



กรมอนามัย

การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp.
ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR)

นางสาวพัทยา พลวิชัย

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับ ปฏิบัติการ
ตำแหน่งเลขที่ 2180
กลุ่มงานจุลชีววิทยา
ส่วนราชการ กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย
กรมอนามัย

เพื่อแต่งตั้งให้ดำรง

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับชำนาญการ
ตำแหน่งเลขที่ 2180
กลุ่มงานจุลชีววิทยา
ส่วนราชการ กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย
กรมอนามัย

บทคัดย่อ

เชื้อ *Legionella* spp. เป็นสาเหตุของโรคเลิเจียนแนร์ ซึ่งพบปนเปื้อนได้ในแหล่งน้ำต่างๆ สามารถแพร่กระจายสู่คนผ่านทางระบบลมหายใจที่ปนเปื้อน การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อเฝ้าระวังเชื้อในแหล่งน้ำจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งวิธีที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐาน คือ วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ต้องใช้ความชำนาญในการอ่านผลและใช้ระยะเวลานานในการทดสอบ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธี Real-time PCR สำหรับตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ที่มีความถูกต้อง มีความจำเพาะและรวดเร็ว

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งดำเนินการตามมาตรฐาน ISO 16140-2 : 2016 - Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method พบว่าวิธี Real-time PCR มีค่าความไว (Sensitivity) ร้อยละ 100, ค่าความถูกต้องสัมพัทธ์ (Relative trueness) ร้อยละ 98.33, ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) ร้อยละ 97.44, ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ร้อยละ 100, ค่าต่ำสุดที่วิธีสามารถตรวจพบได้ (limit of detection) คือ 5.9×10^2 cfu /test portion เมื่อคำนวณเป็นค่า relative level of detection (RLOD) เท่ากับ 0.88 ผ่านตามเกณฑ์เมื่อเทียบกับขีดจำกัดการยอมรับ โดยวิธี Real-time PCR มีความจำเพาะ (Specificity) ต่อเชื้อ *Legionella* spp. และไม่พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบอื่นๆ ที่พบได้บ่อยในแหล่งน้ำ และจากการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี Real-time PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ด้วยสถิติ kappa analysis พบความสอดคล้องในระดับดีมาก (kappa = 0.94) และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ พบว่าวิธี Real-time PCR ให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อถึง 15 เท่า (ลดระยะเวลาการทดสอบทางห้องปฏิบัติการจาก 15 วัน เหลือ 1 วัน) ดังนั้นวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นจึงเหมาะที่จะใช้เป็นวิธีทางเลือกในการควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนเชื้อในแหล่งน้ำต่างๆ นอกเหนือจากวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อเดิมที่ห้องปฏิบัติการมีอยู่ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่รวดเร็วขึ้น หน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและภาคเอกชนสามารถนำผลการทดสอบไปใช้ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคเลิเจียนแนร์ได้อย่างทันท่วงที

คำสำคัญ : *Legionella* spp., Legionnaires' disease, Real-time Polymerase chain reaction

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สามารถดำเนินการจนบรรลุผลสำเร็จไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์และสนับสนุนเป็นอย่างดีจากบุคลากรหลายท่าน ข้าพเจ้าจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ ดังนี้

ขอขอบคุณทีมงานกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ความรู้ ข้อคิด ข้อเสนอแนะ และปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำงาน ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่สำหรับใช้ในการดำเนินงานวิจัย จนกระทั่งการวิจัยครั้งนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

ขอขอบคุณบุคลากรกรมอนามัย ผู้มีความรู้ความเชี่ยวชาญที่ให้ความรู้ในเทคนิคเฉพาะด้าน และแง่คิดใหม่ๆ ในการดำเนินงานวิจัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยฉบับนี้ คงเป็นประโยชน์สำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและผู้สนใจศึกษาต่อไป

พัทยา พลวิชัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค - ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1 - 4
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1 - 2
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 เป้าหมายและตัวชี้วัดความสำเร็จ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 คำศัพท์และนิยาม	3
1.6 กรอบแนวคิดงานวิจัย	4
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5 - 20
2.1 เชื้อลิจิโอเนลลา (<i>Legionella</i> spp.) กับการก่อโรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires disease)	5 - 11
2.1.1 ลักษณะและวงจรชีวิตของเชื้อลิจิโอเนลลา (<i>Legionella</i> spp.)	5 - 7
2.1.2 การเกิดโรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires disease)	7 - 9
2.1.3 สถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ (Legionellosis)	9 - 11
2.2 การตรวจหาเชื้อ <i>Legionella</i> spp. โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เฉพาะเจาะจงและการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันคุณสมบัติของเชื้อ	11
2.3 การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR)	12 - 13
2.4 มาตรฐานการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา	14 - 16
2.5 การประเมินความสอดคล้องของข้อมูลด้วยสถิติ kappa analysis	17
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17 - 20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	21 - 45
3.1 รูปแบบการศึกษา	21
3.2 เครื่องมือ/วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์, สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง	21 - 26
3.2.1 เครื่องมือวิทยาศาสตร์	21
3.2.2 วัสดุ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์	22
3.2.3 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง	22
3.2.4 สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ	22
3.2.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลายบัฟเฟอร์	23 - 26
3.3 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ <i>Legionella</i> spp. ทางห้องปฏิบัติการ	27 - 31
3.3.1 การทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น (Sample concentration)	27
3.3.2 การตรวจหาเชื้อ <i>Legionella</i> spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ	27 - 28

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
3.3 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ <i>Legionella</i> spp. ทางห้องปฏิบัติการ (ต่อ)	
3.3.3 การตรวจหาเชื้อ <i>Legionella</i> spp. ด้วยวิธี Real-time PCR	28 - 31
3.4 ขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ตาม ISO 16140-2 : 2016 - Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method	32 - 42
3.4.1 การศึกษาความไว (Sensitivity)	32 - 36
3.4.2 การศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (relative level of detection: RLOD)	37 - 39
3.4.3 การศึกษาความจำเพาะ (specificity)	40 - 42
3.5 การประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี โดยใช้สถิติ kappa analysis	42 - 45
บทที่ 4 ผลการศึกษา	46 - 54
4.1 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ตาม ISO 16140-2 : 2016 - Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method	46 - 51
4.1.1 ผลการศึกษาความไว (Sensitivity)	46 - 48
4.1.2 ผลการศึกษาค่า relative level of detection (RLOD)	49 - 51
4.1.3 ผลการศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของวิธี Real-time PCR	51
4.2 ผลการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี โดยใช้สถิติ kappa analysis	52 - 54
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	55 - 57
5.1 สรุปผลการศึกษา	55 - 56
5.2 ข้อเสนอแนะ	56 - 57
5.2.1 ข้อเสนอเชิงนโยบาย	56 - 57
5.2.2 ข้อเสนอเชิงปฏิบัติการ	57
5.2.3 ข้อเสนอสำหรับงานวิจัยครั้งต่อไป	57
เอกสารอ้างอิง	58 - 60
ภาคผนวก ก ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลี้จิโอเนลลาในหอฝักเย็นของอาคารในประเทศไทย	61 - 73
ภาคผนวก ข ISO 11731 : 2017 Water quality – Enumeration of <i>Legionella</i>	74 - 79
ภาคผนวก ค ISO 16140-2 : 2016 - Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method	80 - 91

สารบัญตาราง

เรื่อง		หน้า
ตารางที่ 1	การแปลผลความสอดคล้อง (Strange of agreement) ของค่าสถิติ kappa	17
ตารางที่ 2	แสดงส่วนประกอบหลักของปฏิกิริยา PCR (Master Mix) สำหรับ 1 ตัวอย่างทดสอบ (Reaction)	29
ตารางที่ 3	สภาวะของปฏิกิริยาสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ <i>Legionella</i> spp.	29
ตารางที่ 4	การแปลผลการทดสอบ โดยพิจารณาจากค่า Ct และค่าการควบคุมคุณภาพ	31
ตารางที่ 5	แสดงประเภทตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่างสำหรับการศึกษาความไว (Sensitivity)	32 - 33
ตารางที่ 6	การแปลผลการทดสอบจากวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก	35
ตารางที่ 7	การตัดสินผลการทดสอบของวิธีทางเลือก	36
ตารางที่ 8	แสดงประเภทตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่างสำหรับการศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (RLOD)	37
ตารางที่ 9	เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะ	41
ตารางที่ 10	ประเภทตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่าง สำหรับการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี	43
ตารางที่ 11	การแปลผลความสอดคล้อง (Strange of agreement) ของค่าสถิติ kappa	45
ตารางที่ 12	ผลการทดสอบและการแปลผลของตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ	46
ตารางที่ 13	ผลการทดสอบและการแปลผลของตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำ	47
ตารางที่ 14	ผลการทดสอบและการแปลผลของตัวอย่างน้ำจากน้ำพุระดับอาคาร	47 - 48
ตารางที่ 15	สรุปผลการศึกษาความไว (Sensitivity)	48
ตารางที่ 16	ขีดจำกัดการยอมรับ (Acceptability Limit; AL) ของการศึกษาความไว (Sensitivity)	48
ตารางที่ 17	ผลการทดสอบเพื่อหาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (level of detection; LOD) ของวิธี Real-time PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ	49 - 50
ตารางที่ 18	ผลการคำนวณ ค่า RLOD	51
ตารางที่ 19	ผลการศึกษาความจำเพาะ (specificity)	51
ตารางที่ 20	ผลการทดสอบเพื่อประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี โดยใช้สถิติ kappa analysis	52 - 54
ตารางที่ 21	ผลการคำนวณค่าคาดหวัง (Expected) สำหรับประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี โดยใช้สถิติ kappa analysis	54

สารบัญภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 1 เชื้อลิจิโอนเนลลาจากการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE with cysteine (A) และเชื้อลิจิโอนเนลลาจากการย้อมสีแกรม (B)	5
ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อ <i>Legionella</i> spp.	6
ภาพที่ 3 แหล่งรังโรคและการแพร่กระจายของเชื้อ <i>Legionella</i> spp. ในสิ่งแวดล้อม	7
ภาพที่ 4 ช่องทางการรับเชื้อลิจิโอนเนลลาเข้าสู่ร่างกาย	8
ภาพที่ 5 ขั้นตอนพื้นฐานของปฏิกิริยา PCR	13
ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาของ PCR ที่เกิดขึ้น เมื่อนำปริมาณ product ที่เพิ่มขึ้นมา plot เทียบกับ เวลา	13
ภาพที่ 7 ขั้นตอนการเลือกวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี	15
ภาพที่ 8 ขั้นตอนการทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น ด้วยวิธีการกรอง (Membrane filtration)	27
ภาพที่ 9 ขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค Spread plate	27
ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Legionella</i> spp. ที่ขึ้นบน plate GVPC agar (A) จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อ (re-streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE (B) และ BCYE-cys (C)	28
ภาพที่ 11 ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม GenUPTM Bacteria gDNA Kit	28
ภาพที่ 12 ขั้นตอนการเตรียม master mix และการตั้งค่าสถานะของปฏิกิริยาสำหรับการเพิ่ม ปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ <i>Legionella</i> spp.	29
ภาพที่ 13 ลักษณะของกราฟที่มีลักษณะปกติ (S curve: Typical curve)	30
ภาพที่ 14 ลักษณะของกราฟ Positive control และ Negative control (A) คือ raw data (B) คือ calculate Ct	30
ภาพที่ 15 ลักษณะกราฟของตัวอย่างที่พบเชื้อ (Detect) และไม่พบเชื้อ (Not detect) (A) คือ raw data (B) คือ calculate Ct	31
ภาพที่ 16 การเจือจางเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้น สำหรับศึกษาความไว (Sensitivity)	33
ภาพที่ 17 การเตรียมตัวอย่างที่เติมเชื้อ (Spike sample) สำหรับศึกษาความไว (Sensitivity)	35
ภาพที่ 18 การเจือจางเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้น สำหรับศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (relative level of detection: RLOD)	38
ภาพที่ 19 การเตรียมตัวอย่างที่เติมเชื้อ (Spike sample) สำหรับศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (relative level of detection: RLOD)	39
ภาพที่ 20 การเจือจางเชื้อ <i>L. pneumophila</i> สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)	40
ภาพที่ 21 การเจือจางเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)	42
ภาพที่ 22 การเจือจางเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้น สำหรับการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี	43
ภาพที่ 23 การเตรียมตัวอย่างที่เติมเชื้อ (Spike sample) สำหรับการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี	44

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) ของระบบระบายความร้อนรวมที่มีตามอาคารขนาดใหญ่ต่างๆ 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 อาการรุนแรงและอัตราการเสียชีวิตสูง เรียกว่าโรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires disease) หากไม่มีภาวะปอดอักเสบและอาการไม่รุนแรง เรียกว่าโรคไข้ปอนเตียก (Pontiac fever)^[3] การระบาดของโรคไม่ได้เกิดจากการติดต่อจากคนสู่คน แต่เกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อจากแหล่งน้ำสู่คน โดยเชื้อแพร่กระจายจากแหล่งน้ำไปกับละอองฝอยของน้ำและแพร่กระจายผ่านทางอากาศ เมื่อสูดหายใจรับเอาละอองน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าสู่ร่างกายอาจก่อให้เกิดอาการของโรคได้ โดยกลุ่มคนที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อหรือเกิดโรคนี้ ได้แก่ ผู้สูงอายุ ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอหรือกำลังอยู่ระหว่างการรักษาโรคบางชนิด 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 ซึ่งมีการกึ่งในการส่งเสริมให้ประชาชนมีสุขภาพดี โดยมีการศึกษาวิเคราะห์ วิจัย พัฒนาและถ่ายทอดองค์ความรู้และเทคโนโลยีด้านการส่งเสริมสุขภาพ การจัดการปัจจัยเสี่ยง

ต่อสุขภาพ และการจัดการอนามัยสิ่งแวดล้อมที่เอื้อต่อการมีสุขภาพดี รวมทั้งการประเมินผลกระทบต่อสุขภาพ เพื่อมุ่งเน้นให้ประชาชนมีความรู้และทักษะในการดูแลตนเอง ครอบครัวและชุมชน รวมตลอดจนถึง การสนับสนุนให้หน่วยงานส่วนภูมิภาค องค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น และภาคีเครือข่ายทั้งภาครัฐและภาคเอกชน มีส่วนร่วมในการสร้างเสริมสุขภาพและการจัดการอนามัยสิ่งแวดล้อมเพื่อส่งเสริมให้คนไทยมีสุขภาพดี โดยถ้วนหน้า ได้ออกประกาศกรมอนามัย พ.ศ.2544 เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลี้จิโอเนลลาในหอผึ่งเย็น ของอาคารในประเทศไทย เพื่อกำกับ ควบคุมดูแล เฝ้าระวัง และสร้างความตระหนักในการป้องกันปัญหาการ แพร่ระบาดของโรคลีเจียนเนร์ และเป็นแนวทางสำหรับเจ้าหน้าที่ของรัฐ ผู้ประกอบการ และประชาชนทั่วไป ได้มีความรู้ ความเข้าใจในเรื่องโรคลีเจียนเนร์ รวมทั้งสามารถใช้เป็นแนวทางในการบำรุงรักษาระบบน้ำหรือ แหล่งน้ำที่ใช้ภายในอาคารสถานประกอบการต่างๆ ได้ ซึ่งถือเป็นการลดอุบัติการณ์และความเสี่ยงต่อการ ระบาดของโรคดังกล่าวในประเทศไทยได้ และยังเป็นการสร้างเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยให้แก่ประชาชน นักท่องเที่ยวทั้งภายในประเทศและต่างประเทศอีกด้วย

กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย มีภารกิจหลักในการตรวจวิเคราะห์และทดสอบคุณภาพน้ำ บริโภค/อุปโภค น้ำเสีย/น้ำทิ้งและน้ำประปาอื่นๆ โดยการตรวจวิเคราะห์และทดสอบ ประกอบด้วยการตรวจ วิเคราะห์ด้านเคมี-กายภาพ โลหะหนักและการทดสอบทางด้านจุลชีววิทยา ซึ่งรายการทดสอบทางจุลชีววิทยา ประกอบด้วย coliforms, fecal coliforms, *E. coli* และเชื้อก่อโรคอื่นๆ รวมทั้ง *Legionella* spp. โดยปัจจุบันวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน (Reference standard) คือ วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method) ซึ่งต้องใช้ความชำนาญในการอ่านผลการทดสอบ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะและใช้เวลานานกว่า 15 วันในการดำเนินการ จากข้อจำกัดของการทดสอบ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าว อาจทำให้การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคลีเจียนเนร์ไม่ทัน ต่อสถานการณ์ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. และ ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีดังกล่าว เพื่อให้ได้วิธีที่มีความรวดเร็วขึ้น มีความไว (Sensitivity) และมีความจำเพาะสูง (Specificity) สำหรับใช้ทดสอบทางห้องปฏิบัติการ โดยวิธีที่ศึกษาในครั้งนี้ คือ วิธี Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) ซึ่งถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ในตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมหลายชนิด เช่น *E.coli*, *L.monocytogenes*, SARS-CoV-2, enteroviruses และ adenoviruses เป็นต้น โดยเปรียบเทียบความสอดคล้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธี มาตรฐานเพื่อเป็นข้อมูลความน่าเชื่อถือสำหรับนำไปใช้ในการเฝ้าระวังและป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 พัฒนาวิธีทดสอบสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR)
- 1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR) เทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

1.3 เป้าหมายและตัวชี้วัดความสำเร็จ

- 1.3.1 ได้วิธีทดสอบสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR)
- 1.3.2 กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย สามารถเปิดให้บริการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยใช้วิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR) ใช้เวลาในการทดสอบที่รวดเร็วกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method) ถึง ๑๔ วัน เหมาะสมที่จะใช้ในการวินิจฉัย หรือในสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ (Legionnaire)

1.5 คำศัพท์และนิยาม

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

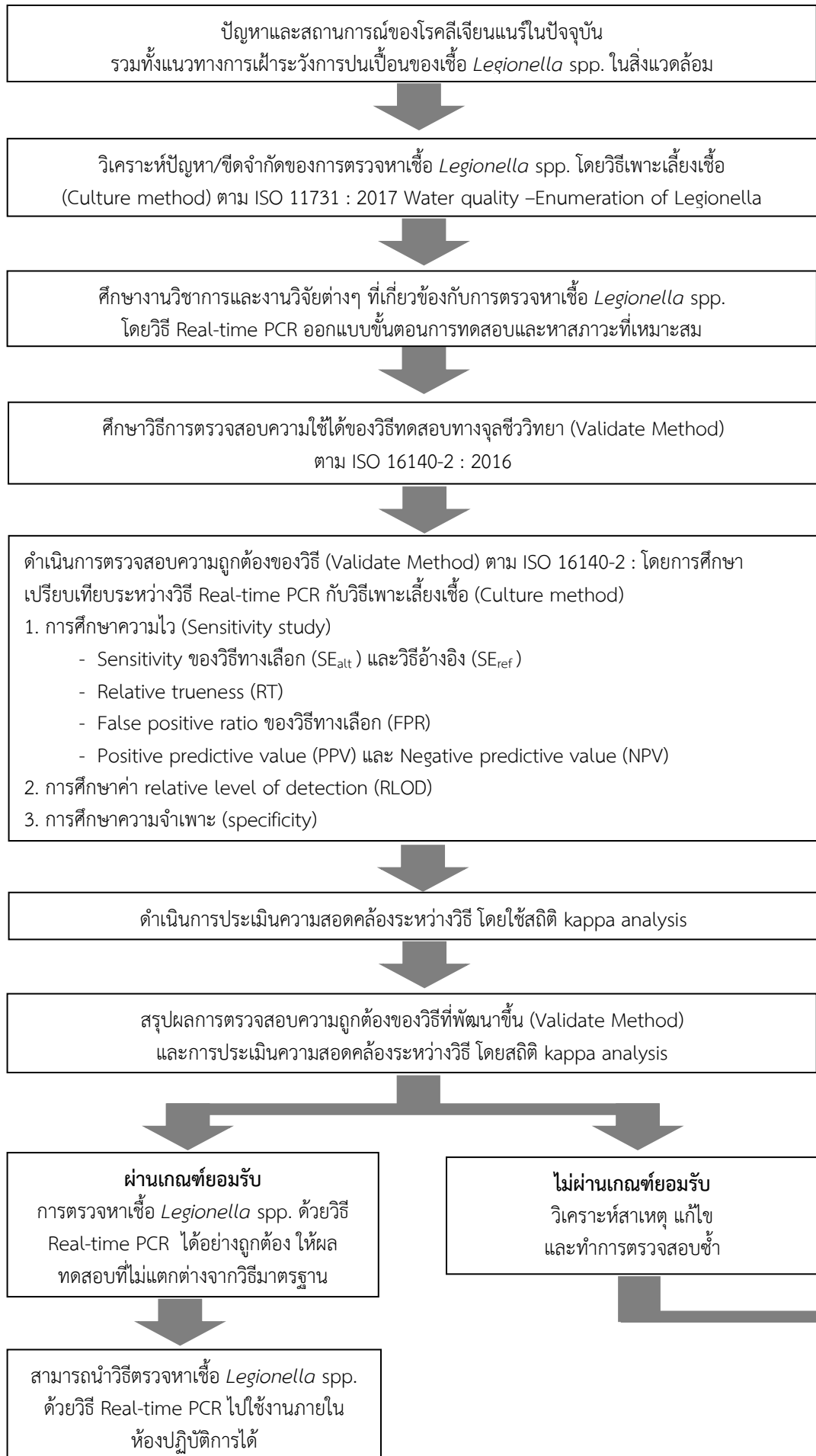
- **โรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires' disease)** เป็นโรคติดเชื้ออย่างฉับพลันจากแบคทีเรียกลุ่มลิจิโอเนลลา สปีชีส์ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากลิจิโอเนลลา นิวโมฟีลา มักเกิดในผู้ชายสูงอายุโดยเฉพาะผู้ที่สูบบุหรี่หรือผู้ที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง เนื่องจากเป็นโรคบางชนิดหรือการใช้สารเคมี ทั้งนี้ในระยะแรกจะมีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ 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 เชื้อลีสทีโอเนลลา (*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 เชื้อลีสทีโอเนลลา (*Legionella* spp.) กับการก่อโรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires disease)

2.1.1 ลักษณะและวงจรชีวิตของเชื้อลีสทีโอเนลลา (*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 มีขนเล็กโบก สะบัดและมีแฟลกเจลลาหนึ่งอัน ช่วยให้เชื้อสามารถเคลื่อนไหวได้รวดเร็ว^[1]

ภาพที่ 1 เชื้อลีสทีโอเนลลาจากการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE with cysteine (A)

และเชื้อลีสทีโอเนลลาจากการย้อมสีแกรม (B)

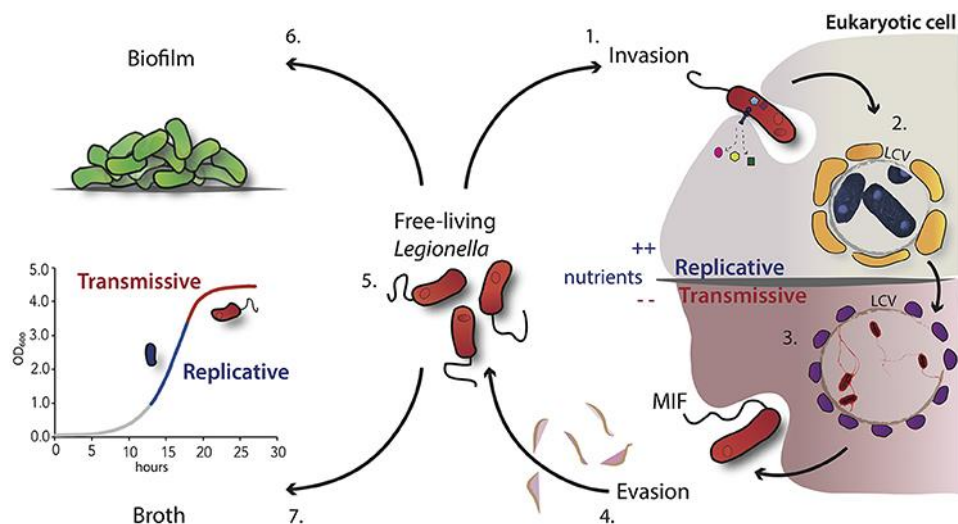
Legionella spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญยาก (fastidious bacteria) ไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป ต้องการกรดอะมิโน L-cysteine และธาตุเหล็กสำหรับเจริญเติบโต ไม่สลายคาร์โบไฮเดรต (nonsaccharolytic) มีเอนไซม์โปรติเอส (protease) คาตาเลส (catalase) และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) *Legionella* spp. ประกอบด้วย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

กว่าเชื้อกลุ่ม 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* เจริญได้ที่ อุณหภูมิ 20–50 องศาเซลเซียส และอยู่ในแหล่งน้ำทั่วไป ทำให้แพร่เชื้อได้ในชุมชนหรือแม้กระทั่ง ในสถานพยาบาล สำหรับเชื้อ *Legionella* สปีชีส์อื่นๆ ที่มีการตรวจพบว่ามีก่อโรคได้ ได้แก่ *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* และ *L. longbeachae*^[2]

Legionella spp. สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดินโคลน ทะเลสาบ ลำธาร และแหล่งน้ำ ที่มนุษย์สร้างขึ้นหรือที่ที่มีความชื้น เช่น น้ำหล่อเย็น (cooling water) หัวฝักบัวอาบน้ำ (shower) สระว่ายน้ำ เป็นต้น สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานหลายเดือนในสิ่งแวดล้อมที่มีความชื้นสูง และแบ่งตัวในที่ที่มี สารอาหารและอินทรีย์วัตถุ เชื้อจะอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นโดยเฉพาะโปรโตซัว (protozoa) โดยรวมกลุ่มกัน เป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) นอกจากนี้เชื้อ *Legionella* สามารถดำรงชีวิตและแบ่งตัวภายในเซลล์ของ โปรโตซัวได้ จึงทำให้เชื้อทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสม^[2]

การติดเชื้อเกิดจากการหายใจเอาละอองอากาศหรือละอองน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป หรือสำลัก เอน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป 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 เชื้อสามารถยับยั้งการรวมตัวกัน ของ phagosome และ lysosome ทำให้ไม่ถูกทำลายจากเอนไซม์ใน lysosome จากนั้นเชื้อออกมาอยู่ใน cytoplasm แบ่งตัวเพิ่มจำนวน และออกจากเซลล์โดยการทำให้เซลล์แตก สามารถไปติดเชื้อในเซลล์ อื่นๆ ต่อไป หลังจากร่างกายมีการติดเชื้อ *L. pneumophila* เชื้อแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ใน alveolar macrophage^[7]

วงจรชีวิตของเชื้อ *Legionella* spp.^[8]



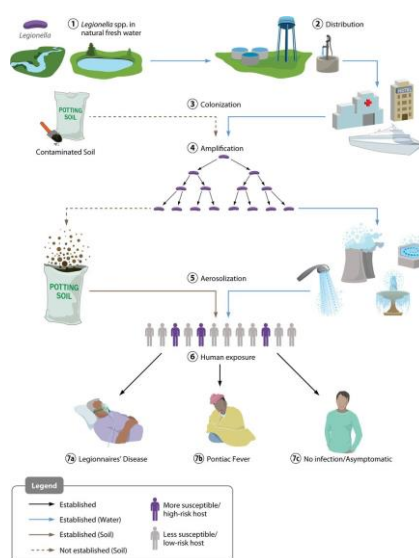
ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อ *Legionella* spp.

