

ตัวชี้วัดที่ 3.35 : ระดับความสำเร็จของการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ

1.1 ผลการวิเคราะห์สถานการณ์ของตัวชี้วัด (รอบ 5 เดือนหลัง)

- ผลผลิต/ผลลัพธ์ระดับ C (Comparison) การเปรียบเทียบ

การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ถือว่ามีความสำคัญอย่างมากสำหรับระบบการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคเลเจียนแนร์ ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่ได้ศึกษาวิธีการตรวจหาเชื้อลิจิโอเนลลา รวมทั้งศึกษาถึงข้อดี ข้อเสีย และประสิทธิภาพของแต่ละวิธีที่ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. 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 จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการตรวจหาเชื้อลิจิโอเนลลา

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

D. Eble (2021) การตรวจหาปริมาณ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ โดยทั่วไปมักใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ตามมาตรฐาน ISO 11731 ซึ่งวิธีนี้ต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อถึง 15 วัน และในขั้นตอนการยืนยันสปีชีส์ของเชื้อก็มีความยุ่งยาก อาจเกิดความผิดพลาดได้ งานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาในขั้นตอนการยืนยันจากโคลนนิ่งของเชื้อที่สงสัย บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงแล้ว ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในขั้นตอนการยืนยันเชื้อลง 2-5 วันได้ ทำให้เกิดความรวดเร็วในการทดสอบและมีความจำเพาะสูง

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) เมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับที่ amplified ได้จาก mip gene ในเชื้อ *Salmonella Typhi* และ *Salmonella Enteritidis* อย่างไรก็ตามผลจาก direct sequencing พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรงตำแหน่ง ของไพรเมอร์เหมือนกับ mip primers (17/20 นิวคลีโอไทด์) ดังนั้นวิธี duplex-PCR จึงมีความไวและความจำเพาะสูง สะดวกและรวดเร็วใน

การตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* และ *Legionella* spp. ทั้งนี้อาจต้องใช้การตรวจหา ยีน mip ร่วมกับยีน 16S rDNA เพื่อลดการเกิดผลบวกปลอมจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ

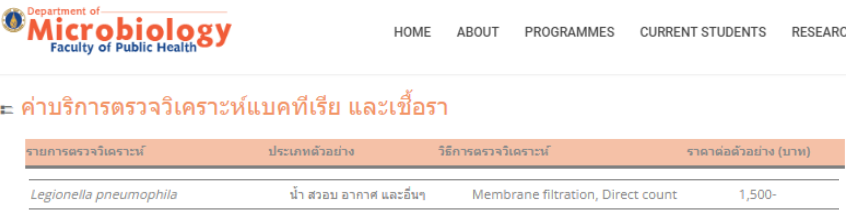
Daniela Toplitsch (2021) การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Legionella* spp. จากตัวอย่างน้ำมีความยุ่งยาก เนื่องจากจะต้องใช้ประสบการณ์ทางห้องปฏิบัติการ ต้องใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานในการทดสอบ รวมทั้งในตัวอย่างน้ำมักมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ จำนวนมากทำให้ยังรบกวนต่อผลการทดสอบได้ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อตาม ISO 11731 กับวิธี qPCR ซึ่งจากผลการทดสอบ พบว่า วิธี qPCR ให้ผลลบกับเชื้ออื่นๆ ได้ดีมาก รวมทั้งยังมีความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ที่มีปริมาณต่ำๆ ได้ จึงถือว่าวิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการทำนายหรือประเมินสถานการณ์การระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในสถานการณ์ฉุกเฉินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Mojtaba Moosavian (2019) ศึกษาความชุกของเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำของเมือง Ahvaz ทางตะวันตกเฉียงใต้ของอิหร่าน โดยใช้ mip gene ในการระบุชนิดของเชื้อลีเจียนเนลลา 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. worsteinsis* (20.8%) ที่เหลือเป็น *L. dumoffi* และ *L. fairfieldensis* (4.1%) ซึ่งการพบเชื้อ *Legionella* ในแหล่งน้ำอาจเป็นอันตรายต่อระบบสุขภาพของประชาชนในพื้นที่ได้ จำเป็นต้องมีการติดตามอย่างสม่ำเสมอ เพื่อลดความเสี่ยงในการแพร่กระจายของเชื้อได้

วิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ถือเป็นวิธีมาตรฐาน (Reference standard) คือ 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 ทำให้การปฏิบัติงานค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน เมื่อศึกษางานวิจัยอื่นๆ ทำให้มีวิธีทางเลือกในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* เพิ่มมากขึ้น เช่น การนำเทคนิค PCR มาใช้ เนื่องจากวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียเริ่มมีบทบาทมากขึ้น เป็นวิธีการตรวจที่มีความไว ความจำเพาะสูง และให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ ซึ่งในกรณีฉุกเฉินหรือในสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ ผลการทดสอบที่ถูกต้องและรวดเร็วจะทำให้ผู้รับบริการ หน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและภาคเอกชน สามารถนำผลการทดสอบไปใช้ประโยชน์ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคได้อย่างทันทั่วถึง เพื่อคุ้มครองและดูแลสุขภาพของประชาชนทุกกลุ่มวัย

ห้องปฏิบัติการที่สามารถให้บริการตรวจหาเชื้อ *Legionella* ในตัวอย่างน้ำ ส่วนใหญ่ใช้วิธีในการทดสอบ คือ การเพาะเชื้อ (culture) เช่นเดียวกับห้องปฏิบัติการของกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย แต่จะต่างกันเพียงในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นมากขึ้น (concentration) เช่น บางห้องปฏิบัติการใช้วิธี direct, filtration, centrifugation ซึ่งแล้วแต่ความพร้อมของห้องปฏิบัติการ หรือขึ้นอยู่กับสภาพตัวอย่างที่ส่งเข้าสู่ห้องปฏิบัติการ โดยตัวอย่างรายชื่อห้องปฏิบัติการแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายชื่อห้องปฏิบัติการทดสอบเชื้อ *Legionella* ในตัวอย่างน้ำ

