit) และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบอาหารสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทดสอบได้ มาตรฐานดังกล่าวครอบคลุม 2 ระยะ ได้แก่ ตรวจสอบความถูกต้องของการนำวิธีทดสอบไปใช้งาน และตรวจสอบขอบข่ายของรายการอาหารที่สามารถทดสอบได้ด้วยวิธีดังกล่าว โดยในมาตรฐานจะแบ่งขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องตามประเภทของวิธีการทดสอบ คือ วิธีทดสอบเชิงคุณภาพ และวิธีทดสอบเชิงปริมาณ มาตรฐาน ISO 16140 นี้จะมีการแบ่งเอกสารออกเป็น 6 ฉบับ เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถเลือกนำไปใช้ได้ตามความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการ ดังต่อไปนี้

1) ISO 16140 -1 : 2016 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 1: Vocabulary. เป็นมาตรฐานที่กำหนดคำศัพท์และนิยามศัพท์ทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับวิธีการตรวจสอบ/ทวนสอบความถูกต้องทางจุลชีววิทยา ⁽¹⁹⁾

2) ISO 16140 -2 : 2016 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. เป็นมาตรฐานที่ระบุหลักการทั่วไปและขั้นตอนทางเทคนิคสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเลือก (วิธีที่พัฒนาขึ้น) เปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง ⁽²⁰⁾

3) ISO 16140 -3 : 2021 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory. เป็นมาตรฐานที่ระบุหลักการทั่วไปและขั้นตอนทางเทคนิคสำหรับการทวนสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบที่ห้องปฏิบัติการเลือกใช้ โดยแสดงให้เห็นว่าสามารถดำเนินการตามวิธีอ้างอิงได้อย่างถูกต้อง (สำหรับวิธีอ้างอิงที่มีและไม่มี validated data) ⁽²¹⁾

4) ISO 16140 -4 : 2020 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory. เป็นมาตรฐานที่ระบุหลักการทั่วไปและขั้นตอนทางเทคนิคสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเลือก (วิธีที่พัฒนาขึ้น) ของห้องปฏิบัติการทดสอบเดียว โดยไม่เปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง (ผลการศึกษาใช้ได้เฉพาะห้องปฏิบัติการที่ศึกษาเท่านั้น) ⁽²²⁾

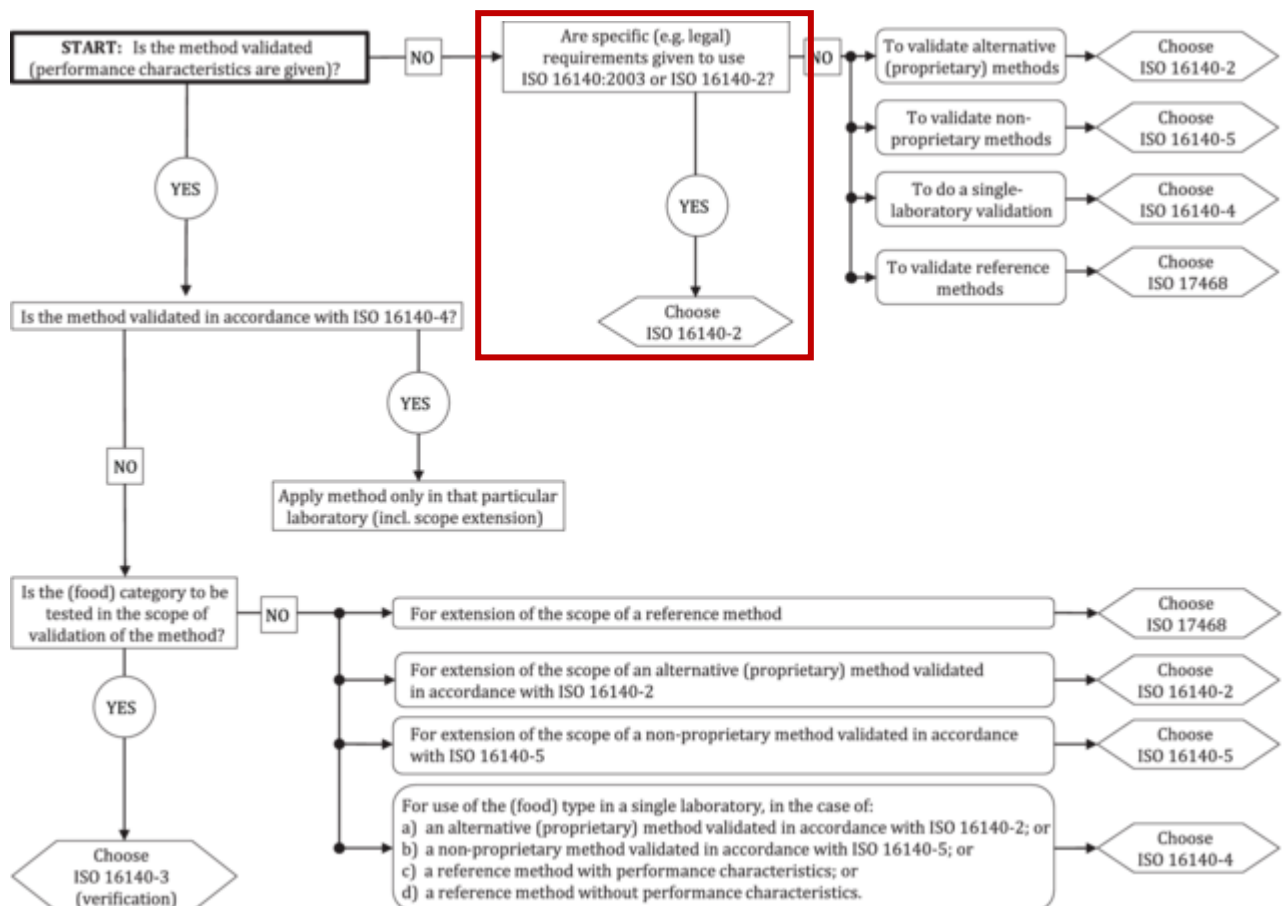
5) ISO 16140 -5 : 2020 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods. เป็นมาตรฐานที่ระบุหลักการทั่วไปและขั้นตอนทางเทคนิคสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเลือก (วิธีที่พัฒนาขึ้น) โดยทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการหลายๆ แห่ง (เป็นวิธีทดสอบที่ไม่ใช่วัตถุประสงค์ทางการค้าต้องการความรวดเร็วในการศึกษาหรือศึกษาเฉพาะอย่าง) ⁽²³⁾

6) ISO 16140 -6 : 2019 - Microbiology of the food chain – Method validation– Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures. เป็นมาตรฐานที่ระบุหลักการทั่วไปและขั้นตอนทางเทคนิคสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเลือกที่เป็นวิธีการยืนยัน (เป็นวิธีทดสอบที่มีวัตถุประสงค์ทางการค้า) ⁽²⁴⁾

การเลือกขั้นตอนที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี เริ่มต้นจากตรวจสอบว่าวิธีการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการเลือกใช้ เป็นวิธีที่เคยได้รับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้วหรือไม่ ถ้าเป็นวิธีที่เคยมีการ

ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว และพิจารณาว่าการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีนั้นได้ดำเนินการตาม ISO 16140-4 หรือไม่ (เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเลือก (วิธีที่พัฒนาขึ้น) ของห้องปฏิบัติการทดสอบเดียว โดยไม่เปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง) ถ้าวิธีทดสอบนั้นดำเนินการตาม ISO 16140-4 ผลการศึกษาใช้ได้เฉพาะห้องปฏิบัติการที่ศึกษาเท่านั้น ห้องปฏิบัติการอื่นจะนำไปใช้ต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีอีกครั้ง แต่ถ้าการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีนั้น ไม่ได้ดำเนินการตาม ISO 16140-4 ต้องพิจารณาขอบข่ายของกลุ่มอาหารที่ห้องปฏิบัติการต้องการทดสอบ หากอยู่ในขอบข่ายสามารถทำการทวนสอบความถูกต้องของวิธีตาม ISO 16140-3 ได้ แต่กรณีที่อยู่นอกขอบข่ายต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเพิ่มเติม (ดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตาม ISO 17468, ISO 16140-2, ISO 16140-4, ISO 16140-5 ตามความเหมาะสม) และในกรณีที่วิธีทดสอบยังไม่เคยมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีมาก่อนให้ดำเนินการตาม ISO 17468, ISO 16140-2, ISO 16140-4, ISO 16140-5 ตามความเหมาะสม ดังภาพที่ 7

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยต้องการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้น (Alternative method) คือ วิธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธี Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Reference standard) คือ วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method) ตาม ISO 11731 : 2017 Water quality –Enumeration of *Legionella* ดังนั้นในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ให้ดำเนินการตาม ISO 16140 -2 : 2016 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. ⁽²⁰⁾



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการเลือกวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

➤ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method validation) ตาม ISO 16140 -2 : 2016 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์และทดสอบที่มีการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 : 2017 “ข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ” ต้องเลือกวิธีวิเคราะห์ที่เป็นไปตามความต้องการของลูกค้าและเหมาะสมสำหรับตัวอย่างทดสอบ ในกรณีที่ลูกค้าไม่ได้ระบุวิธีทดสอบ ห้องปฏิบัติการต้องเลือกใช้วิธีที่เป็นปัจจุบัน ในระดับวิธีมาตรฐานระหว่างประเทศ ระดับภูมิภาค หรือระดับประเทศ หรือเป็นวิธีในตำราหรือวารสารทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องซึ่งรับรองโดยหน่วยงานด้านวิชาการที่เชื่อถือได้ ถ้าห้องปฏิบัติการต้องการใช้วิธีที่ไม่เป็นมาตรฐาน (non-standard method) วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเอง วิธีที่มีการขยายหรือดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (modified method) รวมทั้งการใช้วิธีมาตรฐานนอกขอบข่ายที่กำหนดไว้ หรือวิธีที่พัฒนาเป็นชุดทดสอบอย่างง่ายและ/หรือให้ผลรวดเร็ว ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบนั้นๆ ที่เรียกว่า วิธีทางเลือก (alternative method) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานหรือวิธีอ้างอิง (reference method) ตามขั้นตอนในวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ เพื่อทดสอบยืนยันว่าวิธีทางเลือกนั้นเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ ในขอบเขตการยอมรับว่าผลทดสอบมีความถูกต้องเชื่อถือได้⁽²⁵⁾

ในปัจจุบันเอกสารอ้างอิงสำหรับดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาที่นิยมใช้อ้างอิง คือ ISO 16140 ฉบับล่าสุดคือ ISO 16140 - 2 : 2016 ที่ได้ออกมาทดแทนฉบับเดิม ISO 16140 : 2003 เอกสารนี้มีชื่อว่า “Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method” ซึ่งเป็นฉบับหนึ่งในกลุ่มวิธีมาตรฐาน ISO 16140 ภายใต้ชื่อเรื่อง “Microbiology of the food chain - Method validation” มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นแนวปฏิบัติในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว (rapid methods) และ/หรือวิธีทดสอบอย่างง่าย (easier methods) ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อการค้า (proprietary methods) หรือวิธีทดสอบที่จะนำมาใช้ทดแทนวิธีอ้างอิง⁽²⁰⁾