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.) ซึ่งเชื้อมีชีวิตได้จากระบบน้ำร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดละอองน้ำ เช่น Cooling Tower (ของเครื่องปรับอากาศแบบรวมที่ใช้ในอาคารใหญ่ๆ เช่น ในโรงแรมหรือโรงพยาบาล) น้ำพุเทียม เครื่องเพิ่มความชื้นและภาชนะน้ำทิ้งของเครื่องเป่าลมเย็น เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อได้จากน้ำประปาที่ร้อนและท่อเย็น อ่างน้ำร้อน บ่อ บึง และสระน้ำ รวมถึงจากดินริมตลิ่งของแหล่งน้ำเหล่านี้ด้วย โดยเชื้อมีชีวิตได้เป็นเดือนในน้ำประปาและน้ำกลั่น ในสภาวะที่เหมาะสมเชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและฟุ้งกระจายสู่สิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำได้ [9]

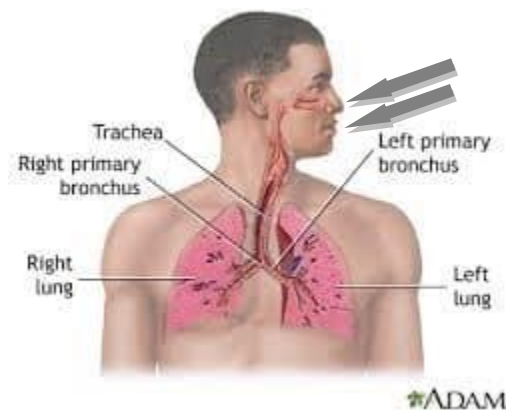


ภาพที่ 3 แหล่งรังโรคและการแพร่กระจายของเชื้อ *Legionella* spp. ในสิ่งแวดล้อม

การติดเชื้อลิจิโอเนลลาและลักษณะอาการของโรค : การติดต่อผ่านทางอากาศ (Airborne transmission) โดยการสูดหายใจเอาละอองน้ำ (อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 5 ไมครอน) หรือผ่านทางสารน้ำที่มีเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เข้าปอด ซึ่งเป็นวิธีการติดต่อที่พบได้มากที่สุด ส่วนการแพร่เชื้อจากคนไปสู่คนยังไม่มีปรากฏ 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 การป่วยค่อนข้างรุนแรงและอาจทำให้การหายใจล้มเหลว อัตราการเสียชีวิต 15-20% โดยโรคลีเจียนแนร์จะมีช่วงระยะเวลาการฟักตัวของเชื้อประมาณ 2 - 10 วัน โดยผู้ที่ได้รับเชื้อลิจิโอเนลลาเข้าสู่ร่างกาย จะยังไม่แสดงอาการในระยะแรกๆ 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 ลักษณะและจำนวนของเชื้อ ในปริมาณที่มากพอ 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 ขึ้นกับประสบการณ์ของเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ ส่วนการวินิจฉัยใช้ปอนเตียกมักจะใช้วิธีย้อมสี Direct immune fluorescent antibody stain จากเนื้อเยื่อที่อาการมีความสอดคล้องกับกลุ่มโรคทางระบบทางเดินหายใจ การทดสอบแอนติเจนจากปัสสาวะและเสมหะสามารถใช้ยืนยันผลการวินิจฉัยได้ แต่ความแม่นยำของการวินิจฉัยจะต่ำกว่า^[10]

การรักษา ใช้ปอนเตียกไม่จำเป็นต้องรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ สามารถหายเองได้ สำหรับคำแนะนำในการรักษาโรคลีเจียนแนร์ คือ ใช้ยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolones) เช่น ยาเลโวฟลอกซาซิน (Levofloxacin) หรือยาแมโครไลด์ (Macrolide) ชนิดใหม่ ยาอะซิโทรไมซิน (Azithromycin) การศึกษาจากการสังเกตชี้ให้เห็นว่ายาเลโวฟลอกซาซิน (Levofloxacin) อาจจะมีผลข้างเคียงมากกว่ายาแมโครไลด์ (Macrolide) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง ยาไรแฟมปีซิน (Rifampicin) ถูกนำมาใช้ร่วมด้วยในผู้ป่วยที่การรักษาล้มเหลว แต่ข้อมูลที่ใกล้เคียงข้อสนับสนุนนี้ยังมีไม่เพียงพอ แต่ยาในกลุ่มเพนิซิลลิน (Penicillin), เซฟาโลสปอริน (Cephalosporins) และยาอะมิโนกลัยโคไซด์ (Aminoglycosides) จะใช้รักษาไม่ได้ผล^[10]

มาตรการป้องกันโรค แหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างเป็นแหล่งแพร่โรคปฐมภูมิของโรคลีเจียนแนร์ ดังนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหลีกเลี่ยงสภาวะที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Legionella* โดยเมื่อไม่ได้ใช้งาน หอหล่อเย็น/หอผึ่งเย็นต้องเปิดน้ำทิ้งให้แห้ง และทำความสะอาดถังคราบโคลและตะกอนเดิม Biocides ในปริมาณที่พอเหมาะเพื่อป้องกันการก่อตัวของไบโอฟิล์ม ตั้งอุณหภูมิระบบน้ำร้อนให้สูงกว่าหรือเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส เพื่อลดความเสี่ยงต่อการแพร่เชื้อ^[1]

มาตรการควบคุมการระบาด ค้นหาปัจจัยเสี่ยงร่วมและทบทวนบันทึกการบำรุงรักษาระบบน้ำที่อาจเป็นแหล่งโรค ในการหาสาเหตุของการระบาดนั้นอาจมีความจำเป็นต้องเพาะเชื้อจากแหล่งโรค การแก้ไข/ฟื้นฟูแหล่งน้ำทำได้โดยการเติมคลอรีน และ/หรือให้ความร้อนระดับสูง ซึ่งพบว่าได้ผลดี การบำรุงรักษาและการฆ่าเชื้ออย่างเหมาะสมในอ่างน้ำวนของสปา, หอหล่อเย็น, และแหล่งน้ำดื่ม น้ำใช้เป็นมาตรการที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการป้องกันการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ได้^[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. ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่าง swab สุขภัณฑ์ต่างๆ^[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 และควบคุมการระบาดของโรคลีเจียนเนรีในระหว่างกลุ่มสมาชิกรวม 29 ประเทศ ซึ่งเมื่อประเทศในกลุ่ม สมาชิกพบผู้ป่วยตั้งแต่ 2 รายขึ้นไป ที่เดินทางมาท่องเที่ยวต่างประเทศและพักอยู่โรงแรมเดียวกัน (โดย พิจารณาจากระยะพักตัวของโรค) จะมีการดำเนินการแจ้งข้อมูลไปยังหน่วยงานสาธารณสุขของประเทศที่เกิดเหตุและหน่วยงานสาธารณสุขของแต่ละประเทศในเครือข่าย เพื่อแนะนำไม่ให้ประชาชนในกลุ่ม ประเทศนั้นๆ เดินทางเข้าไปท่องเที่ยวในประเทศที่เกิดเหตุ ซึ่งอาจสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจให้แก่ ประเทศไทยได้ สถานการณ์ของโรคลีเจียนเนรีโดยรวมในประเทศไทย 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 นอกจากนี้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องควร رصدขึ้นเรื่องมาตรการการป้องกันควบคุมโรค อย่างเข้มแข็งกับธุรกิจโรงแรม สป่า ให้มีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อในระบบน้ำ/ท่อส่งน้ำ ภายในโรงแรมอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ^[16]

2.2 การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะเจาะจงและ การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันคุณสมบัติของเชื้อ^[17]

วิธีทดสอบในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. อ้างอิงตามมาตรฐาน ISO 11731 : 2017 Water quality – Enumeration of *Legionella* โดยก่อนการทดสอบต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อเป้าหมาย (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 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GVPC agar (อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered charcoal yeast extract; BCYE ที่มีส่วนผสมของ glycine, vancomycin, polymyxin B และ cycloheximide) แล้ว spread plate ให้ตัวอย่างเกลี่ยทั่ว ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน หากพบโคโลนีที่คาดว่า จะเป็น *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 เป็นเวลา 2-5 วัน เมื่อครบระยะเวลาให้อ่านผลการทดสอบ หากเป็นเชื้อ *Legionella* spp. ต้องสามารถ เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar with L-cysteine และไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 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 จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาสกัดเพื่อให้ได้สารพันธุกรรม (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)

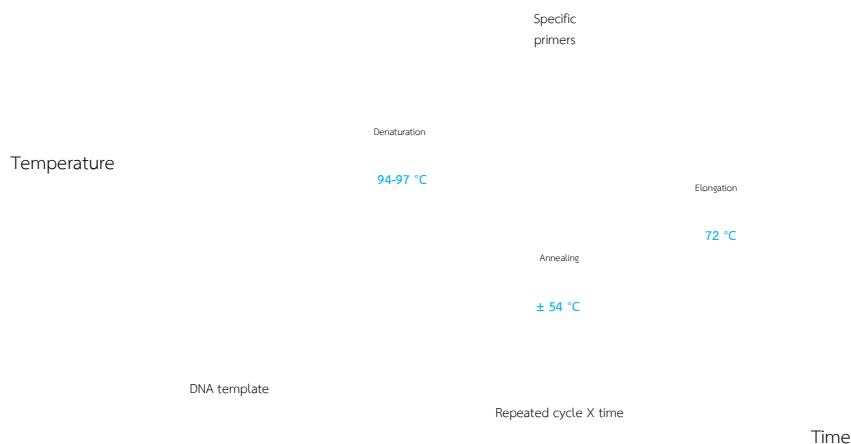
กรณีการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ที่มีสารพันธุกรรมชนิด RNA เช่น ไวรัส SARS-CoV-2 จะมีขั้นตอนการเปลี่ยน RNA เป็น DNA (reverse transcription; RT) จึงเรียกเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ว่า “Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real-time RT-PCR)” ก่อนการทำ real-time PCR วิธีการตรวจจึงเป็น Real-time 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 ดังนั้นจึงไม่ได้อธิบายความว่าน้ำยาต่างยี่ห้อกันที่ใช้ยีนเป้าหมายเดียวกันจะมีความไว (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 ชนิด (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 เป็นการทำลายพันธะระหว่าง 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 ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์ 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 จะเพิ่มจำนวนทีละไม่มากนัก เรียกว่า lag phase (1) แต่เมื่อมีจำนวนมากขึ้นถึงระดับหนึ่ง จำนวน product จึงจะเพิ่มแบบทวีคูณ เรียกว่า exponential phase (2) จนกระทั่งไม่มี polymerase หรือ nucleotides เหลืออยู่ ทำให้ปริมาณคงที่ เป็นระยะที่เรียกว่า plateau phase (3) ดังภาพที่ 6

Number

Time

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]

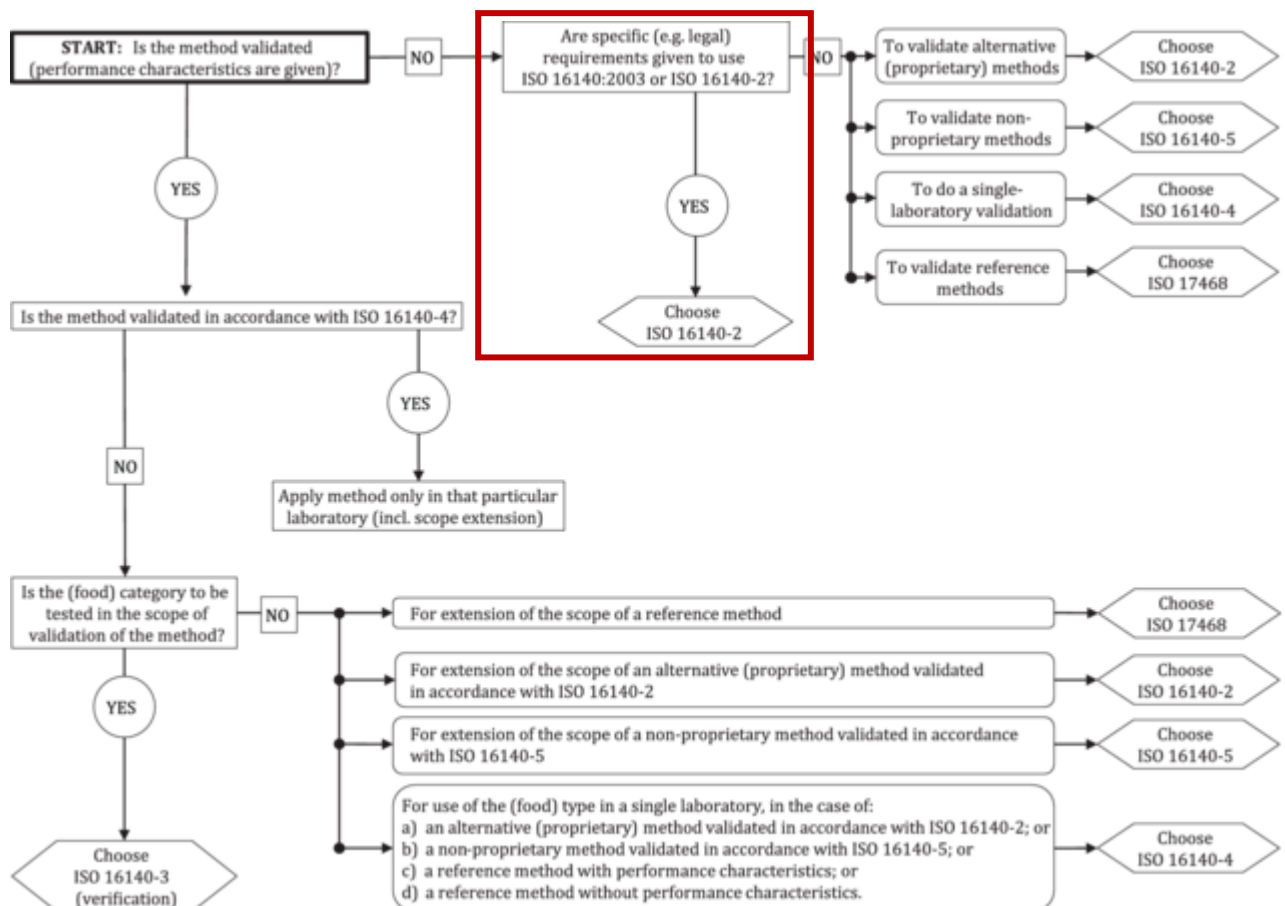
5) ISO 16140 -5 : 2020 - Microbiology of the food chain – Method validation – Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods. เป็นมาตรฐานที่ระบุหลักการทั่วไปและขั้นตอนทางเทคนิคสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเลือก (วิธีที่พัฒนาขึ้น) โดยทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการหลายๆ 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 (ตาม 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 ห้องปฏิบัติการต้องเลือกใช้วิธีที่เป็นปัจจุบันในระดับวิธีมาตรฐานระหว่างประเทศ ระดับภูมิภาค หรือระดับประเทศ หรือเป็นวิธีในตำราหรือวารสารทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องซึ่งรับรองโดยหน่วยงานด้านวิชาการที่เชื่อถือได้ ถ้าห้องปฏิบัติการต้องการใช้วิธีที่ไม่เป็นมาตรฐาน (non-standard method) วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเอง วิธีที่มีการขยายหรือดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (modified method) รวมทั้งการใช้วิธีมาตรฐานนอกขอบข่ายที่กำหนดไว้ หรือวิธีที่พัฒนาเป็นชุดทดสอบอย่างง่าย 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 (เชื้อที่จะคัดเลือกรมาทดสอบ ควรเป็นเชื้อที่มีโอกาสเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อเป้าหมาย หรือมีโอกาสให้ผลทดสอบบวกเช่นเดียวกับเชื้อเป้าหมาย)

2.5 การประเมินความสอดคล้องของข้อมูลด้วยสถิติ kappa analysis^[26]

Kappa coefficient หรือ Cohen's kappa coefficient นั้นเป็นค่าสถิติที่ใช้ทดสอบความสอดคล้อง (Consistency) กันของข้อมูล 2 กลุ่ม ในบางกรณีอาจใช้สำหรับเปรียบเทียบการประเมินค่าของข้อมูลชุดเดียวกันจากผู้ประเมิน 2 คนหรือวิธีทดสอบ 2 วิธี โดย Kappa coefficient นั้นไม่จำเป็นต้องอาศัยสมมุติฐานที่ว่าข้อมูลที่สนใจนั้นมีการแจกแจงแบบปกติ (Normal distribution) หรือที่เรียกว่า Non-parametric statistic ผลลัพธ์ที่ได้จาก Kappa coefficient นั้นจะอธิบายถึงความสอดคล้องระหว่างกันของ 2 ชุดข้อมูลว่าให้ผลเชิงบวกเหมือนกันหรือให้ผลเชิงลบเหมือนกัน โดยการแปลความหมายของค่าสถิติ Kappa ที่คำนวณได้พิจารณาดังตารางที่ 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 แหล่งที่อาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อและเชื้อก่อโรค ดังนี้ นิรภา คงกันคง และคณะ (2543) ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในระบบน้ำทางพันตกรรมในคณะทันตแพทยศาสตร์ 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 และสารเคมีป้องกันการกัดกร่อนและเกิดตะกอนด้วย^[28]

อติเทพ จินา และคณะ (2551) ทำการสอบสวนสิ่งแวดล้อมในสถานที่เกิดโรคลีเจียนเนร์ ในนักท่องเที่ยวชาวเดนมาร์ก ตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา มิถุนายน 2551 โดยเก็บตัวอย่างน้ำส่งตรวจเพื่อหาเชื้อ *Legionella* spp. ผลการสอบสวนพบผู้ป่วยยืนยันโรคลีเจียนเนร์ เป็นชาวเดนมาร์ก 2 ราย โดยรายแรกเป็นผู้ป่วยเพศหญิงอายุ 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) ^[29]

โรม บัวทอง และคณะ (2556) ทำการสอบสวนการระบาดของโรคลีเจียนเนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป ภายหลังจากการเดินทางมาท่องเที่ยวในจังหวัดภูเก็ต ธันวาคม 2549 – มกราคม 2550 เนื่องจากได้รับแจ้งจากสถานทูตอังกฤษประจำประเทศไทยว่า มีนักท่องเที่ยว 4 ราย ป่วยด้วยโรคลีเจียนเนร์ภายหลังจากมาเที่ยวในจังหวัดภูเก็ต ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2549 ทำการศึกษาโดยค้นหาผู้ป่วยเพิ่มเติมโดยใช้นิยามตาม European Working Group for *Legionella* Infection (EWGLI) Network และเก็บตัวอย่างน้ำส่งตรวจเพื่อเพาะเชื้อ *Legionella* spp. ได้แก่ น้ำในหอฝักเย็น น้ำในห้องพัก ผลการสอบสวนพบผู้ป่วยยืนยัน 5 ราย และผู้ป่วยเข้าข่าย 1 ราย ทั้งหมดเป็นชาวแสกนดิเนเวีย เชื้อที่เป็นสาเหตุ คือ *L. pneumophila* serogroup 1 และผลการเพาะเชื้อจากแหล่งน้ำต่างๆ ในโรงแรม พบเชื้อ *Legionella* spp. ซึ่งได้แก่ น้ำจากฝักบัว น้ำจากอ่างล้างหน้า โดยไม่พบในหอฝักเย็น 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 โดยได้เก็บตัวอย่างน้ำจากหอฝักเย็น 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 หอฝักเย็น 10 ตัวอย่าง เครื่องผลิตน้ำอุ่น - น้ำร้อน 1 ตัวอย่าง และถังพักน้ำ/แทงค์น้ำ 1 ตัวอย่าง ^[29]

ชาลิตา อานนท์ และคณะ (2558) ทำการสอบสวนการระบาดของโรคลีเจียนเนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป หมู่ที่ 5 ตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ระหว่างวันที่ 2 - 5 มิถุนายน 2558 หลังได้รับแจ้งจากเครือข่ายลีเจียนเนร์ของสหภาพยุโรป (European Legionnaires' Disease Surveillance Network : ELDSNet) ผ่านสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ว่ามีนักท่องเที่ยว 2 ราย ป่วยเป็นโรคลีเจียนเนร์ หลังจากมาพักที่โรงแรมแห่งหนึ่งในตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ทีมได้ดำเนินการสอบสวนโรค โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากห้องพักผู้ป่วย บ่อพักน้ำ น้ำจากห้องสปา และ swab สุขอนามัย 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 สุขอนามัยจำนวน 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) ได้ศึกษาเรื่องเครือข่ายการเฝ้าระวังการแพร่เชื้อ *Legionella* spp. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปี 2557 – 2558 โดยได้ดำเนินการตรวจเยี่ยมโรงแรมที่เข้าร่วม

เครือข่าย 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 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 ที่มีโอกาสก่อให้เกิดความเสี่ยงในการติดเชื้อลิจิโอเนลลา การตรวจทางห้องปฏิบัติการในการตรวจหาเชื้อลิจิโอเนลลาก็ถือว่ามีความสำคัญอย่างมากสำหรับระบบการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่ได้ศึกษาวิธีในการตรวจหาเชื้อลิจิโอเนลลา 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 พบว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ 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 method ตรวจพบ *L. lytica* และ *L. rowbothamii* ดังนั้นการนำวิธี qPCR มาใช้ร่วมกับ amoebic co-culture method จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการตรวจหาเชื้อลิจิโอเนลลา ^[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% และ specific 100% สำหรับเชื้อ *L. pneumophila* ^[32]

D. Eble (2021) การตรวจหาปริมาณ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ โดยทั่วไปมักใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ตามมาตรฐาน ISO 11731 ซึ่งวิธีนี้ต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ถึง 15 วัน และในขั้นตอนการยืนยันสปีชีส์ของเชื้อก็มีความยุ่งยาก อาจเกิดความผิดพลาดได้ งานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาในขั้นตอนการยืนยันจากโคลินของเชื้อที่สงสัย 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) เมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับที่ 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. จากตัวอย่างน้ำมีความยุ่งยาก เนื่องจากจะต้องใช้ประสบการณ์ทางห้องปฏิบัติการ ต้องใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานในการทดสอบ รวมทั้งในตัวอย่างน้ำมักมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ จำนวนมากทำให้ย่ียรบกวนต่อผลการทดสอบได้ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อตาม ISO 11731 กับวิธี qPCR ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่าวิธี qPCR ให้ผลลบกับเชื้ออื่นๆ 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. worleensis* (20.8%) ที่เหลือเป็น *L. dumoffi* และ *L. fairfieldensis* (4.1%) ซึ่งการพบเชื้อ *Legionella* ในแหล่งน้ำอาจเป็นอันตรายต่อระบบสุขภาพของประชาชนในพื้นที่ได้ จำเป็นต้องมีการติดตามอย่างสม่ำเสมอ เพื่อลดความเสี่ยงในการแพร่กระจายของเชื้อได้^[36]

วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ถือเป็นวิธีมาตรฐาน (Reference standard) ได้แก่ วิธีการเพาะเลี้ยง แต่เนื่องจากเชื้อ *Legionella* เป็นเชื้อที่เจริญยากต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ Buffered charcoal-yeast extract (BCYE) agar ที่มีกรดอะมิโน L-cysteine ผสมอยู่และต้องอาศัยระยะเวลาในการเจริญเติบโตมากกว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ โดยต้องเพาะเลี้ยงนานประมาณ 3-5 วัน ในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อ *Legionella* ที่อยู่ในสภาวะที่ยังมีชีวิต ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (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 ในการตรวจหา *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	1 กรัม
- Yeast Extract	5 กรัม
- Agar	7.5 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