หน่วยงาน/ห้องปฏิบัติการ	รายละเอียด																											
<p>กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย</p> <p>วิธีทดสอบ : เพาะเชื้อ (Culture)</p>	 <p>ประกาศกรมอนามัย เรื่อง กำหนดอัตราค่าบริการตรวจวิเคราะห์และทดสอบและการผลิตชุดทดสอบอย่างง่ายทางภาคสนาม พ.ศ. ๒๕๖๕</p> <table border="1" data-bbox="560 483 1374 562"> <thead> <tr> <th>รายการทดสอบ</th> <th>วิธีทดสอบ</th> <th>ราคา (บาท)/ตัวอย่าง</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ลิจิโอเนลลา (Legionella)</td> <td>Centrifuge</td> <td>1,600</td> </tr> </tbody> </table>	รายการทดสอบ	วิธีทดสอบ	ราคา (บาท)/ตัวอย่าง	ลิจิโอเนลลา (Legionella)	Centrifuge	1,600																					
รายการทดสอบ	วิธีทดสอบ	ราคา (บาท)/ตัวอย่าง																										
ลิจิโอเนลลา (Legionella)	Centrifuge	1,600																										
<p>ห้องปฏิบัติการ Lab service ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล</p> <p>วิธีทดสอบ : เพาะเชื้อ (Culture)</p>	 <p>ค่าบริการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย และเชื้อรา</p> <table border="1" data-bbox="568 775 1385 846"> <thead> <tr> <th>รายการตรวจวิเคราะห์</th> <th>ประเภทตัวอย่าง</th> <th>วิธีการตรวจวิเคราะห์</th> <th>ราคาต่อตัวอย่าง (บาท)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Legionella pneumophila</i></td> <td>น้ำ สวม อากาศ และอื่นๆ</td> <td>Membrane filtration, Direct count</td> <td>1,500-</td> </tr> </tbody> </table>	รายการตรวจวิเคราะห์	ประเภทตัวอย่าง	วิธีการตรวจวิเคราะห์	ราคาต่อตัวอย่าง (บาท)	<i>Legionella pneumophila</i>	น้ำ สวม อากาศ และอื่นๆ	Membrane filtration, Direct count	1,500-																			
รายการตรวจวิเคราะห์	ประเภทตัวอย่าง	วิธีการตรวจวิเคราะห์	ราคาต่อตัวอย่าง (บาท)																									
<i>Legionella pneumophila</i>	น้ำ สวม อากาศ และอื่นๆ	Membrane filtration, Direct count	1,500-																									
<p>สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์</p> <p>วิธีทดสอบ : เพาะเชื้อ (Culture)</p>	 <p>THAI NIH สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข National Institute of Health of Thailand</p> <table border="1" data-bbox="576 1021 1385 1346"> <thead> <tr> <th>การตรวจหาเชื้อ</th> <th>ตัวอย่าง</th> <th>ราคา</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>การตรวจหาเชื้อ Legionella ในตัวอย่างน้ำด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อและนับจำนวน</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (Latex agglutination)</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	การตรวจหาเชื้อ	ตัวอย่าง	ราคา	การตรวจหาเชื้อ Legionella ในตัวอย่างน้ำด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อและนับจำนวน	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป	
การตรวจหาเชื้อ	ตัวอย่าง	ราคา																										
การตรวจหาเชื้อ Legionella ในตัวอย่างน้ำด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อและนับจำนวน	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
<p>- ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม</p> <p>- ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี</p> <p>- ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต</p> <p>- ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง</p> <p>วิธีทดสอบ : เพาะเชื้อ (Culture)</p>	 <table border="1" data-bbox="826 1491 1385 1816"> <thead> <tr> <th>การตรวจหาเชื้อ</th> <th>ตัวอย่าง</th> <th>ราคา</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>การตรวจหาเชื้อ Legionella ในตัวอย่างน้ำด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อและนับจำนวน</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> <tr> <td>การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (Latex agglutination)</td> <td>ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	การตรวจหาเชื้อ	ตัวอย่าง	ราคา	การตรวจหาเชื้อ Legionella ในตัวอย่างน้ำด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อและนับจำนวน	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป		การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป	
การตรวจหาเชื้อ	ตัวอย่าง	ราคา																										
การตรวจหาเชื้อ Legionella ในตัวอย่างน้ำด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อและนับจำนวน	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจหาเชื้อ Legionella จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ Latex agglutination	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (เพาะเชื้อ นับจำนวน และ Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											
การตรวจยืนยันเชื้อ Legionella pneumophila (Latex agglutination)	ผ่ายแคคก็เรียทั่วไป																											

หน่วยงาน/ห้องปฏิบัติการ	รายละเอียด														
ฝ่ายจุลชีววิทยา โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย วิธีทดสอบ : เพาะเชื้อ (Culture)	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>รหัส</th> <th>รายการทดสอบ</th> <th>ชนิดสิ่งส่งตรวจ</th> <th>ปริมาตร</th> <th>เวลาในการรายงานผล</th> <th>หมายเหตุ</th> <th>ราคา</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>EMB050</td> <td>Legionella culture from water*</td> <td>Water</td> <td>1,000 ml</td> <td>14 วันทำการ</td> <td></td> <td>2,500</td> </tr> </tbody> </table>	รหัส	รายการทดสอบ	ชนิดสิ่งส่งตรวจ	ปริมาตร	เวลาในการรายงานผล	หมายเหตุ	ราคา	EMB050	Legionella culture from water*	Water	1,000 ml	14 วันทำการ		2,500
รหัส	รายการทดสอบ	ชนิดสิ่งส่งตรวจ	ปริมาตร	เวลาในการรายงานผล	หมายเหตุ	ราคา									
EMB050	Legionella culture from water*	Water	1,000 ml	14 วันทำการ		2,500									

บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด	รายละเอียด
บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด วิธีทดสอบ : เพาะเชื้อ (Culture)	

