

การเปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อกับวิธี duplex-PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Legionella pneumophila* ในน้ำจากหอหล่อเย็น

อมรรัตน์ อินทรสุด,¹ อนุสรณ์ บุญธรรม,¹ และ สรศักดิ์ อินทรสุด²

¹ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์, ²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัตถุประสงค์ เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) ในหอหล่อเย็นภายในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยการพัฒนาวีธี duplex-PCR เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐาน

วิธีการศึกษา ตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ในน้ำที่เก็บจากหอหล่อเย็นภายในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ภายในปี พ.ศ. 2553 โดยวิธี duplex-PCR ซึ่งใช้ genus-specific primers และ species-specific primers ที่ออกแบบจากยีน 16S rDNA และ macrophage infectivity potentiator (*mip*) gene ของเชื้อ *L. pneumophila* และ *Legionella* spp. อื่นโดยการศึกษานี้ทำการศึกษาร่วมกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

ผลการศึกษา จากการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *Legionella* ของน้ำจากหอหล่อเย็นจำนวนทั้งสิ้น 40 ตัวอย่างด้วยวิธี duplex-PCR พบมีการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่างน้ำทั้งหมด 27 ตัวอย่าง โดยแยกเป็นเชื้อ *L. pneumophila* 8 ตัวอย่างและ *Legionella* spp. 19 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบการปนเปื้อนของเชื้อ *L. pneumophila* จำนวน 4 ตัวอย่าง (วิธี duplex-PCR ให้ผลบวกเป็น *Legionella* spp. จำนวน 3 ตัวอย่าง และให้ผลลบ 1 ตัวอย่าง) เมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้พบว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับที่ amplified ได้จาก *mip* gene ในเชื้อ *Salmonella* Typhi และ *Salmonella* Enteritidis อย่างไรก็ตามผลจาก direct sequencing พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งของไพรเมอร์เหมือนกับ *mip* primers (17/20 นิวคลีโอไทด์)

สรุปผลการศึกษา วิธี duplex-PCR มีความไวและความจำเพาะสูง สะดวก และรวดเร็วในการตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* และ *Legionella* spp. ทั้งนี้เนื่องจากวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลานานอย่างน้อย 3-5 วัน และผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อในกลุ่มนี้มีความหลากหลาย จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการแยกเชื้อ อย่างไรก็ตามหากจะใช้วิธี duplex-PCR นี้ อาจจำเป็นต้องใช้การตรวจหา *mip* ร่วมกับยีน 16S rDNA เพื่อลดการเกิดผลบวกปลอมจากเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ **เชียงใหม่เวชสาร 2559;55(ฉบับเสริม 1):11-22.**

คำสำคัญ: *Legionella* โรคเลเจียนแนร์ หอหล่อเย็น

บทนำ

เชื้อ *Legionella* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป หรือในแหล่งน้ำต่าง ๆ ทั้งแหล่งน้ำตามธรรมชาติและแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น เชื้อสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ดีในแหล่งน้ำนิ่ง ที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 20-50 °C^[1] ซึ่งพบมากตามหอผึ่งเย็นหรือหอหล่อเย็น (cooling tower) ของระบบระบายความร้อนแบบปรับอากาศรวม^[2] ที่มีตามอาคารขนาดใหญ่ต่าง ๆ เช่น โรงแรม หรือโรงพยาบาล ตลอดจนเครื่องทำความร้อน ถึงเก็บน้ำ ระบบกระจายน้ำ การระบาดของเชื้อไม่ได้เกิดจากการติดต่อจากคนสู่คน แต่เกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อจากแหล่งน้ำสู่คน โดยเชื้อแพร่กระจายจากแหล่งน้ำไปกับละอองฝอยของน้ำและแพร่กระจายผ่านทางอากาศ เมื่อผู้ป่วยสูดหายใจรับเอาละอองน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไป จึงเกิดการติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจตามมา^[3] โดยส่วนใหญ่มักพบการติดเชื้อ *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) ในกลุ่มผู้สูงอายุ และมักพบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวหรือโรคเรื้อรัง เช่น โรคปอด มะเร็ง ไต เบาหวาน เอ็ดส์ กลุ่มผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ตลอดจนผู้ที่สูบบุหรี่จัด และกลุ่มนักท่องเที่ยวที่มาพักตามโรงแรมต่างถิ่น มีโอกาสติดเชื้อนี้ได้เช่นเดียวกัน^[1, 4-5] โดยผู้ที่ติดเชื้อชนิดนี้อาจพบอาการแสดงของโรคได้ 2 แบบ ได้แก่ แบบไม่รุนแรงหรือที่เรียกว่าไข้ปอนตีแอคหรือปอนเตียก (pontiac fever) จะมีอาการคล้ายไข้หวัดแต่ผู้ป่วยสามารถหายได้เองภายใน 2-5 วัน และการติดเชื้อแบบที่มีอาการรุนแรงหรือที่เรียกว่าโรคลีเจียนแนร์ (legionnaires' disease) โดยมีอาการปอดอักเสบเป็นลักษณะที่สำคัญ ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อเข้าไปเจริญในเซลล์เม็ดเลือดขาวภายในปอดแล้วทำให้เซลล์แตก ผู้ป่วยมีอาการเจ็บหน้าอก มีการสะสม