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 BCYE Growth Supplement ด้วย Sterile solvent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในขวด BCYE agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- เหย้าอาหารเลี้ยงเชื้อและ BCYE Growth Supplement ให้เข้ากัน
- จากนั้นละลาย GVPC Supplement ด้วยน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมลงในขวด BCYE agar ที่มีการเติม BCYE Growth Supplement
- เหย้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE Growth Supplement และ GVPC Supplement ให้เข้ากัน จากนั้นเทแบ่งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับใช้งาน

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

ส่วนประกอบ

BCYE agar base

- | | |
|----------------------|---------------|
| - Activated Charcoal | 1 กรัม |
| - Yeast Extract | 5 กรัม |
| - Agar | 7.5 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 จากนั้นเทแบ่งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับใช้งาน

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

ส่วนประกอบ

BCYE agar base

- | | |
|----------------------|---------------|
| - Activated Charcoal | 1 กรัม |
| - Yeast Extract | 5 กรัม |
| - Agar | 7.5 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
- เชยอาหารเลี้ยงเชื้อและ 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 แบ่งใส่ขวดหรือหลอดตามปริมาตรที่ต้องการใช้งาน
- 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 แบ่งใส่ขวดหรือหลอดตามปริมาตรที่ต้องการใช้งาน
- 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

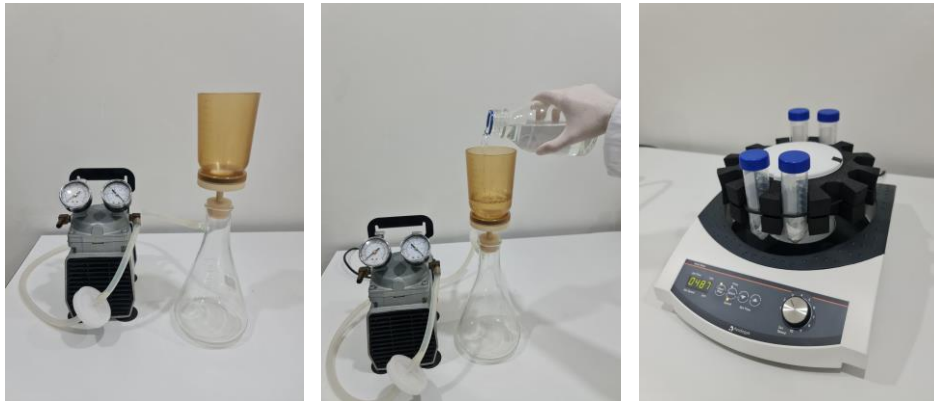
3.3 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ

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)

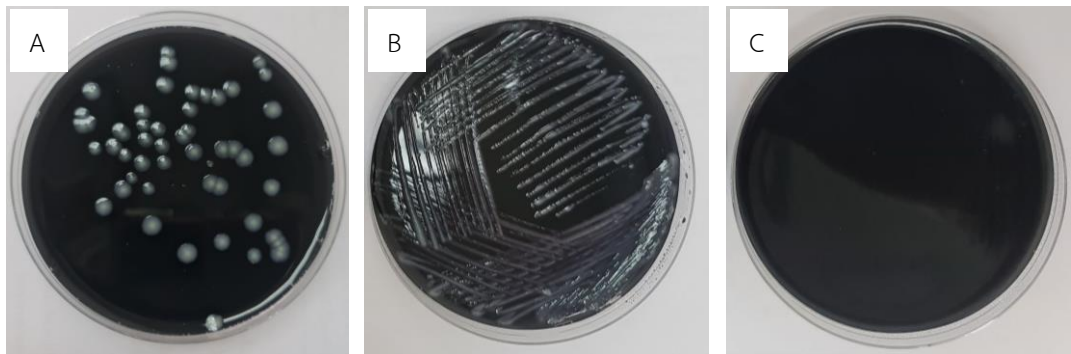
3.3.2 การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

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



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) เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 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 หรือเก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียสสำหรับรอการทดสอบต่อ
- 3) เตรียมส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR (master mix) ลงในหลอด PCR ซึ่งปริมาตรที่ใช้ แสดงดังตารางที่ 2

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

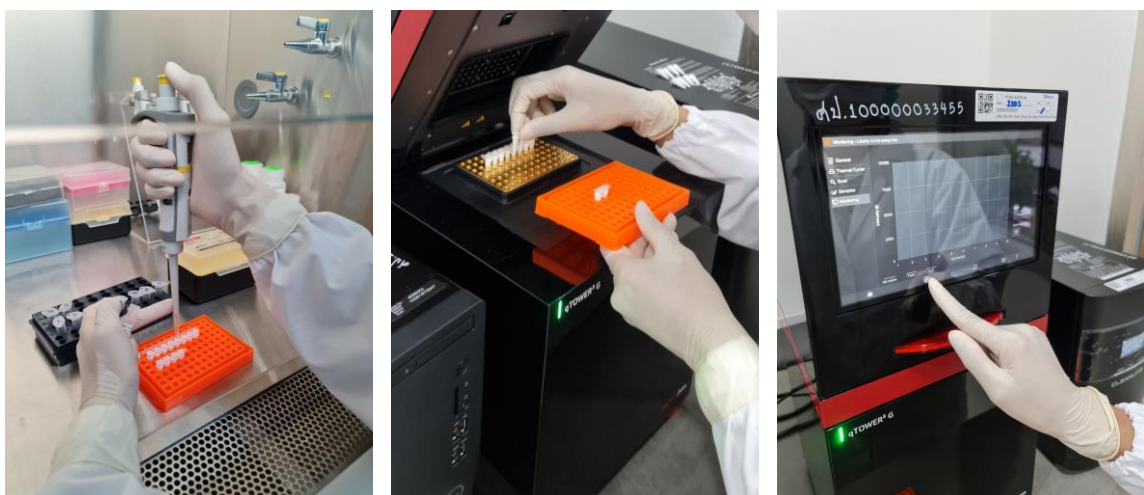
ส่วนประกอบ/ 1 reaction	
2X qPCR Master Mix	10 ไมโครลิตร
Legionella spp. Primer/probe mix	1 ไมโครลิตร
Internal Extraction Control Primer/probe mix	1 ไมโครลิตร
nuclease-free water	3 ไมโครลิตร
DNA sample (Template)	5 ไมโครลิตร
Final volume	20 ไมโครลิตร

- 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 โดยสภาวะของปฏิกิริยา PCR ดังค่าดังตารางที่ 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

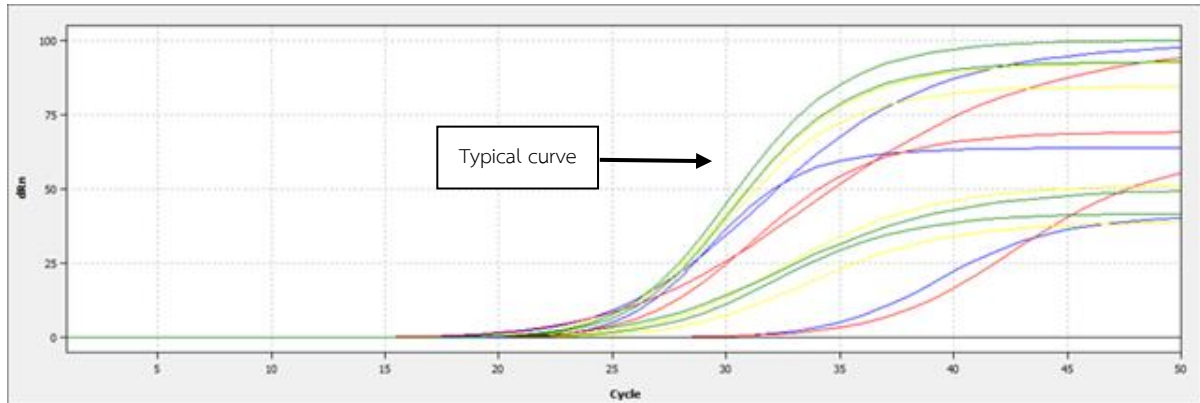


ภาพที่ 12 ขั้นตอนการเตรียม master mix และการตั้งค่าสภาวะของปฏิกิริยาสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* spp.

5) การแปลผลการทดสอบ

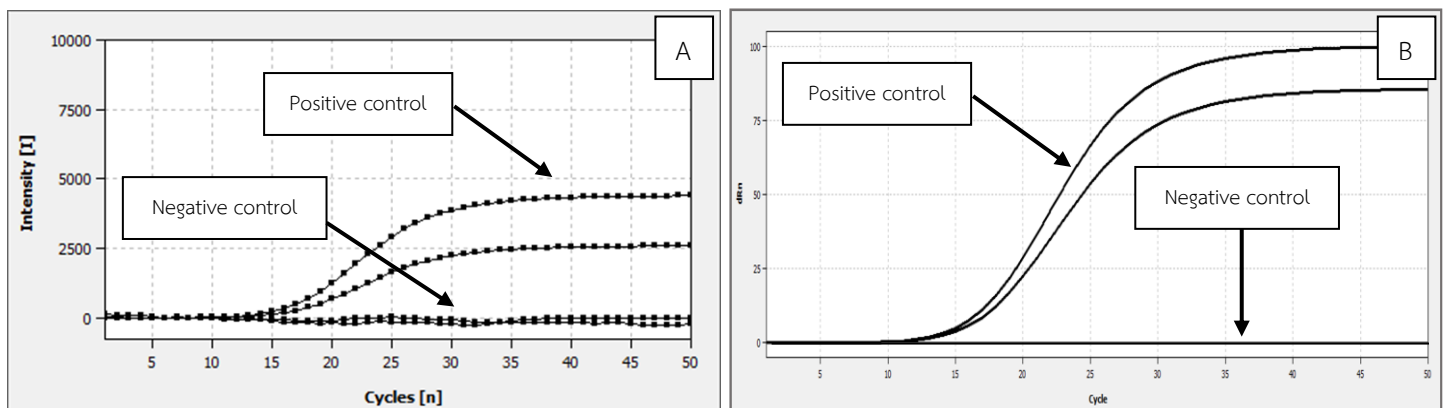
5.1) ก่อนการแปลผลการทดสอบตัวอย่างต้องตรวจสอบค่าการควบคุมคุณภาพการทดสอบทุกครั้ง ดังนี้

- 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

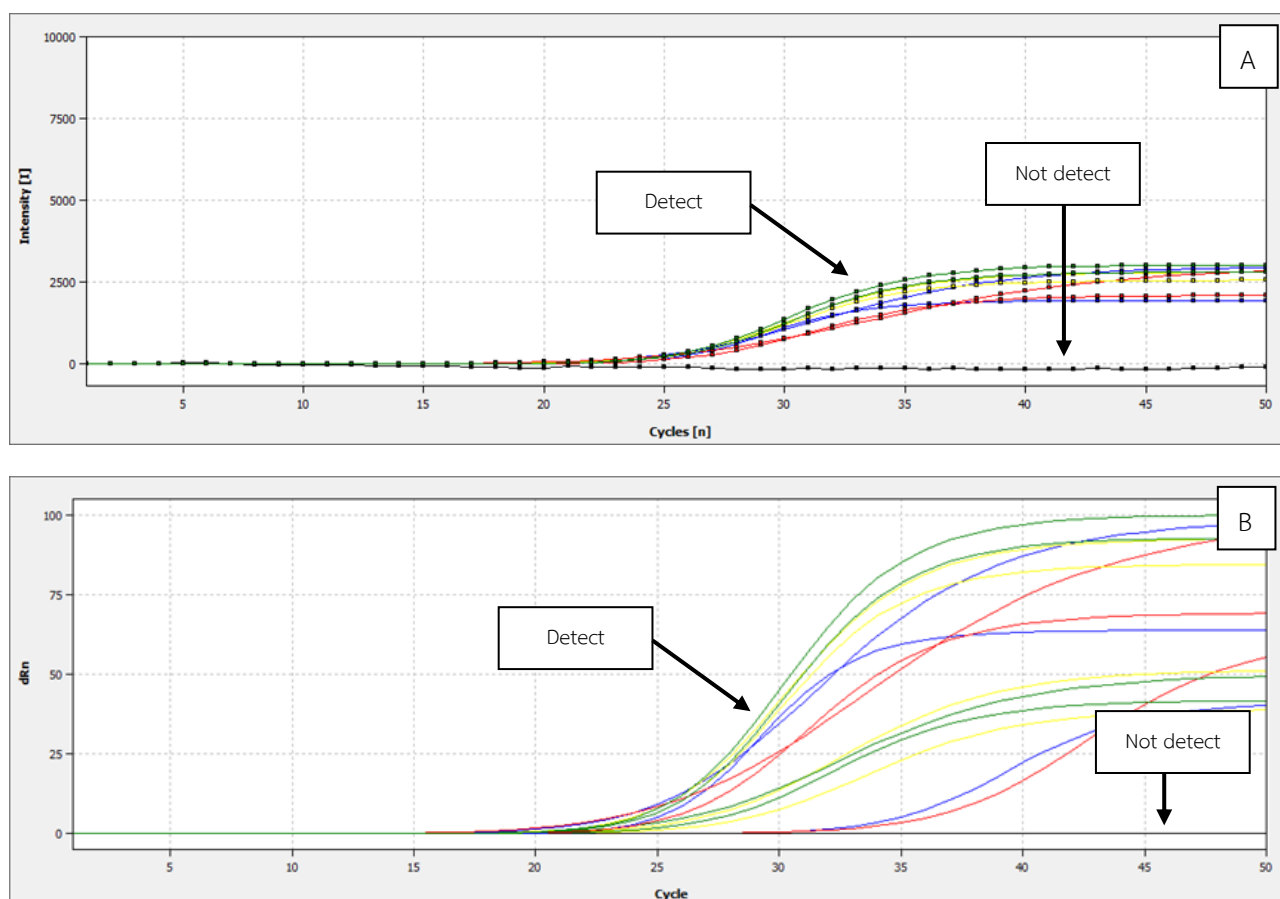
กรณีค่าการควบคุมคุณภาพไม่ผ่านต้องมีการหาสาเหตุและแก้ไขจนค่าการควบคุมคุณภาพผ่านจึงสามารถแปลผลการทดสอบได้

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
- ตัวอย่างจากน้ำพุระดับอาคาร

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

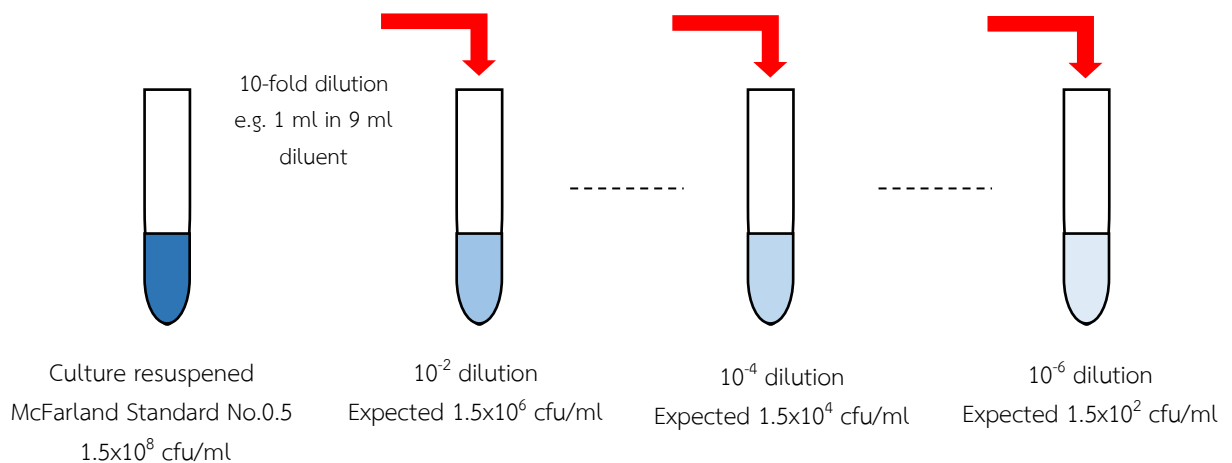
ตารางที่ 5 แสดงประเภทตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่าง สำหรับการศึกษาความไว (Sensitivity)

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)	

ประเภทตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อที่เติม	เชื้อที่เติม
น้ำพุระดับอาคาร	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)	

2) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้น

- 2.1) นำเชื้อ *L. pneumophila* (DMST 12800) จาก stock culture มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ buffered charcoal yeast extract agar (BCYE agar) ที่มีส่วนประกอบของ L-cysteine นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-7 วัน
- 2.2) นำโคลนเชื้อ *L. pneumophila* ละลาย (resuspended) ในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland Standard No.0.5 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 cfu/ml
- 2.3) ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จนถึงระดับความเข้มข้น 10^2 cfu/ml ดังภาพที่ 16
- 2.4) ทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจาง ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-7 วัน
- 2.5) นับจำนวนโคโลนีบน BCYE agar plate จะทราบปริมาณเชื้อตั้งต้นจริง (cfu/ml) ที่เติมลงในตัวอย่างทดสอบ



ภาพที่ 16 การเจือจางเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้น สำหรับศึกษาความไว (Sensitivity)

3) การเติมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงในตัวอย่างทดสอบ (Spike sample)

เตรียมตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

3.1) การเตรียมตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

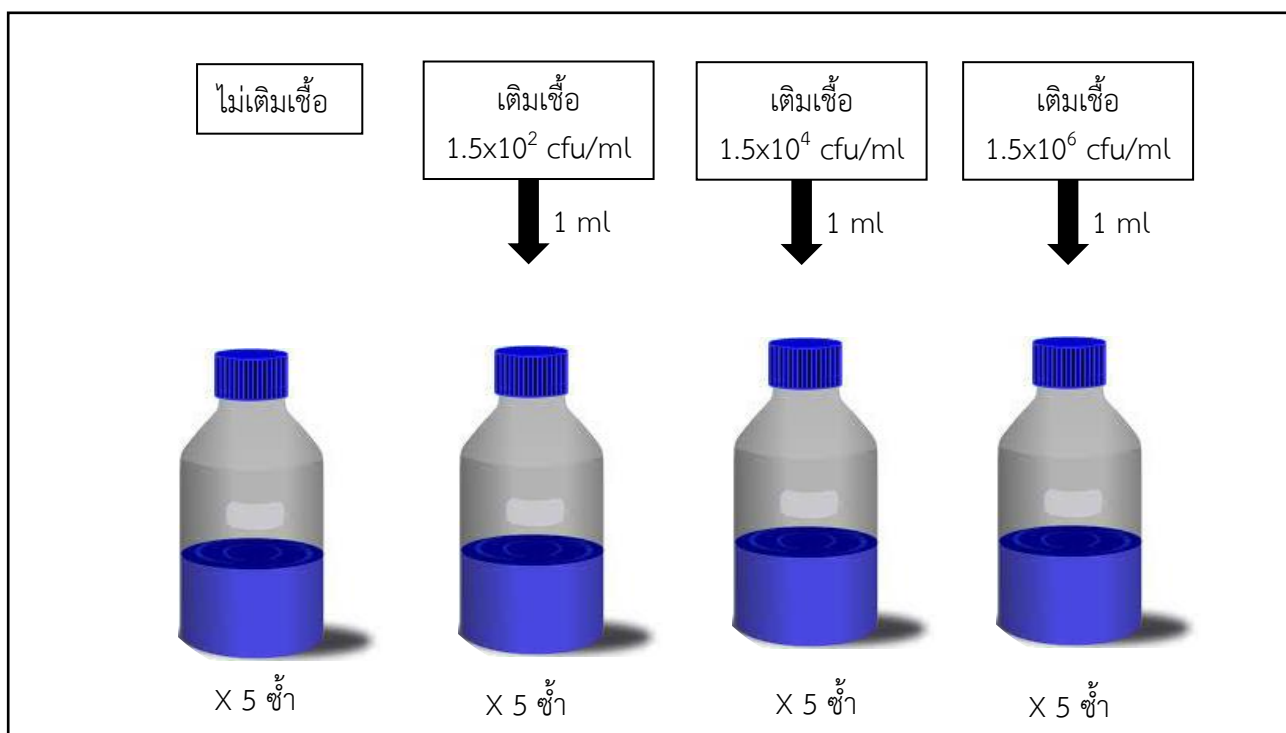
- ตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
ไม่เติมเชื้อ (0 cfu/ml)
- ตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
เติมเชื้อระดับต่ำ (1.5×10^2 cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร
- ตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
เติมเชื้อระดับกลาง (1.5×10^4 cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร
- ตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
เติมเชื้อระดับสูง (1.5×10^6 cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร

3.2) การเตรียมตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำ ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

- ตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
ไม่เติมเชื้อ (0 cfu/ml)
- ตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
เติมเชื้อระดับต่ำ (1.5×10^2 cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร
- ตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
เติมเชื้อระดับกลาง (1.5×10^4 cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร
- ตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
เติมเชื้อระดับสูง (1.5×10^6 cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร

3.3) การเตรียมตัวอย่างน้ำพุระดับอาคาร ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

- ตัวอย่างน้ำพุระดับอาคาร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
ไม่เติมเชื้อ (0 cfu/ml)
- ตัวอย่างน้ำพุระดับอาคาร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
เติมเชื้อระดับต่ำ (1.5×10^2 cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร
- ตัวอย่างน้ำพุระดับอาคาร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
เติมเชื้อระดับกลาง (1.5×10^4 cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร
- ตัวอย่างน้ำพุระดับอาคาร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด
เติมเชื้อระดับสูง (1.5×10^6 cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร



ภาพที่ 17 การเตรียมตัวอย่างที่เติมเชื้อ (Spike sample) สำหรับศึกษาความไว (Sensitivity)

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

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

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

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

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

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

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

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

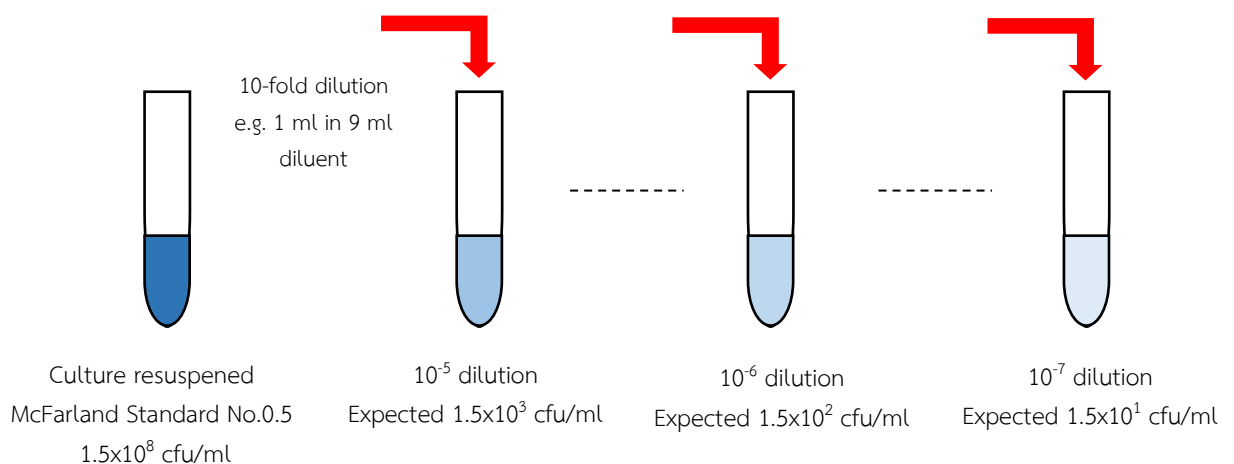
- 1) การเตรียมตัวอย่างทดสอบ ในการศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (RLOD) ใช้ตัวอย่างที่เติมเชื้อ ≥ 3 ระดับๆ ละหลายซ้ำ ดังนี้
 - ระดับที่ 1 ไม่เติมเชื้อ (negative control level) ทดสอบอย่างน้อย 5 ซ้ำ (ต้องไม่พบผลบวก หากพบผลบวก ต้องทำการทดสอบใหม่ ทุกระดับ)
 - ระดับที่ 2 เติมเชื้อระดับต่ำ (low level) ซึ่งเป็นระดับที่ให้ผลบวก (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 และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่างสำหรับการศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (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)	

2) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้น

- 2.1) 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
- 2.2) นำโคลนเชื้อ *L.pneumophila* ละลาย (resuspended) ในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland Standard No.0.5 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 cfu/ml
- 2.3) ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จนถึงระดับความเข้มข้น 10^1 cfu/ml ดังภาพที่ 18
- 2.4) ทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจาง ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน
- 2.5) นับจำนวนโคโลนีบน BCYE agar plate จะทราบปริมาณเชื้อตั้งต้นจริง (cfu/ml) ที่เติมลงในตัวอย่างทดสอบ