บริษัท ยูไนเต็ด แอนนาลิสต์ แอนด์ เอ็นจิเนียริง คอนซัลแตนท์ จำกัด	รายละเอียด														
บริษัท ยูไนเต็ด แอนนาลิสต์ แอนด์ เอ็นจิเนียริง คอนซัลแตนท์ จำกัด วิธีทดสอบ : เพาะเชื้อ (Culture)	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>ประเภท</th> <th>รายการทดสอบ</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>น้ำทิ้ง</td> <td>ไซโนบยาธิ</td> </tr> <tr> <td>ภาคตะกอน</td> <td></td> </tr> <tr> <td>น้ำทิ้ง</td> <td>แบคทีเรียอีโคไล</td> </tr> <tr> <td>ภาคตะกอน</td> <td></td> </tr> <tr> <td>น้ำใช้น้ำในครัวเรือน</td> <td>Legionella spp.</td> </tr> <tr> <td>น้ำทิ้งจากอาคาร</td> <td>pH, BOD, TSS, TDS, Settleable Solids, Fat Oil and Grease, Sulfide, TKN</td> </tr> </tbody> </table>	ประเภท	รายการทดสอบ	น้ำทิ้ง	ไซโนบยาธิ	ภาคตะกอน		น้ำทิ้ง	แบคทีเรียอีโคไล	ภาคตะกอน		น้ำใช้น้ำในครัวเรือน	Legionella spp.	น้ำทิ้งจากอาคาร	pH, BOD, TSS, TDS, Settleable Solids, Fat Oil and Grease, Sulfide, TKN
ประเภท	รายการทดสอบ														
น้ำทิ้ง	ไซโนบยาธิ														
ภาคตะกอน															
น้ำทิ้ง	แบคทีเรียอีโคไล														
ภาคตะกอน															
น้ำใช้น้ำในครัวเรือน	Legionella spp.														
น้ำทิ้งจากอาคาร	pH, BOD, TSS, TDS, Settleable Solids, Fat Oil and Grease, Sulfide, TKN														

- ผลผลิต/ผลลัพธ์ระดับ T (Trends) แนวโน้ม

จากการศึกษาแนวโน้มการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ในสิ่งแวดล้อม และการเกิดโรคลีเจียนแนร์ภายในประเทศไทย พบหลายงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว เพื่อหาแนวทางในการป้องกัน/สอบสวนการเกิดโรค ได้แก่

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

ทัศนีย์ สุโกศล (2551) ได้ตรวจและควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคลีเจียนแนร์ในระบบปรับอากาศ ปีงบประมาณ 2546 – 2547 โดยได้เก็บตัวอย่างน้ำจากห้องเย็น จำนวน 21 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำจากถาดรองน้ำในเครื่องปรับอากาศที่มีอายุการใช้งาน 1 ปีขึ้นไป จำนวน 30 ตัวอย่าง รวมทั้งทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย รวมทั้ง *Staphylococcus* spp. แต่พบแบคทีเรียรวมจากตัวอย่างน้ำห้องเย็นเฉลี่ย 7.03×10^3 CFU/ml และตัวอย่างน้ำจากถาดรองน้ำในเครื่องปรับอากาศเฉลี่ย 4.12×10^5 CFU/ml รวมทั้งพบ biofilm ในตัวอย่างห้องเย็นที่มีการดูแลรักษาด้วยการเติมสารชีวฆาต และสารเคมีป้องกันการกัดกร่อนและเกิดตะกรันด้วย

อติเทพ จินา และคณะ (2551) ทำการสอบสวนสิ่งแวดล้อมในสถานที่เกิดโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวเดนมาร์ก ตำบลศรีคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา มิถุนายน 2551 โดยเก็บตัวอย่างน้ำส่งตรวจเพื่อหาเชื้อ *Legionella* spp. ผลการสอบสวนพบผู้ป่วยยืนยันโรคลีเจียนแนร์ เป็นชาวเดนมาร์ก 2 รายรายแรกเป็นผู้ป่วยเพศหญิงอายุ 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)

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 น้ำในห้องเย็น น้ำในห้องพัก ผลการสอบสวนพบผู้ป่วยยืนยัน 5 ราย และผู้ป่วยเข้าข่าย 1 ราย ทั้งหมดเป็นชาวแสกนดิเนเวีย เชื้อที่เป็นสาเหตุ คือ *L. pneumophila* serogroup 1 และผลการเพาะเชื้อจากแหล่งน้ำต่างๆ ในโรงแรม พบเชื้อ *Legionella* spp. ซึ่งได้แก่ น้ำจากฝักบัว น้ำจากอ่างล้างหน้า โดยไม่พบในห้องเย็น ผลแยกเชื้อพบ *L. bozemanii* จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *L. pneumophila* serogroup 1 จำนวน 2 ตัวอย่าง

อริชา มหาโยธา และคณะ (2557) ได้ศึกษาเรื่องการเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำที่ใช้ในโรงแรมหรือรีสอร์ทในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปี 2556 โดยได้เก็บตัวอย่างน้ำจากห้องฝักเย็น 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 ห้องฝักเย็น 10 ตัวอย่าง เครื่องผลิตน้ำอุ่น - น้ำร้อน 1 ตัวอย่าง และถังพักน้ำ/แทงค์น้ำ 1 ตัวอย่าง

ฉាលิตา อานนท์ และคณะ (2558) ทำสอบสวนการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป หมู่ที่ 5 ตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ระหว่างวันที่ 2 - 5 มิถุนายน 2558 หลังได้รับแจ้งจากเครือข่ายลีเจียนแนร์ของสหภาพยุโรป (European Legionnaires' Disease Surveillance Network : ELDSNet) ผ่านสำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ว่ามีนักท่องเที่ยว 2 ราย ป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์ หลังจากมาพักที่โรงแรมแห่งหนึ่งในตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ทีมได้ดำเนินการสอบสวนโรค โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากห้องพักผู้ป่วย บ่อพักน้ำ น้ำจากห้องสปา และ swab สุขภัณฑ์ เช่น ก๊อกอ่างล้างหน้า หัวฝักบัวสระน้ำ 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)