ของเหลวภายในปอด และมีไข้ ไอ ปวดในช่องท้อง อาจมีอุจจาระร่วง ถ้ามีภาวะปอดอักเสบทั้งสองข้าง อาจทำให้การหายใจล้มเหลวและเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้^[1, 6-7] สำหรับการศึกษาระบาดของวิทยาของโรคลีเจียนแนร์ในประเทศไทยนั้นพบผู้ป่วยรายแรกในปี พ.ศ. 2527^[8]

เชื้อ *Legionella* นอกจากเป็นสาเหตุของไข้ปอนเตียกและโรคลีเจียนแนร์แล้ว การปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* ตามหอหล่อเย็นต่าง ๆ ยังส่งผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจและการท่องเที่ยวของประเทศไทย โดยมีรายงานในปี พ.ศ. 2542 ว่าพบผู้ป่วยจำนวน 3 ราย ที่จังหวัดเชียงใหม่ ต่อมาในปี พ.ศ. 2550 มีกลุ่มนักท่องเที่ยวชาวสวีเดนติดเชื้อ *Legionella* ขณะมาเที่ยวที่จังหวัดภูเก็ต^[9] และในปี พ.ศ. 2553 พบผู้ป่วยเป็นนักท่องเที่ยวชาวสกอตแลนด์ที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ รายงานสรุปโดย European Working Group for *Legionella* Infection (EWGLI) Network ระบุว่ามีผู้ป่วยชาวต่างชาติจำนวน 109 ราย ติดเชื้อ *Legionella* ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการมาท่องเที่ยวในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2536-2553^[10] รายงานดังกล่าวส่งผลโดยตรงต่อการตัดสินใจมาท่องเที่ยวประเทศไทยของชาวต่างชาติ

จากการสำรวจหาเชื้อ *Legionella* ที่อาจปนเปื้อนตามหอหล่อเย็นในประเทศไทย พบว่ามีเชื้อจากตัวอย่างน้ำในหอหล่อเย็นตามอาคารสำนักงานประมาณร้อยละ 57^[11] หากการพบเชือดังกล่าวเกิดขึ้นในระบบปรับอากาศของโรงพยาบาลอาจส่งผลกระทบต่อทั้งสุขภาพอนามัยของผู้ป่วยและญาติ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาล ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้มีอัตราการป่วยและอัตราการตายเพิ่มขึ้นได้ และส่งผลกระทบต่อถึงภาระค่าใช้จ่ายที่จะตามมาในภายหลัง และกระทบต่อภาวะเศรษฐกิจตั้งแต่ระดับครัวเรือนถึงระดับประเทศ ตลอดจนผลกระทบ

ทบทวนความน่าเชื่อถือของโรงพยาบาล ดังนั้นจึงควรมีการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคเลเจียนแนร์ เพื่อป้องกันและเพิ่มความปลอดภัยต่อผู้ที่มารับบริการทั้งผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยในตลอดจนเจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาล จึงควรมีการตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* จากหอหล่อเย็นของระบบปรับอากาศในโรงพยาบาลตามจุดต่าง ๆ อย่างสม่ำเสมอ

L. pneumophila ซีโรไทป์ 1 มักพบเป็นสาเหตุของ Legionnaires' disease โดยวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ถือเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเชื้อ^[1] แต่ปัจจุบันห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ตามโรงพยาบาลส่วนใหญ่ในประเทศไทยยังไม่มีความพร้อมในการตรวจหาเชื้อชนิดนี้ เนื่องจากเชื้อ *L. pneumophila* เป็นเชื้อที่เจริญยากต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดพิเศษ Buffered charcoal-yeast extract (BCYE) agar ที่มีกรดอะมิโน L-cysteine ผสมอยู่และต้องอาศัยระยะเวลาในการเจริญเติบโตมากกว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่ โดยต้องเพาะเลี้ยงนานประมาณ 3-5 วันในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 และที่อุณหภูมิ 35 °ซ เชื้อ *Legionella* ที่อยู่ในสภาวะที่ยังมีชีวิตไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (non culturable but viable *Legionella*) ซึ่งในสภาวะนี้สามารถนำเชื้อกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารอาหารชนิดพิเศษหรือนำกลับมาเพิ่มจำนวนในเชื้ออะมิบาแล้วทำให้เชื้อมีความสามารถในการก่อโรคได้ใหม่อีกครั้ง^[12-14] เนื่องจากวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียเริ่มมีบทบาทมากขึ้น โดยเฉพาะการใช้เทคนิค PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* โดยใช้วิธี duplex-PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยทดสอบกับตัวอย่างน้ำจากหอหล่อเย็นของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ การพัฒนาวิธีตรวจในครั้งนี้เพื่อให้ได้วิธีการตรวจที่สะดวก ให้ผลแม่นยำ รวดเร็ว และสามารถนำไปใช้ควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* ในน้ำจากหอหล่อเย็นของระบบระบายความร้อนแบบปรับอากาศรวมได้

