Journal of the Medical Technologist Association of Thailand
Volume 54 No. 2 August 2026

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *Legionella pneumophila*

นภาวรรณ ปุณกบุตร[1*] พิณทิพย์ สุชาติลิขิตวงศ์[2] และ ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ[2]

[1]ฝ่ายจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

Legionella pneumophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่เรียกว่า “Legionnaires’ disease” พบได้ทั่วไปในน้ำ และแพร่กระจายโดยการสูดละอองน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อนี้ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 1 เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่พบมากที่สุด การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับการติดเชื้อ *L. pneumophila* สามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีการเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากระบบทางเดินหายใจเป็นวิธีมาตรฐานที่มีความจำเพาะสูง แต่มีความไวต่ำและใช้เวลานาน การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *L. pneumophila* ในปัสสาวะเป็นการทดสอบที่ให้ผลรวดเร็วและมีความจำเพาะสูง การตรวจแอนติบอดีในน้ำเหลืองช่วยในการวินิจฉัยและติดตามการระบาด การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อในสิ่งส่งตรวจมีความจำเพาะสูงและให้ผลรวดเร็ว แต่ความไวขึ้นกับชนิดสิ่งส่งตรวจ การตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วและแม่นยำจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคส่งผลให้การรักษาได้อย่างแม่นยำ และส่งเสริมการเฝ้าระวังแหล่งที่มาของการติดเชื้อและการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: การตรวจหาแอนติบอดี, แอนติเจน, การเพาะเชื้อ, *Legionella pneumophila*, PCR

[*]ผู้นิพนธ์หลัก: napawanpunakabutra@gmail.com
วันที่ส่ง: 18 กรกฎาคม 2568 **วันที่แก้ไข:** 4 กันยายน 2568 **วันที่ตอบรับ:** 16 ตุลาคม 2568

Journal of the Medical Technologist Association of Thailand
Volume 54 No. 2 August 2026

บทความปริทัศน์
Review Article

Laboratory Diagnosis of *Legionella pneumophila* Infections

Napawan Punakabutra[1*], Pintip Suchartlikitwong[2] and Tanittha Chatsuwan[2]

[1]Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital,
Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand
[2]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Abstract

Legionella pneumophila is a Gram-negative bacterium that causes a respiratory infection known as Legionnaires' disease. It is commonly found in aquatic environments and is transmitted through inhalation of contaminated water aerosols. Among the various serogroups, *L. pneumophila* serogroup 1 is the most frequent cause of infection. Laboratory diagnosis of *L. pneumophila* infections can be done by several methods. Culture of respiratory specimens is the gold standard method with high specificity but low sensitivity and is time-consuming. Detection of *L. pneumophila* antigen in urine is a rapid diagnostic test with high specificity. Serological testing for antibodies in serum can support diagnosis and facilitate outbreak investigations. Molecular detection of *L. pneumophila* DNA in clinical specimens provides high specificity and rapid results, although its sensitivity varies depending on the type of specimen. Rapid and accurate diagnostic testing enhances the efficiency of disease control, enables precise clinical management, and supports effective surveillance of infection sources and contamination prevention.

Keywords: antibody detection, antigen, culture, *Legionella pneumophila*, PCR

*Corresponding author: napawanpunakabutra@gmail.com
Received date: July 18, 2025 **Revised date:** September 4, 2025 **Accepted date:** October 16, 2025

1. ลักษณะของเชื้อ *Legionella pneumophila* และความสำคัญ

เชื้อ *Legionella pneumophila* เป็นแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เจริญเติบโตในสภาวะแอโรป และจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการสภาพแวดล้อมพิเศษในการเจริญเติบโต โดยจะต้องการกรดอะมิโน L-cysteine แร่ธาตุเหล็ก กรดไขมันบางชนิด และ Coenzyme Q10[1] อุณหภูมิที่เชื้อนี้สามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 25-42 องศาเซลเซียส เชื้อนี้มักพบในแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น น้ำในแม่น้ำ ลำคลอง รวมถึงแหล่งน้ำในระบบน้ำในอาคาร เช่น ระบบน้ำประปา สระว่ายน้ำ ระบบเครื่องปรับอากาศ หอหล่อเย็น และสถานพยาบาลทันตกรรม โดยเฉพาะในระบบน้ำที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ[2] เชื้อ *L. pneumophila* สามารถอาศัยอยู่ในอะมีบาแบบปรสิตและแพร่กระจายไปยังสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่เป็นยูคาริโอท เช่น มนุษย์ ผ่านละอองฝอยของน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนและอาศัยเป็นปรสิตอยู่ในแมคโครฟาจของถุงลม[3]