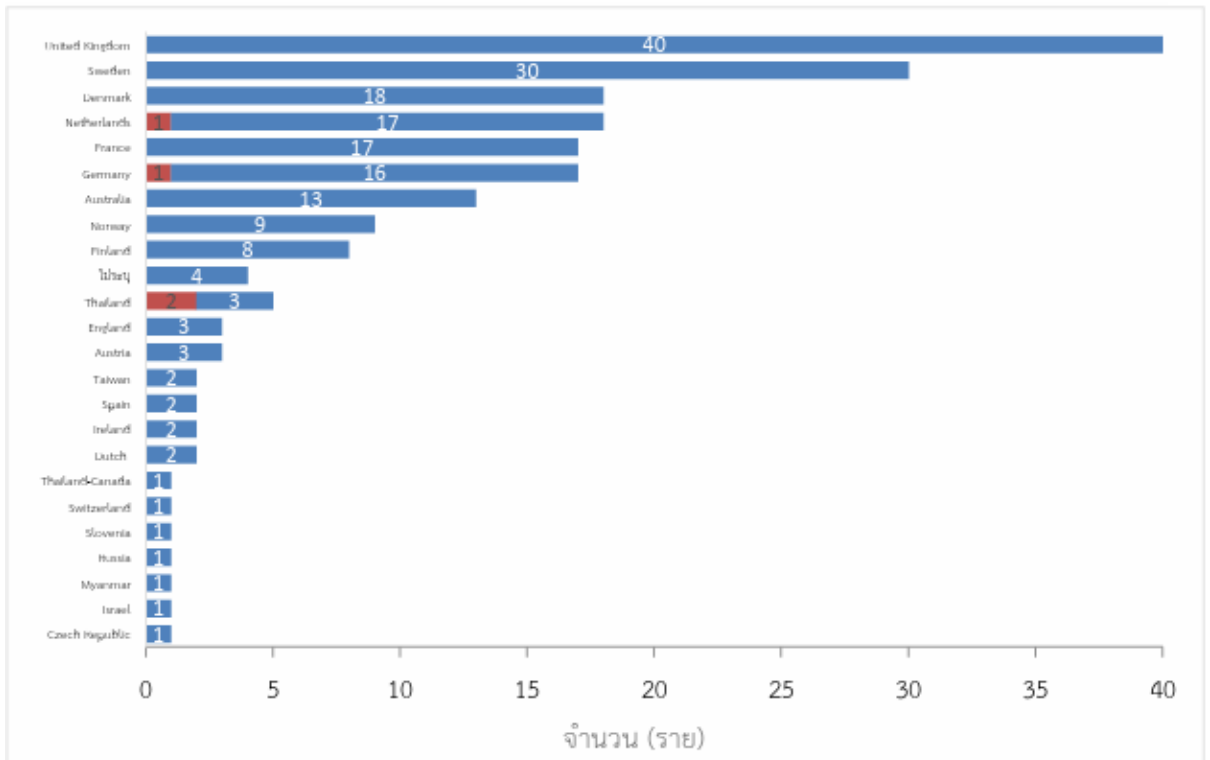
อริชา มหาโยธา และคณะ (2559) ได้ศึกษาเรื่องเครือข่ายการเฝ้าระวังการแพร่เชื้อ *Legionella* spp. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปี 2557 - 2558 โดยได้ดำเนินการตรวจเยี่ยมโรงแรมที่เข้าร่วมเครือข่าย จำนวน 23 แห่ง และได้สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ จำนวน 129 ตัวอย่าง ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. จำนวน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

รณิดา เตชะสุวรรณ (2566) ทำการสอบสวนโรคในสิ่งแวดล้อม ภายหลังจากได้รับรายงานนักท่องเที่ยวชาวสวีเดนป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์หลังเดินทางมาท่องเที่ยวภายในประเทศไทย โดยทำการศึกษาและตรวจสอบสภาพสิ่งแวดล้อมที่มีโอกาสก่อให้เกิดความเสี่ยงในการติดเชื้อ ได้แก่ ระบบน้ำหล่อเย็น ห้องฝักเย็น 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

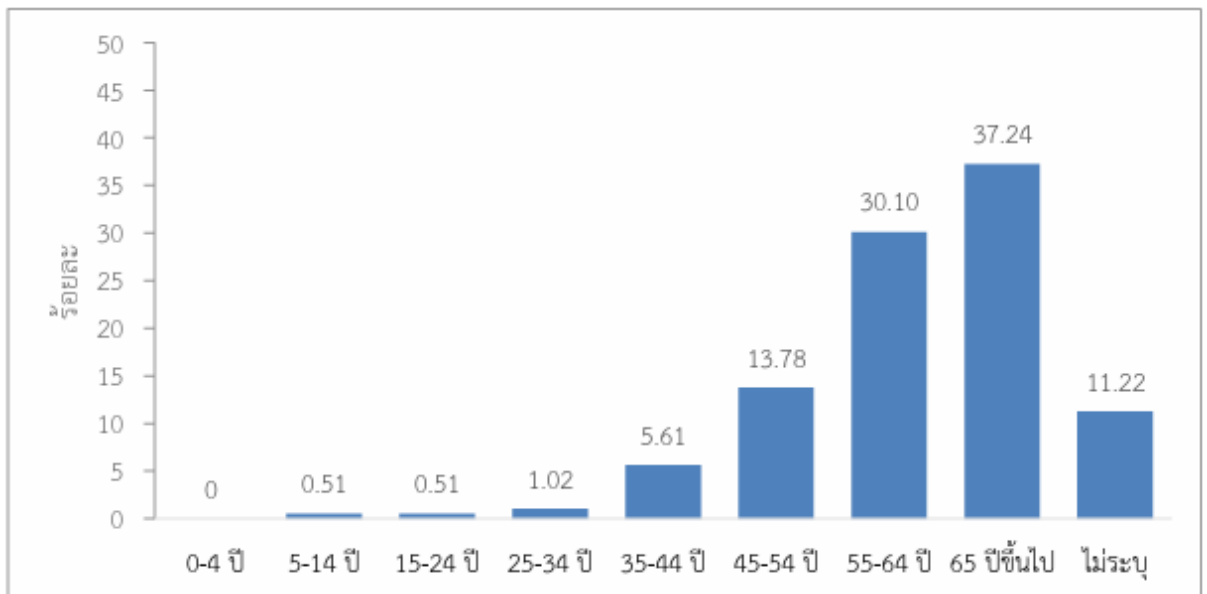
สถานการณ์โรคลีเจียนแนร์ ข้อมูลจากการเฝ้าระวังเหตุการณ์จากโปรแกรมตรวจสอบข่าวการระบาด กรมควบคุมโรค ระหว่างปี พ.ศ. 2556–2567 พบว่า มีการรายงานผู้ป่วยทั้งหมด 196 ราย มีผู้เสียชีวิต 4 ราย ส่วนใหญ่เป็นการรายงานจากผู้ป่วยที่เดินทางกลับจากท่องเที่ยวที่ประเทศไทย และกลับไปป่วยที่ประเทศต้นทาง 163 ราย (ร้อยละ 83.16) สัญชาติที่มีรายงานผู้ป่วยมากที่สุด คือ อังกฤษ สวีเดน เดนมาร์ก เนเธอร์แลนด์ และฝรั่งเศส (ภาพที่ 1) ส่วน 33 ราย (ร้อยละ 16.84) เป็นการรายงานจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในประเทศไทย ในผู้ป่วย 196 ราย พบว่า อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 3:1 กลุ่มอายุที่พบมากที่สุด 3 อันดับ คือ อายุ 65 ปีขึ้นไป ร้อยละ 37.24 รองลงมา คือ 55–64 ปี (30.10) และ 45–54 ปี (13.78) มีฐานอายุของผู้ป่วย เท่ากับ 62 ปี (อายุต่ำสุด 10 ปี, อายุสูงสุด 82 ปี) (ภาพที่ 2)