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำจากหอหล่อเย็นจาก 7 อาคารภายในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่จำนวน 40 ตัวอย่าง โดยก่อนเก็บตัวอย่างน้ำต้องทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิของแหล่งน้ำ จากนั้นทำให้ตะกอนในน้ำฟุ้งกระจายก่อนเก็บตัวอย่างตัวอย่างน้ำ แล้วเก็บน้ำใส่ภาชนะปลอดเชื้อในปริมาณแห้งละ 500 มล. จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำใส่ในกระติกน้ำแข็ง และนำส่งห้องปฏิบัติการทันที ก่อนนำตัวอย่างน้ำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองชนิด cellulose acetate membrane ขนาด pore size 0.2 ไมครอน จากนั้นนำแผ่น cellulose acetate membrane มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้ว resuspend ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 4 มล. ทำการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำตัวอย่างน้ำปริมาตร 200 มล. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อและนำตัวอย่างน้ำปริมาตร 1,000 มล. ไปทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* ต่อไป

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Legionella* จากตัวอย่างน้ำจากหอหล่อเย็น

นำตัวอย่างน้ำปริมาตร 200 มล. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด GVPC agar (อาหารเลี้ยง

เชื้อชนิด Buffered charcoal yeast extract; BCYE ที่มีส่วนผสมของ glycine, vancomycin, polymyxin B, และ cycloheximide) และบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นระยะเวลา 3-7 วัน ถ้าพบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม ม้วนวาลีสิวา-เทา เกิดขึ้น และย้อมสีแกรมพบลักษณะ gram negative rod ให้นำเชื้อจากโคโลนีดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BCYE ที่มีส่วนผสมของ L-cysteine และ BCYE ที่ไม่มีส่วนผสมของ L-cysteine เพื่อเปรียบเทียบกับ การเจริญของเชื้อ หากเชื้อสามารถเจริญได้เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE ที่มีส่วนผสมของ L-cysteine เท่านั้น ให้นำเชื้อดังกล่าวไปทำการทดสอบ *Legionella* latex test (Oxoid) ต่อไป

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ เชื้อ *L. pneumophila* ซีโรไทป์ 1 (ATCC 33152), *L. pneumophila* ซีโรไทป์ 3 (ATCC 33155) และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ อีก 15 สายพันธุ์สำหรับการทดสอบความจำเพาะของวิธี PCR ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* Typhi, และ *Salmonella* Enteritidis โดยเชื้อแบคทีเรีย *Legionella* สายพันธุ์มาตรฐานนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร BCYE agar ที่มีส่วนผสมของ L-cysteine โดยนำไปบ่มเพาะที่ 37 °ซ นาน 3-7 วัน ส่วนเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ทำการเพาะเลี้ยงบน

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้แก่ blood agar, MacConkey agar, thiosulfate citrate bile salts sucrose Agar (TCBS), shigella-salmonella agar (SS agar) ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบซีโรไทป์ของเชื้อแบคทีเรีย *Legionella*

ทำการเขี่ยโคโลนีของเชื้อ *Legionella* บนจานอาหารเพาะเลี้ยงมาทดสอบกับชุดตรวจสำเร็จรูป *Legionella* latex test ที่ใช้ตรวจพิสูจน์เชื้อ *L. pneumophila* ซีโรไทป์ต่าง ๆ โดยทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังที่ชุดตรวจระบุ แล้วสังเกตปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม และแปลผลตามวิธีการดังที่ชุดตรวจสอนแนะนำ

การแยกสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดแยกสกัดดีเอ็นเอ

นำโคโลนีของเชื้อ *Legionella pneumophila* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33152 และ ATCC 33155 ที่เพาะเลี้ยงบน BCYE agar plate ที่มีส่วนผสมของ L-cysteine มาละลายใน LB (Luria-Bertani) broth ปริมาตร 1 มล. ก่อนนำไปปั่นแยกที่แรงเหวี่ยงสัมพัทธ์ 11,000 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ cell pellet มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด NucleoSpin® Tissue kits (Macherey Nagel) โดยทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ตามที่ระบุในชุดสกัด หลังจากสกัดได้ดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอเก็บที่ -20 °ซ

การตรวจหาเชื้อ *Legionella* โดยใช้วิธี duplex-PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยชุดสกัดสำเร็จรูปมาตรวจหาปริมาณและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ก่อนนำดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์เพียงพอมาทำการตรวจหาชนิดของเชื้อ

ตารางที่ 1. โปรแกรมในการทำ PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)
Pre-denaturation	94	3 min	
Touchdown PCR			
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	60	30 sec	10
Extension	72	45 sec	
PCR			
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	55	30 sec	
Extension	72	45 sec	30
Final extension	72	5 min	

Legionella จากการทำ duplex-PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบให้จำเพาะกับสกุล (Genus) *Legionella* ได้แก่ LEG225 (5'-AAGATTAGCCT-GCGTCCGAT-3') และ LEG858 (5'-GTCAACT-TATCGCGTTTGCT-3') ซึ่งออกแบบจากยีน 16S rDNA^[15] โดยมี PCR product ขนาด 654 bp นอกจากนี้ยังใช้ primers ที่จำเพาะกับสปีชีส์ *L. pneumophila* ได้แก่ mip3 (5'-AAAGGCAT-GCAAGACGCTAT-3') และ mip4 (5'-ACGTT-GCTGG CTTACCAGTT-3') ที่ออกแบบมาจากยีน macrophage infectivity potentiator (*mip*)^[16] โดยมี PCR product ขนาด 340 bp โดยงานวิจัยครั้งนี้ได้นำหลักการของ Touchdown PCR มาใช้ร่วมกับการทำ PCR ปกติ และใช้เครื่อง Gene-Amp® PCR system 2,700 โดยมี PCR cycle ดังแสดงในตารางที่ 1 ตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis