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบตาม ISO 16140 – 2 : 2016 ที่ดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการหลัก (organizing laboratory) ประกอบด้วย 3 ส่วน

1) การศึกษาความไว (sensitivity study) เป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือกว่ามีค่าความไว (sensitivity) ที่แตกต่างกันหรือไม่ สามารถศึกษาในตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (naturally contaminated samples) หรือตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples) ก็ได้

2) การศึกษาค่า relative level of detection; RLOD (RLOD study) เป็นการเปรียบเทียบค่าปริมาณต่ำสุดของจุลินทรีย์ที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีทางเลือกและด้วยวิธีอ้างอิง โดยต้องทำการศึกษาในตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples)

3) การศึกษาความจำเพาะ (specificity) หรือศึกษา Inclusivity/exclusivity ของวิธีทางเลือก โดย inclusivity study เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงความสามารถของวิธีทางเลือกในการตรวจพบเชื้อเป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ส่วน exclusivity study เป็นการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์จำนวนหลายๆ สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีทางเลือกไม่ควรตรวจพบเชื้อเหล่านี้ (เชื้อที่จะคัดเลือกมาทดสอบ

ควรเป็นเชื้อที่มีโอกาสเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อเป้าหมาย หรือมีโอกาสให้ผลทดสอบบวกเช่นเดียวกับเชื้อเป้าหมาย)

2.5 การประเมินความสอดคล้องของข้อมูลด้วยสถิติ kappa analysis ⁽²⁶⁾

Kappa coefficient หรือชื่อทางการคือ Cohen's kappa coefficient นั้นเป็นค่าสถิติที่ใช้ทดสอบความสอดคล้อง (Consistency) กันของข้อมูล 2 กลุ่ม ในบางกรณีอาจใช้สำหรับเปรียบเทียบการประเมินค่าของข้อมูลชุดเดียวกันจากผู้ประเมิน 2 คนหรือวิธีทดสอบ 2 วิธี โดย Kappa coefficient นั้นไม่จำเป็นต้องอาศัยสมมติฐานที่ว่าข้อมูลที่สนใจนั้นมีการแจกแจงแบบปกติ (Normal distribution) หรือที่เรียกว่า Non-parametric statistic ผลลัพธ์ที่ได้จาก Kappa coefficient นั้นจะอธิบายถึงความสอดคล้องระหว่างกันของ 2 ชุดข้อมูลว่าให้ผลเชิงบวกเหมือนกันหรือให้ผลเชิงลบเหมือนกัน โดยการแปลความหมายของค่าสถิติ Kappa ที่คำนวณได้พิจารณาตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแปลผลความสอดคล้อง (Strange of agreement) ของค่าสถิติ kappa

ค่าสถิติ kappa	ขนาดความสอดคล้อง (Strange of agreement)
<0.00	แย่มาก (Poor)
0.00 - 0.20	น้อย (Slight)
0.21 - 0.40	พอใช้ (Fair)
0.41 - 0.60	ปานกลาง (Moderate)
0.61 - 0.80	ดี (Sub Stantial)
0.81 - 1.00	ดีมาก/ค่อนข้างสมบูรณ์ (Almost Perfected)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผู้ศึกษาได้ดำเนินการทบทวนวรรณกรรม งานวิจัย บทความ และเอกสารวิชาการ มีรายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะทางระบาดวิทยาของผู้ป่วยโรคลีเจียนเนร์ แหล่งที่อาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อ และเชื้อก่อโรค ดังนี้

นิรภา คงกันคง และคณะ (2543) ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในระบบน้ำทางทันตกรรมในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ช่วงเดือนเมษายน – พฤษภาคม 2543 โดยเก็บตัวอย่างน้ำ 156 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6.00) ⁽²⁷⁾

ทัศนีย์ สุโกศล (2551) ได้ตรวจและควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคลีเจียนเนร์ในระบบปรับอากาศ ปีงบประมาณ 2546 – 2547 โดยได้เก็บตัวอย่างน้ำจากหอผึ่งเย็น จำนวน 21 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำจากถาดรองน้ำในเครื่องปรับอากาศที่มีอายุการใช้งาน 1 ปีขึ้นไป จำนวน 30 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย รวมทั้ง *Staphylococcus* spp. แต่พบแบคทีเรียรวมจากตัวอย่างน้ำหอผึ่งเย็นเฉลี่ย 7.03×10^3 CFU/ml และตัวอย่างน้ำจากจากถาดรองน้ำในเครื่องปรับอากาศเฉลี่ย 4.12×10^5 CFU/ml รวมทั้งพบ biofilm ในตัวอย่างหอผึ่งเย็นที่มีการดูแลรักษาด้วยการเติมสารชีวฆาต และสารเคมีป้องกันการกัดกร่อนและเกิดตะกรันด้วย ⁽²⁸⁾

อดิเทพ จินา และคณะ (2551) ทำการสอบสวนสิ่งแวดล้อมในสถานที่เกิดโรคลีเจียนเนร์ในนักท่องเที่ยวชาวเดนมาร์ก ตำบลศรีคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา มิถุนายน 2551 โดยเก็บตัวอย่างน้ำส่งตรวจเพื่อหาเชื้อ *Legionella* spp. ผลการสอบสวนพบผู้ป่วยยืนยันโรคลีเจียนเนร์ เป็นชาวเดนมาร์ก 2 ราย รายแรกเป็นผู้ป่วยเพศหญิงอายุ 52 ปี ส่วนรายที่ 2 เป็นผู้ป่วยเพศชายไม่ทราบอายุ ตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR and culture ให้ผลยืนยันเชื้อ *L. pneumophila* serogroup 1 และผลการเพาะเชื้อ *Legionella* spp. จากน้ำในแหล่งต่าง ๆ จำนวน 14 ตัวอย่าง swab จากอุปกรณ์ในห้องน้ำ จำนวน 15 ตัวอย่าง รวมเป็น 29

ตัวอย่าง พบเชื้อ *Legionella* spp. จำนวน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 58.62) โดยตัวอย่างที่พบเชื้อเป็นตัวอย่างน้ำ 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 64.29) และตัวอย่าง swab จากอุปกรณ์ในห้องน้ำ 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) และผลการตรวจแยกเชื้อในห้องพักทั้งสองราย จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบสายพันธุ์ *L. pneumophila* serogroup 1 (ร้อยละ 64.7) *Legionella* spp. (ร้อยละ 23.5) ⁽¹³⁾

โรม บัวทอง และคณะ (2556) ทำการสอบสวนการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป ภายหลังจากการเดินทางมาท่องเที่ยวในจังหวัดภูเก็ต ธันวาคม 2549 – มกราคม 2550 เนื่องจากได้รับแจ้งจากสถานทูตอังกฤษประจำประเทศไทยว่า มีนักท่องเที่ยว 4 ราย ป่วยด้วยโรคลีเจียนแนร์ภายหลังจากมาเที่ยวในจังหวัดภูเก็ต ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2549 ทำการศึกษาโดยค้นหาผู้ป่วยเพิ่มเติมโดยใช้นิยามตาม European Working Group for *Legionella* Infection (EWGLI) Network และเก็บตัวอย่างน้ำส่งตรวจเพื่อเพาะเชื้อ *Legionella* spp. ได้แก่ น้ำในหอผึ่งเย็น น้ำในห้องพัก ผลการสอบสวนพบผู้ป่วยยืนยัน 5 ราย และผู้ป่วยเข้าข่าย 1 ราย ทั้งหมดเป็นชาวแสกนดิเนเวีย เชื้อที่เป็นสาเหตุ คือ *L. pneumophila* serogroup 1 และผลการเพาะเชื้อจากแหล่งน้ำต่างๆ ในโรงแรม พบเชื้อ *Legionella* spp. ซึ่งได้แก่ น้ำจากฝักบัว น้ำจากอ่างล้างหน้า โดยไม่พบในหอผึ่งเย็น ผลแยกเชื้อพบ *L. bozemanii* จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *L. pneumophila* serogroup 1 จำนวน 2 ตัวอย่าง ⁽¹²⁾

อริชา มหาโยธา และคณะ (2557) ได้ศึกษาเรื่องการเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำที่ใช้ในโรงแรมหรือรีสอร์ทในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปี 2556 โดยได้เก็บตัวอย่างน้ำจากหอผึ่งเย็น น้ำจากก๊อกน้ำหรือฝักบัวในห้องพัก บ่อหรือถังพักน้ำ ระบบทำน้ำอุ่นหรือน้ำเย็น น้ำจากห้องสปา ระบบกรองน้ำ และสระว่ายน้ำ รวมทั้งสิ้นจำนวน 200 ตัวอย่าง จากโรงแรมและรีสอร์ท 75 แห่ง โดยใช้วิธีการเพาะเชื้อ และตรวจยืนยันชนิดของเชื้อ ด้วยวิธี PCR ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. จำนวน 48 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.7) จากโรงแรมและรีสอร์ท จำนวน 24 แห่ง (ร้อยละ 32) เป็นตัวอย่างก๊อกน้ำ/ฝักบัวในห้องพัก 36 ตัวอย่าง หอผึ่งเย็น 10 ตัวอย่าง เครื่องผลิตน้ำอุ่น - น้ำร้อน 1 ตัวอย่าง และถังพักน้ำ/แทงค์น้ำ 1 ตัวอย่าง ⁽²⁹⁾

มาลีตา อานนท์ และคณะ (2558) ทำการสอบสวนการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป หมู่ที่ 5 ตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ระหว่างวันที่ 2 - 5 มิถุนายน 2558 หลังได้รับแจ้งจากเครือข่ายลีเจียนแนร์ของสหภาพยุโรป (European Legionnaires' Disease Surveillance Network : ELDSNet) ผ่านสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ว่ามีนักท่องเที่ยว 2 ราย ป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์ หลังจากมาพักที่โรงแรมแห่งหนึ่งในตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ทีมได้ดำเนินการสอบสวนโรค โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากห้องพักผู้ป่วย บ่อพักน้ำ น้ำจากห้องสปา และ swab สุขภัณฑ์ เช่น ก๊อกอ่างล้างหน้า หัวฝักบัว สระน้ำ และหัวฝักบัวในห้องพัก ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ผลการสอบสวนพบผู้ป่วยทั้งหมด 6 ราย เป็นผู้ป่วยยืนยัน 2 ราย ผู้ป่วยสงสัย 4 ราย ทั้งหมดเป็นชาวยุโรป อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง เท่ากับ 2 : 1 ผลการเก็บตัวอย่างน้ำส่งตรวจ จำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบเชื้อ 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.50) จากน้ำเย็นที่อ่างล้างหน้า 3 ตัวอย่าง น้ำร้อนจากฝักบัว 3 ตัวอย่าง และน้ำอุ่นที่อ่างอาบน้ำ 3 ตัวอย่าง จำแนกเป็นเชื้อ *Legionella pneumophila* serogroup 1 จำนวน 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 33.33) และ *Legionella* spp. 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.17) swab สุขภัณฑ์จำนวน 12 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.00) จากก๊อกอ่างล้างหน้า 1 ตัวอย่าง หัวฝักบัวห้องผู้ป่วย 1 ตัวอย่าง และหัวฝักบัวสระว่ายน้ำ 1 ตัวอย่าง จำแนกเป็นเชื้อ *Legionella pneumophila* serogroup 1 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.67) *Legionella pneumophila* serogroup 2-14 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.00) และ *Legionella* spp. 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8.33) ⁽¹⁴⁾