เชื้อ *Legionella* ประกอบด้วยเชื้อทั้งหมด 74 สปีชีส์[4] โดยเชื้อ *L. pneumophila* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในมนุษย์มากที่สุด สำหรับสายพันธุ์อื่นพบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในมนุษย์ได้บ่อยรองจากเชื้อ *L. pneumophila* คือ *L. longbeachae*, *L. micdadei, L. bozemanii, L. dumoffii, L. anisa* และ *L. feeleii* จากรายงานการสำรวจสาเหตุของโรคปอดบวมในชุมชนจากเชื้อ *Legionella* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในผู้ป่วย จากการศึกษาของ Yu และคณะ ในทวีปอเมริกาเหนือ ยุโรป ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ พบสาเหตุจากเชื้อ *L. pneumophila* ร้อยละ 91.5, *L. longbeachae* ร้อยละ 3.9, *L. bozemanii* ร้อยละ 2.4 และพบเชื้อ *L. micdadei*, *L. feeleii*, *L. dumoffii*, *L. wadsworthii*, *L. anisa* รวมกันประมาณร้อยละ 2.2[5] Miyashita และคณะ ได้ศึกษาเชื้อ *Legionella* ที่เป็นสาเหตุของโรคปอดอักเสบที่เกิดขึ้นในชุมชนแบบประปรายระหว่างเดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2549 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2562 จำนวนทั้งสิ้น 140 ราย พบเชื้อ *L. pneumophila* ร้อยละ 90.7, *L. bozemanae* ร้อยละ 3.6, *L. dumofii* ร้อยละ 3.6, *L. micdadei* ร้อยละ 1.4 และ *L. longbeachae* ร้อยละ 0.7[6] นอกจากนี้ยังมีรายงานพบเชื้อ *L. anisa* ในน้ำจากปอดของผู้ป่วยและระบบน้ำร้อนของโรงพยาบาลในประเทศฝรั่งเศส[7] พบเชื้อ *L. birminghamensis* จากชิ้นเนื้อในปอดของผู้ป่วยในประเทศสหรัฐอเมริกา[8] พบเชื้อ *L. bozemanii* ในเนื้อเยื่อปอดของผู้ป่วยในประเทศอังกฤษ[9] และแคนาดา[10] และพบเชื้อ *L. feeleii* ในระบบน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้นในประเทศอิตาลี[11] เป็นต้น

เชื้อ *L. pneumophila* ก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ 2 รูปแบบ ได้แก่ โรคปอดอักเสบที่มีอาการรุนแรง (Legionnaires' disease, LD) ซึ่งสามารถทำให้เสียชีวิตได้โดยเฉพาะในกลุ่มผู้สูงอายุและผู้ที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอ และโรคไข้ปอนเตียก (Pontiac fever) ซึ่งมีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ สามารถจำแนกเชื้อชนิดนี้จากโครงสร้างของแอนติเจนชนิด O (O-antigen) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ออกเป็นซีโรกรุ๊ปต่าง ๆ ปัจจุบันพบเชื้อ *L. pneumophila* 18 ซีโรกรุ๊ป และเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 1 ที่เป็นสาเหตุของโรค LD มากที่สุดประมาณร้อยละ 80-95[1, 12] การระบาดครั้งใหญ่ของโรค LD เกิดขึ้นในปี พ.ศ. 2519 ในหมู่ผู้ร่วมประชุมทหารอเมริกันที่เมืองฟิลาเดลเฟีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีผู้ป่วย 182 ราย และเสียชีวิต 29 ราย[13] การระบาดนี้นำไปสู่การค้นพบเชื้อ *L. pneumophila* โดย McDade JE และคณะ ซึ่งพบเชื้อจากปอดของผู้เสียชีวิต[14] โดยก่อนหน้านี้มีการพบการระบาดของเชื้อชนิดนี้หลายครั้ง แต่ยังไม่สามารถหาสาเหตุได้ จนกระทั่งมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจและวิเคราะห์เชื้อ[15, 16] สำหรับเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ปอื่นพบรายงานการติดเชื้อประปราย เช่น ประเทศญี่ปุ่น โดย Miyashita และคณะ ได้ศึกษาเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคปอดอักเสบที่เกิดขึ้นในชุมชนแบบประปรายระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2549 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2562 พบเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 1 จำนวน 111 ราย ซีโรกรุ๊ป 2 จำนวน 2 ราย ซีโรกรุ๊ป 3 จำนวน 4 ราย ซีโรกรุ๊ป 4 จำนวน 1 ราย ซีโรกรุ๊ป 5 จำนวน 1 ราย ซีโรกรุ๊ป 6 จำนวน 7 ราย และซีโรกรุ๊ป 10 จำนวน 1 ราย[6] ที่ประเทศอิตาลีในปี พ.ศ. 2553 พบผู้ป่วยมีอาการปอดอักเสบรุนแรงจากเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 11[17] ในปี พ.ศ. 2557 มีรายงานพบผู้ป่วยมีอาการปอดอักเสบรุนแรงจากเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 12 ในประเทศญี่ปุ่น[18] และมีรายงานพบเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 6 ในน้ำประปาที่รัฐมิชิแกน ประเทศสหรัฐอเมริกา[19] และในปี พ.ศ. 2561 พบการระบาดของเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 2 ทางตอนเหนือของประเทศอิตาลี พบผู้ป่วยทั้งหมด 33 ราย เสียชีวิต 2 ราย[20] ในปี พ.ศ. 2564 สหภาพยุโรปและเขตเศรษฐกิจยุโรป (EU/EEA) มีอัตราการรายงานผู้ป่วยโรค LD 2.4 รายต่อประชากร 100,000 คน[21]

สำหรับประเทศไทย มีรายงานพบผู้ป่วยโรคนี้เป็นระยะตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดยมีรายงานพบผู้ป่วยชายไทยที่เป็นโรค LD ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2527[22] ต่อมาในปี พ.ศ. 2543 มีการดำเนินการสอบสวนโรคในเมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี ภายหลังจากที่มีนักท่องเที่ยวชาวเดนมาร์กได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค LD หลังเดินทางกลับจากประเทศไทย ผลการสอบสวนพบเชื้อ