การทดสอบความไวของวิธี PCR

นำโคโลนีของเชื้อ *L. pneumophila* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33152 มาปรับความเข้มข้นเทียบเท่า McFarland Standard No. 0.5 ใน LB media โดยมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 colony forming unit/mL จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilution จนถึง 10^1 colony forming unit/mL แล้วนำเชื้อแต่ละความเข้มข้นไปแยกสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น ก่อนนำมาทำ PCR

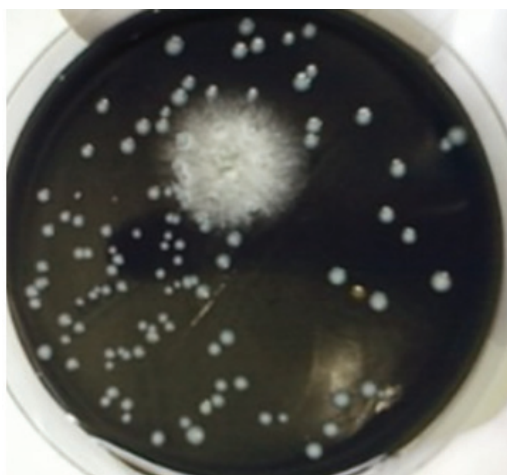
การทดสอบความจำเพาะของวิธี PCR

การหาความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ 15 ชนิดที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น ซึ่งสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป และใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็น negative control

ผลการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Legionella* จากตัวอย่างน้ำจากหอหล่อเย็น

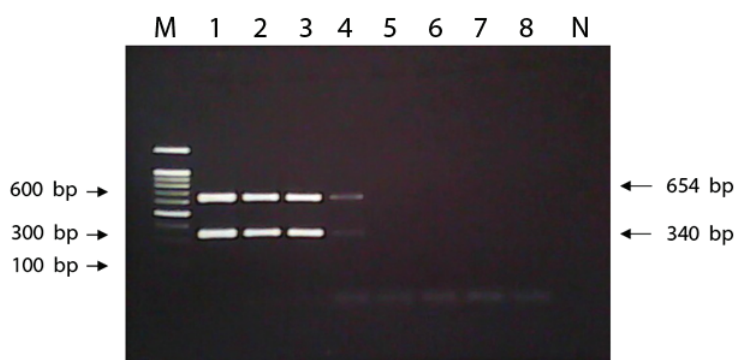
จากตัวอย่างน้ำจำนวน 40 ตัวอย่างที่เก็บจากหอหล่อเย็นตามอาคารสำนักงานต่าง ๆ ในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พบตัวอย่างน้ำที่นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อบนจานอาหาร GVPC ให้ลักษณะ colony กลม สีเทาขาว (รูปที่ 1) และย้อมแกรมพบลักษณะแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ แต่เมื่อนำมาทดสอบความต้องการ L-cysteine ในการเจริญเติบโตพบเชื้อเพียง 4 ตัวอย่างที่ต้องการ L-cysteine ในการเจริญเติบโตซึ่งเป็นเชื้อ *L. pneumophila* และทำการตรวจยืนยันด้วย *Legionella* latex test พบว่าเป็นเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรไทป์ 1 ทั้งหมด



รูปที่ 1. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรไทป์ 1 จากตัวอย่างน้ำจากหอยหล่อเย็นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GVPC

การทดสอบความไวของวิธี PCR

การทดสอบหาความไวของวิธี PCR โดยนำเชื้อ *L. pneumophila* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33152 มาปรับความเข้มข้นให้เทียบเท่ากับ McFarland Standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 colony forming unit/มล. จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilution จนถึง 10^1 แล้วนำไปแยกสกัดดีเอ็นเอและทำการทดสอบ PCR พบแถบดีเอ็นเอที่ dilution ที่ 10^5 colony forming unit/มล. แสดงว่าวิธีนี้มีความไวเท่ากับ 10^5 colony forming unit/มล. (รูปที่ 2)