อริชา มหาโยธา และคณะ (2559) ได้ศึกษาเรื่องเครือข่ายการแผ่รังการแพร่เชื้อ *Legionella* spp. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปี 2557 – 2558 โดยได้ดำเนินการตรวจเยี่ยมโรงแรมที่เข้าร่วมเครือข่าย จำนวน 23 แห่ง และได้สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ จำนวน 129 ตัวอย่าง ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. จำนวน 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.7) ⁽³⁰⁾

รณิดา เตชะสุวรรณ (2566) ทำการสอบสวนโรคในสิ่งแวดล้อม ภายหลังได้รับรายงานนักท่องเที่ยวชาวสวีเดนป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์หลังเดินทางมาท่องเที่ยวภายในประเทศไทย โดยทำการศึกษาและตรวจสอบสภาพสิ่งแวดล้อมที่มีโอกาสก่อให้เกิดความเสี่ยงในการติดเชื้อ ได้แก่ ระบบน้ำหล่อเย็น หอผึ่งเย็น โดยพบว่าคุณภาพน้ำในโรงแรมหลายแห่งยังไม่ได้มาตรฐาน เช่น ปริมาณคลอรีนอิสระคงเหลือไม่เพียงพอ โรงแรมไม่ได้มีการทำความสะอาดถังเก็บน้ำต่างๆ เป็นเวลา 3 ปี ตั้งแต่มีการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (โควิด 19) รวมถึงมีการตรวจพบเชื้อ *Legionella* ในน้ำจากแหล่งน้ำของโรงแรม ปริมาณ 5,000 CFU/L (มาตรฐานยุโรปควรน้อยกว่า 1,000 CFU/L) จึงมีความเป็นไปได้ที่นักท่องเที่ยวป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์จากสิ่งแวดล้อมในโรงแรมนี้ ⁽¹⁵⁾

ซึ่งจากงานวิจัยต่างๆ ที่ได้มีการสอบสวนหาสาเหตุของการแพร่กระจายของโรคลีเจียนแนร์ พบว่ามีสาเหตุหลักมาจากคุณภาพแหล่งน้ำภายในโรงแรมหรืออาคารต่างๆ ไม่เหมาะสม ทั้งปริมาณคลอรีนอิสระคงเหลือในน้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิของน้ำที่ไม่เหมาะสมทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ รวมทั้งสถานประกอบการต่างๆ ยังไม่มีความรู้และไม่ได้ตระหนักถึงความสำคัญของโรคนี้ จึงไม่ได้เข้มงวดในการบำรุงรักษา/ทำความสะอาดระบบประปา ระบบน้ำร้อนรวม ระบบปรับอากาศและระบายความร้อน หอผึ่งเย็น ถังพักน้ำและถังเก็บน้ำ หัวก๊อกน้ำและฝักบัวอาบน้ำ ระบบท่อน้ำ รวมทั้งสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่มีโอกาสก่อให้เกิดความเสี่ยงในการติดเชื้อลิจิโอนেলা การตรวจทางห้องปฏิบัติการในการตรวจหาเชื้อลิจิโอนেলাจึงถือว่ามีความสำคัญอย่างมากสำหรับระบบการแผ่รังการแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่ได้ศึกษาวิธีในการตรวจหาเชื้อลิจิโอนেলা ดังนี้

AKIKO EDAGAWA (2019) ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อม โดยเปรียบเทียบ 3 วิธี คือ 1) วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (conventional culture method) 2) วิธี qPCR (real-time quantitative PCR) และ 3) วิธี real-time qPCR ร่วมกับ amoebic co-culture method โดยเก็บตัวอย่างน้ำจำนวน 110 ตัวอย่าง พบว่า วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ตรวจพบเชื้อเพียง 3 ตัวอย่าง (2.7%), วิธี qPCR ตรวจพบเชื้อ 74.5% ส่วนวิธี real-time qPCR ร่วมกับ amoebic co-culture ตรวจพบเชื้อถึง 75.5% และเมื่อนำมาตรวจหาสปีชีส์ พบว่าวิธี qPCR ร่วมกับ amoebic co-culture method ตรวจพบ *Legionella* spp. *L. pneumophila* และ *L. anisa* ส่วนวิธีที่ไม่ได้ใช้ร่วมกับ amoebic co-culture ตรวจพบ *L. lytica* และ *L. rowbothamii* ดังนั้นการนำวิธี qPCR มาใช้ร่วมกับ amoebic co-culture method จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการตรวจหาเชื้อลิจิโอนেলা ⁽³¹⁾

Deborah A. Wilson (2003) ศึกษาการตรวจหา mip gene ของเชื้อ *Legionella pneumophila* ด้วยวิธี real-time PCR โดยทดสอบกับเชื้อ *L. pneumophila* 27 isolate, *Legionella* สปีชีส์อื่นๆ 20 isolate, แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่ใช่ *Legionella* จำนวน 103 isolate, ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เพาะเชื้อขึ้นจำนวน 8 ตัวอย่างและตัวอย่างที่เพาะเชื้อไม่ขึ้น จำนวน 40 ตัวอย่าง ผลพบว่าวิธี real-time PCR ให้ผล sensitive 100% และspecific 100% สำหรับเชื้อ *L. pneumophila* ⁽³²⁾

D. Eble (2021) การตรวจหาปริมาณ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ โดยทั่วไปมักใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ตามมาตรฐาน ISO 11731 ซึ่งวิธีนี้ต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ถึง 15 วัน และในขั้นตอนการยืนยันสปีชีส์ของเชื้อก็มีความยุ่งยาก อาจเกิดความผิดพลาดได้ งานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาในขั้นตอนการ

ยืนยันจากโคโลนีของเชื้อที่สงสัย บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงแล้ว ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในขั้นตอนการยืนยันเชื้อลง 2-5 วันได้ ทำให้เกิดความรวดเร็วในการทดสอบและมีความจำเพาะสูง⁽³³⁾

อมรรัตน์ อินทรสุต (2559) ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *Legionella* ของน้ำจากหอหล่อเย็นจำนวน 40 ตัวอย่าง ด้วยวิธี duplex-PCR พบมีการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่างน้ำทั้งหมด 27 ตัวอย่าง โดยแยกเป็นเชื้อ *L. pneumophila* 8 ตัวอย่าง และ *Legionella* spp. 19 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบการปนเปื้อนของเชื้อ *L. pneumophila* จำนวน 4 ตัวอย่าง (วิธี duplex-PCR ให้ผลบวกเป็น *Legionella* spp. จำนวน 3 ตัวอย่าง และให้ผลลบ 1 ตัวอย่าง) เมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้พบว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับที่ amplified ได้จาก mip gene ในเชื้อ *Salmonella Typhi* และ *Salmonella Enteritidis* อย่างไรก็ตามผลจาก direct sequencing พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรงตำแหน่งของไพรเมอร์เหมือนกับ mip primers (17/20 นิวคลีโอไทด์) ดังนั้นวิธี duplex-PCR จึงมีความไวและความจำเพาะสูง สะดวกและรวดเร็วในการตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* และ *Legionella* spp. ทั้งนี้อาจต้องใช้การตรวจหา mip ร่วมกับยีน 16S rDNA เพื่อลดการเกิดผลบวกปลอมจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ⁽³⁴⁾

Daniela Toplitsch (2021) การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Legionella* spp. จากตัวอย่างน้ำมีความยุ่งยากเนื่องจากจะต้องใช้ประสบการณ์ทางห้องปฏิบัติการ ต้องใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานในการทดสอบ รวมทั้งในตัวอย่างน้ำมักมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ จำนวนมากทำให้ยังรบกวนต่อผลการทดสอบได้ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อตาม ISO 11731 กับวิธี qPCR ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่าวิธี qPCR ให้ผลบวกกับเชื้ออื่นๆ ได้ดีมาก รวมทั้งยังมีความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ที่มีปริมาณต่ำๆ ได้ จึงถือว่าวิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการทำนายหรือประเมินสถานการณ์การระบาดของโรคเลเจียนแนร์ในสถานการณ์ฉุกเฉินได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽³⁵⁾

Mojtaba Moosavian (2019) ศึกษาความชุกของเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำของเมือง Ahvaz ทางตะวันตกเฉียงใต้ของอิหร่าน โดยใช้ mip gene ในการระบุชนิดของเชื้อลิจิโอเนลลา โดยเก็บตัวอย่างน้ำ จำนวน 144 ตัวอย่าง เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE และ MWY agar plate นำโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบน agar plate ไปวิเคราะห์ลำดับเบส โดยพบเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ 13.9% (20/144) เมื่อวิเคราะห์ด้วย mip gene sequences มี 13 isolates เป็น *L. pneumophila* (54.1%), 5 isolates เป็น *L. worleynsis* (20.8%) ที่เหลือเป็น *L. dumoffi* และ *L. fairfieldensis* (4.1%) ซึ่งการพบเชื้อ *Legionella* ในแหล่งน้ำอาจเป็นอันตรายต่อระบบสุขภาพของประชาชนในพื้นที่ได้ จำเป็นต้องมีการติดตามอย่างสม่ำเสมอ เพื่อลดความเสี่ยงในการแพร่กระจายของเชื้อได้⁽³⁶⁾

วิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ถือเป็นวิธีมาตรฐาน (Reference standard) ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่เนื่องจากเชื้อ *Legionella* เป็นเชื้อที่เจริญยากต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดพิเศษ Buffered charcoal-yeast extract (BCYE) agar ที่มีกรดอะมิโน L-cysteine ผสมอยู่และต้องอาศัยระยะเวลาในการเจริญเติบโตมากกว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ โดยต้องเพาะเลี้ยงนานประมาณ 3-5 วันในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อ *Legionella* ที่อยู่ในสภาวะที่ยังมีชีวิตไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (non culturable but viable *Legionella*) ซึ่งในสภาวะนี้สามารถนำเชื้อกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารอาหารชนิดพิเศษหรือนำกลับมาเพิ่มจำนวนในเชื้ออะมีบา แล้วทำให้เชื้อมีความสามารถในการก่อโรคได้อีกครั้ง เนื่องจากวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียเริ่มมีบทบาทมากขึ้น จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจเพื่อให้ง่าย รวดเร็ว และเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง เช่น การนำเทคนิค PCR มาใช้ เป็นต้น⁽³⁷⁾