L. pneumophila ซีโรกรุ๊ป 1, 5 และ 6 เชื้อ *L. gomanii* และเชื้อ *Legionella* spp. ในน้ำจำนวน 7 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 14 ตัวอย่าง อีกทั้งพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 6 ในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย[23] ในปี พ.ศ. 2551 พบนักท่องเที่ยวชาวเดนมาร์กป่วยเป็น LD ที่จังหวัดพังงา ผลการสอบสวนพบเชื้อ *Legionella* spp. จากตัวอย่างน้ำและสิ่งแวดล้อมรวม 17 ตัวอย่างจากทั้งหมด 29 ตัวอย่าง (58.62%) โดยผลการแยกเชื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 1 มากที่สุด (ร้อยละ 64.7) รองลงมาเป็นเชื้อ *Legionella* spp. (ร้อยละ 23.5) และเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 10 (ร้อยละ 11.8)[24] ในปี พ.ศ. 2558 มีรายงานผู้ป่วยชาวยุโรป 2 รายที่มีประวัติพักในโรงแรมเดียวกันในจังหวัดพังงา จากการตรวจสอบตัวอย่างน้ำและสิ่งแวดล้อมในโรงแรมจำนวน 36 ตัวอย่าง พบเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 1 มากที่สุด (10 ตัวอย่าง) รองลงมาเป็นเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 2-14 (3 ตัวอย่าง) และเชื้อ *Legionella* spp. (2 ตัวอย่าง)[25] ในปี พ.ศ. 2556 มีรายงานนักท่องเที่ยวชาวสวีเดนติดเชื้อ *Legionella* spp. หลังเข้าพักที่โรงแรมแห่งหนึ่งในกรุงเทพมหานคร[26] นอกจากนี้ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 11 จังหวัดนครศรีธรรมราช รายงานผู้ป่วยโรค LD จำนวน 62 ราย ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2560 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นนักท่องเที่ยวชาวยุโรป (ร้อยละ 83.87) ผลการตรวจพบเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 1 มากที่สุด (ร้อยละ 67.80) ตามด้วยเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 2-14 (ร้อยละ 30.51) และเชื้อ *L. bozemanii* (ร้อยละ 1.69)[27] จากข้อมูลเบื้องต้นจะพบว่าสาเหตุส่วนใหญ่ของการติดเชื้อ LD ในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกจะเกิดจากเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 1 แต่จำนวนผู้ติดเชื้อในประเทศในแถบยุโรปหรือสหรัฐอเมริกายังคงสูงกว่าในประเทศไทย

การรักษาโรค LD มักใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มแมคโครไลด์ (macrolides) หรือกลุ่มฟลูโอโรควิโนโลน (fluoroquinolones) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อ การวินิจฉัยโรค LD ในระยะเริ่มต้นจะช่วยให้แพทย์สามารถวางแผนการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอ เช่น ผู้สูงอายุและผู้ป่วยโรคเรื้อรัง การป้องกันโรคสามารถทำได้โดยการควบคุมและบำรุงรักษาระบบน้ำในอาคาร เช่น การตรวจหาปริมาณเชื้อในระบบน้ำ โดยเฉพาะในสถานที่ที่มีผู้คนอยู่รวมกันมาก เช่น โรงพยาบาล โรงแรม หรือสำนักงานขนาดใหญ่ นอกจากนี้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อในหอหล่อเย็น เป็นอีกหนึ่งมาตรการสำคัญในการป้องกันการระบาดของเชื้อในพื้นที่ชุมชน[28]

2. การวิเคราะห์เชื้อทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *L. pneumophila* ทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามีหลายวิธี ได้แก่ การเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย และจากแหล่งน้ำต่าง ๆ การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อจากสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยโดยตรง การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อในน้ำเหลืองของผู้ป่วย และการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ เป็นต้น

2.1 การเพาะแยกและวิเคราะห์เชื้อ *L. pneumophila*

การเพาะแยกเชื้อ *Legionella* เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อชนิดนี้ โดยสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่เหมาะสมสำหรับการเพาะแยกเชื้อ ได้แก่ สิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง เนื่องจากเชื้อสามารถรุกล้ำเซลล์เนื้อเยื่อปอดและเจริญและเพิ่มจำนวนอยู่ภายในเซลล์แมคโครฟาจได้[29, 30] สิ่งส่งตรวจชนิดอื่น ๆ ได้แก่ เลือด น้ำจากช่องเยื่อหุ้มหัวใจ น้ำจากช่องท้อง หนอง เนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ที่สงสัยมีรอยโรคการติดเชื้อ *L. pneumophila* เป็นต้น การเก็บสิ่งส่งตรวจจะเก็บในภาชนะปราศจากเชื้อ และควรนำส่งห้องปฏิบัติการทันทีที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากเชื้อ *Legionella* เป็นเชื้อที่เจริญเติบโตช้าในสิ่งส่งตรวจที่สามารถพบเชื้อประจำถิ่นหรือเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นร่วมด้วยต้องมีขั้นตอนการกำจัดหรือลดเชื้อเหล่านี้ก่อนการเพาะแยกเชื้อ นอกจากนี้ยังสามารถเพาะแยกเชื้อจากน้ำที่สงสัยว่ามีเชื้อ *Legionella* ปนเปื้อน ทั้งที่มาจากแหล่งน้ำธรรมชาติและแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น สระน้ำจืด บ่อน้ำร้อนธรรมชาติ บริเวณปากแม่น้ำ ทะเล น้ำจากหอหล่อเย็น น้ำจากเครื่องปรับอากาศ สปา ฝักบัว ก๊อกน้ำ สระว่ายน้ำ เป็นต้น[31] สิ่งส่งตรวจที่เก็บจากสิ่งแวดล้อมจะต้องเก็บในขวดปราศจากเชื้อและปริมาณมากกว่า 1 ลิตร และส่งห้องปฏิบัติการทันที โดยการนำส่งต้องแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น กรณีที่ไม่สามารถส่งได้ทันทีสามารถเก็บสิ่งส่งตรวจได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ปัจจุบันการเพาะแยกเชื้อ *Legionella* จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง buffered charcoal-yeast extract (BCYE) ที่มี α-ketoglutarate ผสมและไม่ผสมยาปฏิชีวนะ (Table 1) การเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยจากบริเวณที่ปราศจากเชื้อ เช่น เลือด น้ำจากปอด น้ำจากช่องเยื่อหุ้มหัวใจ จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะ สำหรับสิ่งส่งตรวจที่มีเชื้อ