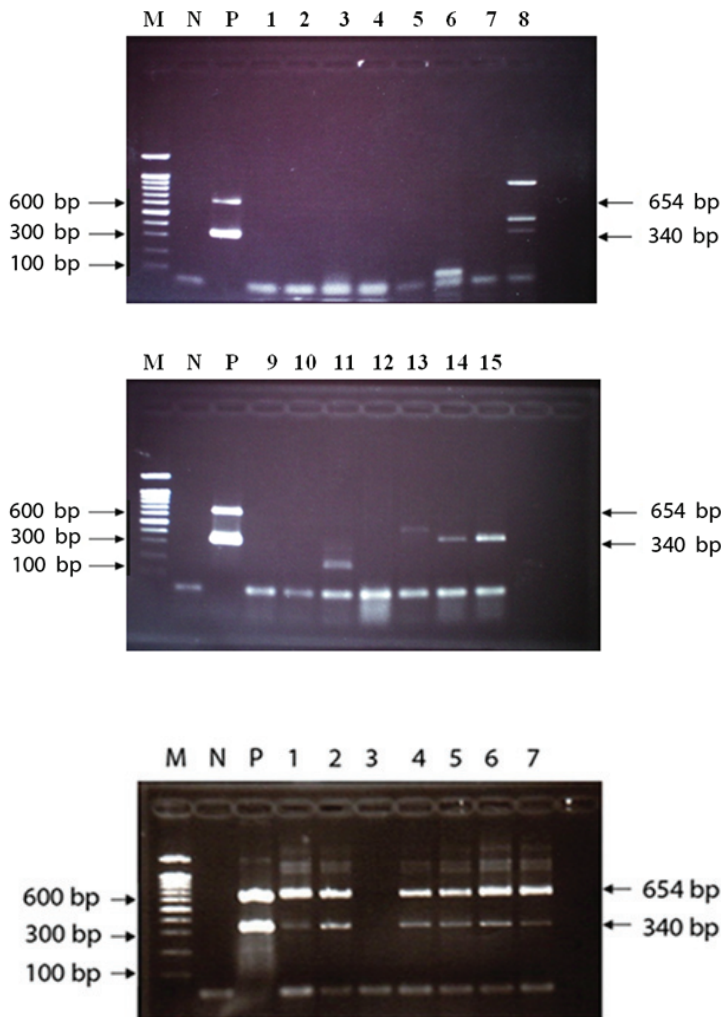
รูปที่ 2. ผลการทดสอบความไวของวิธี PCR โดยใช้เชื้อ *L. pneumophila* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33152. M: standard DNA marker, N: negative control, 1-8: ปริมาณเชื้อภายหลังจากการทำปฏิกิริยา PCR ที่ 10^8 - 10^1 colony forming unit/มล.

การทดสอบความจำเพาะของวิธี PCR

ทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ จำนวน 15 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบหาความจำเพาะของวิธี PCR ซึ่งได้ผลการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 3 โดยพบว่า primer ไม่เกิดปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ใช้ในการทดสอบ แต่พบว่ามีแถบ PCR product ขนาดใกล้เคียงกับขนาดของ *mip* gene (340 bp) เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* Typhi และ *Salmonella* Enteritidis โดยแถบดีเอ็นเอที่พบมีลักษณะที่จางกว่า PCR product ดังกล่าวถูกนำไปทำ direct sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank โดยใช้ basic local alignment search tool (BLAST) program ซึ่งก็ให้ผลเป็น *L. pneumophila*

การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *L. pneumophila* และ *Legionella* spp. จากตัวอย่างน้ำ

ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานจากตัวอย่างน้ำทั้งหมด 40 ตัวอย่าง จากหอยหล่อเย็นของอาคาร 7 แห่งภายในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พบการปนเปื้อนของเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรไทป์ 1 จำนวน 4 ตัวอย่าง แต่ผลจากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella*



รูปที่ 3. ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี PCR โดยใช้เชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 15 สายพันธุ์ เมื่อใช้ LEG 225 & LEG 858 primer และ mip3 & mip4 primer . M: Standard DNA marker, N: negative control, P: positive control, 1-15: ผลการทำปฏิกิริยา PCR กับดีเอ็นเอซึ่งแยกสกัดได้จากเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella Typhi*, *Salmonella Enteritidis* ตามลำดับ

รูปที่ 4. ผลการตรวจหาเชื้อ *Legionella* โดยวิธี duplex-PCR จากตัวอย่างน้ำ 1-7 ที่เก็บจากหอหล่อเย็น. M: Standard DNA marker, N: negative control, P: positive control, 1-7: ผลการทำปฏิกิริยา PCR กับดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างน้ำ 1-7

โดยวิธีการ duplex-PCR ให้ผลบวกต่อเชื้อ *Legionella* จำนวน 27 ตัวอย่าง โดยพบเชื้อ *L. pneumophila* จำนวน 8 ตัวอย่างและเชื้อ *Legionella* spp. จำนวน 19 ตัวอย่าง (ผลบางส่วนแสดงในรูปที่ 4) โดยผลการตรวจพบเชื้อ *Legionella* ด้วยวิธี duplex-PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อแสดงในตารางที่ 2

อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหา

เชื้อ *Legionella* ที่อาจปนเปื้อนภายในน้ำจากหอหล่อเย็นของโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ และการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* จากตัวอย่างน้ำให้ได้ผลรวดเร็ว แม่นยำและเชื่อถือได้ สามารถนำไปใช้ตามโรงพยาบาลต่าง ๆ จากการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* ภายในหอหล่อเย็นพบว่าตัวอย่างน้ำจำนวน 40 ตัวอย่างที่เก็บจากอาคาร 7 แห่งภายในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* จากตัวอย่างน้ำจำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10) เมื่อตรวจด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทั้งหมด

ตารางที่ 2. ผลการตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* และ *Legionella* spp. จากตัวอย่างน้ำที่ได้จากหอหล่อเย็นด้วยวิธี PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

	PCR(+) for <i>L. pneumophila</i>	PCR(+) for <i>Legionella</i> spp.	PCR (-)
Culture (+) for <i>L. pneumophila</i>	0	3	1
culture (-) for <i>Legionella</i>	8	16	12
Total (40)	8	19	13

พบเป็นเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรไทป์ 1 แต่พบผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี duplex-PCR 27 ตัวอย่าง (ร้อยละ 67.5) เป็นเชื้อ *L. pneumophila* จำนวน 8 ตัวอย่าง และ เชื้อ *Legionella* spp. จำนวน 19 ตัวอย่าง