โรคลีเจียนแนร์มีรายงานผู้ป่วยเป็นประจำทุกปี โดยช่วงก่อนการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 มีรายงานผู้ป่วยสูงสุดในปี พ.ศ. 2562 คือ 40 ราย ต่อมาปี พ.ศ. 2563–2564 มีการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 และมีการใช้มาตรการป้องกันและควบคุมการระบาด เช่น การล็อกดาวน์ การปิดสถานที่เสี่ยงต่อการเกิดโรค เป็นต้น ส่งผลให้รายงานผู้ป่วยลดลงเหลือเพียง 1–2 รายต่อปี แต่เมื่อมีการผ่อนคลายมาตรการ และเปิดประเทศให้นักท่องเที่ยวเดินทางเข้ามาในประเทศไทย รายงานผู้ป่วยลีเจียนแนร์ มีแนวโน้มพบผู้ป่วยมากขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2565 และในปี พ.ศ. 2566 มีรายงานผู้ป่วยสูงสุด 49 ราย (ภาพที่ 3) ส่วนเดือนที่มีรายงานผู้ป่วยมากที่สุด คือ กุมภาพันธ์ (ภาพที่ 4) จังหวัดที่มีรายงานพบผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นจังหวัดท่องเที่ยว ได้แก่ ภูเก็ต กรุงเทพมหานคร ชลบุรี สุราษฎร์ธานี และกระบี่ (ภาพที่ 5) โดยสถานที่ที่ผู้ป่วยให้ประวัติเข้าพักมากที่สุด คือ โรงแรม (ร้อยละ 49.49) รองลงมา คือ รีสอร์ท (38.27) และเกสต์เฮาส์หรืออพาร์ทเมนต์ (1.02)

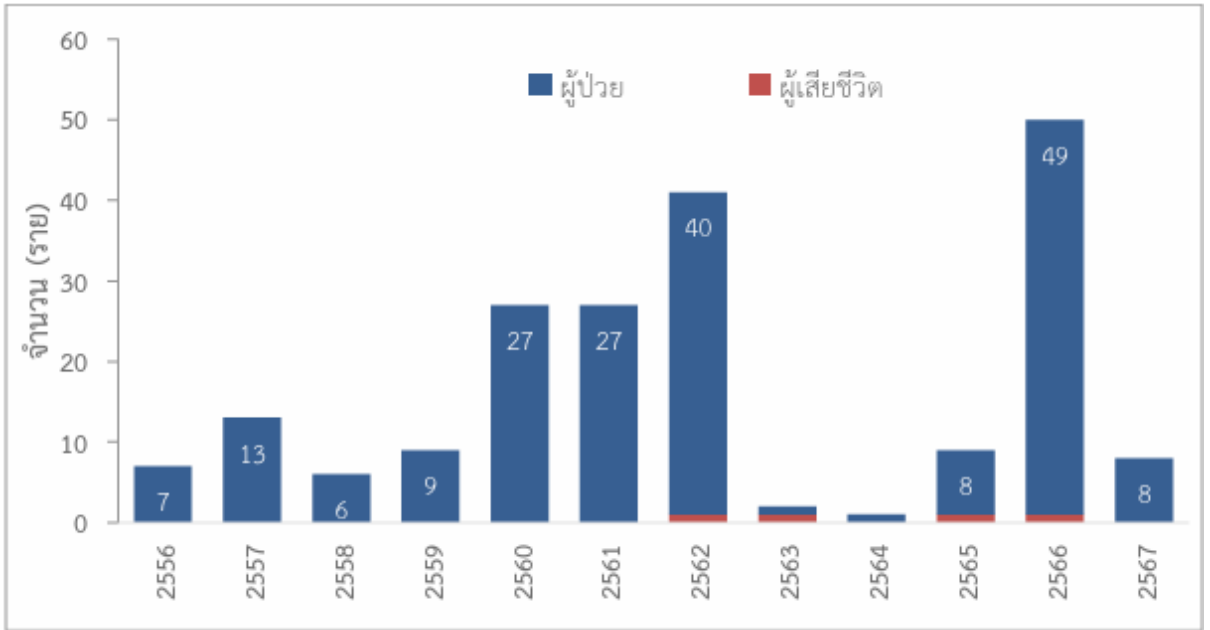
การประเมินความเสี่ยงและมาตรการในการควบคุมป้องกันโรค ในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา พบจำนวนผู้ป่วยโรคลีเจียนแนร์มีรายงานเพิ่มสูงขึ้น พื้นที่ที่มีรายงานผู้ป่วยหรือผู้ป่วยรายงานว่าเคยเดินทางไปก่อนเริ่มอาการป่วย เป็นจังหวัดท่องเที่ยว ซึ่งน่าจะเป็นการติดเชื้อในประเทศไทย โดยอาจเนื่องมาจากการควบคุมดูแลระบบน้ำและระบบปรับอากาศที่ไม่ได้มาตรฐาน ซึ่งเป็นการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเจริญของเชื้อ *Legionella pneumophila* การติดตาม ควบคุม กำกับคุณภาพระบบน้ำ และระบบปรับอากาศจึงมีความสำคัญ และจำเป็นต้องเร่งดำเนินการ โดยตรวจสอบและปรับปรุงระบบน้ำและระบบปรับอากาศในสถานประกอบการ เพื่อป้องกันผลกระทบต่อการดำเนินชีวิตและสุขภาพของนักท่องเที่ยว ทั้งชาวไทยและชาวต่างชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันที่มีการรณรงค์เรื่องการท่องเที่ยว และมีนักท่องเที่ยวเดินทางเข้ามาในประเทศไทยมากขึ้น