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการศึกษา

รูปแบบการศึกษาเป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental Research) เพื่อพัฒนาศักยภาพการทดสอบทางห้องปฏิบัติการของกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย ในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยห้องปฏิบัติการได้พัฒนาวิธีสำหรับตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR) ขึ้น และดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธีมาตรฐาน (วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ) และวิธีที่พัฒนาขึ้น (วิธี Real - time PCR) ซึ่งต้องให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกัน โดยขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบปฏิบัติตามมาตรฐาน ISO 16140-2 : 2016 “Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method ประกอบด้วยการศึกษาความไว (Sensitivity), ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Relative level of detection; RLOD) และความจำเพาะ (specificity) โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในครั้งนี้เป็นตัวอย่างน้ำที่ส่งตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ (naturally contaminated samples) และตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples)

3.2 เครื่องมือ/วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์, สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

3.2.1 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Real-time PCR) ยี่ห้อ Analytik Jena รุ่น qTOWER³
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance) รุ่น ME-T3002T ยี่ห้อ Mettler Toledo
- เครื่องวัดความเป็นกรด – เบส (pH meter) รุ่น S20 ยี่ห้อ Mettler Toledo
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SX-700 ยี่ห้อ Tomy อุณหภูมิ 121 ± 3 องศาเซลเซียส
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) รุ่น NU-543 ยี่ห้อ NuAire
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) รุ่น KB720 ยี่ห้อ Binder อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Eppendorf, Germany)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น BAD-12 ยี่ห้อ RAYPA อุณหภูมิ 50 ± 1 องศาเซลเซียส
- ชุดกรองตัวอย่างน้ำ (Membrane filtration equipment)
- เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex shaker) ยี่ห้อ Heidolph
- เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie2 ยี่ห้อ Genie
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 1-10 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Eppendorf
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 100-1,000 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Eppendorf
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 10-100 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Eppendorf
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 0.5-10 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Eppendorf

3.2.2 วัสดุ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

- แผ่นกรอง (Membrane filter) ชนิด polycarbonate ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร (PALL, USA)
- ปิเปตทิป (pipette tip) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- ปิเปตทิปแบบมีแผ่นกรอง (pipette filter tip) ขนาด 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
- หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
- ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (test tube rack)
- จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- ขวดแก้วขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- หลอด PCR ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

3.2.3 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

- *Legionella pneumophila* (DMST 12800)
- *Escherichia coli* (DMST 4212)
- *Klebsiella pneumoniae* (DMST 7592)
- *Klebsiella aerogenes* (DMST 8841)
- *Staphylococcus aureus* (DMST 8013)
- *Staphylococcus epidermidis* (DMST 5868)
- *Pseudomonas aeruginosa* (DMST 4739)
- *Salmonella* Typhimurium (DMST 562)

3.2.4 สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture)

- Glycine vancomycin polymyxin B cycloheximide agar (GVPC)
- Buffered charcoal yeast extract agar with L-cysteine (BCYE)
- Buffered charcoal yeast extract agar without L-cysteine (BCYE-cys)
- Tryptic Soy Agar (TSA)
- Tryptic Soy Broth (TSB)
- Plate Count Agar (PCA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ (buffered water)

สำหรับตรวจสอบหาสารพันธุกรรม ด้วยวิธี Real time PCR

- ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำหรับแบคทีเรีย (GenUP™ Bacteria gDNA Kit, Berlin, Germany)
- ชุดน้ำยา PCR สำหรับตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของ *Legionella* spp. (PCR max™)

3.2.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลายบัฟเฟอร์

3.2.5.1 Glycine vancomycin polymyxin B cycloheximide agar (GVPC)

ส่วนประกอบ

BCYE agar base

- | | |
|----------------------|---------------|
| - Activated Charcoal | 2 กรัม |
| - Yeast Extract | 10 กรัม |
| - Agar | 15 กรัม |
| - น้ำกลั่น | 500 มิลลิลิตร |

GVPC Supplement

- | | |
|------------------------|------------------|
| - Glycine | 1.5 กรัม |
| - Vancomycin | 0.0005 มิลลิลิตร |
| - Polymyxin B Sulphate | 40000 IU |
| - Cycloheximide | 0.04 กรัม |
| - น้ำกลั่น sterile | 10 มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar base 13.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- ละลาย GVPC Supplement ด้วยน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในขวด BCYE agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- เขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อและ GVPC Supplement ให้เข้ากัน จากนั้นเทแบ่งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับใช้งาน

3.2.5.2 Buffered charcoal yeast extract agar with L-cysteine (BCYE)

ส่วนประกอบ

BCYE agar base

- | | |
|----------------------|---------------|
| - Activated Charcoal | 2 กรัม |
| - Yeast Extract | 10 กรัม |
| - Agar | 15 กรัม |
| - น้ำกลั่น | 500 มิลลิลิตร |

BCYE Growth Supplement

- | | |
|--|--------------|
| - ACES Buffer (N-2-Acetamido-2-Aminoethanesulfonic acid) | 5 กรัม |
| - Potassium Hydroxide | 1.4 กรัม |
| - Ferric Pyrophosphate | 0.125 กรัม |
| - Potassium Alfa-Ketoglutarate | 0.5 กรัม |
| - L-Cysteine HCl | 0.2 กรัม |
| - Sterile solvent | 10 มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar base 13.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- ละลาย BCYE Growth Supplement ด้วย Sterile solvent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในขวด BCYE agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- เขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อและ BCYE Growth Supplement ให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับใช้งาน

3.2.5.3 Buffered charcoal yeast extract agar without L-cysteine (BCYE-cys)

ส่วนประกอบ

BCYE agar base

- | | |
|----------------------|---------------|
| - Activated Charcoal | 2 กรัม |
| - Yeast Extract | 10 กรัม |
| - Agar | 15 กรัม |
| - น้ำกลั่น | 500 มิลลิลิตร |

BCYE without Cysteine Supplement

- | | |
|--|--------------|
| - ACES Buffer (N-2-Acetamido-2-Aminoethanesulfonic acid) | 5 กรัม |
| - Potassium Hydroxide | 1.4 กรัม |
| - Ferric Pyrophosphate | 0.125 กรัม |
| - Potassium Alfa-Ketoglutarate | 0.5 กรัม |
| - Sterile solvent | 10 มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar base 13.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- ละลาย BCYE without Cysteine Supplement ด้วย Sterile solvent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในขวด BCYE agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- เขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อและ BCYE without Cysteine Supplement ให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับใช้งาน

3.2.5.4 Tryptic Soy Agar (TSA)

ส่วนประกอบ

- | | |
|-------------------------------|---------|
| - Pancreatic Digest of Casein | 15 กรัม |
| - Papaic Digest of Soybean | 5 กรัม |
| - Sodium Chloride | 5 กรัม |
| - Agar | 15 กรัม |

- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ขั้นตอนการเตรียม
- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 40 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
 - ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดหรือหลอดตามปริมาณที่ต้องการใช้งาน
 - จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2.5.5 Tryptic Soy Broth (TSB)

ส่วนประกอบ

- Pancreatic Digest of Casein 17 กรัม
- Papaic Digest of Soybean 3 กรัม
- Dextrose 2.5 กรัม
- Sodium Chloride 5 กรัม
- Dipotassium Phosphate 2.5 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดหรือหลอดตามปริมาณที่ต้องการใช้งาน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2.5.6 Plate Count Agar (PCA)

ส่วนประกอบ

- Pancreatic Digest of Casein 5 กรัม
- Yeast Extract 2.5 กรัม
- Dextrose 1 กรัม
- Agar 15 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 23.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดตามปริมาณที่ต้องการใช้งาน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2.5.7 สารละลายบัฟเฟอร์ (buffered water)

ส่วนประกอบ

1) phosphate buffer stock solution

- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 34 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 ± 0.5 โดยใช้ 1 N NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2) magnesium chloride stock solution

- magnesium chloride (MgCl_2 หรือ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 38 หรือ 81.1 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง magnesium chloride ตามสัดส่วน ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ปิเปต phosphate buffer stock solution ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และ magnesium chloride stock solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2 ± 0.1
- แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาณที่ต้องการใช้งาน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.3 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ

การทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

3.3.1 การทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น (Sample concentration)

เป็นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทดสอบ เพื่อให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นมากขึ้น เหมาะสมสำหรับนำไปทดสอบในขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR ต่อไป โดยในการศึกษาครั้งนี้ทำการ concentrate ตัวอย่างด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นกรอง (Membrane filtration) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- 1) นำตัวอย่างปริมาตร 250 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรอง ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร
- 2) นำแผ่นกรองที่ผ่านการกรองตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และ resuspend ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- 3) นำไป Vortex ประมาณ 15 นาที เพื่อชะให้เชื้อหลุดออกจากแผ่นกรอง ได้เป็นตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเพียงพอสำหรับนำไปทดสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น ด้วยวิธีการกรอง (Membrane filtration)

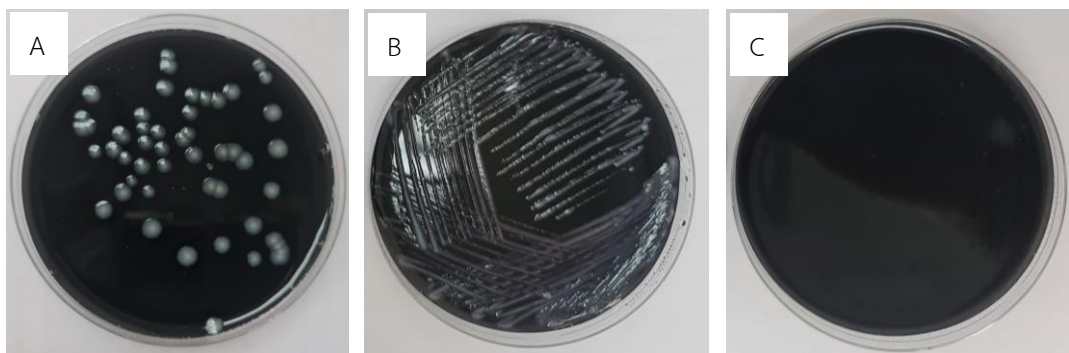
3.3.2 การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

- 1) ทำการ Inoculate ตัวอย่างที่ผ่านการ Concentrate ด้วยวิธี Membrane filtration ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GVPC plate
- 2) spread plate ให้ตัวอย่างเกลี่ยทั่วผิวน้ำอาหาร



ภาพที่ 9 ขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค Spread plate

- 3) นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-10 วัน
- 4) ถ้าพบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม มันวาว สีขาว-เทาเกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ GVPC และเมื่อนำไปย้อมสีแกรมพบลักษณะ gram negative rod ให้นำโคโลนีดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE ที่มีส่วนประกอบของ L-cysteine (BCYE) และ BCYE ที่ไม่มีส่วนประกอบของ L-cysteine (BCYE-cys) เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน
- 5) กรณีเชื้อสามารถเจริญได้เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE ที่มีส่วนประกอบของ L-cysteine เท่านั้น ให้บันทึกผลเป็น Detected (พบเชื้อ *Legionella* spp.) แต่หากเชื้อเจริญหรือไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ให้บันทึกผลเป็น Not Detected (ไม่พบเชื้อ *Legionella* spp.)



ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Legionella* spp. ที่ขึ้นบน plate GVPC agar (A) จากนั้นไปเพาะเลี้ยงต่อ (re-streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE (B) และ BCYE-cys (C)

3.3.3 การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real-time PCR

- 1) นำตัวอย่างที่ผ่านการ Concentrate ด้วยวิธี Membrane filtration ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาสกัด DNA โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำหรับแบคทีเรีย (GenUP™ Bacteria gDNA Kit, Berlin, Germany) ทำตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่ระบุในชุดสกัด



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม GenUP™ Bacteria gDNA Kit

- 2) DNA ที่สกัดได้ นำไปตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อ *Legionella* ด้วยวิธี Real-time PCR หรือ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสสำหรับรอการทดสอบต่อ
- 3) เตรียมส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR (master mix) ลงในหลอด PCR ซึ่งปริมาตรที่ใช้ แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR (Master Mix) สำหรับ 1 ตัวอย่างทดสอบ (Reaction)

ส่วนประกอบ/ 1 reaction	
2X qPCR Master Mix	10 ไมโครลิตร
<i>Legionella</i> spp. Primer/probe mix	1 ไมโครลิตร
Internal Extraction Control Primer/probe mix	1 ไมโครลิตร
nuclease-free water	3 ไมโครลิตร
DNA sample (Template)	5 ไมโครลิตร
Final volume	20 ไมโครลิตร

- 4) นำหลอด PCR ที่บรรจุส่วนประกอบหลักของปฏิกิริยา PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Real-time PCR) ยี่ห้อ Analytik Jena รุ่น qTOWER3 โดยใช้ DNA ของเชื้อ *Legionella pneumophila* เป็นตัวควบคุมผลบวก และ nuclease-free water เป็นตัวควบคุมผลลบ โดยสถานะของปฏิกิริยา PCR ตั้งค่าดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สภาวะของปฏิกิริยาสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* spp.

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Enzyme activation	95 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	10 วินาที	50 รอบ
Annealing and extension *	60 องศาเซลเซียส	60 วินาที	

* เป็นขั้นตอนที่มีการเก็บข้อมูลการเรืองแสงของสารเรืองแสงเป้าหมาย คือ FAM

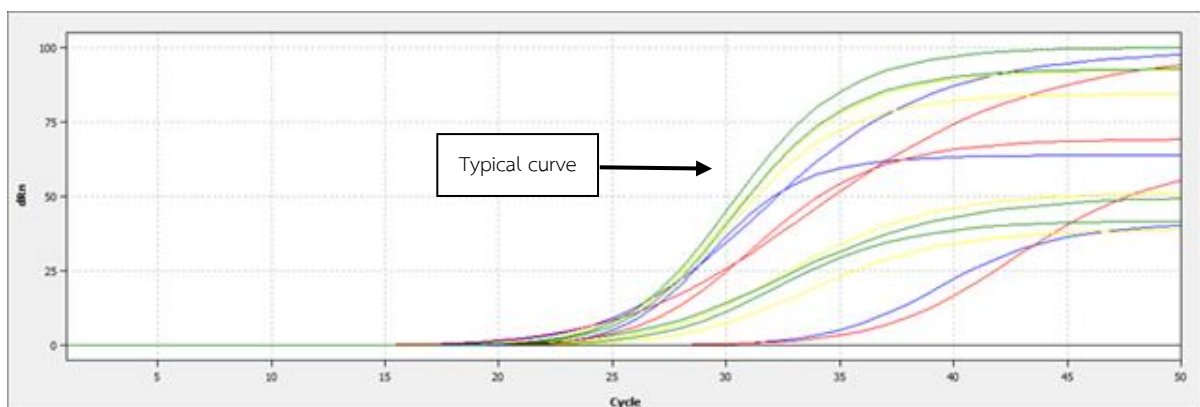


ภาพที่ 12 ขั้นตอนการเตรียม master mix และการตั้งค่าสภาวะของปฏิกิริยาสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* spp.

5) การแปลผลการทดสอบ

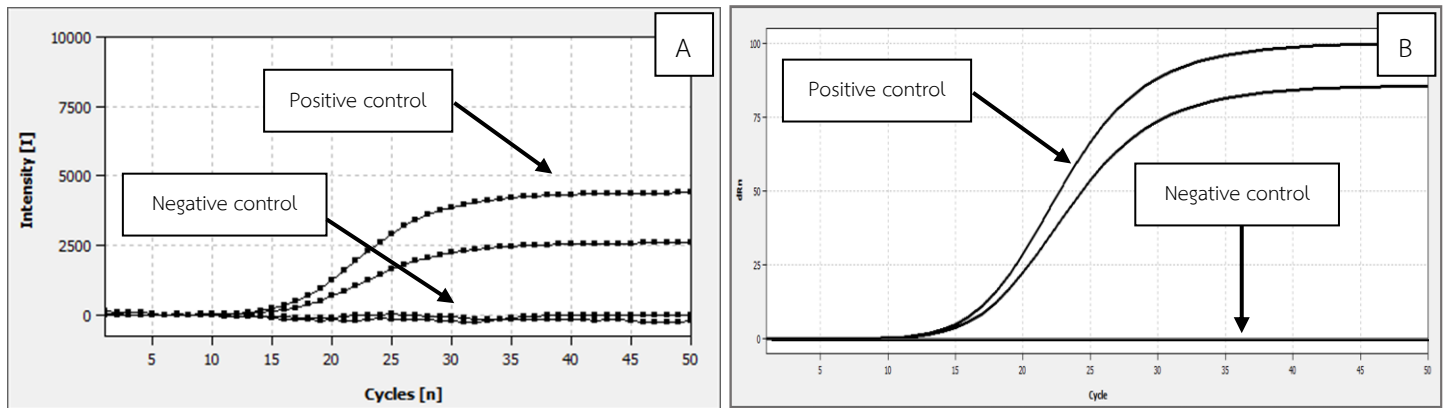
5.1) ก่อนการแปลผลการทดสอบตัวอย่างต้องตรวจสอบค่าการควบคุมคุณภาพการทดสอบทุกครั้ง ดังนี้

- ตรวจสอบลักษณะ curve ของ real time plot ว่าเป็น curve ที่มีลักษณะปกติ (S curve: Typical curve)



ภาพที่ 13 ลักษณะของกราฟที่มีลักษณะปกติ (S curve: Typical curve)

- Positive control ต้องให้ค่า Ct value อยู่ในช่วงที่กำหนด (อยู่ในช่วง 16 ถึง 23)
- Negative control ใช้ Nuclease free water เป็น Negative control ทุกครั้งในการทำปฏิกิริยา PCR ต้องซึ่งต้องไม่มีค่า Ct values



ภาพที่ 14 ลักษณะของกราฟ Positive control และ Negative control

(A) คือ raw data (B) คือ calculate Ct

- Internal control ใช้สำหรับตรวจสอบคุณภาพของขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่าง และการเกิดปฏิกิริยา amplification ซึ่งในการทดสอบต้องแสดงค่า Ct ของ Internal control เพื่อยืนยันว่าขั้นตอนการสกัดและการเกิดปฏิกิริยา amplification เป็นไปอย่างสมบูรณ์
- Duplication เป็นตัวอย่างที่มาจากการทำงานซ้ำ โดยทำซ้ำอย่างน้อย 10% ของตัวอย่างแต่ละชุดที่ทดสอบ ซึ่งต้องให้ผลการทดสอบเหมือนกับตัวอย่างเดียวกัน

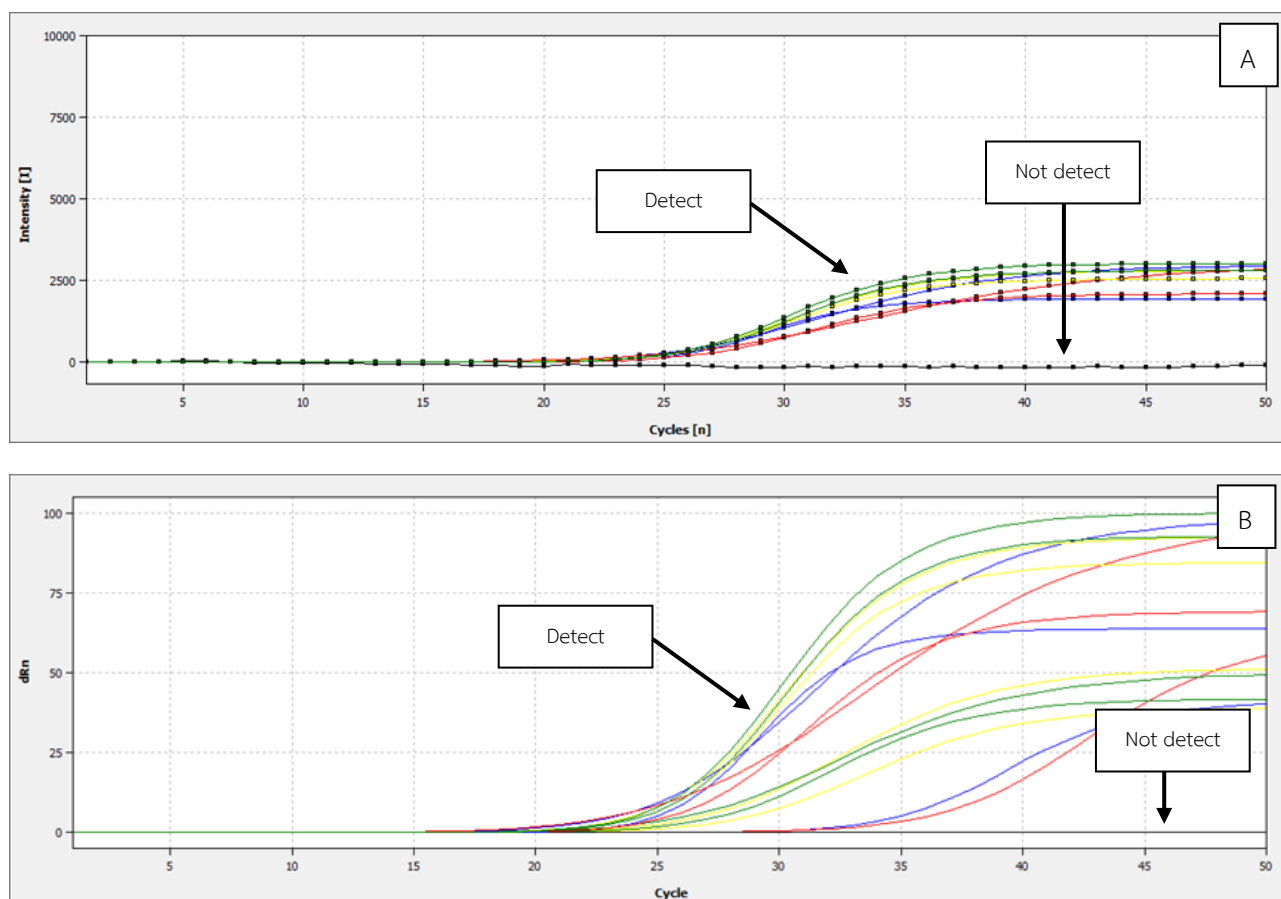
กรณีค่าการควบคุมคุณภาพไม่ผ่านต้องมีการหาสาเหตุและแก้ไขจนค่าการควบคุมคุณภาพผ่านจึงสามารถแปลผลการทดสอบได้