แม้ว่ามีกำหนดการซ่อมบำรุงและทำความสะอาดหอหล่อเย็นเป็นประจำอยู่แล้ว แต่เมื่อตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *L. pneumophila* ภายในหอหล่อเย็น ทางผู้ที่เกี่ยวข้องควรดำเนินการป้องกันความเสี่ยงจากการแพร่กระจายเชื้อ เมื่อพิจารณาจำนวนเชื้อ *L. pneumophila* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน พบว่ามีปริมาณเชื้อ *Legionella* <500 colony forming unit/ลิตร โดยอยู่ในเกณฑ์ที่เฝ้าระวัง ซึ่งเกณฑ์ที่ WHO และองค์กรอื่นระบุว่ามีความเสี่ยงสูง (มีจำนวนเชื้อ *Legionella* >1,000 colony forming unit/ลิตร)^[1,17] ซึ่งต้องปิดปรับปรุงโดยทันที แต่ทั้งนี้ทางผู้ที่เกี่ยวข้องได้ปฏิบัติตามคำแนะนำขององค์กรต่าง ๆ^[1,17] โดยทำการตรวจซ้ำก่อนปิดหอหล่อเย็นชั่วคราวและล้างทำความสะอาดภายในหอหล่อเย็น แล้วจึงเก็บตัวอย่างน้ำมาทำการตรวจซ้ำอีกครั้งในภายหลัง ซึ่งทางหน่วยงานที่รับผิดชอบของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ได้ปฏิบัติตามด้วยความระมัดระวัง โดยได้ทำความสะอาดหอหล่อเย็นที่ให้ผลบวกทั้งหมดแล้วโดยการขัดล้างด้วยผงซักฟอก หลังการทำความสะอาดได้เติมน้ำ

ประปาใหม่ และภายหลังจากนั้นอีก 1 สัปดาห์ได้เก็บตัวอย่างน้ำมาตรวจอีกครั้ง พบว่าตัวอย่างน้ำทั้งหมดตรวจไม่พบเชื้อ *Legionella* จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่มีการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ *Legionella* ได้ ซึ่งอาจเกิดจากสารพันธุกรรมที่คงค้างอยู่ในหอหล่อเย็นเท่านั้น ภายหลังจากทำความสะอาดโดยการขัดล้างหอหล่อเย็นอีกครั้ง ก่อนที่จะเก็บตัวอย่างน้ำมาตรวจเชื้อ *L. pneumophila* ในครั้งนี้ตัวอย่างน้ำทั้งหมดให้ผลลบจากทั้งการตรวจด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี duplex-PCR

ในการศึกษานี้กลุ่มผู้วิจัยได้ใช้ genus-specific primers และ species-specific primers ที่ออกแบบจาก 16S rDNA และ *mip* gene ของเชื้อ *Legionella* spp. และ *L. pneumophila* ซึ่งให้ PCR product ขนาด 654 bp และ 340 bp ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้จากวิธี duplex-PCR กับการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน มีตัวอย่างน้ำจำนวน 8 ตัวอย่างให้ผลการตรวจด้วยวิธี PCR เป็นผลบวกกับเชื้อ *L. pneumophila* แต่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลลบกับเชื้อ *L. pneumophila* ซึ่งกรณีนี้อาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากวิธี duplex-PCR มีความไวสูงกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ อาจจะเป็น uncultured *L. pneumophila* หรือ non culturable but viable *Legionella* โดยในตัวอย่างน้ำมีเชื้อ *L. pneumophila* ปนเปื้อนอยู่แต่เป็นเชื้อที่อยู่ในระยะ

ที่เพาะเลี้ยงไม่ได้บนอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Legionella* โดยทั่วไป แต่สามารถตรวจพบได้โดยใช้เทคนิค PCR^[18] และยังสามารถเพิ่มจำนวนในอะมิบาหรือบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glutamate และ pyruvate เป็นส่วนประกอบและก่อโรคใหม่ได้^[12-14] หรืออาจเป็นเชื้อที่ตายแล้ว ซึ่งวิธี duplex-PCR สามารถตรวจพบได้เนื่องจากเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ อย่างไรก็ตามตัวอย่างน้ำ 2 ใน 8 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากวิธี duplex-PCR ได้นำไปทำ direct sequencing ซึ่งเมื่อนำผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank โดยใช้ BLAST program ซึ่งก็ให้ผลเป็น *L. pneumophila* นอกจากนี้มีตัวอย่างน้ำ 3 ตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจด้วยวิธี duplex-PCR ให้ผลบวกกับเชื้อ *Legionella* spp. แต่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลบวกกับเชื้อ *L. pneumophila* ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากตัวอย่างน้ำมีเชื้อ *Legionella* spp. หรือ unculture *Legionella* spp. ในปริมาณที่มากกว่า *L. pneumophila* จึงทำให้วิธี duplex-PCR สามารถเพิ่มขยายปริมาณยีน 16S rDNA เพียงอย่างเดียว และเมื่อนำตัวอย่างน้ำ 1 ใน 3 ตัวอย่างนี้ไปทำ direct sequencing ร่วมกับเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ BLAST program พบว่าเป็น *Legionella* spp. (ร้อยละ 98) หรือ unculture *Legionella* spp. (ร้อยละ 98) นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างน้ำ 13 ตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจด้วยวิธี PCR ให้ผลลบกับทั้งเชื้อ *L. pneumophila* และ *Legionella* spp. แต่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลบวกกับเชื้อ *L. pneumophila* หรือ *Legionella* spp. ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการมีสารซึ่งเป็น PCR inhibitor ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำดังกล่าว โดยสังเกตว่าน้ำมีตะไคร่น้ำปนอยู่ ซึ่งจากรายงานวิจัยพบว่า pigment ของสาหร่ายสามารถยับยั้งปฏิกิริยาของ PCR ได้^[19] นอกจากนี้อาจเกิดจาก