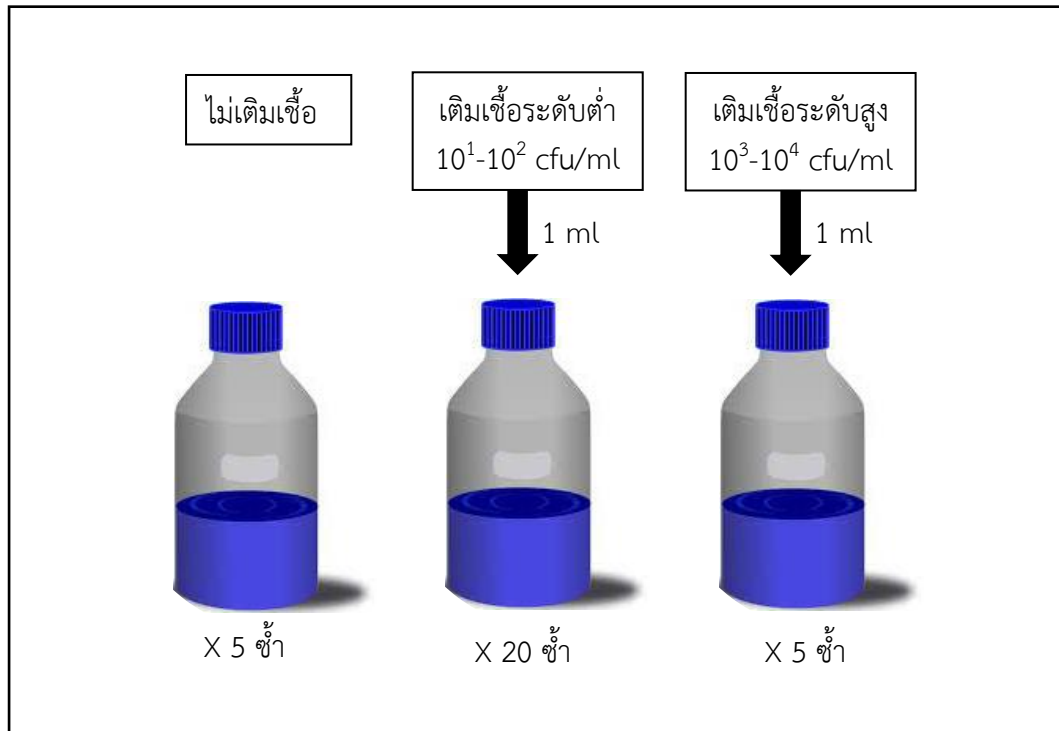


ภาพที่ 18 การเจือจางเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้น สำหรับศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (relative level of detection: RLOD)

3) การเติมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงในตัวอย่างทดสอบ (Spike sample)

เตรียมตัวอย่าง ดังนี้

- 3.1) การเตรียมตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ประกอบด้วย
 - ตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด ไม่เติมเชื้อ (0 cfu/ml)
 - ตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 20 ขวด เติมเชื้อระดับต่ำ ($10^1 - 10^2$ cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร
 - ตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด เติมเชื้อระดับสูงขึ้น ($10^3 - 10^4$ cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร



ภาพที่ 19 การเตรียมตัวอย่างที่เติมเชื้อ (Spike sample) สำหรับศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (relative level of detection: RLOD)

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)

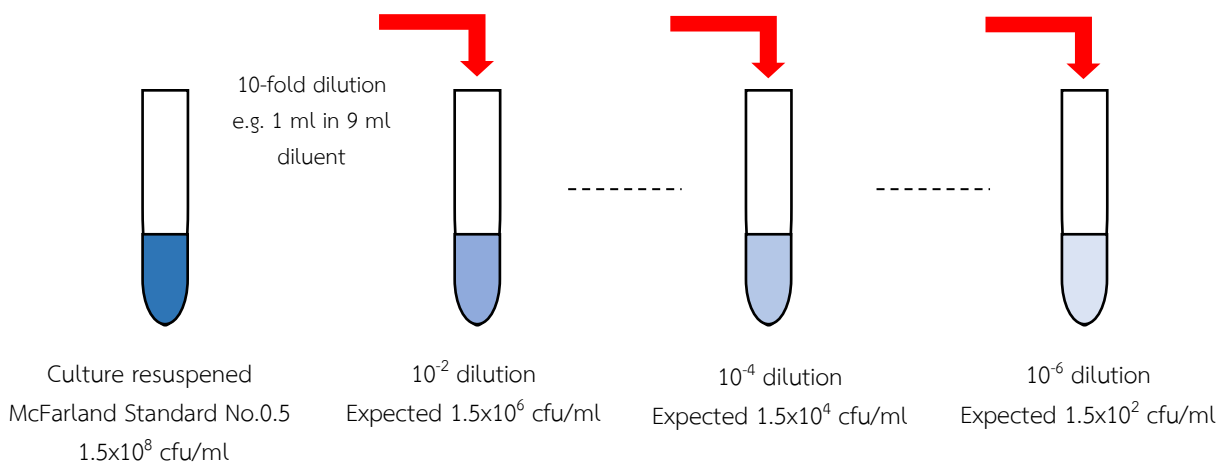
3.4.3.1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างทดสอบ/จำนวนตัวอย่าง

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) ที่มีส่วนผสมของ L-cysteine นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน
- 1.2) นำโคโลนีเชื้อ *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 20 การเจือจางเชื้อ *L. pneumophila* สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)

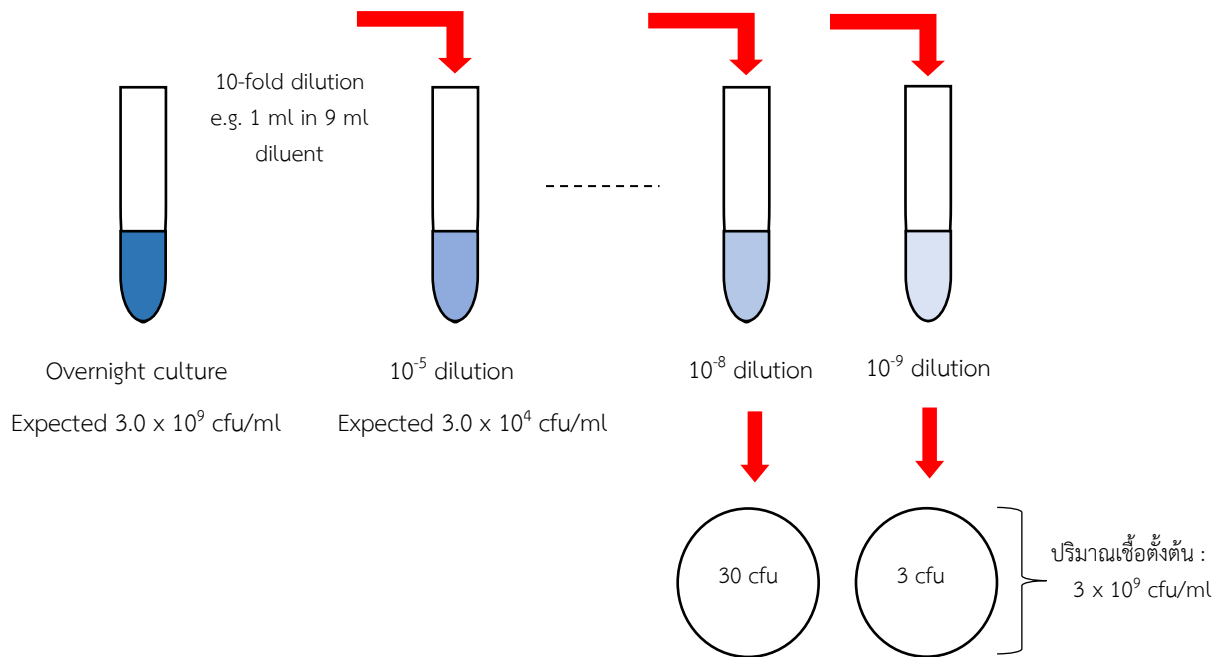
2) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้นสำหรับเป็นเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย (Non-target microorganism)

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	
	<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 21 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

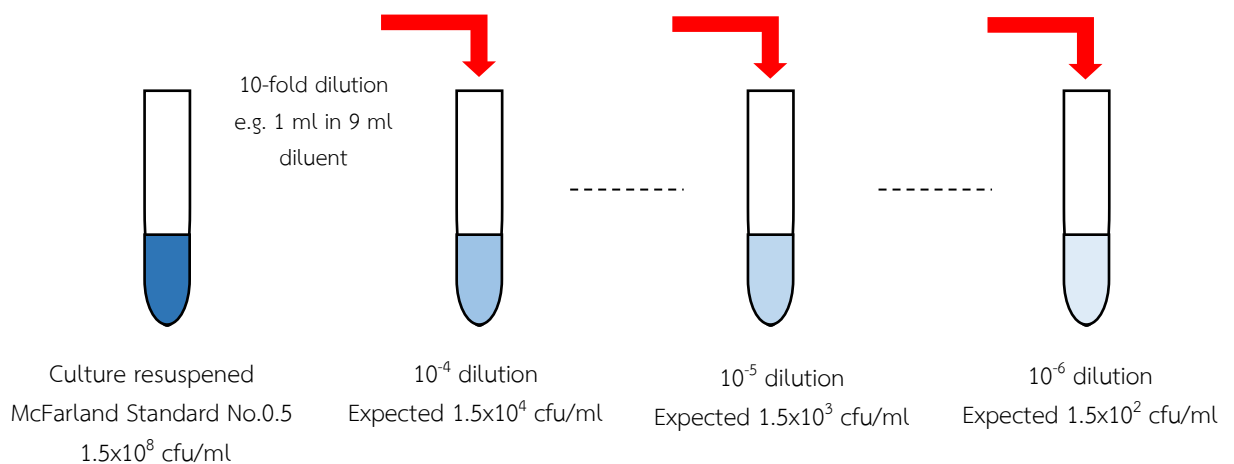
- 1) การเตรียมตัวอย่างทดสอบ ใช้ตัวอย่างทดสอบ จำนวน 2 ชุด ดังนี้
 - ชุดที่ 1 ตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยไม่เติมเชื้อ จำนวน 35 ตัวอย่าง
 - ชุดที่ 2 ตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยเติมเชื้อ จำนวน 35 ตัวอย่างปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ คือ 250 มิลลิลิตรต่อ test portion โดยจำนวนตัวอย่างที่ต้องเตรียม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

ตารางที่ 10 ประเภทตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่าง สำหรับการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี

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

2) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้น

- 2.1) 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
- 2.2) นำโคลนเชื้อ *L. pneumophila* ละลาย (resuspended) ในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland Standard No.0.5 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 cfu/ml
- 2.3) ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จนถึงระดับความเข้มข้น 10^1 cfu/ml ดังภาพที่ 22
- 2.4) ทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจาง ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน
- 2.5) นับจำนวนโคโลนีบน BCYE agar plate จะทราบปริมาณเชื้อตั้งต้นจริง (cfu/ml) ที่เติมลงในตัวอย่างทดสอบ



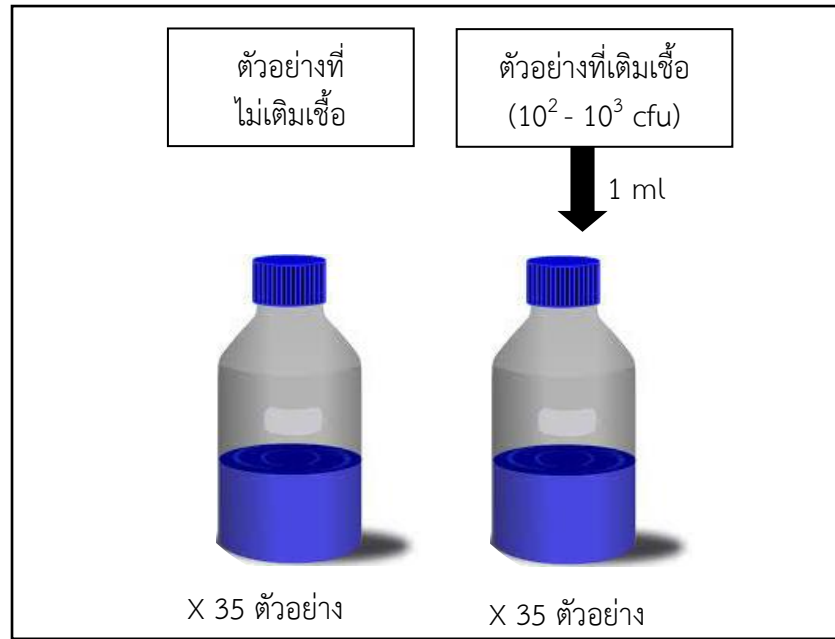
ภาพที่ 22 การเจือจางเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้น สำหรับการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี

3) การเติมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงในตัวอย่างทดสอบ (Spike sample) เตรียมตัวอย่าง ดังนี้

3.1) นำตัวอย่างน้ำที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ แบ่งเป็น 2 ชุด ประกอบด้วย

- ชุดที่ 1 ตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้อ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 35 ขวด
- ชุดที่ 2 ตัวอย่างที่เติมเชื้อ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 35 ขวด

3.2) เติมเชื้อที่เตรียมไว้ในตัวอย่างน้ำชุดที่ 2 โดยเติมเชื้อระดับ $10^2 - 10^3$ cfu/ml) ขวดละ 1 มิลลิลิตร



ภาพที่ 23 การเตรียมตัวอย่างที่เติมเชื้อ (Spike sample) สำหรับการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี

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

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

โดย P_o คือ ผลรวมของผลทดสอบที่ตรงกันจากการทดสอบ

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

P_e คือ ผลรวมของความน่าจะเป็นที่ตรงกันจากค่าคาดหวัง (Expected)

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

- การแปลความหมายของค่าสถิติ Kappa ที่คำนวณได้พิจารณาตามตารางที่ 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)

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ตาม ISO 16140-2

จากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธี Real-time PCR (วิธีทางเลือก: Alternative method) กับวิธี เพาะเลี้ยงเชื้อ (วิธีอ้างอิง: Reference method) ผลการศึกษาแบ่งเป็น 3 ส่วน ดังต่อไปนี้

4.1.1 ผลการศึกษาความไว (Sensitivity)

เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR ว่ามีความไว (sensitivity) ที่แตกต่างกันหรือไม่ ทำการทดสอบในกลุ่มตัวอย่างน้ำ โดยเลือกตัวแทนจากตัวอย่างน้ำ 3 ประเภท ได้แก่ ตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ, ตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำ, ตัวอย่างน้ำจากน้ำพุระดับอาคาร ประเภทละ 20 ตัวอย่าง และใช้เป็นตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ (artificially contaminated samples) ดำเนินการทดสอบตามขั้นตอน/สภาวะที่ระบุไว้ในขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ ผลการทดสอบของตัวอย่างแต่ละประเภทแสดงดังตารางที่ 12, 13 และ 14

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบและการแปลผลของตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ

ปริมาณเชื้อที่เติม (cfu/Test portion)	ผลการทดสอบ		การแปลผล
	วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ	Real-time PCR	
0 cfu	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
5.1×10^2 cfu	Not detect	Not detect	NA
	Detect	Detect	PA
	Not detect	Not detect	NA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
4.6×10^4 cfu	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
4.0×10^6 cfu	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบและการแปลผลของตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำ

ปริมาณเชื้อที่เติม (cfu/Test portion)	ผลการทดสอบ		การแปลผล
	วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ	Real-time PCR	
0 cfu	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
5.1×10^2 cfu	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
4.6×10^4 cfu	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
4.0×10^6 cfu	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบและการแปลผลของตัวอย่างน้ำจากน้ำพุระดับอาคาร

ปริมาณเชื้อที่เติม (cfu/Test portion)	ผลการทดสอบ		การแปลผล
	วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ	Real-time PCR	
0 cfu	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
5.1×10^2 cfu	Not detect	Not detect	NA
	Not detect	Not detect	NA
	Detect	Detect	PA
	Not detect	Detect	PD
	Detect	Detect	PA

ปริมาณเชื้อที่เติม (cfu/Test portion)	ผลการทดสอบ		การแปลผล
	วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ	Real-time PCR	
4.6×10^4 cfu	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
4.0×10^6 cfu	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA
	Detect	Detect	PA

สรุปผลการเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR ในตัวอย่างน้ำ จำนวนรวม 60 ตัวอย่าง และคำนวณหาค่า Sensitivity ของวิธี Real-time PCR (SE_{alt}), Sensitivity ของวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (SE_{ref}), ค่าความถูกต้อง (Relative trueness), False positive ratio ของวิธี Real-time PCR (FPR), ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value : PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value : NPV) แสดงดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 สรุปผลการศึกษาความไว (Sensitivity)

Method		วิธี Real-time PCR		SE_{alt}	SE_{ref}	RT	FPR	PPV	NPV
		ผลบวก	ผลลบ						
วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ	ผลบวก	PA = 38	ND = 0	100%	97.44%	98.33%	4.76%	97.44%	100%
	ผลลบ	PD = 1	NA = 21						

จากผลการทดสอบพบว่ามีความไว (Sensitivity) ของวิธี Real-time PCR (SE_{alt}) ร้อยละ 100, ค่าความไว (Sensitivity) ของวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (SE_{ref}) ร้อยละ 97.44, ค่าความถูกต้องสัมพัทธ์ (Relative trueness) ร้อยละ 98.33 มีค่า False positive ratio ของวิธี Real-time PCR (FPR) ร้อยละ 4.76, ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value : PPV) ร้อยละ 97.44 และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value : NPV) ร้อยละ 100

เมื่อคำนวณค่าความแตกต่างระหว่าง (ND-PD) และคำนวณผลรวมของ (ND+PD) ที่ได้จากการทดสอบ นำไปเทียบกับช่วงของขีดจำกัดการยอมรับ (Acceptability Limit; AL) พบว่าผลการทดสอบอยู่ในช่วงของขีดจำกัดการยอมรับ แสดงว่าวิธี Real-time PCR มีความไว (sensitivity) ไม่แตกต่างจากวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ แสดงดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ขีดจำกัดการยอมรับ (Acceptability Limit; AL) ของการศึกษาความไว (Sensitivity)

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

4.1.2 ผลการศึกษาค่า relative level of detection (RLOD)

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบ เพื่อประเมินค่าปริมาณเชื้อ *Legionella* spp. ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (level of detection; LOD) ของวิธี Real-time PCR เทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อโดยคำนวณเป็นค่า Relative level of detection (RLOD)

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบเพื่อหาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (level of detection; LOD) ของวิธี Real-time PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

ระดับการเติมเชื้อ	ปริมาณเชื้อ (cfu/Test portion)	ผลการทดสอบ	
		Culture method (GVPC plate)	PCR method
ไม่เติมเชื้อ (negative control level)	0 cfu	Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
เชื้อระดับต่ำ (low level)	2.4×10^2 cfu	Detect	Detect
		Not detect	Detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Detect	Detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect

ระดับการเติมเชื้อ	ปริมาณเชื้อ (cfu/Test portion)	ผลการทดสอบ	
		Culture method (GVPC plate)	PCR method
เชื้อระดับต่ำ (low level)	5.9×10^2 cfu	Detect	Detect
		Detect	Detect
		Detect	Detect
		Detect	Detect
		Not detect	Detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Detect	Detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Not detect	Not detect
		Detect	Detect
		Detect	Detect
		Not detect	Not detect
		Detect	Detect
		Detect	Detect
		Not detect	Not detect
เติมเชื้อระดับสูงขึ้น (higher level)	2.4×10^3 cfu	Detect	Detect
		Detect	Detect
		Detect	Detect
		Detect	Detect
		Detect	Detect
เติมเชื้อระดับสูงขึ้น (higher level)	5.9×10^3 cfu	Detect	Detect
		Detect	Detect
		Detect	Detect
		Detect	Detect
		Detect	Detect

จากตารางพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 5.9×10^2 cfu/test portion ให้ผลการทดสอบที่เป็นบวก 25 -75 % ของตัวอย่างทดสอบ ทั้งวิธี Real-time PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (level of detection; LOD) ของทั้ง 2 วิธี คือ 5.9×10^2 cfu/test portion

- การคำนวณและการแปลผลค่า RLOD

นำผลการทดสอบที่ได้คำนวณค่า RLOD โดยใช้โปรแกรม Excel RLOD calculation program ให้ผลการทดสอบดังตาราง 18

ตารางที่ 18 ผลการคำนวณ ค่า RLOD จากโปรแกรม RLOD calculation program

Name: Water sample				
CFU concentration	n ₁	n ₂	y ₁	y ₂
2.38	20	20	2	3
2.77	20	20	9	10
3.38	5	5	5	5
3.77	5	5	5	5

Name	RLOD	RLODL	RLODU	b=ln(RLOD)	sd(b)	z-Test statistic	p-value
Water sample	0.884	0.482	1.619	-0.124	0.303	0.408	1.317
Combined	0.884	0.482	1.619	-0.124	0.303	0.408	1.317

จากตาราง พบว่าค่า RLOD เท่ากับ 0.884 ซึ่งผ่านตามเกณฑ์เมื่อเทียบกับขีดจำกัดการยอมรับ (Acceptability Limit; AL) ของค่า RLOD ซึ่งกำหนดไว้ที่ 1.5

4.1.3 ผลการศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของวิธี Real-time PCR

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

ตารางที่ 19 ผลการศึกษาความจำเพาะ (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
	<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

4.2 ผลการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี โดยใช้สถิติ kappa analysis

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบเพื่อประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี โดยใช้สถิติ kappa analysis

ลำดับ	ประเภทตัวอย่างน้ำ	ผลการทดสอบ		การแปลผล
		Culture method (GVPC plate)	PCR method	
1	น้ำแอร์ซิลเลอร์	Not detect	Not detect	NA
2	น้ำแอร์ซิลเลอร์	Not detect	Not detect	NA
3	น้ำหอฝิ่งเย็น	Not detect	Not detect	NA
4	น้ำใช้ หอฝิ่งเย็น	Not detect	Not detect	NA
5	น้ำใช้ หอฝิ่งเย็น	Not detect	Not detect	NA
6	บ่อน้ำพุ	Not detect	Not detect	NA
7	น้ำใช้	Not detect	Not detect	NA
8	น้ำใช้	Not detect	Not detect	NA
9	น้ำใช้	Not detect	Not detect	NA
10	บ่อน้ำพุ	Not detect	Not detect	NA
11	น้ำใช้	Not detect	Not detect	NA
12	น้ำซิลเลอร์	Not detect	Not detect	NA
13	น้ำใช้ หอฝิ่งเย็น	Not detect	Not detect	NA
14	บ่อน้ำพุ	Not detect	Not detect	NA
15	น้ำจากก๊อกน้ำ	Not detect	Not detect	NA
16	น้ำใช้อาคาร	Not detect	Not detect	NA
17	น้ำใช้อาคาร	Not detect	Not detect	NA
18	น้ำจากก๊อกน้ำ	Not detect	Not detect	NA
19	น้ำจากก๊อกน้ำ	Not detect	Not detect	NA
20	น้ำทิ้งแอร์ซิลเลอร์	Not detect	Not detect	NA
21	น้ำทิ้งแอร์ห้องพัก	Not detect	Not detect	NA
22	น้ำใช้ห้องครัว	Not detect	Not detect	NA
23	น้ำใช้ห้องพัก	Not detect	Not detect	NA
24	น้ำใช้ห้องพัก	Not detect	Not detect	NA
25	น้ำใช้ตลาดฟ้า	Not detect	Not detect	NA
26	น้ำใช้ หอฝิ่งเย็น	Not detect	Not detect	NA
27	น้ำใช้ หอฝิ่งเย็น	Not detect	Not detect	NA
28	บ่อน้ำพุ	Not detect	Not detect	NA
29	น้ำซิลเลอร์	Not detect	Not detect	NA
30	น้ำใช้ห้องพัก	Not detect	Not detect	NA
31	น้ำใช้ห้องพัก	Not detect	Not detect	NA
32	น้ำใช้ห้องพัก	Not detect	Not detect	NA

ลำดับ	ประเภทตัวอย่างน้ำ	ผลการทดสอบ		การแปลผล
		Culture method (GVPC plate)	PCR method	
33	น้ำใช้ห้องพัก	Not detect	Not detect	NA
34	บ่อน้ำพุ	Not detect	Not detect	NA
35	บ่อน้ำพุ	Not detect	Not detect	NA
36	น้ำแอร์ซิลเลอร์ (spike sample)	Detect	Detect	PA
37	น้ำแอร์ซิลเลอร์ (spike sample)	Detect	Detect	PA
38	น้ำหอฝึ่งเย็น (spike sample)	Detect	Detect	PA
39	น้ำใช้ หอฝึ่งเย็น (spike sample)	Detect	Detect	PA
40	น้ำใช้ หอฝึ่งเย็น (spike sample)	Detect	Detect	PA
41	บ่อน้ำพุ (spike sample)	Not detect	Detect	PD
42	น้ำใช้ (spike sample)	Detect	Detect	PA
43	น้ำใช้ (spike sample)	Detect	Detect	PA
44	น้ำใช้ (spike sample)	Detect	Detect	PA
45	บ่อน้ำพุ (spike sample)	Detect	Detect	PA
46	น้ำใช้ (spike sample)	Detect	Detect	PA
47	น้ำซิลเลอร์ (spike sample)	Detect	Detect	PA
48	น้ำใช้ หอฝึ่งเย็น (spike sample)	Detect	Detect	PA
49	บ่อน้ำพุ (spike sample)	Detect	Detect	PA
50	น้ำจากก๊อกน้ำ (spike sample)	Detect	Detect	PA
51	น้ำใช้อาคาร (spike sample)	Detect	Detect	PA
52	น้ำใช้อาคาร (spike sample)	Detect	Detect	PA
53	น้ำจากก๊อกน้ำ (spike sample)	Detect	Detect	PA
54	น้ำจากก๊อกน้ำ (spike sample)	Detect	Detect	PA
55	น้ำทิ้งแอร์ซิลเลอร์ (spike sample)	Detect	Detect	PA
56	น้ำทิ้งแอร์ห้องพัก (spike sample)	Detect	Detect	PA
57	น้ำใช้ห้องครัว (spike sample)	Detect	Detect	PA
58	น้ำใช้ห้องพัก (spike sample)	Detect	Detect	PA
59	น้ำใช้ห้องพัก (spike sample)	Detect	Detect	PA
60	น้ำใช้ตลาดฟ้า (spike sample)	Detect	Detect	PA
61	น้ำใช้ หอฝึ่งเย็น (spike sample)	Detect	Detect	PA
62	น้ำใช้ หอฝึ่งเย็น (spike sample)	Detect	Detect	PA
63	บ่อน้ำพุ (spike sample)	Not detect	Detect	PD
64	น้ำซิลเลอร์ (spike sample)	Detect	Detect	PA
65	น้ำใช้ห้องพัก (spike sample)	Detect	Detect	PA
66	น้ำใช้ห้องพัก (spike sample)	Detect	Detect	PA