5.2) การแปลผลการทดสอบตัวอย่าง

การอ่านผลจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจนสามารถตรวจวัดได้ (Cycles) และปริมาณแสง Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ ถ้าในตัวอย่างมีสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* spp. อยู่ จะแสดงลักษณะกราฟเป็น S-curve ถ้าไม่มีจะแสดงลักษณะกราฟเป็นเส้นตรง โดยจากกราฟสามารถรายงานได้เป็นค่า Ct ซึ่งค่า Ct คือ จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย จนถึงระดับที่เครื่อง PCR สามารถตรวจวัดได้ การรายงานผลทดสอบดำเนินการดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การแปลผลการทดสอบ โดยพิจารณาจากค่า Ct และค่าการควบคุมคุณภาพ

Target	Internal control	Positive control	Negative control	การแปลผล
≤ 30	+ / -	+	-	พบเชื้อ (Detect)
> 30	+	+	-	พบเชื้อ (Detect)
> 30	-	+	-	พบเชื้อ (Detect)
-	+	+	-	ไม่พบเชื้อ (Not detect)



ภาพที่ 15 ลักษณะกราฟของตัวอย่างที่พบเชื้อ (Detect) และไม่พบเชื้อ (Not detect)

(A) คือ raw data (B) คือ calculate Ct

3.4 ขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ตาม ISO 16140-2 : 2016 - Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method

ประกอบด้วยการศึกษา 3 ส่วน ดังนี้

3.4.1 การศึกษาความไว (Sensitivity)

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือกว่ามีค่าความไว (sensitivity) ที่แตกต่างกันหรือไม่ ดำเนินการดังนี้

3.4.1.1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างทดสอบ/จำนวนตัวอย่าง

- 1) กลุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างที่ผู้วิจัยดำเนินการศึกษา คือ กลุ่มตัวอย่างน้ำ (categories) ประกอบด้วยตัวอย่าง 3 ประเภท (types) ได้แก่
 - ตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ
 - ตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำ
 - ตัวอย่างจากน้ำพุประดับอาคาร

โดยนำตัวอย่างแต่ละประเภทมาทดสอบเบื้องต้นเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ผลไม่พบเชื้อ ทำให้ไม่สามารถหาตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติได้ (naturally contaminated samples) ในงานวิจัยครั้งนี้จึงใช้เป็นตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อแทน (artificially contaminated samples)

- 2) จำนวนตัวอย่าง ในการทดสอบตัวอย่างแต่ละประเภท (types) ทำการทดสอบประเภทละ 20 ตัวอย่าง รวมเป็น 60 ตัวอย่าง

3.4.1.2 การเตรียมตัวอย่างให้ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (artificially contaminated samples) โดยวิธี Spiking สำหรับการทดสอบความไว (Sensitivity)

- 1) การเตรียมตัวอย่างทดสอบ ในการศึกษาความไว (Sensitivity) ตัวอย่างทดสอบแต่ละประเภท ต้องพบสัดส่วนของผลบวก (fractional positive result) อยู่ในช่วง 25-75% ของตัวอย่างแต่ละประเภท (ตัวอย่างที่ทดสอบไม่ควรให้ผลบวกทั้งหมด หรือผลลบทั้งหมด) ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ คือ 250 มิลลิลิตรต่อ test portion โดยจำนวนตัวอย่างที่ต้องเตรียม แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงประเภทตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่าง สำหรับการศึกษความไว (Sensitivity)

ประเภทตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อที่เติม	เชื้อที่เติม
น้ำจากฝักบัวอาบน้ำ	5	ไม่เติมเชื้อ (0 cfu/ml)	<i>L. pneumophila</i> (DMST 12800)
	5	ต่ำ (10^2 cfu/ml)	
	5	กลาง (10^4 cfu/ml)	
	5	สูง (10^6 cfu/ml)	
น้ำจากก๊อกน้ำ	5	ไม่เติมเชื้อ (0 cfu/ml)	<i>L. pneumophila</i> (DMST 12800)
	5	ต่ำ (10^2 cfu/ml)	
	5	กลาง (10^4 cfu/ml)	
	5	สูง (10^6 cfu/ml)	
น้ำพุประดับอาคาร	5	ไม่เติมเชื้อ (0 cfu/ml)	<i>L. pneumophila</i> (DMST 12800)
	5	ต่ำ (10^2 cfu/ml)	
	5	กลาง (10^4 cfu/ml)	
	5	สูง (10^6 cfu/ml)	

3.4.1.3 ขั้นตอนการทดสอบ

เมื่อเตรียมตัวอย่างในแต่ละประเภทเรียบร้อยแล้ว นำไปทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR ตามข้อ 3.3

3.4.1.4 การแปลผลการทดสอบ

- นำผลการทดสอบจากทั้ง 2 วิธี วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR มาคำนวณ หาค่า Sensitivity ของวิธีทางเลือก (SE_{alt}), Sensitivity ของวิธีอ้างอิง (SE_{ref}), Relative trueness (RT), False positive ratio ของวิธีทางเลือก (FPR)
- แปลผลการทดสอบของแต่ละตัวอย่าง ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การแปลผลการทดสอบจากวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก

วิธีทดสอบ	วิธีอ้างอิง (วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ) +	วิธีอ้างอิง (วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ) -
วิธีทางเลือก (Real-time PCR) +	+ / + (PA)	- / + (PD)
วิธีทางเลือก (Real-time PCR) -	+ / - (ND)	- / - (NA)

หมายเหตุ

- Positive Agreement (PA) คือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งวิธีทางเลือก (+) และวิธีอ้างอิง (+)
- Negative Deviation (ND) คือ ตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธีทางเลือก (-) แต่ให้ผลบวกด้วยวิธีอ้างอิง (+)
- Positive Deviation (PD) คือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธีทางเลือก (+) แต่ให้ผลลบด้วยวิธีอ้างอิง (-)
- Negative Agreement (NA) คือ ตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้งวิธีทางเลือก (-) และวิธีอ้างอิง (-)

3) จากข้อมูลสรุปการแปลผลการทดสอบในตาราง นำข้อมูลมาคำนวณหาค่าต่อไปนี้

$$\text{- Sensitivity ของวิธีทางเลือก (SE}_{alt}) = \frac{PA+PD}{PA+ND+PD} \times 100$$

$$\text{- Sensitivity ของวิธีอ้างอิง (SE}_{ref}) = \frac{PA+ND}{PA+ND+PD} \times 100$$

$$\text{- Relative trueness (RT) = } \frac{PA+NA}{NA+PA+PD+ND} \times 100$$

$$\text{- False positive ratio (FPR) ของวิธีทางเลือก = } \frac{PD}{NA} \times 100$$

$$\text{- Positive predictive value (PPV) = } \frac{PA}{PA+PD} \times 100$$

$$\text{- Negative predictive value (NPV) = } \frac{NA}{NA+ND} \times 100$$

- 4) ตัดสินผลการทดสอบของวิธีทางเลือก โดยคำนวณความแตกต่างระหว่าง (ND-PD) และคำนวณผลรวมของ (ND+PD) แล้วนำค่าที่คำนวณได้ ไปตรวจสอบว่าอยู่ในช่วงของขีดจำกัดการยอมรับ (Acceptability Limit; AL) หรือไม่ หากผลการคำนวณอยู่ในช่วงขีดจำกัดการยอมรับ แสดงว่าวิธีทางเลือกผ่านเกณฑ์การยอมรับ

ตารางที่ 7 การตัดสินผลการทดสอบของวิธีทางเลือก

จำนวนกลุ่มตัวอย่าง (categories)	(ND – PD)	(ND + PD)
1	3	6

หมายเหตุ

- ND = จำนวนตัวอย่างที่ให้ผล Negative Deviation
(ให้ผลลบด้วยวิธีทางเลือก แต่ให้ผลบวกด้วยวิธีมาตรฐาน)
- PD = จำนวนตัวอย่างที่ให้ผล Positive Deviation
(ให้ผลบวกด้วยวิธีทางเลือก แต่ให้ผลลบด้วยวิธีมาตรฐาน)

3.4.2 การศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (relative level of detection: RLOD) เป็นการศึกษาเพื่อประเมินระดับการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ที่วิธี Real-time PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ สามารถตรวจพบได้ (level of detection; LOD) และคำนวณเป็นค่า Relative level of detection (RLOD)

3.4.2.1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างทดสอบ/จำนวนตัวอย่าง

- 1) กลุ่มตัวอย่าง สำหรับการศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (RLOD) ตัวอย่างที่ใช้จะคัดเลือกจากตัวอย่างเพียง 1 ประเภท โดยตัวอย่างที่ผู้วิจัยเลือกดำเนินการศึกษา คือ ตัวอย่างน้ำประปาจากฝักบัวอาบน้ำ เพื่อใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างทดสอบ โดยในงานวิจัยครั้งนี้ใช้เป็นตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ (artificially contaminated samples)
- 2) จำนวนตัวอย่าง ในการทดสอบต้องมีการเติมเชื้อ 3 ระดับ รวม 30 ตัวอย่าง

3.4.2.2 การเตรียมตัวอย่างให้ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (artificially contaminated samples) โดยวิธี Spiking สำหรับการหาค่า RLOD

- 1) การเตรียมตัวอย่างทดสอบ ในการศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (RLOD) ใช้ตัวอย่างที่เติมเชื้อ ≥ 3 ระดับๆ ละหลายซ้ำ ดังนี้
 - ระดับที่ 1 ไม่เติมเชื้อ (negative control level) ทดสอบอย่างน้อย 5 ซ้ำ (ต้องไม่พบผลบวก หากพบผลบวก ต้องทำการทดสอบใหม่ ทุกระดับ)
 - ระดับที่ 2 เติมเชื้อระดับต่ำ (low level) ซึ่งเป็นระดับที่ให้ผลบวก (fractional recovery) จำนวน 25-75% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด โดยทดสอบอย่างน้อย 20 ซ้ำ
 - ระดับที่ 3 เติมเชื้อระดับสูงขึ้น (higher level) ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าระดับต่ำเล็กน้อย ทดสอบอย่างน้อย 5 ซ้ำปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ คือ 250 มิลลิลิตรต่อ test portion โดยจำนวนตัวอย่างที่ต้องเตรียม แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงประเภทตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่าง
สำหรับการศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (RLOD)