ประจำถิ่นอื่นร่วมด้วย เช่น เสมหะ น้ำจากหลอดลม จะเพาะแยกเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งชนิดที่ไม่ผสมและผสมยาปฏิชีวนะ เช่น BCYEα ที่มี polymyxin B anisomycin และ vancomycin (PAV) และ BCYEα ที่มี cefamandole, polymyxin B, anisomycin (BMPA) เพื่อเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อ เนื่องจากเชื้อ *Legionella* บางสายพันธุ์ไม่เจริญบน BMPA โดยสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยดังกล่าวจะต้องเติมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ HCl-KCl pH 2.2 ก่อนหรือผ่านการเจือจางและนำไปบ่มด้วยความร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการเพาะแยกเชื้อก็สามารถเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อได้[32, 33]

Table 1 Selective media used for the cultivation and isolation of *Legionella* from different specimen types.[33]

Selective media	Antimicrobial agents	Types of specimens
BCYEα[1]	none	clinical specimen and environment
BMPA[2]	cefamandole, polymyxin B, anisomycin	clinical specimen and environment
PAV[3]	polymyxin B, anisomycin, vancomycin	clinical specimen and environment
MWY[4]	vancomycin, polymyxin B, anisomycin	environment
CCVC[5]	cafalothin, colistin, vancomycin, cycloheximide	environment
BCYE α-L[6]	none	*Legionella* Identification

[1]buffered charcoal-yeast extract (BCYE) with α-ketoglutarate; [2]BCYEα with cefamandole, polymyxin B, and anisomycin; [3]BCYEα with polymyxin B, anisomycin, and vancomycin; [4]modified Wadowsky Yee medium is BCYEα with vancomycin, polymyxin B, anisomycin, and glycine; [5]BCYEα with cafalothin, colistin, vancomycin, and cycloheximide; [6]BCYEα without L-cysteine

สำหรับการเพาะแยกเชื้อจากสิ่งแวดล้อม เช่น แหล่งน้ำต่าง ๆ ควรเก็บตัวอย่างน้ำปริมาณอย่างน้อย 1 ลิตรขึ้นไปในภาชนะปราศจากเชื้อ ถ้าตัวอย่างน้ำมีคลอรีนผสมอยู่ให้เติมสารละลาย sodium thiosulfate เข้มข้น 0.1 N จำนวน 0.5 มิลลิลิตรต่อปริมาตรสิ่งส่งตรวจ 1 ลิตร เพื่อกำจัดสารคลอรีน[34] ตัวอย่างน้ำควรแช่เย็นและนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 72 ชั่วโมง ตัวอย่างน้ำที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนน้อย เช่น น้ำดื่ม น้ำประปา ควรทำการกรองด้วยแผ่นกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมครอน หรือปั่นให้เชื้อตกตะกอนก่อนทำการเพาะแยกเชื้อเพื่อเพิ่มอัตราการพบเชื้อ กรณีที่ตัวอย่างน้ำนั้นมีเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นปนเปื้อนอยู่มาก การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ HCl-KCl pH 2.2 หรือการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะช่วยลดจำนวนเชื้อปนเปื้อนและเพิ่มอัตราการพบเชื้อ *Legionella* ในสิ่งส่งตรวจได้[35] จากนั้นจึงนำตัวอย่างน้ำที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวข้างต้นมาทำการเพาะแยกเชื้อ *Legionella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อการเจริญของเชื้อ (Table 1) Fields และคณะ ได้ทำการศึกษาการเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อในตัวอย่างน้ำ โดยนำตัวอย่างน้ำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำตัวอย่างส่วนหนึ่งมาเพาะแยกเชื้อ ที่เหลือนำไปบ่มซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำซ้ำขั้นตอนเดิมจนครบ 6 สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่มโอกาสการพบเชื้อได้เพิ่มขึ้น[36]

2.2 การวิเคราะห์เชื้อ *L. pneumophila*

L. pneumophila เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญช้าและต้องการ L-cysteine ในการเจริญเติบโต ดังนั้นการเพาะแยกเชื้อชนิดนี้จากสิ่งส่งตรวจต้องบ่มสูงสุดเป็นเวลา 14 วัน จึงจะสามารถรายงานผลไม่พบเชื้อได้ โคโลนีของเชื้อชนิดนี้หลังจากบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 2-5% เป็นเวลา 2 วัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 1 มิลลิเมตร เมื่อบ่มต่อไปอีก 24 ชั่วโมง โคโลนีจะมีขนาดใหญ่ขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-3 มิลลิเมตร ลักษณะกลม (Fig. 1) โคโลนีของเชื้อ *L. pneumophila* สามารถเรืองแสงสีเหลืองอมเขียวอ่อนเมื่อส่องดูภายใต้แสง

อัลตราไวโอเลต การทดสอบเบื้องต้นที่ช่วยพิสูจน์ว่าโคโลนีดังกล่าวเป็นโคโลนีของเชื้อ *L. pneumophila* จริงคือการนำโคโลนีมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYEα-L และ blood agar โคโลนีของเชื้อ *L. pneumophila* จะไม่เจริญบนอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้ เนื่องจากขาด L-cysteine ในการเจริญเติบโต