ลำดับ	ประเภทตัวอย่างน้ำ	ผลการทดสอบ		การแปลผล
		Culture method (GVPC plate)	PCR method	
67	น้ำใช้ห้องพัก (spike sample)	Detect	Detect	PA
68	น้ำใช้ห้องพัก (spike sample)	Detect	Detect	PA
69	บ่อน้ำพุ (spike sample)	Detect	Detect	PA
70	บ่อน้ำพุ (spike sample)	Detect	Detect	PA

ตารางที่ 21 ผลการคำนวณค่าคาดหวัง (Expected) สำหรับประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี โดยใช้สถิติ kappa analysis

Method		วิธี culture		รวม
		ผลบวก	ผลลบ	
วิธี PCR	ผลบวก	PA = 33	PD = 2	35
	Expected	$(33 \times 35) / 70 = 16.5$	$(37 \times 35) / 70 = 18.5$	
	ผลลบ	ND = 0	NA = 35	35
	Expected	$(33 \times 35) / 70 = 16.5$	$(37 \times 35) / 70 = 18.5$	
รวม		33	37	70

1) คำนวณอัตราส่วน Kappa

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

โดย P_o คือ ผลรวมของผลทดสอบที่ตรงกันจากการทดสอบ

$$= (PA + NA) / N = (33 + 35) / 70 = 0.97$$

P_e คือ ผลรวมของความน่าจะเป็นที่ตรงกันจากค่าคาดหวัง (Expected)

$$= (PA_{(expected)} + NA_{(expected)}) / N = (16.5 + 18.5) / 70 = 0.50$$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า} \quad Kappa &= \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} \\ &= \frac{0.97 - 0.50}{1 - 0.50} \\ &= 0.94 \end{aligned}$$

วิธี Real-time PCR ถูกประเมินเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการทดสอบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ด้วยสถิติ kappa analysis โดยทดสอบในตัวอย่างน้ำที่ส่งตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ (naturally contaminated samples) และตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples) จำนวนรวม 70 ตัวอย่าง โดยพบว่าให้ความสอดคล้องของทั้งสองวิธี ในระดับดีมาก (kappa = 0.94)

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น เพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. พบว่ามีค่าความถูกต้องสัมพัทธ์ (Relative trueness) ร้อยละ 98.33 มีค่าความไว (Sensitivity) ร้อยละ 100 ซึ่งมากกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐาน (ค่าความไวของวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ร้อยละ 97.44) รวมทั้งมีค่า False positive ratio ของวิธี Real-time PCR (FPR) ร้อยละ 4.76 เนื่องจากผลการทดสอบตัวอย่างน้ำประปาหมู่บ้านระดับอาคาร จำนวน 1 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR เป็นผลบวก แต่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลเป็นลบ กรณีนี้อาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากตัวอย่างน้ำพุมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ จำนวนมาก ซึ่งอาจรบกวนการเจริญของเชื้อ *Legionella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในกรณีที่มีปริมาณเชื้อ *Legionella* spp. น้อยๆ นอกจากนี้เชื้อที่ตรวจพบอาจเป็น uncultured *Legionella* หรือ non culturable but viable *Legionella* โดยในตัวอย่างน้ำมีเชื้อ *Legionella* spp. ปนเปื้อนอยู่ แต่อาจเป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงไม่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออาจเป็นเชื้อที่ตายแล้ว ทำให้สามารถตรวจพบได้เฉพาะวิธี Real-time PCR เนื่องจากเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ผลการศึกษาจึงแสดงว่าวิธี Real-time PCR มีความไวมากกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) พบว่าวิธี Real-time PCR มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Legionella* spp. ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่พบได้บ่อยในแหล่งน้ำที่นำมาทดสอบจำนวน 7 ชนิด โดยพบว่าวิธี Real-time PCR มีความจำเพาะต่อเชื้อเป้าหมายและเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายมากกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ (เชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย) ได้บางส่วน (partial inhibition) เชื้อยังสามารถเจริญได้บ้าง แต่จะให้ลักษณะโคโลนีที่แตกต่างจากโคโลนีของเชื้อ *Legionella* spp. อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากจำนวนชนิดของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบมีจำนวนน้อย

จากการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี Real-time PCR กับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ตัวอย่างน้ำที่ส่งตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ (naturally contaminated samples) และตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples) พบว่าให้ความสอดคล้องตรงกันระหว่าง 2 วิธี ในระดับค่อนข้างสมบูรณ์ ($\kappa = 0.94$) นอกจากนี้วิธี Real-time PCR ยังมีความสามารถในการตรวจจับการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำที่มีปริมาณเชื้อเพียง 5.9×10^2 cfu/test portion และมีค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) เป็นร้อยละ 100 ซึ่งแสดงว่าไม่มีผลของวิธี Real-time PCR เป็นลบเมื่อวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นบวก ดังนั้นวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในระบบการเฝ้าระวังแหล่งน้ำที่สงสัยมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. เพื่อการดำเนินการป้องกันก่อนเกิดการแพร่กระจายของเชื้อหรืออาจใช้เป็นวิธียืนยันโคโลนีของ *Legionella* spp. เนื่องจากการแยกโคโลนีเชื้อยังเป็นวิธีการที่จำเป็นสำหรับการตรวจหาเชื้อที่มีชีวิต แต่วิธี PCR ให้ผลที่รวดเร็วกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อถึง 15 เท่า (ลดระยะเวลาการทดสอบทางห้องปฏิบัติการจาก 15 วัน เหลือ 1 วัน) ดังนั้นวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นจึงเหมาะที่จะใช้เป็นวิธีทางเลือกในการควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนเชื้อในแหล่งน้ำต่างๆ นอกเหนือจากวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อเดิมที่ห้องปฏิบัติการมีอยู่ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่รวดเร็วขึ้น หน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและภาคเอกชนสามารถนำผลการทดสอบไปใช้ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคเลิเจียนแนร์ได้อย่าง

ทันทั่วทั้งที่ โดยตาม ISO 16140-2 : 2016 และการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี โดยใช้สถิติ kappa analysis พบว่าผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits) ทั้งหมด และให้ผลทดสอบที่ไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐาน (วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ) ดังนั้นห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยวิธี Real-time PCR มาใช้ภายในห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้อง

ผลจากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อเทียบกับการศึกษาของนักวิจัยอื่นๆ พบว่ามีความสอดคล้องกัน ดังนี้ งานวิจัยของ Daniela Toplitsch (2021) กล่าวว่า วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Legionella* spp. จากตัวอย่างน้ำมีความยุ่งยาก เนื่องจากจะต้องใช้ประสบการณ์ทางห้องปฏิบัติการ ต้องใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานในการทดสอบ รวมทั้งในตัวอย่างน้ำมักมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ จำนวนมากทำให้ย้อมรบกวนต่อผลการทดสอบได้ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อตาม ISO 11731 กับวิธี qPCR ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่า วิธี qPCR ให้ผลลบกับเชื้ออื่นๆ ได้ดีมาก รวมทั้งยังมีความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ที่มีปริมาณต่ำๆ ได้ จึงถือว่าวิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการทำนายหรือประเมินสถานการณ์การระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในสถานการณ์ฉุกเฉินได้อย่างมีประสิทธิภาพ^[35] งานวิจัยของ 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*^[32] และจากงานวิจัยของ เบญจพร หนูทอง และคณะ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา พบว่าวิธี PCR ที่พัฒนาได้มีขนาด 265 bp มีค่า limit of detection เท่ากับ 10^2 CFU/ml โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับ 100 ไอโซเลทของเชื้อ *Legionella* และเชื้อแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในแหล่งน้ำ 10 ชนิด จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ตัวอย่างน้ำ พบความสอดคล้องกันในระดับค่อนข้างดี (kappa = 0.81) และค่า negative predictive value ร้อยละ 100.00 นอกจากนี้เมื่อใช้โคลนเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยเป็นเชื้อ *L. pneumophila* ผลการเปรียบเทียบแสดงความสอดคล้องตรงกันอย่างสมบูรณ์ (kappa = 1.00) แต่วิธี PCR ให้ผลการตรวจที่รวดเร็วกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อถึง 8 เท่า ดังนั้นวิธี PCR ที่พัฒนาขึ้นจึงเหมาะที่จะใช้เป็นวิธีทางเลือกในการควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนเชื้อในแหล่งน้ำต่างๆ รวมถึงสามารถนำไปใช้เป็นวิธีการตรวจยืนยันโคลนเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยเป็นเชื้อ *L. pneumophila* นอกจากวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อเดิมที่มีอยู่เพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วขึ้น^[38]

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ข้อเสนอเชิงนโยบาย

เสนอให้มีการทบทวน/ปรับปรุงประกาศกรมอนามัย พ.ศ.2544 เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลี้จิโอเนลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย ที่ได้มีการกำหนดระดับการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ในหน่วย cfu/L ซึ่งวิธีการทดสอบที่สามารถคำนวณผลให้อยู่ในหน่วย cfu/L ได้ คือ วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method) โดยวิธีนี้มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้ระยะเวลานานในการเพาะเลี้ยงเชื้อและยืนยันคุณสมบัติของเชื้อซึ่งอาจไม่ทันต่อการเฝ้าระวังโรคได้ การปรับปรุงประกาศกรมอนามัย พ.ศ.2544 เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลี้จิโอเนลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย โดยทบทวนเกณฑ์ระดับการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. เป็นพบ/ไม่พบ ซึ่งเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ ด้วยวิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR) จะเป็นแนวทางหนึ่งที่ให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วขึ้น มีความจำเพาะต่อเชื้อเป้าหมายที่ต้องการทดสอบ ผู้ประกอบการ

หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง สามารถนำผลการทดสอบไปใช้ในการเฝ้าระวัง ป้องกันและแก้ไขสาเหตุได้อย่างทันต่อสถานการณ์ เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ อันจะส่งผลกระทบต่อประชาชนทุกกลุ่มวัย

5.2.2 ข้อเสนอเชิงปฏิบัติการ

การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยใช้วิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR) เป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว มีความจำเพาะสูง ช่วยลดระยะเวลาและเพิ่มความแม่นยำในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการได้ มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการเพื่อรองรับปริมาณงานที่มีจำนวนมาก ผู้รับบริการสามารถนำผลการทดสอบไปใช้ในการเฝ้าระวังสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ที่อาจกระทบต่อสุขภาพได้อย่างทันทั่วทั้งที่ รวมทั้งใช้เป็นเครื่องมือในการสร้างความตระหนักแก่สถานประกอบการต่างๆ เช่น โรงแรม รีสอร์ท ในการให้ความสำคัญกับการบำรุงรักษาระบบน้ำและอากาศภายในอาคารให้ถูกสุขลักษณะและมีความเหมาะสม ซึ่งถือเป็นการลดอุบัติการณ์และความเสี่ยงต่อการระบาดของโรคดังกล่าวในประเทศไทยได้ ดังนั้นจึงควรมีการประชาสัมพันธ์แนวทางการตรวจเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real-time PCR แทนการตรวจด้วยวิธีการเพาะเชื้อ

5.2.3 ข้อเสนอสำหรับงานวิจัยครั้งต่อไป

วิธีที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ ในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method), เทคนิค Polymerase Chain Reaction, เทคนิค ELISA หรือ Enzyme-linked Immunosorbent assay แต่ละเทคนิคมีข้อดีในแง่เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และให้ผลการทดสอบที่แม่นยำ แต่ยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องขั้นตอนการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีหลายขั้นตอน ต้องรอผลทดสอบ ผู้ทดสอบต้องมีความชำนาญ ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ/สารเคมีที่มีความจำเพาะ และมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ซึ่งข้อจำกัดเหล่านี้อาจทำให้ผลการทดสอบมีความล่าช้า ไม่ทันต่อการแก้ไขปัญหาในกรณีที่มีการแพร่ระบาดของโรคได้ การพัฒนาชุดทดสอบภาคสนามสำหรับตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว ถือเป็นอีกแนวทางในการลดข้อจำกัดข้างต้นได้ สามารถนำมาใช้ในการทดสอบภาคสนามได้สำหรับคัดกรองเบื้องต้น (screening) เพื่อให้การเฝ้าระวังสุขภาพของประชาชนรวมทั้งการเฝ้าระวังด้านอนามัยสิ่งแวดล้อมสามารถดำเนินการได้อย่างทันทั่วทั้งที่

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 ฝ้าระวังปัญหาการแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์. [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. การศึกษาอุบัติการณ์เกิดโรค legionellosis. วารสารอนามัยสิ่งแวดล้อม 2542; 3 :45-49.
12. โรม บัวทอง, รุ่งนภา ประสานทอง, วิวัฒน์ ศีตมโนชน, ทวีศักดิ์ เนตรวงศ์, ธาธิยา เสาวรัญ, ขจรเดช จันทะยานี, นงนุช มารินทร์ และคณะ. การระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป ภายหลังจากการเดินทางมาท่องเที่ยวในจังหวัดภูเก็ต ธันวาคม 2549 - มกราคม 2550: บทบาทของการสอบสวนสิ่งแวดล้อมในประเทศที่เกิดเหตุ: รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2556; 44: 38-46.
13. อติเทพ จินดา, ปรรภา บาลบุรี, วิรัตน์ เพาะปลูก, รุ่งทิพย์ นวลศรี, นงนุช จาตุรธาบัณฑิต, โอภาส คันธานนท์ และคณะ. การสอบสวนสิ่งแวดล้อมในโรงแรมที่เกิดโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวเดนมาร์ก เขาหลัก ตำบลคีตกัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา มิถุนายน 2551. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2551; 39: 653-657.

14. ฆาลิตา อานนท์, โรม บัวทอง, นราศักดิ์ บ่อหนา, ปวีณฉัตร ลูสีดา, นัจพร พรหมชัยศรี, นงนุช จาตุราบัณฑิต และคณะ. การสอบสวนสิ่งแวดล้อมของการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป หมู่ที่ 5 ตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ระหว่างวันที่ 2 - 5 มิถุนายน 2558. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2558; 46: 721-727.
15. รณิดา เตชะสุวรรณา. โรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยว : การสอบสวนสิ่งแวดล้อมในโรงแรมที่ได้รับแจ้งว่าเป็นที่พักของนักท่องเที่ยวชาวสวีเดนที่ติดเชื้อในกรุงเทพมหานคร เดือนมกราคม 2566. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2566; 54: 305-312.
16. สำนักสารสนเทศ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. (2565). กรมควบคุมโรคเผย โรคลีเจียนแนร์ไม่ใช่โรคใหม่การแพร่เชื้อต้องหายใจละอองน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *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 โภคาธิกรณ. 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. นีรภา คงกันคง, นวรัตน์ วราอัสวปติเจริญ, วรัญญ คงกันคง, ดวงพร จิรวินบูลย์, ภัทรมน รัตนพันธุ์ และวิวัฒน์ ลีตระกูลนำชัย. การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในระบบน้ำทางทันตกรรมในคณะทันตแพทยศาสตร์ 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 พรธนประเทศ. การเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำที่ใช้ในโรงแรมหรือรีสอร์ท ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2557; 23: 201-209.
30. อธิชา มหาโยธา, เตือนใจ บุตรโคตร, ปรีศนา วงศ์วีรพันธ์, วิชัย ปราสาททอง, อุดมเกียรติ พรธนประเทศ, 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. Fuchslin. 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. อมรรัตน อินทรสุต, อนุสรณ บุญธรรม, และ สรศักดิ์ อินทรสุต. 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.
38. เบญจพร หนูทอง, อาภากร นบนอบ และศศิธร หนูทอง. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี Polymerase Chain Reaction สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อ *Legionella pneumophila*. วารสารวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 64 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม-กันยายน 2565 : 160-171.

ภาคผนวก ก

ประกาศกรมอนามัย

เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อสลิโอเนลลาในหอฝึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย

(ประกาศ ณ วันที่ 8 มกราคม 2544)

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝ้งเย็นของอาคารในประเทศไทย

1



ประกาศกรมอนามัย
เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลิจิโอนัลลา
ในหอฝ้งเย็นของอาคารในประเทศไทย

โดยที่เป็นการสมควรกำหนดข้อปฏิบัติสำหรับควบคุมการแพร่ระบาดของ
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝ้งเย็นของอาคารเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการคุ้มครอง
สุขภาพอนามัยของประชาชนที่อยู่ในและนอกอาคาร กรมอนามัยจึงออก
ประกาศกำหนดข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝ้งเย็นของอาคาร
ในประเทศไทยไว้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ส่วนที่ 1
บทนำ

ข้อ 1 คำนำ

โรคเลิเจียนแนร์ (Legionnaires' disease) เป็นโรคติดเชื้อจาก
แบคทีเรียในจินัสลิจิโอนัลลาอย่างเฉียบพลันในทางเดินหายใจส่วนล่าง โดย
กลุ่มคนที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อหรือเกิดโรคนี ได้แก่ ผู้สูงอายุ เช่น
ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอหรือกำลังอยู่ในระหว่าง
การรักษาโรคบางชนิด เช่น มะเร็ง เบาหวาน โรคไต และเอชไอวี เป็นต้น

2 ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝ้งเย็นของอาคารในประเทศไทย

ผู้ที่ดื่มสุราหรือสูบบุหรี่จัด และผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยยาบางชนิด การติดเชื้อนี้
อาจมีอันตรายร้ายแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ โดยโรคนีมีสาเหตุมาจากการหายใจ
เอาละอองน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อลิจิโอนัลลา ซึ่งเจริญเติบโตได้ดีในหอฝ้งเย็น
ที่ไม่มีการดูแลบำรุงรักษาอย่างถูกต้องเข้าสู่ร่างกาย

ดังนั้น ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝ้งเย็นของอาคารนี้
กำหนดขึ้นเพื่อลดอุบัติการณ์และลดความเสี่ยงต่อการระบาดของโรคเลิเจียนแนร์
ในประเทศไทย เพื่อเป็นแนวทางให้เจ้าหน้าที่ของรัฐ ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ
เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคารที่ใช้หอฝ้งเย็น และภาคเอกชนที่เกี่ยวข้อง
กับการให้บริการและการบำรุงรักษาหอฝ้งเย็น ตลอดจนผู้รับผิดชอบในการ
ออกแบบ การปฏิบัติการและการดูแลรักษาอาคารได้ถือปฏิบัติ

ข้อ 2 วัตถุประสงค์และการบังคับใช้

(1) ข้อปฏิบัติฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อเป็นแนวปฏิบัติสำหรับการป้องกัน
และควบคุมเชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝ้งเย็นเพื่อลดการปนเปื้อนและความเสี่ยง
ต่อการระบาดของโรคเลิเจียนแนร์

(2) ข้อปฏิบัติฉบับนี้ให้ใช้บังคับกับหอฝ้งเย็นทุกชนิดที่ติดตั้งอยู่ใน
อาคาร

ข้อ 3 คำนิยามในข้อปฏิบัตินี้มีดังนี้

“ละอองฝอย (Aerosol)” หมายถึง อนุภาคใดๆ ที่มีขนาดเล็กกว่า
10 ไมครอน

“การปรับอากาศ (Air-conditioning)” หมายถึง การควบคุม
อุณหภูมิ ความชื้น การระบายอากาศและการฟอกอากาศในบริเวณที่ต้องการ
ให้อยู่ในเกณฑ์คุณภาพที่กำหนด

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย 3

“ช่องดูดอากาศเข้า (Air intake)” หมายถึง ช่องเปิดใดๆ ที่ดูดอากาศ
เข้าสู่ระบบส่งลมเย็นในอาคาร

“สาหร่าย (Algae)” หมายถึง พืชน้ำที่มีขนาดเล็ก ซึ่งต้องการ
แสงสว่างในการเจริญเติบโต

“สารชีวฆาต (Biocide)” หมายถึง สารเคมีที่มีประสิทธิภาพทำลาย
จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก

“น้ำที่ระบายออก (Bleed)” หมายถึง น้ำซึ่งถูกระบายออกจากระบบ
ทำความเย็นอย่างช้าๆ เพื่อควบคุมความเข้มข้นของสารละลายในน้ำ

“สะอาด” หมายถึง ปราศจากกากตะกอน เมือก สาหร่าย รา สนิม
ตะกรัน ฟูน ลิ่งสกปรก และสิ่งแปลกปลอมใดๆ โดยการตรวจสอบด้วยตาเปล่า

“หอผึ่งเย็น (Cooling tower)” หมายถึง อุปกรณ์ที่ใช้ลดอุณหภูมิ
ของน้ำ โดยอาศัยหลักการคายความร้อนของละอองน้ำขณะผ่านอากาศ

“สารยับยั้งการกัดกร่อน (Corrosion inhibitors)” ได้แก่ สารเคมี
ที่ใช้ป้องกัน หรือชะลอการกัดกร่อนของโลหะด้านที่สัมผัสกับน้ำ

“ท่อปลายตัน (Deadleg)” หมายถึง ท่อที่มีปลายปิดข้างหนึ่งหรือ
ติดอยู่กับเครื่องอุปกรณ์ต่างๆ เช่น ลิ้น ก๊อกร มาตร เป็นต้น

“ตัวกระจายสาร (Dispersant)” หมายถึง สารเคมีซึ่งเติมร่วมกับ
สารเคมีที่ใช้บำบัดน้ำ เพื่อให้สารอินทรีย์ที่เกาะติดบริเวณพื้นผิวหน้าของ
โลหะหลุดออกมา และช่วยป้องกันการจับตัวเป็นก้อนของกากตะกอน

“การทำลายเชื้อ” หมายถึง การลดจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้สารเคมี
หรือวิธีการทางกายภาพ

“ละอองปลิว (Drift)” หมายถึง ละอองน้ำที่ล่องลอยออกจากช่อง
ระบายลมของหอผึ่งเย็น

4 ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย

“อุปกรณ์กำจัดละอองปลิว (Drift eliminator)” หมายถึง แผงดัก
ละอองน้ำที่ล่องลอยออกจากหอผึ่งเย็นทางช่องระบายลม

“ความสกปรก” หมายถึง การปนเปื้อนด้วยสิ่งมีชีวิตหรือการสะสม
ตะกอนดินบนผิวหน้าของวัตถุ ที่ใช้ในการถ่ายเทความร้อน อันเป็นสาเหตุให้
เกิดการสูญเสียประสิทธิภาพในการทำงานของหอผึ่งเย็น

“ลิจิโอนัลลา (Legionella)” เป็นชื่อจีนัสของแบคทีเรียซึ่งพบได้
ในแหล่งน้ำธรรมชาติ และระบบน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น และอาจก่อโรคได้โดย
เฉพาะที่พบบ่อยคือ ลิจิโอนัลลา นิวโมฟิลา (*Legionella pneumophila*)

“โรคลิจิเยียนแนร์ (Legionnaires' disease)” เป็นโรคติดต่ออย่าง
ฉับพลันจากแบคทีเรียกลุ่มลิจิโอนัลลา สปีชีส์ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากลิจิโอนัลลา
นิวโมฟิลา มักเกิดในผู้สูงอายุโดยเฉพาะผู้ที่สูบบุหรี่ หรือผู้ที่ภูมิคุ้มกัน
บกพร่องเนื่องจากเป็นโรคบางชนิดหรือการใช้สารเคมี ทั้งนี้ในระยะแรกจะมี
อาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ ได้แก่ มีไข้เล็กน้อย ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อและข้อต่อ
หมดแรง อ่อนเพลีย และเบื่ออาหาร ต่อมาจะมีอาการคล้ายปอดอักเสบ ได้แก่
มีไข้สูง ไอแห้งๆ หรืออาจมีเสมหะ หายใจไม่สะดวก หนาวสั่นและเจ็บหน้าอก

“น้ำที่เติมซดเชย (Make-up water)” หมายถึง น้ำสะอาดที่เติมลงไป
ในหอผึ่งเย็นเพื่อทดแทนน้ำที่สูญเสียไปจากการระเหย การระบาย การรั่วไหล
หรือเป็นละอองปลิว

“การระบาดของโรคลิจิเยียนแนร์” หมายถึง การเกิดโรคตั้งแต่ 1 ราย
ขึ้นไป

“สารยับยั้งตะกรัน (Scale inhibitor)” หมายถึง สารเคมีที่เติมลงใน
น้ำเพื่อป้องกันการเกิดตะกรัน

“สารกำจัดตะกรัน (Descalants)” หมายถึง สารเคมีที่เติมลงไปในน้ำ
เพื่อใช้กำจัดตะกรัน

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิสต์ไอโณแลลาในห่อหุ้มเย็นของอาคารในประเทศไทย 5

6 ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิสต์ไอโณแลลาในห่อหุ้มเย็นของอาคารในประเทศไทย