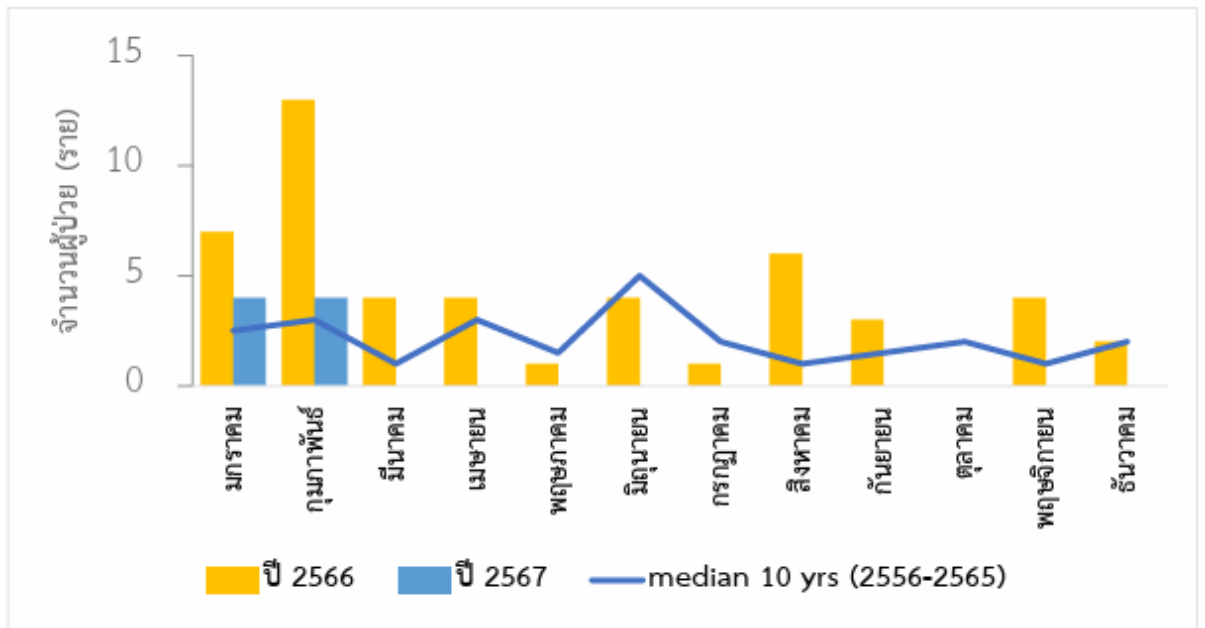
ภาพที่ 1 จำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตโรคโควิด-19 จำแนกตามสัญชาติที่ได้รับรายงาน ระหว่างปี พ.ศ. 2566-2567



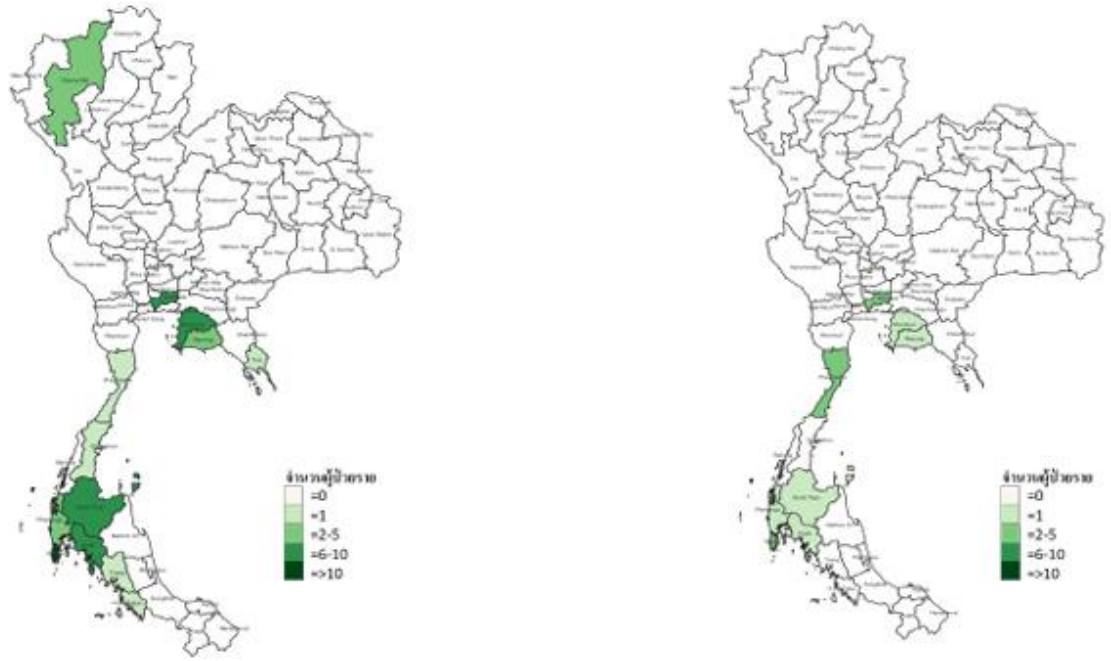
ภาพที่ 2 ร้อยละของผู้ป่วยโรคโควิด-19 จำแนกตามกลุ่มอายุ ประเทศไทย ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2566-2 มีนาคม 2567