การทดสอบเพื่อพิสูจน์ยืนยันว่าโคโลนีที่พบเป็นเชื้อ *L. pneumophila* และระบุซีโรกรุ๊ปของเชื้อ *L. pneumophila* สามารถทำได้หลายวิธี เช่น Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับจีนัสหรือสปีชีส์และ/หรือซีโรกรุ๊ปของเชื้อ *Legionella* ที่ต้องการทดสอบ, การหาลำดับของกรดนิวคลีอิก[37], เครื่องวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์แบบอัตโนมัติที่ใช้เทคนิค Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ซึ่งสะดวกรวดเร็ว[38] แต่วิธี MALDI-TOF MS ไม่สามารถวิเคราะห์ซีโรกรุ๊ปของเชื้อได้, *Legionella* latex test หรือ dryspot *Legionella* latex test ซึ่งใช้หลักการ latex agglutination ในการจำแนก ซีโรกรุ๊ป 1 ของเชื้อ *L. pneumophila* แยกจากซีโรกรุ๊ป 2-14 และเชื้อ *Legionella* species อื่น ๆ[39]

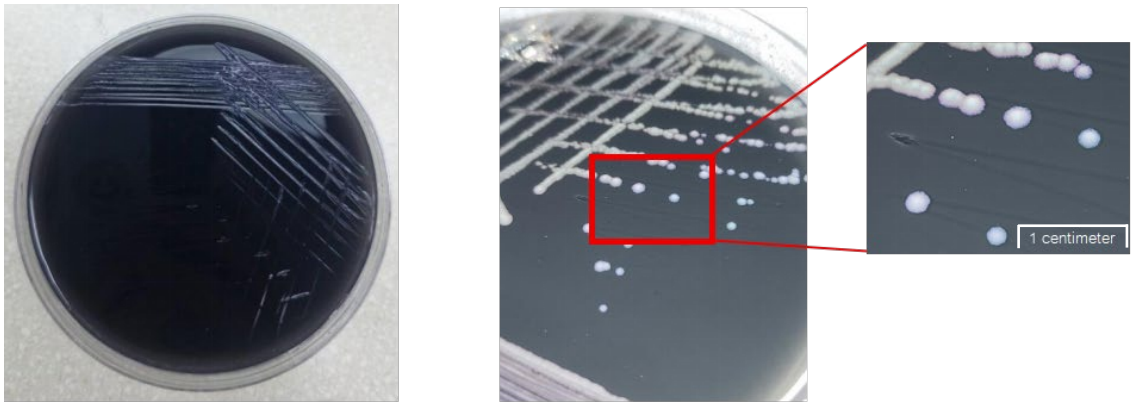


Fig. 1 Colonial morphology of *L. pneumophila* (24-hour and 72-hour-old colonies) on BCYEα medium.

แม้ว่าวิธีการเพาะแยกเชื้อจะเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยโรค แต่มีข้อจำกัดหลายอย่าง ได้แก่ ขั้นตอนการปฏิบัติค่อนข้างซับซ้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจที่ไม่ได้มาจากบริเวณปราศจากเชื้อ เช่น เสมหะ ความจำเพาะของการเพาะแยกเชื้อเป็นร้อยละ 100 ความไวของการทดสอบนี้อยู่ระหว่างร้อยละ 11-65 เมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยวิธีอื่น[40-42] เนื่องจากคุณภาพของสิ่งส่งตรวจ ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง หรือการได้รับยาปฏิชีวนะก่อนการเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อการเพาะแยกเชื้อ เป็นต้น นอกจากนี้ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญในการสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อและการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์เชื้อ รวมถึงการใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นานประมาณ 7-14 วัน และมีค่าใช้จ่ายสูง ปัจจุบันจึงมีห้องปฏิบัติการที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อเพียงไม่กี่แห่งในประเทศไทย

2.3 การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *L. pneumophila* ในปัสสาวะผู้ป่วย

การตรวจแอนติเจนของเชื้อ *L. pneumophila* ในปัสสาวะผู้ป่วยมีหลายวิธี มีรายงานการตรวจแอนติเจนของเชื้อ *L. pneumophila* ครั้งแรกโดยใช้หลักการ enzyme immunospecific assay (EIA)[43] ซึ่งเป็นการตรวจสารไลโปโพลีแซกคาไรด์ของเชื้อ สามารถตรวจพบในระยะแรกของการติดเชื้อหลังจากผู้ป่วยแสดงอาการของโรค 2-3 วัน และสามารถตรวจพบได้นานจนถึง 2 เดือน แต่มีบางรายอาจตรวจพบได้นานกว่านั้น หลังจากนั้นก็มีรายงานการตรวจด้วยวิธีอื่นด้วย เช่น radioimmunoassay (RIA)[44] แต่เนื่องจากปัญหาสารกัมมันตรังสีของการทดสอบจึงไม่เป็นที่นิยมใช้ ในปัจจุบันมีชุดทดสอบโดยใช้หลักการ EIA สำหรับตรวจเชื้อ *L. pneumophila* จำหน่ายหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีชุดตรวจโดยใช้หลักการ rapid immunochromatographic (ICT) สามารถตรวจได้อย่างรวดเร็วใช้เวลาเพียง 15-20 นาทีในการตรวจวิเคราะห์ และไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อนในการตรวจวิเคราะห์ การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อในปัสสาวะมีความจำเพาะสูงร้อยละ 99-100 แต่ความไวต่ำถึงปานกลางประมาณร้อยละ 56-99 ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิดของชุดทดสอบ กลุ่มผู้ป่วย ความรุนแรงของโรค

ระยะเวลาในการตรวจหลังผู้ป่วยแสดงอาการของโรค ซีโรกรุ๊ปของเชื้อ *L. pneumophila* โดยการทดสอบเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 1 มีความไวสูงกว่าซีโรกรุ๊ปอื่น ๆ[45, 46] การตรวจแอนติเจนของเชื้อในปัสสาวะนี้เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรค LD แพทย์สามารถวางแผนการรักษาได้อย่างถูกต้อง อย่างไรก็ตาม ถ้าผลการทดสอบแอนติเจนของเชื้อ *L. pneumophila* ในปัสสาวะผู้ป่วยเป็นลบ อาจยังสรุปไม่ได้ว่าผู้ป่วยไม่มีการติดเชื้อ *L. pneumophila* เนื่องจากข้อจำกัดในแง่ความไวของการทดสอบ