“อาคาร” หมายถึง

- (1) อาคารตามกฎหมายว่าด้วยอาคารชุด
- (2) อาคารกิจการที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพตามกฎหมายว่าด้วยการสาธารณสุข
- (3) อาคารโรงพยาบาลของทางราชการหรือสถานพยาบาลตามกฎหมายว่าด้วยสถานพยาบาล
- (4) อาคารโรงงานอุตสาหกรรมตามกฎหมายว่าด้วยโรงงานหรือนิคมอุตสาหกรรม
- (5) อาคารโรงเรียนและสถาบันการศึกษาของทางราชการ และเอกชนตามกฎหมายว่าด้วยโรงเรียนราษฎร์ และกฎหมายว่าด้วยสถาบันอุดมศึกษาของทางราชการ
- (6) อาคารของศูนย์การค้าหรือห้างสรรพสินค้า
- (7) อาคารตามกฎหมายควบคุมอาคารหรือการสาธารณสุข

“พนักงานเจ้าหน้าที่” หมายถึง

- (1) เจ้าพนักงานท้องถิ่นหรือเจ้าพนักงานสาธารณสุขหรือผู้ซึ่งได้รับแต่งตั้งจากเจ้าพนักงานท้องถิ่นตามกฎหมายว่าด้วยการสาธารณสุข
- (2) ผู้ซึ่งรัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขแต่งตั้งให้ปฏิบัติการตามกฎหมายสถานพยาบาล
- (3) เจ้าพนักงานสาธารณสุข หรือผู้ซึ่งรัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขแต่งตั้งให้เป็นพนักงานเจ้าหน้าที่ปฏิบัติตามกฎหมายโรคติดต่อ

ข้อ 4 หน้าที่ความรับผิดชอบ

- (1) ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคารที่มีการติดตั้งห่อหุ้มเย็นมีหน้าที่ต้องปฏิบัติตามดังต่อไปนี้

(ก) จัดทำแผนหรือโครงการควบคุมป้องกันโรคลิสต์เจียนแนร์ประจำอาคาร โดยอย่างน้อยต้องมีองค์ประกอบดังนี้

- การประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพของโรคลิสต์เจียนแนร์ จากห่อหุ้มเย็นตามแบบฟอร์มรายการตรวจสอบเพื่อประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดโรคลิสต์เจียนแนร์ของห่อหุ้มเย็นท้ายข้อปฏิบัตินี้

- การจัดเก็บรวบรวมสถิติ ข้อมูล และจัดทำบันทึกรายละเอียดของกิจกรรมที่ได้ดำเนินการตามโครงการหรือแผนปฏิบัติการทั้งหมด

(ข) จัดให้มีและใช้มาตรการคุ้มครองความปลอดภัยแก่ผู้ควบคุมและบำรุงรักษาห่อหุ้มเย็นของอาคาร โดยผู้ควบคุมจะต้องผ่านการฝึกอบรมหลักสูตรผู้ควบคุมและบำรุงรักษาห่อหุ้มเย็น ด้านการป้องกันและควบคุมเชื้อลิสต์ไอโณแลลา ที่กรมอนามัยและกรมควบคุมโรคติดต่อร่วมกันกำหนด

(ค) จัดให้มีผู้ควบคุมและบำรุงรักษาห่อหุ้มเย็นด้านการป้องกันและควบคุมเชื้อลิสต์ไอโณแลลา ที่มีความรู้ความสามารถ และมีคุณวุฒิระดับปริญญาตรี ด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ อนามัยสิ่งแวดล้อม อาชีวอนามัยสาธารณสุขศาสตร์ หรือสาขาอื่นๆ ที่มีประสบการณ์และความรู้ด้านการสาธารณสุข

ในกรณีที่ไม่สามารถจัดหาผู้ควบคุมและบำรุงรักษาห่อหุ้มเย็นไว้เป็นการประจำได้ ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคาร อาจมอบหมายให้ บุคคลอื่นหรือผู้รับจ้าง ที่มีความชำนาญ ประสบการณ์ และคุณวุฒิดังกล่าว รวมทั้งผ่านการฝึกอบรมหลักสูตรผู้ควบคุมและบำรุงรักษาห่อหุ้มเย็นด้านการป้องกันและควบคุมเชื้อลิสต์ไอโณแลลา เพื่อควบคุมและบำรุงรักษาห่อหุ้มเย็นแทนได้

(2) ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคารมีหน้าที่ต้องจดทะเบียนระบบห่อหุ้มเย็นทุกระบบของอาคาร กับพนักงานเจ้าหน้าที่ตามแบบฟอร์มการจดทะเบียนห่อหุ้มเย็นท้ายข้อปฏิบัตินี้

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อสลิโคโนเนลลาในหอฝิ่นของอาคารในประเทศไทย 7

(3) ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคาร ต้องจัดให้มีคู่มือคำแนะนำไว้ประจำระบบปรับอากาศทุกระบบ โดยคู่มือคำแนะนำอย่างน้อยต้องมีเนื้อหารายละเอียด ดังต่อไปนี้

- (ก) แผนผังของระบบปรับอากาศ
- (ข) วิธีการใช้งานของระบบ
- (ค) ข้อควรระวังที่จำเป็นซึ่งระบุวิธีการและความถี่ในการตรวจสอบสภาพของระบบ รวมถึงขั้นตอนการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของระบบ
- (ง) รายละเอียดของผู้จำหน่ายอุปกรณ์ระบบปรับอากาศที่อยู่ และหมายเลขโทรศัพท์ที่ใช้ติดต่อ

(4) ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคาร ต้องปฏิบัติหรือแก้ไข หรือปรับปรุงให้ถูกต้องตามข้อปฏิบัติฉบับนี้ทุกประการ

ส่วนที่ 2 หอฝิ่น

ข้อ 5 การออกแบบ และก่อสร้างหอฝิ่นต้องปฏิบัติดังนี้

- (1) เพื่อทำให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพน้อยที่สุดต่อผู้อยู่ในอาคาร และประชาชนทั่วไป การติดตั้งระบบฝิ่นของอาคาร ต้องได้รับความเห็นชอบจากผู้อนุญาตตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องก่อน
- (2) ระบบฝิ่นควรได้รับการออกแบบ และก่อสร้างในลักษณะช่วยลดการแพร่กระจายของละอองปลิวจากระบบ และช่วยให้เกิดความสะอาดและปลอดภัยต่อการปฏิบัติงานการทำลายเชื้อและการทำความสะอาดเป็นประจำ
- (3) การออกแบบระบบฝิ่น ควรมีลักษณะดังต่อไปนี้
 - (ก) ง่าย ใช้งานสะดวก ทั้งนี้ให้หลีกเลี่ยงการออกแบบอุปกรณ์ของระบบฝิ่นที่เป็นท่อปลายตัน วง ห่วง และช่อง

8 ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อสลิโคโนเนลลาในหอฝิ่นของอาคารในประเทศไทย

(ข) มีช่องทางเข้าไปบริเวณส่วนต่างๆ ของระบบได้โดยสะดวก เพื่อการตรวจสอบ การเก็บตัวอย่าง การทำความสะอาด การทำลายเชื้อ การซ่อมบำรุงและการปรับปรุงแก้ไข

(4) หอฝิ่นใหม่ที่ติดตั้งใหม่หรือได้รับการปรับปรุงแก้ไขใหม่ต้องมีอุปกรณ์ที่จะช่วยลดการเกิด และการกระจายละอองออกมาของละอองปลิว ดังต่อไปนี้

- (ก) ระบบจ่ายน้ำภายในหอฝิ่นเย็นที่มีการฟั่นละอองปลิวออกจากหอฝิ่นน้อยที่สุด
- (ข) อุปกรณ์กำจัดละอองปลิวที่มีประสิทธิภาพสูงในการดักละอองปลิว

(ค) ผนังล้อมรอบด้านข้างเหนืออ่างรองรับน้ำในหอฝิ่นเย็น เพื่อลดผลกระทบจากแรงลมภายนอกที่จะพัดพาละอองปลิวออกทางด้านข้างของหอฝิ่นเย็นได้ โดยผนังดังกล่าวควรทึบแสงเพื่อป้องกันไม่ให้แสงแดดผ่านเข้าไป ทำให้เกิดการเจริญเติบโตของสาหร่ายและเชื้อสลิโคโนเนลลา

(5) วัสดุที่ใช้ก่อสร้างหอฝิ่นเย็นต้องไม่สึกกร่อนง่าย ต้องทนทานต่อสารเคมี ระบาย ไม่มีรูพรุน ทึบแสง และผ่านการทำลายเชื้อแล้ว รวมทั้งต้องไม่เป็นวัสดุที่จะเอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโต และการเพิ่มขยายตัวอย่างรวดเร็วของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้

(6) ระบบระบายน้ำทิ้ง ต้องอยู่ตำแหน่งล่างสุดของอ่างรองรับน้ำในหอฝิ่นเย็น เพื่อให้สามารถระบายน้ำทั้งหมดในระบบฝิ่นเย็น ได้ง่าย และสะดวก

ข้อ 6 สถานที่ติดตั้งหอฝิ่นเย็น ต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้

- (1) ตำแหน่งที่ตั้งหอฝิ่นเย็นต้องอยู่ห่างจากบริเวณต่อไปนี้ไม่น้อยกว่า 5 เมตร โดยวัดจากฐานตั้งหอฝิ่นเย็น

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อสลิโอะเนลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย 9

- ในอาคาร
- (ก) ทางลมเข้า (Air inlets) เพื่อระบาย และหมุนเวียนอากาศ
 - (ข) พื้นที่ที่มีคนอยู่อาศัยและเปิดหน้าต่าง
 - (ค) ทางเท้า และบริเวณการจราจร
 - (ง) ที่หรือทางสาธารณะ
 - (จ) ช่องระบายอากาศทั้งจากห้องครัว
 - (ฉ) ระบบส่งลมเย็นหรือบริเวณอื่นๆ ของระบบรวมทั้งช่องดูดอากาศเข้าของอาคารที่อาจมีสารอาหาร เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อสลิโอะเนลลา
 - (ซ) ถังเก็บกักหรือพักน้ำของอาคาร
- ในกรณีที่อาคารเดิมที่ไม่มีการดัดแปลงหรือถอนและเปลี่ยนแปลงการใช้อาคาร ซึ่งไม่สามารถติดตั้งหอผึ่งเย็นให้อยู่ห่างจากบริเวณดังกล่าว ในระยะที่กำหนดได้ ต้องจัดให้มีมาตรการป้องกันการแพร่กระจายของละอองปิวจากหอผึ่งเย็น
- (2) ในการกำหนดตำแหน่งที่ตั้งของหอผึ่งเย็น ต้องคำนึงถึงอิทธิพลจากผลกระทบของอาคารที่อยู่ใกล้เคียงทิศทางของกระแสลม และการพัดกระจายตัวของลมที่อยู่เหนืออาคารเหล่านี้ด้วย รวมทั้งหอผึ่งเย็นต้องติดตั้งอยู่ห่างและอยู่ใต้ทิศทางลมจากช่องดูดอากาศเข้าของอาคารด้วย

ข้อ 7 น้ำที่เติมขดเชย ในระบบหมุนเวียนน้ำต้องเป็นน้ำจากแหล่งน้ำเดียวกันที่ใช้ในหอผึ่งเย็น

ข้อ 8 การระบายน้ำทั้งจากหอผึ่งเย็น ต้องปฏิบัติดังต่อไปนี้

- (1) น้ำทั้งจากหอผึ่งเย็นต้องมีคุณภาพได้มาตรฐานตามกฎหมายว่าด้วยโรงงาน

10 ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อสลิโอะเนลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย

- (2) น้ำจากท่อส่งน้ำและน้ำทิ้งจากระบบปรับอากาศหรือระบายอากาศ ต้องระบายทิ้งลงสู่ที่ระบายที่มีอุปกรณ์หรือข้อต่อที่ป้องกันมิให้น้ำทิ้งไหลย้อนกลับเข้าสู่ระบบปรับอากาศหรือระบายอากาศ

ข้อ 9 การทดสอบก่อนใช้งาน ระบบปรับอากาศต้องปฏิบัติดังต่อไปนี้

- (1) ระบบปรับอากาศของอาคารต้องมีคุณลักษณะ และการใช้งานเป็นไปตามกฎหมายว่าด้วยการควบคุมอาคาร
- (2) หอผึ่งเย็นต้องได้รับการทดสอบอย่างเหมาะสมก่อนใช้งาน เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย
- (3) ระบบปรับอากาศทั้งหมดภายในอาคารต้องอยู่ในสภาพสะอาดปราศจากสิ่งสกปรกก่อนใช้งาน
- (4) ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคาร ต้องจัดให้มีมาตรการควบคุมความเสี่ยงต่อสุขภาพ ที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างดำเนินการทดสอบก่อนใช้งาน การเริ่มต้นใช้งาน และในระหว่างการใช้งานตามปกติของระบบปรับอากาศ

(5) การใช้งานหอผึ่งเย็นของอาคารต้องปฏิบัติดังต่อไปนี้

- (ก) กรณีที่ใช้งานหอผึ่งเย็นสลับกันเป็นช่วงๆ อย่างน้อยต้องเปิดใช้งานสัปดาห์ละครั้งและน้ำที่ใช้ในหอผึ่งเย็นต้องผ่านการบำบัด และตรวจสอบคุณภาพแล้ว

(ข) กรณีที่หยุดใช้งานหอผึ่งเย็นนานกว่า 1 สัปดาห์ น้ำในหอผึ่งเย็นต้องผ่านการบำบัดด้วยสารชีวฆาตทันทีเมื่อมีการใช้งานหอผึ่งเย็นใหม่

(ค) กรณีที่หยุดใช้งานหอผึ่งเย็นนานกว่า 1 เดือน ต้องระบายน้ำในหอผึ่งเย็นทิ้ง แล้วทำความสะอาด และทำลายเชื้อในหอผึ่งเย็นนั้น อย่างน้อยเดือนละ 1 ครั้ง

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลีสทีโอเนลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย 11

(ง) กรณีที่หยุดใช้งานหอผึ่งเย็น โดยไม่มีกำหนด ต้องระบายน้ำ
ในหอผึ่งเย็นทิ้ง โดยไม่ปล่อยให้หมักน้ำขัง

ส่วนที่ 3

การดูแลบำรุงรักษาและตรวจสอบเฝ้าระวังระบบผึ่งเย็น

ข้อ 10 ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคารต้อง
ดำเนินการและบำรุงรักษาระบบผึ่งเย็นดังต่อไปนี้

(1) ซ่อมแซม ดูแล และบำรุงรักษาหอผึ่งเย็นให้อยู่ในสภาพที่ดี
และสะอาดพร้อมที่จะใช้งานได้ตลอดเวลา

(2) จัดหาคู่มือการบำรุงรักษาประจำระบบผึ่งเย็นทุกระบบซึ่งอย่างน้อย
ต้องประกอบด้วย

(ก) แผนผังโครงสร้างที่สมบูรณ์ของระบบการระบายอากาศและ
ระบบผึ่งเย็น

(ข) วิธีการทำความสะอาด การทำลายเชื้อ และขั้นตอนการกำจัด
สิ่งปนเปื้อนพร้อมทั้งคำแนะนำในการรื้อถอนส่วนประกอบ

(ค) วิธีการบำบัดน้ำในหอผึ่งเย็น

(ง) วิธีการปิด-เปิด และเดินเครื่อง

(3) การบำรุงรักษาระบบผึ่งเย็นเป็นประจำต้องดำเนินการโดยผู้ที่มี
ความรู้ความสามารถ ความชำนาญและประสบการณ์ในการป้องกันอันตรายที่
เกิดขึ้นจากการปฏิบัติงานได้

(4) ตรวจตราความสะอาด ความสกปรก และกากตะกอนในหอผึ่งเย็น
ทุกเครื่อง สัปดาห์ละครั้งโดยใช้สายตา

12 ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลีสทีโอเนลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย

(5) ต้องจัดทำและดำเนินการตามแผนการบำรุงรักษาหอผึ่งเย็น
รวมถึง การทำความสะอาด การทำลายเชื้อ และการบำบัดน้ำสำหรับหอผึ่งเย็น
ทุกเครื่องเพื่อเป็นการป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อลีสทีโอเนลลา และทำให้
สารเคมีที่ใช้ในการบำบัดน้ำมีประสิทธิภาพสูงสุด

(6) อาจนำเครื่องกรองน้ำ แสงอัลตราไวโอเลต ก๊าซโอโซนและอื่นๆ
มาช่วยในการบำรุงรักษาหอผึ่งเย็น แต่ต้องไม่เป็นการนำมาใช้เพื่อทดแทนการ
ทำความสะอาด การทำลายเชื้อและการบำบัดน้ำตามแผนการประจำในข้อ 10(5)

ข้อ 11 การทำความสะอาดและการทำลายเชื้อ ในระบบผึ่งเย็นของอาคารต้อง
ปฏิบัติ ดังนี้

(1) การทำลายเชื้อ การทำความสะอาดและการกำจัดตะกอนในหอ
ผึ่งเย็น โดยปกติทั่วไปต้องกระทำอย่างน้อย 1 ครั้งภายใน 6 เดือน หรือมากกว่า
เมื่อจำเป็น

(2) การทำความสะอาดและการทำลายเชื้อต้องกระทำในหอผึ่งเย็นที่
มีสภาพ ดังต่อไปนี้

(ก) มีการปนเปื้อนในระหว่างการก่อสร้างจากฝุ่นหรือสารอันตราย
ต่างๆ

(ข) หยุดใช้งานมานานกว่า 1 เดือน

(ค) ถูกดัดแปลงแก้ไขทางกลไกหรือถอดชิ้นส่วนออกในลักษณะ
ที่อาจทำให้หอผึ่งเย็น ได้รับการปนเปื้อนได้

(ง) เมื่อสภาพแวดล้อมรอบหอผึ่งเย็นเต็มไปด้วยฝุ่นหรือ
ไม่สามารถควบคุมคุณภาพน้ำได้หรือ เมื่อหอผึ่งเย็นที่อยู่ใกล้เคียงกันเป็นแหล่ง
การระบาดของโรคเลิเจียนแนร์

(จ) อื่นๆ ตามที่พนักงานเจ้าหน้าที่เห็นควร

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝิ่นเย็นของอาคารในประเทศไทย 13

(3) ระบบเก็บกักน้ำพิเศษซึ่งต่อเชื่อมกับระบบฝิ่นเย็น และมีลักษณะน้ำ
ขังนิ่ง ต้องได้รับการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้งานในสภาพปกติ

(4) การทำความสะอาดและทำลายเชื้อ ต้องปฏิบัติ ดังนี้

(ก) เดิมคลอรีนครั้งแรกในน้ำในระบบฝิ่นเย็นเพื่อให้มีคลอรีนอิสระ
ตกค้าง (residual free chlorine) อยู่ในระดับ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อลดความ
เสี่ยงต่อสุขภาพกับผู้ทำความสะอาด แล้วทำการหมุนเวียนน้ำพร้อมๆ กับเติม
ตัวกระจายสารเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโรคของคลอรีน โดย
หมุนเวียนน้ำเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ทำการรักษาปริมาณคลอรีนอิสระ
ให้อยู่ในระดับไม่น้อยกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตรตลอดเวลา

ถ้าในกรณีที่ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของน้ำมากกว่า 8.0
ปริมาณความเข้มข้นของคลอรีนอิสระตกค้างที่วัดได้ต้องอยู่ระหว่าง 15 ถึง
20 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือใช้วิธีการระบายน้ำออกจาก
ระบบอย่างเต็มที่ เป็นเวลาหลายๆ ชั่วโมง เพื่อลดค่าความเป็นกรดต่างและ
ปริมาณคลอรีนในระบบลง

(ข) ระบายน้ำทิ้งออกจากเส้นท่อและทำความสะอาดระบบจ่ายน้ำ
บ่อสูบน้ำและหอฝิ่นเย็นทำการล้างบริเวณหรือทางที่จะเข้าไปยังหอฝิ่นเย็นและ
อุปกรณ์ต่างๆ สำหรับตะกรันและตะกอนอื่นๆ ที่ไม่สามารถกำจัดออกไปได้
ให้ใช้สารเคมีสำหรับกำจัดตะกรัน ที่ไม่ทำให้เกิดความเสียหายแก่หอฝิ่นเย็น
และเส้นท่อ

ให้หลีกเลี่ยงวิธีทำความสะอาดที่ก่อให้เกิดละอองน้ำล่องลอย
มากเกินไป เช่น ระบบฉีดน้ำแรงดันสูง เป็นต้น หากไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ให้ปิด
ประตู หน้าต่าง และช่องลมที่อยู่ใกล้เคียงให้สนิทก่อนการทำความสะอาด

ผู้ที่ต้องฉีดน้ำด้วยระบบแรงดันสูงต้องได้รับการฝึกอบรมและต้อง
สวมอุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคลตามข้อ 19(2) ในขณะที่ปฏิบัติงาน
ทุกครั้ง

14 ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝิ่นเย็นของอาคารในประเทศไทย

(5) เติมน้ำสะอาดและคลอรีนซ้ำเพื่อให้ระดับคลอรีนอิสระตกค้าง
ไม่น้อยกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

(6) ระบายและถ่ายเทน้ำทิ้ง แล้วเปลี่ยนถ่ายเติมน้ำสะอาด สารเคมี
และสารชีวฆาตที่ใช้ในการบำบัดคุณภาพน้ำให้อยู่ในระดับเหมาะสมก่อนเปิด
เดินเครื่องระบบ

(7) ในระหว่างการทำความสะอาดและการทำลายเชื้อ ควรปิดพัดลม
ของหอฝิ่นเย็นทุกครั้ง

(8) โดยทั่วไปน้ำในหอฝิ่นเย็นต้องมีปริมาณความเข้มข้นของคลอรีน
อิสระตกค้างไม่น้อยกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรตลอดเวลา

ข้อ 12 การบำบัดน้ำ ในระบบฝิ่นเย็นของอาคารต้องปฏิบัติดังต่อไปนี้

(1) เพื่อควบคุมเชื้อลิจิโอนัลลา กรมวิธีการบำบัดน้ำต้องลดหรือ
ป้องกันการเกิดขึ้นของสิ่งต่างๆ ในระบบฝิ่นเย็นดังต่อไปนี้

(ก) ตะกรัน และสิ่งที่เป็นผลผลิตจากการกัดกร่อน ซึ่งอาจจะเป็น
แหล่งอาศัยและคุ้มครองเชื้อลิจิโอนัลลาในระบบ

(ข) ตะกอนซึ่งอาจไปลดประสิทธิภาพกรรมวิธีการบำบัดน้ำ

(ค) แบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นๆ

(2) ใช้สารชีวฆาตเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของตะไคร่ และสาหร่าย
สำหรับกรณีที่มีการเจริญเติบโตของตะไคร่และสาหร่ายอย่างรวดเร็ว ให้ใช้สาร
ทำความสะอาดที่มีฤทธิ์เป็นด่างกำจัด และทำให้แตกกระจายออกไป แล้วจึง
ชะล้างทำความสะอาดและเติมสารชีวฆาตซ้ำอีกครั้ง

(3) ในการกำจัดตะกอนเลนอาจใช้ตัวกระจายสาร หรือสารเคมีที่
ช่วยให้เกิดการรวมตัวก็ได้

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝิ่นของอาคารในประเทศไทย 15

(4) สารเคมีที่ใช้ในการบำบัดน้ำต้องไม่มีฤทธิ์ที่เป็นผลเสียต่อวัสดุ อุปกรณ์ที่เป็นโลหะที่ใช้ในระบบเส้นท่อ เช่น ยาง และโลหะที่เคลือบสาร อีพ็อกซี่ป้องกันการกัดกร่อนเป็นต้น และต้องเหมาะสมเป็นกลางต่อวัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในงานระบบเส้นท่อ

(5) การบรรจุ เก็บสะสมและควบคุมดูแลสารเคมีต้องปฏิบัติตาม ข้อกำหนดของกฎหมายที่เกี่ยวข้อง

ข้อ 13 การใช้สารชีวฆาตต้องปฏิบัติดังต่อไปนี้

(1) ต้องใช้สารชีวฆาตอย่างน้อย 2 ชนิด โดยใส่สลับกันสัปดาห์ละครั้ง เพื่อป้องกัน อุบัติการณ์คือสารเคมีของเชื้อจุลินทรีย์

(2) ก่อนเริ่มดำเนินการบำบัดน้ำด้วยสารชีวฆาต ต้องมั่นใจว่าระบบ ฝิ่นเย็นอยู่ในสภาวะที่สะอาด

(3) การป้องกันการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ในระบบฝิ่นเย็นต้องใช้สารชีวฆาตด้วยวิธีการเติมใส่เป็นครั้ง แบบไม่ต่อเนื่อง (Shot/Slug dose) และให้รวมถึงการเติมสารชีวฆาตใส่ลงในอ่างรองรับน้ำของ หอฝิ่นเย็นโดยตรง เป็นระยะสลับกันด้วยวิธีแบบเดียวกัน

(4) สารชีวฆาตที่ใช้ในการกำจัดและควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อ ลิจิโอนัลลา ต้องมีคุณสมบัติดังนี้

(ก) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรฐานและได้รับการจดทะเบียนอย่าง ถูกต้อง โดยสารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการบำบัดน้ำต้องได้รับอนุญาตให้ใช้และ ปฏิบัติตามข้อกำหนดของหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

(ข) มีประสิทธิภาพที่เชื่อถือได้ในการทำลายเชื้อลิจิโอนัลลาและ เชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้กว้างขวางเมื่อใช้ในปริมาณหรือขนาดตามที่ผู้ผลิตหรือ ผู้จำหน่ายได้กำหนดหรือแนะนำไว้