ประเภทตัวอย่าง	ระดับการเติมเชื้อ	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อที่เติม	เชื้อที่เติม
น้ำจากฝักบัวอาบน้ำ	ไม่เติมเชื้อ	5	(0 cfu/ml)	<i>L. pneumophila</i> (DMST 12800)
	เชื้อระดับต่ำ (low level)	20	(10 ¹ - 10 ² cfu/ml)	
	เชื้อระดับสูงขึ้น (higher level)	5	(10 ³ - 10 ⁴ cfu/ml)	

3.4.2.3 ขั้นตอนการทดสอบ

เมื่อเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว นำไปทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR โดยดำเนินการตาม ข้อ 3.3

3.4.2.4 การแปลผลการทดสอบ

- การคำนวณและการแปลผลค่า RLOD

- 1) RLOD หมายถึง อัตราส่วนระหว่างค่า LOD ของวิธีทางเลือก (วิธี Real-time PCR) และค่า LOD ของวิธีอ้างอิง (วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ)

$$RLOD = \frac{LOD_{alt}}{LOD_{ref}}$$

- 2) สำหรับแต่ละกลุ่มตัวอย่าง (category) ค่า RLOD จะประมาณในรูปแบบของ complementary-log-log (CLL) model คำนวณใช้โปรแกรม Excel RLOD calculation program
- 3) นำค่า RLOD ที่คำนวณได้เทียบกับขีดจำกัดการยอมรับ Acceptability Limit (AL) โดยค่า AL กำหนดไว้ที่ 1.5 หมายถึง ค่า LOD ของวิธีทางเลือกจะต้องไม่เกิน 1.5 เท่าของค่า LOD ของวิธีอ้างอิง และเป็นที่ยอมรับ หากค่า LOD ของวิธีทางเลือกต่ำกว่าค่า LOD ของวิธีอ้างอิง เพราะนั่นหมายถึง วิธีทางเลือกมีโอกาสตรวจพบเชื้อได้ในระดับการปนเปื้อนที่ต่ำกว่าวิธีอ้างอิง

3.4.3 การศึกษาความจำเพาะ (specificity)

เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงความสามารถของวิธีทางเลือกในการตรวจพบเชื้อเป้าหมาย (Target microorganism) และตรวจไม่พบเชื้อที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย (Non-target microorganism)

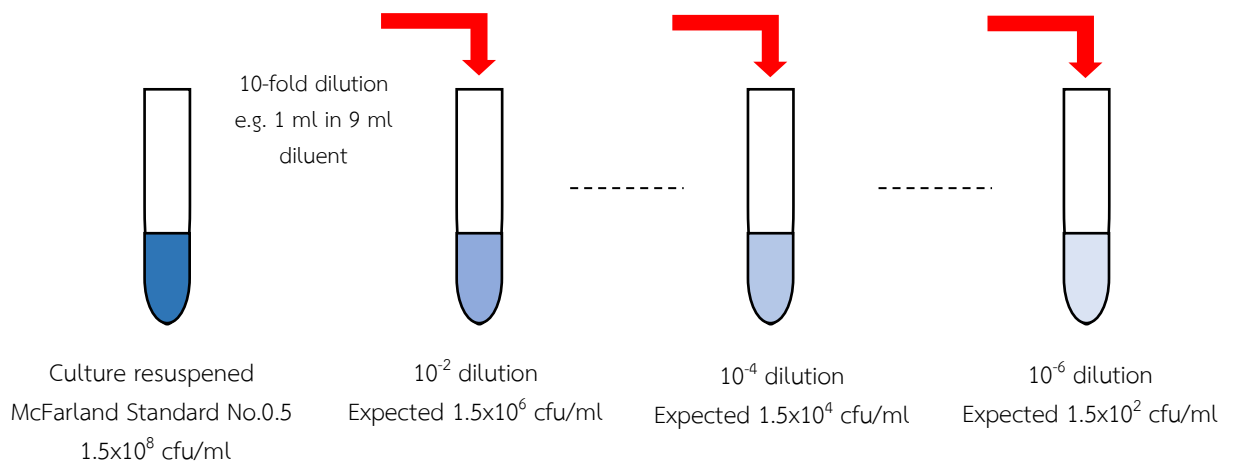
3.4.3.1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างทดสอบ/จำนวนตัวอย่าง

การศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของวิธีทดสอบครั้งนี้ ตรวจสอบโดยใช้เชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่พบได้ในน้ำจากสิ่งแวดล้อม จำนวน 8 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella Typhimurium*

3.4.3.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)

1) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้นสำหรับเป็นเชื้อเป้าหมาย (Target microorganism)

- 1.1) นำเชื้อ *L. pneumophila* (DMST 12800) จาก stock culture มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ buffered charcoal yeast extract agar (BCYE agar) ที่มีส่วนประกอบของ L-cysteine นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน
- 1.2) นำโคลนเชื้อ *L.pneumophila* ละลาย (resuspended) ในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland Standard No.0.5 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 cfu/ml
- 1.3) ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จนถึงระดับความเข้มข้น 10^2 cfu/ml (ปริมาณเชื้อสำหรับใช้งาน คือ ประมาณ 1.5×10^2 cfu/ml) ดังภาพที่ 20
- 1.4) ทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจาง ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน
- 1.5) นับจำนวนโคโลนีบน BCYE agar plate ทราบปริมาณเชื้อตั้งต้นจริง (cfu/ml)



ภาพที่ 16 การเจือจางเชื้อ *L. pneumophila* สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)

2) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้นสำหรับเป็นเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย (Non-target microorganism)

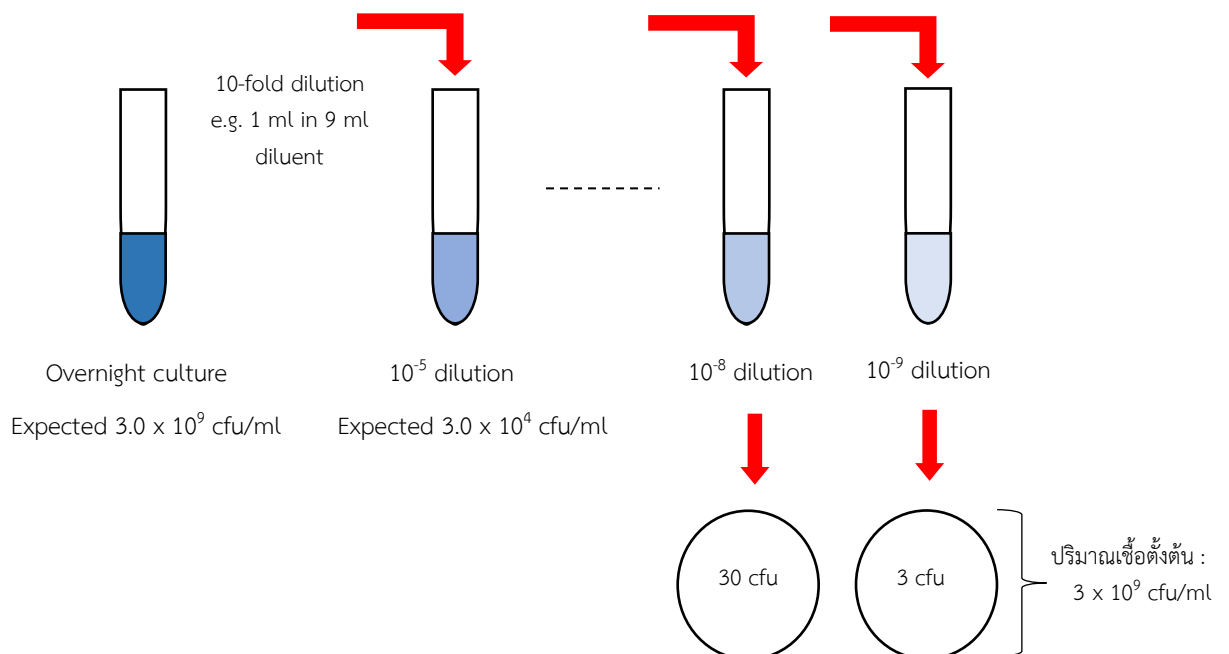
- 2.1) เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะ จำนวน 7 สายพันธุ์
แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะ

การทดสอบ	เชื้อทดสอบ	รหัสเชื้อจุลินทรีย์	ปริมาณเชื้อ
ความจำเพาะ (specificity)	<i>Escherichia coli</i>	DMST 4212	10^4 cfu/ml
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DMST 7592	

การทดสอบ	เชื้อทดสอบ	รหัสเชื้อจุลินทรีย์	ปริมาณเชื้อ
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	DMST 8841	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	DMST 8013	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DMST 5868	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DMST 4739	
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	DMST 562	

- 2.2) นำเชื้อทดสอบตามสายพันธุ์ข้างต้น จาก stock culture มา streak ลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง
- 2.3) เลือกโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเพาะเลี้ยงลงใน Tryptic Soy Broth (TSB) 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง
- 2.4) ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-9}
- 2.5) ทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจาง ด้วยเทคนิค pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) นำไปบ่มที่ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ดังภาพที่ 21
- 2.6) นับจำนวนโคโลนีบน PCA จะทราบปริมาณเชื้อตั้งต้น (cfu/ml)
- 2.7) ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ให้ได้เชื้ออยู่ในระดับที่ต้องการ คือ 10^4 cfu/ml



ภาพที่ 17 การเจือจางเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)

3.4.3.3 ขั้นตอนการทดสอบ

นำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน ตามปริมาณที่คาดหวังมาทดสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR โดยดำเนินการตาม ข้อ 3.3.2 และ 3.3.3

3.4.3.4 การแปลผลการทดสอบ

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

3.5 การประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี โดยใช้สถิติ kappa analysis

3.5.1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างทดสอบ/จำนวนตัวอย่าง

- 1) กลุ่มตัวอย่าง สำหรับการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี Real-time PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างน้ำที่ส่งตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ (naturally contaminated samples) และตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples) อย่างละ 35 ตัวอย่าง จำนวนรวม 70 ตัวอย่าง

3.5.2 การเตรียมตัวอย่างให้ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (artificially contaminated samples) โดยวิธี Spiking สำหรับประเมินความสอดคล้อง