2.4 การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *L. pneumophila* ในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยด้วยวิธี direct fluorescent antibody (DFA)

การตรวจด้วยวิธี direct fluorescent antibody (DFA) นี้เป็นการตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* ในสิ่งส่งตรวจ เช่น เสมหะ น้ำจากหลอดลม หรือชิ้นเนื้อปอด โดยใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะกับ outer membrane protein ของเชื้อ *L. pneumophila* ทุกซีโรกรุ๊ป[47] ใช้เวลาทดสอบประมาณ 2-4 ชั่วโมง ความไวของการทดสอบประมาณร้อยละ 25-75 ในการตรวจจากเสมหะหรือน้ำจากหลอดลม แต่ความไวของการทดสอบสูงขึ้นร้อยละ 80-90 เมื่อตรวจจากชิ้นเนื้อปอด[41, 48, 49] ความจำเพาะของการทดสอบประมาณร้อยละ 95-99 แต่อาจพบ cross-reaction กับสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ได้[50] การตรวจด้วยวิธีนี้ หากผลการทดสอบเป็นลบ อาจยังสรุปไม่ได้ว่าผู้ป่วยไม่มีการติดเชื้อ *L. pneumophila* เนื่องจากข้อจำกัดในแง่ความไวของการทดสอบ เช่นเดียวกับการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะ

2.5 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *L. pneumophila* ในน้ำเหลืองผู้ป่วย

ในปี พ.ศ. 2520 ได้เริ่มมีการนำเทคนิคการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อในน้ำเหลืองของผู้ป่วยมาใช้ในการวิเคราะห์น้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจโดยไม่ทราบสาเหตุ[14] และมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจ ปัจจุบันการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อในน้ำเหลืองมีวิธีการตรวจหลายวิธี ได้แก่ indirect immunofluorescence assay (IFA)[51], microagglutination[52], counterimmunoelectrophoresis (CIE)[53], latex agglutination[54], indirect hemagglutination assay (IHA)[55], ELISA[56] เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีความไวและความจำเพาะแตกต่างกันไป การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *L. pneumophila* ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยควรเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยในระยะเวลาห่างกัน 3-6 สัปดาห์ แอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบเป็นเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 1 และควรตรวจแอนติบอดีทั้งชนิด IgG IgM และ IgA เพื่อเพิ่มความไวของการทดสอบ[57] ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในขณะนั้นหรือเป็นชนิดเฉียบพลันจะมีระดับแอนติบอดีชนิด IgM สูง มากกว่า 1 : 256 ในช่วงแรกของการติดเชื้อ ซึ่งมีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรค

การตรวจวินิจฉัยโรคโดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อในน้ำเหลืองของผู้ป่วยนี้ช่วยในการวินิจฉัยระยะและการดำเนินของโรคในผู้ป่วยได้ สามารถเก็บตัวอย่างไว้ศึกษาได้ในระยะเวลานาน โดยการทดสอบนี้มีความไวประมาณ 74-93.8% และความจำเพาะประมาณร้อยละ 75-100[40, 58, 59] แต่ก็มีข้อจำกัด เช่น ความไวของการทดสอบขึ้นอยู่กับการเก็บน้ำเหลืองของผู้ป่วยในระยะเวลาที่เหมาะสม และแอนติเจนที่นำมาใช้ในการทดสอบ การทดสอบที่ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญในการอ่านผลการทดสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เป็นต้น

2.6 การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *L. pneumophila*

ในปี พ.ศ. 2535 มีรายงานการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *L. pneumophila* ครั้งแรกในน้ำจากหลอดลมของผู้ป่วย วิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อนี้ได้มีการพัฒนาจนปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, multiplex real-time PCR และสามารถตรวจในสิ่งส่งตรวจได้หลายชนิด เช่น สิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจต่าง ๆ ได้แก่ หลอดลม คอหอย ช่องจมูก และสิ่งส่งตรวจจากภายในคอ เลือด น้ำเหลือง ปัสสาวะ[60-62] รวมไปถึงการตรวจจากตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติหรือจากแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้นและสงสัยมีเชื้อ *Legionella* ปนเปื้อนได้อีกด้วย[63] ตำแหน่งเป้าหมายของยีนที่ใช้ส่วนใหญ่ ได้แก่ 5S rRNA 16s rRNA ที่จำเพาะกับเชื้อ *Legionella* ยีน macrophage infectivity potentiator (*mip*) ที่จำเพาะกับเชื้อ *L. pneumophila* และยีน *wzm* ซึ่งเป็นยีนจำเพาะกับเชื้อ *L. pneumophila* ซีโรกรุ๊ป 1 ยีน *wzm* มีบทบาทในกระบวนการขนส่งสารชนิดต่าง ๆ ภายในเซลล์และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไลโปโพลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของผนังเซลล์[3, 63] มีการศึกษาการวิเคราะห์เชื้อ *Legionella* จากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแหล่งน้ำต่าง ๆ ในประเทศไทยโดยใช้ 16s rRNA และยีน *mip* ที่จำเพาะกับเชื้อ *L. pneumophila* พบว่าสามารถวิเคราะห์เชื้อ *L. pneumophila* ได้ 206 สายพันธุ์ จากเชื้อ *Legionella* ที่เพาะแยกได้ทั้งหมด 256 สายพันธุ์ และได้เชื้อ *Legionella* สายพันธุ์ใหม่อีก 7 สายพันธุ์[64]