16 ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝิ่นของอาคารในประเทศไทย

(ค) สารชีวฆาตอื่นที่นำมาใช้ต้องมีส่วนช่วยสนับสนุน ให้สาร ชีวฆาตที่ใช้สำหรับทำลายเชื้อลิจิโอนัลลาทำงานอย่างมีประสิทธิภาพสมบูรณ์ ยิ่งขึ้น และช่วยให้ระบบฝิ่นเย็นปลอดจากภาวะใดๆ ทางจุลชีววิทยา

(ง) ไม่รบกวนต่อวิธีการชั้นสูงเพื่อจำแนกชนิดและประเภทของ เชื้อลิจิโอนัลลา

(จ) เหมาะสมทั้งทางด้านกายภาพและเคมีกับน้ำที่ผ่านกรรมวิธี การบำบัดแล้ว

(5) สารเคมีที่ใช้และผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End-Products) ที่เกิดขึ้น ภายหลังจากการบำบัดน้ำต้องสามารถย่อยสลายทางชีวภาพและเคมีได้ โดย ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด สำหรับในกรณีที่มี การระบาย หรือเกิดอุบัติเหตุรั่วไหลของสารเคมี หรือผลิตภัณฑ์สุดท้ายลงสู่ ระบบบำบัดน้ำ น้ำทิ้งจากระบบต้องผ่านการบำบัดคุณภาพน้ำก่อนระบายลงสู่ แหล่งรองรับน้ำสาธารณะ

ข้อ 14 การบันทึกข้อมูล ต้องปฏิบัติดังต่อไปนี้

(1) ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคาร ต้องจัดให้มีการบันทึกในสมุดบันทึกประจำหอฝิ่นเย็นทุกเครื่อง พร้อมให้ข้อมูลที่ ถูกต้องเพียงพอ และสะดวกต่อการตรวจสอบขอข้อมูลของพนักงาน เจ้าหน้าที่ ตลอดเวลา การบันทึกข้อมูลต้องครอบคลุมรายละเอียด ดังต่อไปนี้

(ก) รายละเอียดเกี่ยวกับหอฝิ่นเย็น เช่น ที่ตั้ง แบบ รุ่น และขนาด เป็นต้น

(ข) ชื่อผู้บันทึกและเก็บรักษาสมุดบันทึกข้อมูล

(ค) ชื่อบุคคลหรือบริษัทที่รับผิดชอบในการประเมินความเสี่ยง แผนปฏิบัติการ การจัดการการป้องกันและข้อควรระวัง

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝ้งเย็นของอาคารในประเทศไทย 17

- (ง) ชื่อบุคคลหรือบริษัทที่ดำเนินการบำบัดน้ำ
 - (จ) รายละเอียดในการบำรุงรักษา เช่น
 - วันที่และผลในการตรวจตราเบื้องต้น โดยสายตา
 - วันที่ทำความสะอาดและทำลายเชื้อ
 - วันที่ทำการบำบัดน้ำด้วยสารเคมีและสารชีวภาพ
 - วันที่ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบเฝ้าระวังคุณภาพน้ำ
- และเชื้อลิจิโอนัลลา รวมทั้งวันที่รายงานผลการตรวจสอบ
- (ฉ) รายละเอียดในการปรับปรุงแก้ไข และวันที่เริ่มดำเนินการ
- (2) การบันทึกข้อมูลตามข้อ 14 (1) ต้องมีลายเซ็นของผู้ปฏิบัติงาน หรือผู้ที่รับผิดชอบรับรองกำกับว่าได้มีการดำเนินงานจริง
- (3) สมุดบันทึกต้องเก็บรักษาไว้อย่างน้อย 2 ปี

ข้อ 15 แผนการดำเนินงานเมื่อเกิดการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในอาคาร ต้อง ปฏิบัติดังต่อไปนี้

- (1) ถ้าปรากฏว่ามีหรือสงสัยว่าจะมีการระบาดของโรคลีเจียนแนร์เกิดขึ้น ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคารต้องแจ้งพนักงาน เจ้าหน้าที่ที่ทราบทันที
- (2) ในกรณีที่มีสงสัยว่าจะมีการระบาดของโรคลีเจียนแนร์อันเนื่องมาจากหอฝ้งเย็นของอาคาร ให้พนักงานเจ้าหน้าที่เรียก หรือขอข้อมูลเอกสาร หรือหลักฐานจากผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือ ผู้ครอบครองอาคาร ดังนี้
 - (ก) แบบแปลนอาคารที่แสดงรายละเอียดชั้นต่างๆ ในอาคาร ที่ตั้งของหอฝ้งเย็น และช่องทางสำหรับอากาศภายนอกระบายเข้าสู่อาคาร
 - (ข) แผนผังวงจรของหอฝ้งเย็น
 - (ค) สมุดบันทึกประจำหอฝ้งเย็น

18 ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝ้งเย็นของอาคารในประเทศไทย

(ง) หอฝ้งเย็นที่สงสัยเป็นต้นเหตุของการระบาดของโรคต้อง ไม่มีการระบายน้ำทิ้ง หรือทำลายเชื้อก่อนพนักงานเจ้าหน้าที่จะดำเนินการ เก็บตัวอย่างน้ำส่งตรวจ

(จ) ข้อมูลอื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับการสอบสวนทางวิทยาการระบาด

(3) เมื่อได้ชั้นสูตรแน่ชัดแล้วว่าหอฝ้งเย็นใดเป็นต้นเหตุการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ให้พนักงานเจ้าหน้าที่ออกคำสั่งให้ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคารทำความสะอาดและทำลายเชื้อทันที ในหอฝ้งเย็นที่เกี่ยวข้องกับการระบาดของโรคตามขั้นตอน ดังนี้

เติมสารคลอรีนหรือสารประกอบคลอรีนลงในน้ำของระบบ เพื่อ ให้มีคลอรีนอิสระในน้ำอยู่ระดับ 20-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 1-2 ชั่วโมง พร้อมกับเติมตัวกระจายสารทางชีวภาพ (biodispersant) ทันที หรือในเวลาเดียวกัน

(ก) หมุนเวียนน้ำในระบบโดยปิดพัดลมอย่างน้อย 6 ชั่วโมง และรักษาระดับคลอรีนอิสระให้อยู่ต่ำสุดที่ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตลอดเวลา

(ข) หลังจาก 6 ชั่วโมงแล้วให้ขจัดคลอรีน (dechlorinate) และระบายน้ำออกจากระบบ

(ค) ทำความสะอาดหอฝ้งเย็น บ่อสูบน้ำ และระบบจ่ายน้ำ ทั้งนี้ ผู้ปฏิบัติงาน จะต้องสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคลตามข้อ 19(2)

(ง) เติมน้ำสะอาด ใส่สารคลอรีนหรือสารประกอบคลอรีน

(จ) หมุนเวียนน้ำซึ่งมีคลอรีนอิสระที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรอีกครั้ง ในขณะที่ปิดพัดลมเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(ฉ) ขจัดคลอรีนและระบายน้ำออกจากระบบ

(ช) เติมและหมุนเวียนน้ำสะอาดอีกครั้งแล้วเก็บตัวอย่างน้ำไป ตรวจวิเคราะห์

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย 19

(ข) เปิดใช้งานระบบฝึ่งเย็นตามปกติใหม่

(ฅ) โดยทั่วไปน้ำในหอฝึ่งเย็นต้องมีปริมาณความเข้มข้นของ
คลอรีนอิสระตกค้างไม่น้อยกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรตลอดเวลา

ข้อ 16 การเก็บตัวอย่างน้ำและการตรวจสอบฝึ่งเย็นทางจุลชีววิทยา ต้อง
ปฏิบัติดังต่อไปนี้

(1) ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคาร ต้อง
จัดให้มีและดำเนินการทดสอบหาเชื้อลิจิโอนัลลา และการตรวจนับแบคทีเรีย
ทั้งหมดตามแผนเป็นประจำ เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำ โดย
ให้มีการตรวจวัดทุกๆ 3 เดือน สำหรับอาคารสถานพยาบาล และตรวจวัดทุกๆ
6 เดือน สำหรับอาคารอื่นๆ

(2) การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อการฝึ่งเย็นทางจุลชีววิทยาต้องปฏิบัติดังนี้

(ก) เก็บตัวอย่างน้ำก่อนมีการใช้สารชีวฆาต หรือเก็บตัวอย่างน้ำ
ในขณะที่เปิดเดินเครื่องระบบ และมีน้ำไหลเวียนในระบบแล้วอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

(ข) ในกรณีที่มีการทำลายเชื้อจะต้องเก็บตัวอย่างน้ำหลังจากการ
ทำลายเชื้อแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน

(ค) เก็บรักษาตัวอย่างน้ำไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส หรือ
แช่เย็น และนำส่งเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจวิเคราะห์ทันที หรืออย่างช้า
ภายใน 5 วัน

(ง) เก็บตัวอย่างน้ำ ณ จุดที่น้ำไหลเข้ามาเติมชดเชยในระบบ
ในอ่างรองรับน้ำและท่อน้ำทิ้ง จากหอฝึ่งเย็นแต่ละเครื่องอย่างน้อย 3 ตัวอย่าง

(3) ห้องปฏิบัติการเอกชนที่ตรวจวิเคราะห์เชื้อลิจิโอนัลลาต้องได้รับ
การรับรองจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

20 ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย

(4) ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคารต้อง
จัดส่งรายงานผลการตรวจสอบให้พนักงานเจ้าหน้าที่ หรือกรมอนามัยและกรม
ควบคุมโรคติดต่อ หน่วยงานละ 1 ชุด ตามเวลาที่กำหนดใน 16(1) พร้อมกับ
ข้อมูลที่บันทึกตามรายละเอียดในแบบบันทึกข้อมูลสำหรับการควบคุมเชื้อ
ลิจิโอนัลลาในระบบฝึ่งเย็นที่แนบท้ายข้อปฏิบัตินี้

(5) การตรวจสอบฝึ่งเย็นเชื้อลิจิโอนัลลาในหอฝึ่งเย็นเป็นประจำ
ต้องเป็นส่วนหนึ่งของแผนปฏิบัติที่ดีด้านการบำรุงรักษา การทำความสะอาด
และการติดตามผลอย่างสม่ำเสมอ

ข้อ 17 การแก้ไขการปนเปื้อนจากเชื้อลิจิโอนัลลา ต้องปฏิบัติ ดังต่อไปนี้

(1) ในกรณีที่ตรวจพบเชื้อลิจิโอนัลลาในระบบฝึ่งเย็นให้พนักงาน
เจ้าหน้าที่ออกหนังสือให้ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครอง
อาคารต้องดำเนินการแก้ไขด้วยมาตรการต่างๆ ตามระดับการปนเปื้อนของ
เชื้อลิจิโอนัลลา ดังนี้

(ก) กรณีตรวจพบเชื้อลิจิโอนัลลา น้อยกว่า 100,000 ซี เอฟ ยู
(Colony Forming Unit) ต่อลิตรให้ถือว่าการใช้มาตรการบำรุงรักษาอย่างเดียว
ไม่เพียงพอ ต้องแนะนำให้มีการแก้ไขเพิ่มเติมแผนการบำรุงรักษา การตรวจสอบ
ฝึ่งเย็นและการติดตามผลของระบบฝึ่งเย็นให้ถูกต้องใหม่

(ข) กรณี ตรวจพบเชื้อลิจิโอนัลลา ตั้งแต่ 100,000 ถึงไม่
มากกว่า 1,000,000 ซี เอฟ ยู ต่อลิตร ให้ถือว่าอยู่ในสถานะที่จะมีอันตราย
เกิดขึ้นได้ ต้องออกหนังสือแจ้งเตือนให้มีการประเมินผลวิธีการบำรุงรักษาใหม่
รวมทั้ง กระบวนการทำลายเชื้อในน้ำที่ใช้อยู่ การแก้ไขให้ถูกต้อง การตรวจสอบ
ฝึ่งเย็น และการติดตามผล

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลีสทีโอเนลลาในหอยผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย 21

(ค) กรณีตรวจพบเชื้อลีสทีโอเนลลา ตั้งแต่ 1,000,000 ซี เอฟ ยู ต่อลิตรขึ้นไป ให้ถือว่าอยู่ในสภาวะที่เป็นอันตรายร้ายแรง ต้องออกคำสั่งปิดระบบทันทีเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ทำความสะอาด ทำลายเชื้อ ตรวจสอบฝ้า ระวังและ ติดตามผล

(2) มาตรการแก้ไขในข้อ 17 (1) (ก) และ (ข) ต้องดำเนินการ ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากได้รับรายงานการตรวจพบเชื้อ และภายหลัง ดำเนินการตามมาตรการดังกล่าวแล้วหากยังคงตรวจพบเชื้อก็ต้องแก้ไขซ้ำ จนกระทั่งระบบผึ่งเย็นปราศจากการปนเปื้อน

(3) ในกรณีที่ไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำหรือคำตักเตือน และต่อมาใน ภายหลังตรวจพบว่ามีการปนเปื้อนจากเชื้อลีสทีโอเนลลาอีก ให้พนักงานเจ้าหน้าที่ ต้องสั่งปิดระบบทันที

ส่วนที่ 4

ความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน

ข้อ 18 การฝึกอบรม

บุคคลซึ่งมีหน้าที่ในการดูแลบำรุงรักษา การตรวจสอบฝ้าระวัง การ บำบัดน้ำ และการทำงานของระบบผึ่งเย็น ต้องผ่านการฝึกอบรมตามหลักสูตร ที่กรมอนามัยและกรมควบคุมโรคติดต่อกำหนด

ข้อ 19 ผู้ได้รับใบอนุญาต ผู้ดำเนินการ เจ้าของหรือผู้ครอบครองอาคาร หรือ ผู้ที่ได้รับมอบหมายตามข้อ 4(1) (ค) ต้องจัดให้หมวกและใช้มาตรการป้องกัน อันตรายส่วนบุคคล ดังต่อไปนี้

22 ประกาศกรมอนามัย เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุม
เชื้อลีสทีโอเนลลาในหอยผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย

(1) ผู้ปฏิบัติงานซึ่งมีหน้าที่ในการบำรุงรักษาหอยผึ่งเย็นต้องได้รับทราบ ถึงความเสี่ยงอันตรายของโรคลีเจียนเนอรี่ และได้รับคำแนะนำการใช้อุปกรณ์ ป้องกันอันตรายส่วนบุคคลที่ถูกต้อง

(2) ผู้ปฏิบัติงานต้องได้รับและใช้อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล ที่เหมาะสมตามประเภทของงานและลักษณะสภาวะอันตรายดังต่อไปนี้

(ก) งานตรวจสอบ สภาวะอันตราย ได้แก่ ละอองฝอย ซึ่ง ผู้ปฏิบัติงานต้องได้รับ และใช้อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคลในขณะทำงาน ประกอบด้วยชุดหน้ากากสวมครึ่งหน้าที่สามารถกรองอนุภาคขนาดเล็กกว่า 5 ไมครอนได้ พร้อมชุดแต่งกายทำงานทั่วไป

(ข) งานบำบัดน้ำ สภาวะอันตราย ได้แก่ ละอองฝอย และละออง สารเคมี ซึ่งผู้ปฏิบัติงานต้องได้รับและใช้อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล ในขณะทำงานประกอบด้วย ชุดหน้ากากสวมครึ่งหน้า เช่นเดียวกับข้อ 19 (2) (ก) ถุงมือ รองเท้าครึ่งแข้งซึ่งทำจากวัสดุกันน้ำ และแว่นครอบตาทั้ง 2 ข้าง

(ค) งานฉีดน้ำแรงดันสูง สภาวะอันตราย ได้แก่ ละอองฝอย ซึ่ง ผู้ปฏิบัติงานต้องได้รับและใช้อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคลในขณะทำงาน ประกอบด้วยชุดหน้ากากสวมครึ่งหน้า ชุดหมวกกันน้ำได้ ถุงมือและรองเท้า ครึ่งแข้งซึ่งทำจากวัสดุกันน้ำ และแว่นครอบตาทั้ง 2 ข้าง

(ง) งานทำความสะอาดและบำบัดน้ำด้วยสารเคมีสภาวะอันตราย ได้แก่ ละอองสารเคมีซึ่งผู้ปฏิบัติงานต้องได้รับ และใช้อุปกรณ์ป้องกันอันตราย ส่วนบุคคลในขณะทำงาน ประกอบด้วยชุดหน้ากากสวมเต็มหน้าที่มีดัดจับดูดซึม ชนิดที่กันไอระเหยสารคลอรีนหรือสารเคมี ชุดหมวกกันน้ำได้ ถุงมือ และ รองเท้าครึ่งแข้ง ซึ่งทำจากวัสดุกันน้ำ

(3) เมื่อเกิดอุบัติเหตุสารเคมีหกรดผิวหนังต้องล้างด้วยน้ำสะอาดมากๆ ทันที

- (4) ผู้ปฏิบัติงานต้องปฏิบัติตนให้มีสุขลักษณะส่วนบุคคลตามมาตรฐาน
รวมทั้งสถานที่ที่ปฏิบัติงานต้องมีอ่างล้างมือและห้องอาบน้ำอย่างเพียงพอ
- (5) ห้ามบริโภคอาหาร เครื่องดื่ม หรือสูบบุหรี่ ขณะปฏิบัติงานดูแลบำรุง
รักษา
- (6) ต้องล้างและเช็ดมือให้แห้งก่อนบริโภคอาหาร เครื่องดื่ม หรือสูบบุหรี่
- (7) ผู้ปฏิบัติงานที่ได้สัมผัสกับสารเคมีหรือสารอันตรายหรือได้รับ
มอบหมายให้ปฏิบัติงานตามข้อ 11 และข้อ 12 ต้องได้รับการตรวจสอบสุขภาพตาม
ข้อกำหนดของกฎหมายคุ้มครองแรงงาน
- (8) ในกรณีที่ผู้ปฏิบัติงานรู้สึกว่ามีอาการผิดปกติทางผิวหนัง ระบบการ
หายใจ และอื่นๆ เมื่อต้องสัมผัสกับสารเคมีหรือสารอันตราย ต้องได้รับการตรวจ
รักษาจากแพทย์ทันที

ประกาศ ณ วันที่ 8 มกราคม 2544



(นายวัลลภ ไทยเหนือ)
อธิบดีกรมอนามัย

ภาคผนวก ข

ISO 11731 : 2017 Water quality – Enumeration of Legionella

INTERNATIONAL
STANDARD

ISO
11731

Second edition
2017-05

**Water quality — Enumeration of
*Legionella***

Qualité de l'eau — Dénombrement des Legionella



Reference number
ISO 11731:2017(E)

© ISO 2017

Water quality — Enumeration of *Legionella*

8 Procedure

8.1 Samples

Due to the complex nature of different sample matrices, the laboratory shall determine the appropriate method for each sample type. The decision matrix is provided in Annex J to determine which appropriate method shall be undertaken. Annex J describes the requirements and provides additional options.

In order to ensure the detection of legionellae from water samples, a concentration technique by membrane filtration (see 8.2.2 or 8.2.3) will be required in most cases. Where the concentration of legionellae is expected to be greater than 10^4 colony forming units per litre (cfu/l), direct plating of the unconcentrated sample can also be carried out. For highly contaminated samples, dilute (refer to Annex C for suitable diluents) and use direct plating before and after the pre-treatment (see 8.3). Record volumes of sample diluted or processed and which pre-treatment(s) has (have) been applied.

When the number of legionellae in any given sample is not known, concentration techniques are usually performed. Therefore, follow the procedure described in 8.2.2 or 8.2.3.

8.2 Concentration of water samples

8.2.1 General

For a general description of the membrane filtration technique, see ISO 8199. Filtration can be done by vacuum filtration or positive pressure filtration.

The flow rate should be adjusted so as not to exceed the maximum specified by the manufacturer for the filter size or type.

8.2.2 Membrane filtration and direct placing of the membrane filter on culture media

Filter the water sample (without treatment, after acid treatment and, if required, after heat treatment) through a cellulose nitrate or mixed cellulose esters membrane filter. The acid treatment can also be done directly on the membrane filter in the funnel (see 8.3.2). The volume filtered depends on the particulate content of the water or the desired detection level. The filtered volume of the sample shall be recorded. Carefully remove the membrane filter from the stand with disinfected forceps and place it (right-side up) directly on the culture media, ensuring that no air bubble is trapped underneath.

NOTE Where concentration by filtration is not possible (e.g. due to a high level of deposit), the sample can be concentrated by centrifugation.

8.2.3 Membrane filtration followed by a washing procedure

Filter the water sample through a polycarbonate or polyethersulfone membrane filter. The volume filtered depends on the particulate content of the water or the desired detection level. The filtered volume of the sample shall be recorded. Remove the membrane filter from the stand with disinfected forceps. Work carefully to avoid loss of residual deposit. Place the membrane filter (right-side down) in a screw cap sterile container with or without sterile glass beads. To wash the microorganisms from the membrane filter, add 5 ml to 10 ml of sterile diluent or sample, and shake vigorously using a vortex mixer for at least 2 min. Alternatively, place the container in an ultrasonic water bath for a time interval that has been verified to determine the optimum time interval for maximum recovery. Ensure that the level of diluent covering the membrane is below the level of water in the ultrasonic water bath.

This concentrate represents the prepared sample. Record the volume of the concentrate. Membrane filters may be cut into pieces using sterile scissors to aid elution.

Divide the concentrate into three portions. Use one portion untreated, one portion for treatment with heat (see 8.3.1) and one portion for treatment with acid solution (see 8.3.2).

8.3 Sample pre-treatment

8.3.1 Heat treatment

Add the sample (concentrated or unconcentrated) to a sterile container and place it in a water bath at $(50 \pm 1) ^\circ\text{C}$ for (30 ± 2) min. small volumes (≤ 5 ml) should be used to ensure a short period until the desired temperature is reached. If many samples are treated together or large sample volumes are treated or thick-walled containers are used, monitor the temperature in a separate container similar to that used for the sample. The time starts when the required temperature is reached. Large sample volumes or thick-walled containers should be cooled to avoid overheating after being removed from the water bath.

8.3.2 Acid treatment

Dilute one volume of the sample (concentrated or unconcentrated) with nine volumes of the acid solution, mix well and leave it for $(5,0 \pm 0,5)$ min. If the diluted acid treated sample is used for the calculation of the final concentration of *Legionella* species in the sample, the dilution should be factored. Volumes greater than 0,1 ml can be plated to decrease the limit of detection. Acid treatment can also be done directly on the membrane filter in the funnel. Transfer around 30 ml acid solution onto the membrane filter. Leave it for $(5 \pm 0,5)$ min and remove the acid solution by filtration. Wash the membrane filter with at least 20 ml of the diluent. It is important that the diluent does not rinse the surface of the funnel that had not been in contact with the acid solution.

8.4 Culture

8.4.1 General

The choice of the method used for the enumeration of *Legionella* species depends on the origin/characteristics of the sample and the reason of sampling or investigation. An assumption shall be made about the expected concentration of interfering microorganisms based on experience or origin of the sample. Also, the desired lower limit of detection level needs to be considered. A decision matrix for choosing an appropriate method is described in detail in Annex J. Depending on the desired detection level, it is possible to use more than one plate of the different culture media mentioned in the following subclauses.

8.4.2 Samples with a high concentration of Legionella species and a low concentration of interfering microorganisms

Plate the sample directly if the number of *Legionella* is expected to exceed 10^4 cfu/l. Inoculate and spread 0,1 ml to 0,5 ml of the sample on one plate of BCYE agar and one plate of BCYE+AB agar. Record the inoculated volume.

8.4.3 Samples with a low concentration of Legionella species and a low concentration of interfering microorganisms

8.4.3.1 Direct placing of membrane filter on culture media after membrane filtration

Filter the sample (see 8.2.2) and place the untreated membrane filter directly on one plate of BCYE agar. The membrane filters treated with acid solution according to 8.3.2 are placed on one or more of the selective or highly selective plates of BCYE+AB agar or GVPC agar or MWY agar.

8.4.3.2 Plating after membrane filtration with washing procedure

Inoculate and spread 0,1 ml to 0,5 ml of each concentrated portion of the sample (untreated, heat treated and acid treated) from the membrane filtration with washing procedure (see 8.2.3) on one plate of BCYE agar and on one or more of the selective or highly selective plates of BCYE+AB agar or GVPC agar or MWY agar. Record the inoculated volume.

8.4.4 Samples with a high concentration of interfering microorganisms

Culture samples with a high concentration of interfering microorganisms unconcentrated (direct), concentrated (see 8.2) or diluted (1:10). Divide each subsample into three portions. Use one portion untreated, the second portion for treatment with heat (see 8.3.1) and the third portion for treatment with acid solution (see 8.3.2). Inoculate and spread 0,1 ml to 0,5 ml of each portion of the subsamples on one plate of GVPC agar or one plate of MWY agar. Record the inoculated volume.

8.4.5 Samples with an extremely high concentration of interfering microorganisms

Culture samples with an extremely high concentration of interfering microorganisms unconcentrated and diluted (1:10 and 1:100) after a pre-treatment with a combination of heat and acid. For the combined treatment first, the heat treatment (see 8.3.1) is done followed by the acid treatment (see 8.3.2). It is important to cool the heat-treated sample to room temperature before the acid treatment is done. Prepare dilutions directly after the acid treatment in sterile diluent (see Annex C). Mix well by shaking, using a vortex mixer or an ultrasonic water bath. If necessary, add a layer (just enough to cover the bottom of the container) of sterile glass beads to the sample to aid disaggregation of the material. Inoculate and spread 0,1 ml to 0,5 ml of each portion on one plate of GVPC agar or one plate of MWY agar. Record the inoculated volume.