- 1) การเตรียมตัวอย่างทดสอบ ใช้ตัวอย่างทดสอบ จำนวน 2 ชุด ดังนี้
 - ชุดที่ 1 ตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยไม่เติมเชื้อ จำนวน 35 ตัวอย่าง
 - ชุดที่ 2 ตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยเติมเชื้อ จำนวน 35 ตัวอย่างปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ คือ 250 มิลลิลิตรต่อ test portion โดยจำนวนตัวอย่างที่ต้องเตรียมแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ประเภทตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่าง สำหรับการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี

ชุดที่	ประเภทตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อที่เติม	เชื้อที่เติม
1	ตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้อ	35	0 cfu/ml	<i>L. pneumophila</i> (DMST 12800)
2	ตัวอย่างที่เติมเชื้อ	35	10^2 - 10^3 cfu/ml	

3.4.2.5 ขั้นตอนการทดสอบ

เมื่อเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว นำไปทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR โดยดำเนินการตาม ข้อ 3.3

3.4.2.6 การแปลผลการทดสอบ

นำผลการทดสอบที่ได้ มาคำนวณทางสถิติ

- คำนวณอัตราส่วน Kappa

$$Kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

โดย P_o คือ ผลรวมของผลทดสอบที่ตรงกันจากการทดสอบ

$$P_o = (PA + NA) / N$$

P_e คือ ผลรวมของความน่าจะเป็นที่ตรงกันจากค่าคาดหวัง (Expected)

$$P_e = (PA_{(expected)} + NA_{(expected)}) / N$$

- การแปลความหมายของค่าสถิติ Kappa ที่คำนวณได้พิจารณาดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การแปลผลความสอดคล้อง (Strange of agreement) ของค่าสถิติ kappa

ค่าสถิติ kappa	ขนาดความสอดคล้อง (Strange of agreement)
<0.00	แย่ (Poor)
0.00 - 0.20	น้อย (Slight)
0.21 - 0.40	พอใช้ (Fair)
0.41 - 0.60	ปานกลาง (Moderate)
0.61 - 0.80	ดี (Sub Stantial)
0.81 - 1.00	ดีมาก/ค่อนข้างสมบูรณ์ (Almost Perfected)

เอกสารอ้างอิง

1. สมาคมโรคติดเชื้อในเด็กแห่งประเทศไทย. โรคลีเจียนแนร์ (Legionellosis) [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 2 ตุลาคม 2566]. เข้าถึงได้จาก : <https://www.pidst.or.th/A225.html>
2. Nisar, M. A., Ross, K. E., Brown, M. H., Bentham, R., & Whiley, H. (2020). Legionella pneumophila and Protozoan Hosts: Implications for the Control of Hospital and Potable Water Systems. *Pathogens*, 9(4), 286. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040286>
3. Jeffrey W. Mercante, Jonas M. Winchell , Current and Emerging Legionella Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations, *Clinical Microbiology Reviews*, January 2015 Vol. 28 Number 1 page 95-133
4. ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลีเจียนเนลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย, สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, สำนักงานกิจการโรงพิมพ์ องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กันยายน 2549.
5. สถานการณ์โรคลีเจียนแนร์ในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2556-2565 กองระบาดวิทยา/สำนักสื่อสารความเสี่ยงฯ กรมควบคุมโรค [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 2 ตุลาคม 2566]. เข้าถึงได้จาก : <https://pr.moph.go.th/print.php?url=pr/print/2/02/178422/>
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual Epidemiological Report for 2021. Stockholm: ECDC; 2023.
7. Khweek, A.A., & Amer, A. (2010). Replication of Legionella pneumophila in human cells: Why are we susceptible: *Frontiers in Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00133>
8. The Life Cycle of L. pneumophila : Cellular Differentiation Is Linked to Virulence And Metabolism, [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 2 ตุลาคม 2566]. เข้าถึงได้จาก : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5780407/>
9. สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. การควบคุม ฝ้าระวังปัญหาการแพร่ระบาด โรคลีเจียนแนร์. [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 2 ตุลาคม 2566]. เข้าถึงได้จาก : <https://env.anamai.moph.go.th/th/magazine/2743#wow-book/34>
10. Viasus, D., Gaia, V., Manzur-Barbur, C., & Carratala, J. (2002) Legionnaires' Disease: Update on Diagnosis and Treatment. *Infectious Diseases and Therapy*, 11(3), 973–986. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00635-7>
11. ไพรัช ศรีไสว. การศึกษาอุบัติการณ์การเกิดโรค legionellosis. วารสารอนามัยสิ่งแวดล้อม 2542; 3 :45-49.
12. โรม บัวทอง, รุ่งนภา ประสานทอง, วิวัฒน์ ศีตมโนชน, ทวีศักดิ์ เนตรวงศ์, ธาเรีย เสาวรัญ, ขจรเดช จันทะยานี, นงนุช มารินทร์ และคณะ. การระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป ภายหลังจากการเดินทางมาท่องเที่ยวในจังหวัดภูเก็ต ธันวาคม 2549 - มกราคม 2550: บทบาทของการสอบสวนสิ่งแวดล้อมในประเทศที่เกิดเหตุ: รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2556; 44: 38-46.

13. อติเทพ จินดา, ปรรณ บาลบุรี, วิรัตน์ เพาะปลูก, รุ่งทิพย์ นวลศรี, นงนุช จาตุรบัณฑิต, โอภาส คັນธามนธ์ และคณะ. การสอบสวนสิ่งแวดล้อมในโรงแรมที่เกิดโรคเลิเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวเดนมาร์ก เขาหลัก ตำบลคึกคัก อำเภอดงแก้วป่า จังหวัดพังงา มิถุนายน 2551. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา ประจำสัปดาห์ 2551; 39: 653-657.
14. ฆาลิตา อานนท์, โรม บัวทอง, นราศักดิ์ บ่อหนา, ปวีณฉัตร ลูสีดา, นัจพร พรหมชัยศรี, นงนุช จาตุรบัณฑิต และคณะ. การสอบสวนสิ่งแวดล้อมของการระบาดของโรคเลิเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป หมู่ที่ 5 ตำบลคึกคัก อำเภอดงแก้วป่า จังหวัดพังงา ระหว่างวันที่ 2 - 5 มิถุนายน 2558. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2558; 46: 721-727.
15. รณิดา เตชะสุวรรณ. โรคเลิเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยว : การสอบสวนสิ่งแวดล้อมในโรงแรมที่ได้รับแจ้งว่าเป็นที่พักของนักท่องเที่ยวชาวสวีเดนที่ติดเชื้ในกรุงเทพมหานคร เดือนมกราคม 2566. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2566; 54: 305-312.
16. สำนักสารสนเทศ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. (2565). กรมควบคุมโรคเผย โรคเลิเจียนแนร์ไม่ใช่โรคใหม่การแพร่เชื้อต้องหายใจละอองน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *Legionella pneumophila*. [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 2 ตุลาคม 2566]. เข้าถึงได้จาก : <https://pr.moph.go.th/index.php?url=pr/detail/2/02/178422/>
17. ISO 11731 : 2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*; 2017.
18. อโณทัย โกศาจิกรณ. Basic Real-time PCR. เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ Introduction to Real-time PCR and its applications; 2549.
19. ISO 16140 –1 : 2016 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 1: Vocabulary.
20. ISO 16140 -2 : 2016 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva; 2016.
21. ISO 16140 -3 : 2021 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory.
22. ISO 16140 -4 : 2020 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory.
23. ISO 16140 -5 : 2020 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods.
24. ISO 16140 -6 : 2019 - Microbiology of the food chain – Method validation– Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures.
25. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva; 2017.

26. Parin Kittipongdaja. Agreement Measurement (Cohen's kappa) [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 2 ตุลาคม 2566]. เข้าถึงได้จาก : <https://parinkittipongdaja.medium.com/agreement-measurement-part-1-3-e99fbb9d1256>.
27. นิรภา คงกันคง, นวรัตน์ วราอัศวปติเจริญ, วรัญญู คงกันคง, ดวงพร จิรวินบูลย์, ภัทรมน รัตนพันธ์ และ วิวัฒน์ ลีตระกูลนำชัย. การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคลีเจียนแนร์ในระบบน้ำทางทันตกรรมในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ช่วงเดือนเมษายน – พฤษภาคม 2543. วารสารทันตกรรมขอนแก่น 2543; 3: 73-79.
28. ทศนีย์ สุโกศล. การตรวจและควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคลีเจียนแนร์ในระบบปรับอากาศ. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี; 2551. 59.
29. อธิชา มหาโยธา, กรวิทย์ นาคคนทรง, อภิญญา อรรคชาติ, อุดมเกียรติ พรธนะประเทศ. การเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำที่ใช้ในโรงแรมหรือรีสอร์ท ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2557; 23: 201-209.
30. อธิชา มหาโยธา, เตือนใจ บุตรโคตร, ปริศนา วงศ์วีรพันธ์, วิชัย ปราสาททอง, อุดมเกียรติ พรธนะประเทศ, ภัทรพร เชยประทุม และคณะ. เครือข่ายการเฝ้าระวังการแพร่เชื้อ *Legionella* spp. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2559; 25: 929-934.
31. Akiko Edagawa, Akio Kimura, Hiroshi Miyamoto. Investigations on Contamination of Environmental Water Samples by *Legionella* using Real-Time Quantitative PCR Combined with Amoebic Co-Culturing. Biocontrol Science, 2019, Vol. 24, No. 4, 213—220.
32. Deborah A. Wilson, Belinda Yen-Lieberman, Udo Reischl, Steve M. Gordon, Gary W. Procop. Detection of *Legionella pneumophila* by Real-Time PCR for the mip Gene. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 2003, Vol. 41, No. 7 p. 3327–3330.
33. D. Eble, V. Gehrig, P. Schubert-Ullrich, R. Köppel, H.P. Fuchsli. Comparison of the culture method with multiplex PCR for the confirmation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. J Appl Microbiol. 2021;131: 2600 –2609
34. อมรรัตน์ อินทรสุด, อนุสรณ บุญธรรม, และ สรศักดิ์ อินทรสุด. การเปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อกับวิธี duplex-PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Legionella pneumophila* ในน้ำจากหอหล่อเย็น. เชียงใหม่เวชสาร 2559;55 (ฉบับเสริม 1): 11-21.
35. Daniela Toplitsch, Sabine Platzer, Romana Zehner, Stephanie Maitz, Franz Mascher and Clemens Kittinger. Comparison of Updated Methods for *Legionella* Detection in Environmental Water Samples. Int. J. Environ. Res. Public Health 2021, 18, 5436.
36. Mojtaba Moosavian, Mina Moradzadeh, Ataollah Ghadiri, and Morteza Saki. Isolation and Identification of *Legionella* spp. in environmental water sources based on macrophage infectivity potentiator (mip) gene sequencing in southwest Iran. AIMS Microbiology, 2019, Volume 5, Issue 3, 223–231.
37. Bartram J, Chartier Y, Lee J, et al. *Legionella* and the prevention of legionellosis. India: World Health Organization; 2007.