ความจำเพาะของการทดสอบด้วยวิธีนี้ มีความจำเพาะสูงที่ร้อยละ 80-100 โดยเฉพาะในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ[41, 65] แต่ความไวของการทดสอบอยู่ระหว่างร้อยละ 11-100 แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดสิ่งส่งตรวจและช่วงเวลาในการเก็บสิ่งส่งตรวจกับอาการของโรค พบว่าการตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจมีความไวสูงเมื่อเทียบกับเลือดหรือปัสสาวะ[41, 61, 66] การทดสอบด้วยวิธีนี้ ได้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาและนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์โรค LD อย่างแพร่หลาย

2.7 การตรวจ Subtype ของเชื้อ

การวิเคราะห์ subtype ของเชื้อ *Legionella* ใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ เพื่อดูความสัมพันธ์ของเชื้อที่พบในสิ่งแวดล้อมที่สงสัยเป็นสาเหตุของการระบาดกับเชื้อที่ได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย และติดตามความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* การแบ่งชนิดย่อยช่วยให้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้อย่างละเอียดมากขึ้น เทคนิคที่ใช้ ได้แก่ เทคนิค pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) เป็นการย่อยดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วย restriction enzyme ตามด้วยการแยกด้วยอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) ซึ่งจะทำให้แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามขนาด รอยพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการนี้สามารถนำมาใช้เพื่อแยกแยะระหว่างสายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อในสปีชีส์เดียวกันได้ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือใช้เวลานานและต้องใช้เครื่องมือเฉพาะในการทำอิเล็กโทรโฟเรซิส เทคนิค Multilocus Sequence Typing (MLST) เป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน housekeeping ประมาณ 6-7 ยีน ซึ่งเป็นยีนที่มีความเสถียรไม่เปลี่ยนแปลงง่ายและจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย โดยแต่ละยีนจะถูกจัดสรรหมายเลขอัลลีล (allele) ตามลำดับเบสที่แตกต่างกัน และการรวมกันของหมายเลขอัลลีลเหล่านี้จะกำหนดเป็น sequence type (ST) สำหรับสายพันธุ์นั้น ๆ ข้อมูลที่ได้สามารถเปรียบเทียบได้ระหว่างห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ทั่วโลก ซึ่งปัจจุบันพบมากกว่า 3,000 STs[67] โดย ST1 เป็น sequence type ที่พบบ่อยที่สุดทั้งในตัวอย่างจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม[12, 67-69] บาง ST พบได้บ่อยเฉพาะในบางภูมิภาคของโลก เช่น สายพันธุ์ ST47 พบบ่อยในประเทศเบลเยียม อังกฤษ ฝรั่งเศส และเนเธอร์แลนด์[70-72] สายพันธุ์ ST37 เป็นสาเหตุของการระบาดในประเทศสเปน แคว้นคาตาโลเนีย ในปี พ.ศ. 2545 และเมืองมูร์เซีย ในปี พ.ศ. 2543[73, 74] ในประเทศไทยมีข้อมูลที่ปรากฏในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ครั้งที่ 25 รายงานข้อมูลของเชื้อนี้โดยนำลำดับเบสของดีเอ็นเอของเชื้อมาเปรียบเทียบกันโดยวิธี MLST ซึ่งโดยใช้ยีนจำนวน 7 ยีน ได้แก่ *flaA pile asd mip mompS proA* และ *neuA* และวิเคราะห์ข้อมูล ST ในรูปแบบโปรไฟล์อัลลีล โดยใช้ฐานข้อมูลของ European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI) ผลการศึกษาพบเชื้อ *L. pneumophila* เป็น ST1 มากสุดจำนวน 55 สายพันธุ์[75] Gaia และคณะ ยังพบว่าการจำแนก subtype ของเชื้อนี้ด้วยวิธี MLST ร่วมกับวิธี monoclonal antibody subgroup ให้ผลการจำแนก subtype ของเชื้อได้ดียิ่งขึ้น[76] นอกจากนี้ Zhan และคณะ ได้เปรียบเทียบการจำแนก subtype ของเชื้อ *L. pneumophila* ที่เพาะแยกได้จากแหล่งน้ำในธรรมชาติและแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้นพบว่าวิธี MSLT โดยใช้ยีน *cca trpA lspE lssD* และ *icmK* ได้ผลการจำแนกที่ดีกว่าวิธี sequence-base typing (SBT)[77] วิธี MSLT นี้มีข้อจำกัดคือ ต้นทุนการทดสอบสูงเนื่องจากต้องหาลำดับเบสของสารพันธุกรรม สำหรับเทคนิคการวิเคราะห์ Variable Number Tandem Repeat (VNTR) จะตรวจสอบจำนวนของลำดับเบสที่ซ้ำในจีโนมของแบคทีเรีย ลำดับที่ซ้ำเหล่านี้มีความยาวที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ ซึ่งช่วยให้สามารถแยกแยะสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ แต่วิธีนี้ยังมีข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการน้อยเนื่องจากยังไม่เป็นที่นิยมต่างจากเทคนิค PFGE

นอกจากวิธีดังกล่าวข้างต้นแล้ว เทคนิค Whole genome sequencing (WGS) เป็นการถอดรหัสลำดับของจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *Legionella* ซึ่งให้ข้อมูลที่ครอบคลุมและละเอียดที่สุด สามารถระบุ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ความแปรผันทางพันธุกรรม และลักษณะทางจีโนมอื่น ๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรมหรือโปรตีนที่เชื้อโรคสร้างขึ้น ซึ่งช่วยให้เชื้อก่อโรคในสิ่งมีชีวิตที่เชื้ออาศัยอยู่ได้ แต่เทคนิคนี้ก็มีข้อจำกัดในเรื่องต้นทุนสูงและความซับซ้อนของกระบวนการทำ นอกจากนี้ยังต้องการเครื่องมือทางชีวสารสนเทศที่มีความซับซ้อนเพื่อการวิเคราะห์ข้อมูล[3, 78-82]

ความแตกต่างของความไว ความจำเพาะตลอดจนข้อดีและข้อจำกัดของแต่ละการทดสอบแสดงไว้ใน Table 2

Table 2 The sensitivity, specificity, advantages, and limitations of the tests.