8.4.6 Incubation

Allow the inoculated plates to stand until the inoculated volume has been absorbed, then invert the plates and incubate at $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ for 7 d to 10 d. Create a humid atmosphere to prevent desiccation of the plates, for example, by placing in an enclosed container. NOTE Validation data using artificially spiked samples have demonstrated no difference in counts between incubation for 7 d and 10 d. Natural samples containing wild strains of *Legionella* can, however, require the full incubation period of 10 d to present growth.

8.4.7 Examination of the plates

Inspect the plates for the first time either on day 2, 3, 4 or 5 followed by a final inspection at the end of the incubation period. This is to identify samples where overgrowth has occurred. The final quantitative result is not available until the end of the incubation period. As *Legionella* grows slowly and can be masked by the growth of other microorganisms, it is also recommended to use the dissection microscope with oblique incident illumination. Record the number of each type of presumptive *Legionella* colony present.

In case of outbreak investigations, it is advisable for samples expected to have a high concentration of interfering microorganisms to check the plates on day 2 to determine if dilutions are needed. Be aware of the potentially negative impact of the conservation of the concentrate or sample for a period of two additional days.

Colonies of *Legionella* are white-grey in general but can also appear in other colours. They are smooth with an entire edge and exhibit a characteristic ground-glass appearance. Under an ultraviolet lamp (5.3), colonies of several species (*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. gratiana*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii* and *L. tucsonensis*) autofluoresce brilliant white; *L. erythra* and *L. rubrilucens* appear red. Colonies of *L. pneumophila* appear dull green often tinged with yellow. The colour of fluorescence can help to differentiate colonies in samples containing different species of *Legionella*. To avoid the possibility that *Legionella* cells could be killed or damaged so that they are not recoverable, plates should not be exposed to ultraviolet light for a longer time than is necessary. It should be noted that new species of *Legionella* might possess characteristics different to those described above.

8.5 Confirmation of presumptive *Legionella* colonies on culture media: BCYE agar and BCYE-cys agar

Subculture from the plate showing the highest counts of presumptive colonies of *Legionella* water volume. When there is only one colony type, pick three presumptive colonies. If more morphological different types of presumptive colonies of *Legionella* are growing on the plate, take at least one colony from each type. Subculture onto a plate of BCYE agar and a plate of BCYE-cys agar. Be careful not to carry over any culture media with the colony and first inoculate a plate of BCYE-cys agar and then a plate of BCYE agar. Incubate at $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ for 2 d to 5 d. Regard as *Legionella* those colonies which grow on the plate of BCYE agar but fail to grow on the plate of BCYE-cys agar. Record the results for each plate. If the initial subcultures do not confirm as *Legionella*, analyse further subcultures of presumptive *Legionella* colonies from another type of plate (culture media or sample treatments).

L. oakridgensis and *L. spiritensis* require L-cysteine and iron (III) for primary isolation but sometimes grow weakly in the absence of added L-cysteine thereafter. Accordingly, careful comparison needs to be made of the differences in growth between supplemented and unsupplemented culture media.

NOTE Alternative procedures can be used to confirm the isolate as *Legionella* species providing the suitability of the alternative procedure is verified.

For special situations like outbreak investigations, at least five presumptive colonies if only one morphology is present, or two presumptive colonies for each type of morphology shall be confirmed. If identification of the *Legionella* colonies is to be carried out and included on the testreport, all typical morphologies present on any of the plates should be confirmed and the identifications reported.

ภาคผนวก ค

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

**INTERNATIONAL
STANDARD**

**ISO
16140-2**

First edition
2016-06-15

**Microbiology of the food chain —
Method validation —**

**Part 2:
Protocol for the validation of
alternative (proprietary) methods
against a reference method**

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes —

*Partie 2: Protocole pour la validation de méthodes alternatives
(commerciales) par rapport à une méthode de référence*



Reference number
ISO 16140-2:2016(E)

© ISO 2016

INTERNATIONAL STANDARD ISO 16140-2:2016(E)

Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method

1 Scope

This part of ISO 16140 specifies the general principle and the technical protocol for the validation of alternative, mostly proprietary, methods for microbiology in the food chain. Validation studies according to this part of ISO 16140 are intended to be performed by organizations involved in method validation.

This part of ISO 16140 is applicable to the validation of methods for the analysis (detection or quantification) of microorganisms in

- products intended for human consumption,
- products intended for animal feeding
- environmental samples in the area of food and feed production, handling, and
- samples from the primary production stage.

This part of ISO 16140 is in particular applicable to bacteria and fungi. Some clauses of this part of ISO 16140 could be applicable to other (micro) organisms or their metabolites on a case-by-case-basis. In the future, guidance for other organisms (e.g. viruses and parasites) will be included in either this part or a separate part of ISO 16140

2 Normative references

The following documents, in whole or in part, are normatively referenced in this document and are indispensable for its application. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO 16140-1, Microbiology of the food chain— Method validation — Part 1: Vocabulary

3 Terms and definitions

For the purposes of this document, the terms and definitions given in ISO 16140-1 apply.

4 General principles for the validation of alternative methods

The validation protocol comprises two phases:

- a method comparison study of the alternative (proprietary) method against the reference method carried out in the organizing laboratory;
- an interlaboratory study of the alternative (proprietary) method against the reference method carried out in different laboratories.

The technical rules for performing the method comparison study and the interlaboratory study are given in Clause 5 and Clause 6, depending upon whether the alternative (proprietary) method is qualitative or quantitative in nature. The data generated in some parts of the validation study are evaluated using the so-called Acceptability Limits (AL) and no statistical evaluation of the data are conducted. These AL are based on experts' opinion and data generated in existing validation studies.

5 Qualitative methods — Technical protocol for validation

5.1 Method comparison study

5.1.1 General considerations

The method comparison study is the part of the validation process that is performed in the organizing laboratory. It consists of three parts namely the following:

- a comparative study of the results of the reference method to the results of the alternative method in (naturally and/or artificially) contaminated samples (so-called sensitivity study);
- a comparative study to determine the relative level of detection (RLOD) in artificially contaminated samples (so-called RLOD study);
- an inclusivity/exclusivity study of the alternative method.

The results (tables and calculations) of the different parts and the interpretation of the results, including discrepant results, shall be given in a study report. Test portions size shall be used as written in the reference method

5.1.2 Paired or unpaired study

The reference and alternative methods shall be performed with, as far as possible, exactly the same sample (same test portion). However, a distinction is made between studies where the same test portion can be used for both the reference and the alternative method due to both methods having exactly the same first step in the (enrichment) procedure and those where different test portions need to be used for the reference and the alternative method (e.g. due to different enrichment broths). In the case where the same test portion is used for both methods, the results from both methods are highly related to each other. For example, when the sample is not contaminated, both methods should find the result of that sample negative. Due to this relationship, the data produced by the reference and the alternative method are named paired or matched. In this part of ISO 16140, the wording “paired study” will be used for this type of study.

The opposite situation where there is no shared initial (enrichment) step for both the reference and the alternative method is also possible. In this case, different test portions coming from the same batch or lot of product have to be used for the two methods and the resulting data are named unpaired or unmatched. In this part of ISO 16140, the word “unpaired study” will be used for this type of study. The choice of having a paired study or an unpaired study depends on the protocols of the reference and alternative method. If there is a common initial step in the (enrichment) procedures, a paired study design is mandatory.

This clause describes the method comparison study if the reference and alternative method have a joint initial step in the (enrichment) procedures (paired study) and if the reference and alternative method do not have a joint initial (enrichment) step (unpaired study). Differences between both types of studies are indicated in the text where appropriate.

5.1.3 Sensitivity study

The sensitivity study aims to determine the difference in sensitivity between the reference and the alternative method. This study is conducted using naturally and/or artificially contaminated samples. Different categories and types shall be tested for this. Acceptability Limits have been defined for the maximum acceptable difference depending on the type of study (paired/unpaired) and the number of categories tested.

5.1.3.1 Selection of categories to be used

The selection of categories and types used within the validation will depend on the type or group of microorganisms and the scope of the validation. If the method is to be applied for a broad range of foods, then at least five categories of food shall be studied. The validation study report shall state the food categories used in the study. If the method is to be validated for a restricted number of food categories, e.g. “ready-to-eat, ready-to-reheat meat products”, and “heat-processed milk and dairy products”, then only these categories need to be studied. In addition to food, feed samples, environmental samples, and primary production stage samples can be included as additional categories. This will broaden the application of the use of the alternative method for these additional categories. For all selected categories (food and others), at least three different types per category shall be included in the study. Annex A presents an overview of the relevant types and categories for specific microorganisms that might be relevant for the validation. Annex A should be used to facilitate the selection of categories, types, and items for the specific microorganism involved. It should not be regarded as a mandatory choice.

When selecting samples for the study, it is of the highest priority to find those that are naturally contaminated. If it is not possible to acquire a sufficient number of naturally contaminated samples, artificial contamination of samples is permissible (see Annex B and Annex C). Details on the preparation of the artificially inoculated samples should be given in the validation study report. It is desirable that food samples come from as wide a distribution as possible in order to reduce any bias from local food specialities and to broaden the range of validation.

It shall be ensured that with the selection of the different types, both high and low (natural) background microflora, different types of stresses due to processing, and raw (unprocessed) items are included in the study.

EXAMPLE For the validation of a method for detection of *Listeria monocytogenes* and the category “ready to-eat, ready-to-reheat meat products”, the types can be (1) cooked meat products (lower background flora, heat stress), (2) fermented or dried meat products (high background flora, pH stress), and (3) raw cured (smoked) ($a_w < 0,92$) (intermediate background flora, a_w stress).

In some cases, for example, for an alternative method that is applicable for a broad range of foods, it is possible to combine the “ready-to-eat” and “raw” categories from the same product group. For example, the categories raw and ready-to-eat meat (products) can be combined into one category having three types divided over relevant raw and ready-to-eat food types. The selection of (combined) food categories should be based on risk analysis.

5.1.3.2 Number of samples

For each category being examined, a minimum of 60 individual samples shall be tested made up of at least three types with at least 20 samples representative for each type (three types × 20 samples for each type = 60 samples). Fractional positive results by either the reference or alternative method (i.e. samples should not be all positive or all negative) shall be obtained for each type tested. In the ideal situation, 10 samples (50 %) tested per type should be positive and 10 negative, but should range between 25 % and 75 %. For each category, at least 30 samples shall have a positive result by the reference and/or the alternative method.

5.1.3.3 Alternative-method result and confirmation

Many alternative-method protocols contain two steps, the first being the enrichment and detection step and the second being the confirmation of the detection result from step one. The end results of the alternative method is the result after step two. The end result will be the same as the result after enrichment and detection in case there is no confirmation step included in the protocol of the alternative method. The (end) result of the alternative method shall be confirmed for the sensitivity study part. All results obtained with the alternative method in an unpaired study shall be confirmed. In a paired study, only the positive results obtained with the alternative method, for which the corresponding result with the reference method was negative, shall be confirmed. This confirmation is needed to determine whether the result is a true-positive or false-positive result. The confirmation test or tests shall be able to recover and confirm the identity of the isolate as being the target of the method. These test(s) can be based on the confirmation procedure of the reference method, the confirmation step of the alternative method in case this procedure is able to isolate and confirm the identity of the target analyte, a combination of both, or by any other means that is able to isolate and confirm the identity of the target analyte. If the enrichments of the reference and alternative methods differ in terms of the number of enrichments (i.e. primary/non-selective and secondary/selective) or total duration of incubation, an additional confirmation pathway is necessary for the validation study. The first pathway shall be that to be used with the alternative method according to its procedure/instructions (regular testing conditions by the alternative method according to the kit insert procedure; this does not include the complementary tests which can be performed during the validation study). The second pathway shall divert a portion of the alternative method's incubated enrichment to that of the reference method such that at minimum, the total duration of incubation of the reference method enrichment(s) is/are respected. The results of the two confirmation pathways are to be reported separately.

5.1.3.4 Calculation and interpretation for sensitivity

In general, the data shall be presented in a report in order to have an overview of the raw data obtained. Information shall be given on the type of contamination (naturally contaminated or artificially contaminated) of the samples used, the type of study design that was used (e.g. paired study or unpaired study), and the confirmation test(s) used to confirm the alternative-method result. For artificially contaminated samples, the (reference to the) procedure used for preparation shall be specified (see also Annex C).

The results obtained for the reference and alternative methods originating from the same sample, meaning from one test portion in case of a paired study or two test portions in case of an unpaired study, shall be described for a paired study according to Table 1 and for an unpaired study according to Table 2. Table 3 is prepared for the summarized sample results for all categories per category (≥ 60 samples) and per type (≥ 20 samples) for both a paired and unpaired study.

Table 1 — Comparison and interpretation of sample results between the reference and alternative methods for a paired study

Result of the (reference or alternative) method per sample			
Reference method	Alternative method (including any confirmations as described in the alternative-method protocol)	Confirmed alternative method (by any means) ^a	Interpretation (based on the confirmed alternative-method result)
+	+	Not needed ^b	Positive Agreement (PA)
-	-	Not needed ^b	Negative Agreement (NA)
+	-	Not needed ^b	Negative Deviation due to false negative alternative-method result (ND)
-	+	+	Positive Deviation (PD)
-	+	-	Negative Agreement due to false positive alternative-method result (NA) ^c
^a Confirmation of the alternative-method result is done according to 5.1.3.3 . ^b No need for additional confirmation test(s). Confirmed alternative-method result is the same as the alternative-method result. ^c This false-positive result (FP) shall also be used to calculate the false positive ratio.			

Table 2 — Comparison and interpretation of sample results between the reference and alternative methods for an unpaired study

Result of the (reference or alternative) method per sample			
Reference method	Alternative method (including any confirmations as described in the alternative-method protocol)	Confirmed alternative method (by any means) ^a	Interpretation (based on the confirmed alternative-method result)
+	+	+	Positive Agreement (PA)
+	+	-	Negative Deviation due to false positive alternative-method result (ND) ^b
-	-	-	Negative Agreement (NA)
-	-	+	Negative Agreement due to false negative alternative-method result (NA)
+	-	-	Negative Deviation (ND)
+	-	+	Negative Deviation due to false negative alternative-method result (ND)
-	+	+	Positive Deviation (PD)
-	+	-	Negative Agreement due to false positive alternative-method result (NA) ^b
^a Confirmation of the alternative-method result is done according to 5.1.3.3 ^b These false-positive results (FP) shall also be used to calculate the false positive ratio.			

Table 3 — Summary of results obtained with the reference and alternative methods of all samples for each category

	Reference-method positive (R+)	Reference-method negative (R-)
Alternative-method positive (A+)	+/+ Positive Agreement (PA)	-/+ Positive Deviation (PD)
Alternative-method negative (A-)	+/- Negative Deviation (ND)	-/- Negative Agreement (NA)

Based on data summarized in Table 3 for the combined categories per category and per type, calculate the values for sensitivity of the alternative method (1) and of the reference method (2), as well as the relative trueness (3) and false positive ratio for the alternative method after the additional confirmation of the results (4) as follows:

$$\text{Sensitivity for the alternative method: } SE_{\text{alt}} = \frac{(PA + PD)}{(PA + ND + PD)} \times 100 \% \quad (1)$$

$$\text{Sensitivity for the reference method: } SE_{\text{ref}} = \frac{(PA + ND)}{(PA + ND + PD)} \times 100 \% \quad (2)$$

$$\text{Relative trueness: } RT = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100 \% \quad (3)$$

$$\text{False positive ratio for the alternative method: } FPR = \frac{FP}{NA} \times 100 \% \quad (4)$$

where N is the total number of samples (NA + PA + PD + ND) and FP is the false-positive results. For explanation of the abbreviations used, see Table 1 to Table 3.

The confirmed alternative-method results shall be used to determine whether the alternative method produces comparable results to the reference method. Calculate the difference between (ND – PD) for both paired and unpaired studies and the sum of (ND + PD) for paired studies. Check whether the difference and/or sum of PD and ND conform to the Acceptability Limit (AL) stated in Table 4 with respect to the type of study (paired or unpaired) and the number of categories used in the evaluation.

NOTE Acceptability Limits (AL) are based on data and consensus expert opinion. The AL are not based on statistical analysis of the data. The interpretation of results shall be done per category and for all categories used in the validation study. An interpretation of results shall also be done per enrichment protocol in case different protocols are used for different types of samples. The AL is not met when the observed value is higher than the AL. When the AL is not met, investigations should be made (e.g. root cause analysis) in order to provide an explanation of the observed results. Based on the AL and the additional information, it is decided whether the alternative method is regarded as not fit for purpose for the category or categories involved. The reasons for acceptance of the alternative method in case the AL is not met shall be stated in the study report.

Table 4 — Acceptability limit parameters and values for a paired and unpaired study design in relation to the number of categories used

Number of categories	Paired study		Unpaired study
	(ND ^a - PD ^b)	(ND + PD)	(ND - PD)
1	3	6	3
2	4	8	4
3	5	10	5
4	5	12	5
5	5	14	5
6	6	16	6
7	6	18	7
8	6	20	7
a	ND = number of samples with Negative Deviation results.		
b	PD = number of samples with Positive Deviation results.		

NOTE Information on differences observed between results of the alternative method before and after confirmation of the results (step 1 and step 2) according to the alternative-method protocol should be presented in the validation report as additional information, but is not used in the overall assessment of the alternative method performance.

5.1.4 Relative level of detection study

A comparative study is conducted to evaluate the level of detection (LOD) of the alternative method against the reference method. The evaluation is based on the calculation of the relative level of detection (RLOD). In the study, replicates of artificially contaminated samples are used at three or more levels of contamination. Preferably, the levels are known as it allows calculation of the LOD. However, this is not required.

5.1.4.1 Selection of categories, number of samples, and replicates tested

For the selection of categories and types, see 5.1.3.1. The same categories will be used as selected for the sensitivity study (see 5.1.3). For each category, one relevant type is selected. In order to have a better representation of the evaluated category, this type should be different from those used in the sensitivity study (if possible). The samples shall be artificially inoculated. Procedures for the preparation of artificially inoculated samples are presented in Annex C. Each type will be inoculated with a different strain. A minimum of three levels per type will be prepared consisting of at least a negative control level, a low level, and a higher level. Ideally, the low level shall be the theoretical detection level (i.e. 0,7 cfu per test portion) and the higher level just above the theoretical detection level (e.g. 1 cfu to 1,5 cfu per test portion). At least the low level should have fractional recovery by the reference method (fractional recovery at the low level should be between 25 % and 75 % of the number of samples tested). An estimate for the level of contamination (except for the negative control) should be made. At the negative control level, at least five replicate samples should be tested by both methods. For the second (low) level (theoretical detection level), at least 20, and for the third (higher) level, at least five replicates samples should be tested by both methods. The negative control level shall not produce positive results. When positive results are obtained, the experiments have to be repeated for all levels. Positive deviating

test results obtained with the alternative method shall be additionally confirmed (see 5.1.3.3). The RLOD shall be evaluated after confirmation.

NOTE 1 In order to have a better assurance that fractional recovery will be obtained, more levels of contamination can be produced and tested.

NOTE 2 The level of contamination needed targets the LOD of the reference method if the alternative method has a lower LOD than the reference method.

5.1.4.2 Calculation and interpretation of the RLOD

The RLOD is defined as the ratio of the LODs of the alternative method and the reference method:

$$RLOD = \frac{LOD_{alt}}{LOD_{ref}} \quad (5)$$

For each category, at least the RLODs shall be estimated by fitting a complementary-log-log (CLL) model to the combined absence/presence data of both methods as a function of method. The contamination levels are not needed for the calculations of the RLOD since they are included in the model resulting in curves in a graph of probability of detection versus log dose (contamination level). The statistical model and the calculations are worked out in Annex D. Calculations can be performed with the Excel® spreadsheet of this part of ISO 16140. The Excel® spreadsheet for calculating RLOD values is freely available for download at <http://standards.iso.org/iso/16140> and then select the RLOD file. For calculations using this Excel® spreadsheet, the option of “unknown concentration” shall be used. Calculate for each item *i* the RLOD_{*i*} Tabulate the results as indicated in Table 5.

Table 5 — Presentation of RLOD before and after confirmation of the alternative-method results

	RLOD using the alternative-method results	RLOD using the confirmed alternative-method results
Item (category) (<i>i</i>)	RLOD _{<i>i</i>}	RLOD _{<i>i</i>}
1		
2		
...		
k		
Combined		

An Acceptability Limit (AL) for the RLOD based on the confirmed alternative-method results specifies the maximum increase in LOD of the alternative versus the reference method that would not be considered as relevant in consideration of the fitness for purpose of the method. Consequently, AL will be a value >1. The interpretation should be made for each item. The AL for paired study data are set at 1,5, meaning that the LOD for the alternative method shall not be higher than 1,5 times the LOD of the reference method. An LOD value for the alternative method smaller than the LOD value for the reference method

is always accepted as this means that the alternative method is likely to detect lower levels of contamination than the reference method. The AL for unpaired study data are set at 2,5, meaning that the LOD for the alternative method shall not be higher than 2,5 times the LOD of the reference method. An LOD value for the alternative method smaller than the LOD value for the reference method is always accepted as this means that the alternative method is likely to detect lower levels of contamination than the reference method. The AL is not met when the observed value is higher than the AL. When the AL is not met, investigations should be made (e.g. root cause analysis) in order to provide an explanation of the observed results. Based on the AL and the additional information, it is decided whether the alternative method is regarded as not fit for purpose for the item or category involved. The reasons for acceptance of the alternative method in case the AL is not met shall be stated in the study report. In addition to the calculation of the RLOD, the data may be evaluated using the AOAC probability of detection (POD) model described in Reference [14] and included in the AOAC validation guidelines.[6] The evaluation using the POD model can give additional information on the equivalence of the methods.

5.1.5 Inclusivity and exclusivity study

5.1.5.1 Selection and number of strains

A range of strains shall be used. Criteria for selecting test strains are given in Annex E. The strains used should take into account the measurement principle of the alternative method (e.g. culture-based, immunoassay-based, and molecular). Different measurement principles may require the use of different test panels of strains.

Each strain used shall be characterized biochemically and/or serologically and/or genetically in sufficient detail for its identity to be known. Strains used should preferentially have been isolated from foods, feeds, the food-processing environment, or primary production taking into account the scope of the validation. However, clinical, environmental, and culture collection strains can be used. The original source of all isolates should be known and they should be held in a local (e.g. expert laboratory), national, or international culture collection to enable them to be used in future testing, if required. For inclusivity testing, at least 50 pure cultures of (target) microorganisms shall be tested. For testing the inclusivity for Salmonella methods, at least 100 pure cultures of different serotypes of Salmonella shall be tested.

For exclusivity testing, at least 30 pure cultures of (non-target) microorganisms shall be tested.

Some microorganisms will be difficult or impossible to culture like viruses or protozan parasites. Where the target organism cannot be cultured, pure suspensions of the test strains should be used for spiking at the earliest appropriate step of the method.

NOTE 1 For some microorganisms, it will be difficult to obtain the required number of strains for inclusivity and exclusivity. In these cases, an agreed set of test strains should be selected by the parties involved in the validation study.

NOTE 2 Guidelines for the preservation and maintenance of strains in (local) collections can be found in ISO 11133

5.1.5.2 Inoculation of target strains (inclusivity)

Each test is performed once and only with the alternative method (including a confirmation step if prescribed in the alternative-method protocol). Inoculation of a suitable growth medium is carried out with a dilution of a pure culture of each test strain. This culture is used for testing the inclusivity. No sample is added. The pure culture should be grown in a non-selective broth under optimal conditions of growth to provide high cell populations in a stationary phase. The inoculum level shall be 10 times to

100 times greater than the minimum detection level of the alternative method being validated and the protocol of the alternative method shall be used including all (enrichments) detailed in the instructions of the alternative method. If the alternative method includes more than one (enrichment) protocol (e.g. for different sample types), then use the most challenging one with the complete panel of test strains. When negative or doubtful results are obtained, the test should be repeated and with the reference method included, checking that the strain could be detected with the appropriate reference method. If results are negative, consideration could be given to repeat the test with the addition of a food item. If the alternative protocol includes a confirmation step, the confirmation tests shall be included in testing the selected strains.

5.1.5.3 Inoculation of non-target strains (exclusivity)

Each test is performed once and only with the alternative method (including a confirmation step if prescribed in the alternative-method protocol). Inoculation of a suitable growth medium is carried out with a dilution of a pure culture of each test strain. This culture is used for testing the exclusivity. No sample is added.

The pure culture should be grown in a non-selective broth under optimal conditions of growth to provide high cell populations in a stationary phase. If the method involves a growth in a selective medium before a detection step, then for the purposes of exclusivity testing, the selective medium should be replaced by a non-selective medium. If the alternative method gives a positive or doubtful result, then the test should be repeated using the complete (enrichment) protocol recommended in the instructions of the alternative method using selective enrichments if these are noted in the instructions. If the alternative method includes more than one type of enrichment (e.g. for different sample types), then each of these should be used with the complete panel of test strains. Additionally, the reference method should be used to check that the strain could not be detected with the reference method.

5.1.5.4 Expression and interpretation of the results

Tabulate the results as in Table 6. The interpretation shall be done by the laboratory in charge of the method comparison study. The report should state any anomalies from the expected results.

Table 6 — Presentation of the results for inclusivity and exclusivity

Microorganisms	Alternative method	
	Test result	Confirmed result
Inclusivity (target strains)		
1		
2		
Etc.		
Exclusivity (non-target strains)		
1		
2		
Etc.		