PCR inhibitor ในดิน ที่อาจปนเปื้อนมาในตัวอย่างน้ำ ซึ่ง humic acid เป็น inhibitor ที่สำคัญในปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกัน^[20-22] อย่างไรก็ตามเมื่อนำโคโลนีจาก culture plate ที่ให้ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็น *L. pneumophila* ไปสกัดดีเอ็นเอ แล้วทำ PCR พบว่าเป็นเชื้อ *L. pneumophila*

การทดสอบหาความจำเพาะของ primers ที่ใช้พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นใกล้เคียงกับขนาดของ *mip* gene (340 bp) เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* Typhi และ *Salmonella* Enteritidis แต่พบแถบ ดีเอ็นเอในลักษณะที่จางกว่า เมื่อนำไปทำ direct sequencing และเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลโดยใช้ BLAST program แล้วพบว่าเหมือนกับบางส่วนของเอนไซม์ cysteine synthase และเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วนปลายของ PCR product พบว่าคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายของ *mip* primers ถึง 17 ตำแหน่งจาก 20 ตำแหน่ง ดังนั้นหากต้องการนำ *mip* primers ไปใช้เพียงอย่างเดียวเพื่อตรวจหา *L. pneumophila* อาจทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ อย่างไรก็ตามจากรายงานวิจัยของ Fiume และคณะ^[23] ซึ่งได้ทดสอบความจำเพาะของ *mip* primers กับเชื้อหลายสายพันธุ์พบมีความจำเพาะกับ *L. pneumophila* เพียงเชื้อเดียว

โดยทั่วไปตามธรรมชาติมักพบเชื้อ *Legionella* อาศัยอยู่ภายในเชื้อปรสิตบางชนิดตามแหล่งน้ำต่าง ๆ เชื้อปรสิตที่เป็น natural reservoir host ที่สำคัญ ได้แก่ *Acanthamoeba*, *Naegleria* และ *Hartmannella* ส่วนหนึ่งของการศึกษาในครั้งนี้จึงเพาะเลี้ยงหาเชื้อปรสิตที่เป็น natural host ของเชื้อ *Legionella* จากตัวอย่างน้ำ และพบเชื้อ *Naegleria* จากตัวอย่างน้ำ 3 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างน้ำทั้งหมดนี้ให้ผล PCR เป็นผลบวกสอดคล้องกัน โดยเป็นเชื้อ *L. pneumophila* 1 ตัวอย่าง ส่วน

อีก 2 ตัวอย่างเป็น *Legionella* spp. แต่มีเฉพาะตัวอย่างน้ำ 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่ให้ผลบวกเป็นเชื้อ *L. pneumophila* จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ การที่ตรวจพบเชื้อปรสิตที่เป็น natural reservoir host ของเชื้อ *Legionella* spp. ทำให้มีความเป็นไปได้สูงที่อาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* ได้ รวมทั้งโอกาสที่จะตรวจพบเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำดังกล่าวก็มีสูงร่วมด้วยเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวจิราพรรณ ใจพรหม บัณฑิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยทำให้การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อัญชลี วรรณสาร ภาควิชาปรสิต คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การอนุเคราะห์ตรวจหาเชื้ออะมีบาในตัวอย่างน้ำ งานวิจัยนี้ได้รับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- Bartram J, Chartier Y, Lee J, et al. *Legionella* and the prevention of legionellosis. India: World Health Organization; 2007.
- National Guidelines for the Control of Legionellosis in Ireland, 2009. Report of Legionnaires' Disease Subcommittee of the Scientific Advisory Committee. Health Protection Surveillance Centre; 2009.
- Centers of disease control and prevention. *Legionella* (Legionnaires' Disease and Pontiac Fever): Causes & Transmission *Legionella* in the Environment (Electronic material). 2013. Available from: <http://www.cdc.gov/Legionella/about/causes-transmission.html>. Accessed July 1, 2014).
- Silk BJ, Foltz JL, Ngamsnga K, et al. Legionnaires' disease case-finding algorithm, attack rates, and risk factors during a residential outbreak among older adults: an environmental and cohort study. BMC Infect Dis [Internet]. 2013 [cited 2014 July 1]; 13: 291. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-13-291.pdf>
- European Centre for Disease Prevention and Control. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet): Operating procedures. Stockholm: ECDC; 2012.
- Centers of disease control and prevention. *Legionella* (Legionnaires' Disease and Pontiac Fever): Signs & Symptoms Legionnaires' Disease [Internet]. 2013. Available from: <http://www.cdc.gov/Legionella/about/signs-symptoms.html>. Accessed July 1, 2014).
- Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15:506–526.
- ไพรัช ศรีไสว, สงคราม ทรัพย์เจริญ, เบญจเพช คล้าย, และคณะ. ลีจิโอเนลโลสิส-รายงานผู้ป่วยรายแรกในประเทศไทย. สารศิริราช 2527;36: 269-77.
- โรม บัวทอง, รุ่งนภา ประสานทอง, วิวัฒน์ ศีตมโนชน และคณะ. การระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป ภายหลังจากการเดินทางมาท่องเที่ยวในจังหวัดภูเก็ต : บทบาทของการสอบสวนสิ่งแวดล้อมในประเทศที่เกิดเหตุ [อินเทอร์เน็ต]. เข้าถึงเมื่อ 1 กรกฎาคม 2557. เข้าถึงจาก: http://lms.kmddc.go.th/e_learning/e-data/25/S3_015/pdf/Rom_2.pdf.
- สำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. องค์ความรู้เรื่องโรคติดต่ออุบัติใหม่: โรคลีเจียนแนร์ (LEGIONELLOSIS) [อินเทอร์เน็ต]. เข้าถึงเมื่อ 1 กรกฎาคม 2557. เข้าถึงจาก: http://beid.ddc.moph.go.th/media/factsheet_detail.php?id=9.
- Tishyadhigama P, Dejsirilert S, Srisawai P, et al. environmental surveillance of Legionella species in Thailand. J Med Assoc Thai 1995;78:57-71.
- García MT, Jones S, Pelaz C, et al. Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable Legionella pneumophila after disinfection. Environ Microbiol 2007;9:1267-77.