ภาพที่ 3 จำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตโรคไข้ฉี่หนู ประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2556–2567



ภาพที่ 4 ผู้ป่วยโรคไข้ฉี่หนู จำแนกรายเดือน ปี พ.ศ. 2566, 2567
เปรียบเทียบค่ามัธยฐาน 10 ปีย้อนหลัง



ภาพที่ 5 จังหวัดที่มีรายงานผู้ป่วยโรคลีเจียนแนร์เดินทางมาท่องเที่ยว ระหว่างปี พ.ศ. 2566–2567

จากแนวโน้มสถานการณ์โรคลีเจียนแนร์ที่ได้มีการสอบสวนหาสาเหตุของการแพร่กระจายของโรคลีเจียนแนร์ พบว่าสาเหตุที่ทำให้จำนวนของผู้ติดเชื้อและอุบัติการณ์เกิดโรค ยังคงมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้น เกิดจากคุณภาพแหล่งน้ำภายในโรงแรมหรืออาคารต่างๆ ไม่เหมาะสม ทั้งปริมาณคลอรีนอิสระคงเหลือในน้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิของน้ำที่ไม่เหมาะสมทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ รวมทั้งสถานประกอบการต่างๆ ยังไม่มีความรู้และไม่ได้ตระหนักถึงความสำคัญของโรคนี จึงไม่ได้เข้มงวดในการบำรุงรักษา/ทำความสะอาดระบบประปา ระบบน้ำร้อนรวม ระบบปรับอากาศและระบายความร้อน หอผึ่งเย็น ถังพักน้ำและถังเก็บน้ำ หัวก๊อกน้ำและฝักบัวอาบน้ำ ระบบท่อน้ำ รวมทั้งสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่มีโอกาสก่อให้เกิดความเสี่ยงในการติดเชื้อลีจิโอเนลลา

การตรวจทางห้องปฏิบัติการในการตรวจหาเชื้อลีจิโอเนลลาจึงถือว่ามีสำคัญอย่างมากสำหรับระบบการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ เนื่องจากผลการทดสอบสามารถใช้เป็นหลักฐานเพื่อสร้างความตระหนักให้แก่ทั้งผู้ประกอบการ เจ้าหน้าที่ภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้อง ในการร่วมมือกันเพื่อป้องกันปัญหาการแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ ลดอุบัติการณ์และความเสี่ยงต่อการระบาดของโรคดังกล่าวในประเทศไทยได้ และยังเป็นการสร้างเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยให้แก่ประชาชน นักท่องเที่ยวทั้งภายในประเทศและต่างประเทศอีกด้วย

- ผลผลิต/ผลลัพธ์ระดับ Le (Level) ของผลการดำเนินการในปัจจุบัน

จากการดำเนินงานตัวชี้วัดที่ผ่านมาจากรอบ 5 เดือนแรก ห้องปฏิบัติการได้ดำเนินการทดสอบตัวอย่างที่ผู้รับบริการส่งตรวจเพื่อหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อทางห้องปฏิบัติการ จำนวน 17 ตัวอย่าง พร้อมพัฒนาวิธีทดสอบสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR) และดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้น ห้องปฏิบัติการได้จัดทำคู่มือการทดสอบการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) ในตัวอย่างน้ำ เพื่อใช้เป็นมาตรฐานปฏิบัติงานสำหรับการทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real - time PCR ในตัวอย่างน้ำ ซึ่งวิธีปฏิบัติงานประกอบด้วย

- 1) การทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น (Sample concentration) เป็นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทดสอบ เพื่อให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นมากขึ้น เหมาะสมสำหรับนำไปทดสอบในขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR ต่อไป
- 2) การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ
- 3) การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real-time PCR
- 4) การแปลผลการทดสอบและการควบคุมคุณภาพ
- 5) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีสำหรับใช้ในการทดสอบ

คู่มือการทดสอบการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) ในตัวอย่างน้ำ ที่จัดทำขึ้นนี้ช่วยให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถดำเนินการทดสอบได้อย่างถูกต้อง ลดความผิดพลาดของผลการทดสอบได้มากขึ้น



กระทรวงสาธารณสุข
MINISTRY OF PUBLIC HEALTH

กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย
PUBLIC HEALTH LABORATORY DIVISION

คู่มือการทดสอบ
การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) ในตัวอย่างน้ำ
(รหัสเอกสาร : TM MI)
ฉบับที่ : 01 แก้ไขครั้งที่ : 00 วันที่มีผลบังคับใช้ : 31/01/2567

ผู้จัดทำ / Prepared by

[Signature]

(นางสาวพัทธมา พลวิชัย)
วันที่ 29/01/2567

ผู้ทบทวน / Reviewed by

[Signature]

(นางสาวพรชกร แก้วสำราญ)
วันที่ 30/01/2567

ผู้อนุมัติ / Approved by

[Signature]

(นางสาวพรชกร แก้วสำราญ)
วันที่ 31/01/2567

ชื่อเอกสาร : คู่มือการทดสอบการตรวจหาเชื้อ <i>Legionella</i> spp. ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) ในตัวอย่างน้ำ		
รหัสเอกสาร : TM MI	ฉบับที่ : 01	หน้าที่ : 2 / 13
วันที่มีผลบังคับใช้ : 31/01/2567	แก้ไขครั้งที่ : 00	