13. Steinert M, Emödy L, Amann R, et al. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol 1997; 63:2047-53.
14. Ducret A, Chaballier M, Dukan S. Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Legionella pneumophila*. BMC Microbiol 2014;14:3.
15. Koide M, Saito A. Diagnosis of *Legionella pneumophila* infection by polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 1995;21:199-201.
16. Bonetta Sa, Bonetta Si, Ferretti E, et al. Evaluation of *Legionella pneumophila* contamination in Italian hotel water system by quantitative real-time PCR and culture method. J Appl Microbiol 2010;108:1576-83.
17. Health Protection Surveillance Centre. National Guidelines for the Control of Legionellosis in Ireland, 2009.[Internet] Available from: <https://www.hpsc.ie/A-Z/Respiratory/Legionellosis/.../File,3936,en.pdf>. Accessed July 10, 2014
18. Devos L, Clymans K, Boon N, et al. Evaluation of nested PCR assays for detection of *Legionella pneumophila* in wide range of aquatic sample. J Appl Microbiol 2005;99:916-25.
19. Jin HJ, Oh MY, Jin DH, et al. Identification of a Taq DNA polymerase inhibitor from the red seaweed *Symphocladia latiuscula*. J Environ Biol 2008;29:475-8.
20. Matheson CD, Gurney C, Esau N, et al. Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. Open Enzym Inhib J 2010;3:38-45.
21. Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition. Forensic Sci Int Genet 2012;6:297-305.
22. Seo SB, Lee HY, Zhang AH, et al. Effects of humic acid on DNA quantification with Quantifiler® Human DNA Quantification kit and short tandem repeat amplification efficiency. Int J Legal Med 2012;126:961-8.
23. Fiume L, Bucca, Poda G. Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by species-specific real time PCR assays. Lett Appl Microbiol 2005;41:470-5.

The comparison in detection of *Legionella pneumophila* from water in cooling tower between cultivation method and duplex-PCR

Amornrat Intorasoot,¹ Anusorn Boonthum,¹ and Sorasak Intorasoot²

¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine, ²Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

Objective The objective of this study was the detection of *Legionella pneumophila* in cooling towers distributed around Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital by comparing the cultivation method with the in house duplex-PCR.

Methods *Legionella* spp. were detected in water sampling from cooling towers in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital during 2010 by duplex-PCR. The primers using in this study were genus-specific primers and species-specific primers designed from 16sRNA gene and macrophage infectivity potentiator (*mip*) gene of *Legionella* spp. and *L. pneumophila*. The cultivation method was used as gold standard method in this study.

Results *Legionella* were detected in 27 samples from a total of 40 samples by duplex-PCR. From 27 PCR-positive samples, 8 samples were contaminated with *L. pneumophila* and 19 samples were contaminated with *Legionella* spp. *L. pneumophila* were detected in 4 samples by cultivation method while duplex-PCR method showed 3 positive results and 1 negative result from the same samples. In determination of specificity of PCR primers designed from *mip* gene, PCR products amplified from *Legionella*, *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Enteritidis are similar in size. The direct DNA sequencing of the PCR products showed the similar nucleotide sequences between two *Salmonella* and *mip* primers (17/20 nucleotides).

Conclusion Duplex-PCR is the convenient and rapid method with high specificity and high sensitivity in the detection of *L. pneumophila* and *Legionella* spp. Cultivation method needs at least 3-5 days for *Legionella* culture and most *Legionella* shows the variety in biochemical reaction. Therefore, cultivation method is an inappropriate method in *Legionella* isolation. Nevertheless, detection of both 16s rDNA gene and *mip* gene in duplex-PCR need to perform together for reducing of false positive result from other bacteria.
Chiang Mai Medical Journal 2016;55(suppl 1):11-22.

Keywords: *Legionella*, Legionnaires' disease, cooling tower