1. วัตถุประสงค์
เพื่อใช้เป็นมาตรฐานปฏิบัติงานสำหรับการทดสอบเชื้อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) ในตัวอย่างน้ำ
2. ขอบข่าย
คู่มือการทดสอบฉบับนี้ใช้สำหรับการทดสอบเชื้อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) ในตัวอย่างน้ำ
3. นิยาม
ไม่มี
4. เอกสารอ้างอิง
4.1 ISO 11731 : 2017 Water quality Enumeration of *Legionella*
5. แบบฟอร์ม
ไม่มี
6. เครื่องมือและอุปกรณ์
 - 6.1 เครื่องมือ
เครื่องชั่งปริมาณสารานุกรม (Real time PCR) ชื่อ Analytik Jena รุ่น qTOWER³
เครื่องชั่ง 2 ส่วนตั่ง (Balance) รุ่น ME T3002T ชื่อ Mettler Toledo
เครื่องวัดความเข้มข้น เมก (µM meter) รุ่น S20 ชื่อ Mettler Toledo
เครื่องฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SX 700 ชื่อ Torry อุตสาหกรรม 121 ± 3 องศาเซลเซียส
ฟิล์มกรองเชื้อ (Laminar Flow) รุ่น NU 543 ชื่อ NuAire
ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) รุ่น KB720 ชื่อ Binder อุตสาหกรรม 36 ± 2 องศาเซลเซียส
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ชื่อรุ่น 4 องศาเซลเซียส (Eppendorf, Germany)
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น BAD 12 ชื่อ RAYPA อุตสาหกรรม 50 ± 1 องศาเซลเซียส
ชุดกรองตัวอย่างน้ำ (Membrane filtration equipment)
เครื่องเขย่งสารละลาย (Vortex shaker) ชื่อ Heidolph
เครื่องเขย่งสารละลาย (Vortex mixer) รุ่น Vortex Genie2 ชื่อ Genie
เครื่องสุญญากาศละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ชื่อ Eppendorf
เครื่องสุญญากาศละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ชื่อ Eppendorf
เครื่องสุญญากาศละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ชื่อ Eppendorf
เครื่องสุญญากาศละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 0.5-10 ไมโครลิตร ชื่อ Eppendorf
 - 6.2 อุปกรณ์
แผ่นกรอง (Membrane filter) ชนิด polycarbonate ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร (PALL, USA)
ปิเปตติง (pipette tip) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
ปิเปตติงแบบมีแผ่นกรอง (pipette filter tip) ขนาด 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
หลอดทดสอบ (test tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
ตะแกรงใส่หลอดทดสอบ (test tube rack)
จานเพาะเชื้อ (petri dish)
ขวดแก้วขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร
ภาชนะพลาสติก

ภาพที่ 6 คู่มือการทดสอบการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) ในตัวอย่างน้ำ

ห้องปฏิบัติการดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้น (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 ดังนั้นในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีจะดำเนินการตาม 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. ประกอบด้วยการศึกษา 3 ส่วน ดังนี้

- 1) การศึกษาความไว (sensitivity study)
เป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือกว่ามีค่าความไว (sensitivity) ที่แตกต่างกันหรือไม่
- 2) การศึกษาค่า relative level of detection; RLOD (RLOD study)
เป็นการศึกษาเพื่อประเมินระดับการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ที่วิธี Real-time PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ สามารถตรวจพบได้ (level of detection; LOD) และคำนวณเป็นค่า Relative level of detection (RLOD)
- 3) การศึกษาความจำเพาะ (specificity) หรือศึกษา Inclusivity/exclusivity ของวิธีทางเลือก
โดย inclusivity study เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงความสามารถของวิธีทางเลือกในการตรวจพบเชื้อเป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ส่วน exclusivity study เป็นการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์จำนวนหลายๆ สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีทางเลือกไม่ควรตรวจพบเชื้อเหล่านี้ (เชื้อที่จะคัดเลือกมาทดสอบ ควรเป็นเชื้อที่มีโอกาสเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อเป้าหมาย หรือมีโอกาสให้ผลทดสอบบวกเช่นเดียวกับเชื้อเป้าหมาย)

จากผลการดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ที่ห้องปฏิบัติการได้ดำเนินการแล้ว ตามแผนการขับเคลื่อนการดำเนินงานตามตัวชี้วัด คือ ดำเนินการทางห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity) ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

การทดสอบ	เชื้อทดสอบ	Culture method	PCR method
Target microorganism	<i>Legionella pneumophila</i> (DMST 12800)	Detect	Detect
Non-target microorganism	<i>Escherichia coli</i> (DMST 4212)	Partial inhibition	Not detect
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (DMST 7592)	Partial inhibition	Not detect
	<i>Klebsiella aerogenes</i> (DMST 8841)	Partial inhibition	Not detect
	<i>Staphylococcus aureus</i> (DMST 8013)	Partial inhibition	Not detect
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (DMST 5868)	Partial inhibition	Not detect

การทดสอบ	เชื้อทดสอบ	Culture method	PCR method
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DMST 4739)	Partial inhibition	Not detect
	<i>Salmonella Typhimurium</i> (DMST 562)	Partial inhibition	Not detect

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

พบว่าวิธี Real-time PCR มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Legionella* spp. ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่พบได้บ่อยในแหล่งน้ำที่นำมาทดสอบ จำนวน 7 ชนิด โดยพบว่าวิธี Real-time PCR มีความจำเพาะต่อเชื้อเป้าหมายและเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายมากกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ (เชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย) ได้บางส่วน (partial inhibition) เชื้อยังสามารถเจริญได้บ้าง แต่จะให้ลักษณะโคโลนีที่แตกต่างจากโคโลนีของเชื้อ *Legionella* spp.

ดังนั้นจึงเหมาะสมที่ห้องปฏิบัติการจะดำเนินการเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธี Real-time PCR ในหัวข้ออื่นๆ ให้ครอบคลุมตามที่มาตรฐานได้กำหนดไว้ เพื่อให้สามารถนำวิธีมาใช้ภายในห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้องและมั่นใจ

กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย
 เมษายน 2567