Methods	Sensitivity	Specificity	Advantages	Limitations
Culture	11-65%[83]	100%[32, 84]	Gold standard	Specimens used for culture must be of good quality and collected within an appropriate timeframe. The process requires various laboratory instruments, is time-consuming, and involves high costs.
Antigen detection in urine	56-99%[45, 85]	99-100%[42, 46]	The method is convenient, delivers rapid results, and eliminates the need for multiple analytical instruments.	Test sensitivity is influenced by several factors, including the type of diagnostic kit, the characteristics of the patient population, and the interval between symptom onset and specimen collection. Notably, the sensitivity for detecting *Legionella pneumophila* serogroups other than serogroup 1, and non-*pneumophila Legionella* species, is significantly lower.
Antigen detection by DFA[2]	25-90%[40, 41]	95-99%[48]	Capable of detecting *Legionella pneumophila* from all serogroups.	Test sensitivity varies according to the specimen type, and cross-reactivity has been reported with some bacterial strains.
Antibody determination	74-80%	75-100%[58, 59]	This method allows for diagnosis of the disease stage and progression and is well suited for epidemiological investigations across various time points, owing to the ability to store serum samples for extended periods before testing.	The sensitivity of the test depends on timely collection of patient serum and the appropriateness of the antigen used. Additionally, skilled personnel are required, especially for tests that involve result interpretation using fluorescence microscopy.
Nucleic Acid Detection	11-100%[66]	80-100%[41,61,65]	The method is convenient and delivers rapid, reliable test results.	Sensitivity and specificity depend on the type of specimen and the timing of specimen collection relative to the disease course.

Table 2 The sensitivity, specificity, advantages, and limitations of the tests. (Cont.)

Methods	Sensitivity	Specificity	Advantages	Limitations
Subtype of *L. pneumophila*	-	-	This method is utilized to establish the correlation between environmental reservoirs of *L. pneumophila* and the occurrence of Legionnaires' disease outbreaks across different time periods.	The technique is complex, requires specialized equipment, is time-consuming, and incurs high costs.

[1]LD, Legionnaires' disease

[2]DFA, direct fluorescent antibody

3. สรุป

การตรวจหาเชื้อ *Legionella* ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน และสามารถดำเนินการได้หลายวิธี ทั้งการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ (เช่น เทคนิค PCR) รวมถึงการตรวจทางระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะ ปัจจุบันมีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคเหล่านี้อย่างต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยและควบคุมการระบาดของโรค หนึ่งในเทคนิคที่ได้รับความสนใจอย่างมากในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา คือ การวินิจฉัยเชื้อ *L. pneumophila* ด้วยวิธีทางโมเลกุล เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเหนือวิธีดั้งเดิมหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านความรวดเร็ว ความไว ความจำเพาะ และความสามารถในการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งสามารถใช้ติดตามและสืบหาต้นตอของการระบาด (epidemiological tracking) ได้อย่างแม่นยำ ส่งผลให้สามารถควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ ยังมีการพัฒนาเทคโนโลยี biosensor (ตัวตรวจวัดทางชีวภาพ) และระบบตรวจสอบคุณภาพน้ำแบบอัตโนมัติ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการตรวจหาเชื้อ *Legionella* แบบ real-time ได้อย่างเหมาะสม โดยเฉพาะในระบบน้ำของอาคาร โรงพยาบาล และสถานที่สาธารณะ รวมถึงแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้นหรือพบในธรรมชาติ การเฝ้าระวังเชิงป้องกันลักษณะนี้ช่วยลดโอกาสการแพร่เชื้อในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิผล การตรวจวิเคราะห์เชื้อมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการดูแลรักษาผู้ป่วย โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ที่มีความเสี่ยงสูง เช่น ผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ หรือผู้สูงอายุ การวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำช่วยให้แพทย์สามารถให้การรักษาได้อย่างเหมาะสมและทันเวลา ลดความรุนแรงของโรค และอาจช่วยป้องกันการเสียชีวิตได้อย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารอ้างอิง

1. Cianciotto NP, Hilbi H, Buchrieser C. Legionnaires' disease. The prokaryotes: human microbiology: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013. p. 147-217.
2. Konishi T, Yamashiro T, Koide M, Nishizono A. Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator. J Biosci Bioeng 2006; 101: 478-84.
3. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 506-26.
4. Sauerborn Klobucar R, Kovacevic M, Svetlicic E, *et al. Legionella sheltonii* sp. nov., a novel species isolated on a cruise ship during routine monitoring. Int J Syst Evol Microbiol 2025; 75: 10.
5. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, *et al*. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. J Infect Dis 2002; 186: 127-8.

6. Miyashita N, Higa F, Aoki Y, *et al*. Distribution of *Legionella* species and serogroups in patients with culture-confirmed Legionella pneumonia. J Infect Chemother 2020; 26: 411-7.
7. Bornstein N, Mercatello A, Marmet D, Surgot M, Deveaux Y, Fleurette J. Pleural infection caused by *Legionella anisa*. J Clin Microbiol 1989; 27: 2100-1.
8. Wilkinson HW, Thacker WL, Benson RF, *et al*. *Legionella birminghamensis* sp. nov. isolated from a cardiac transplant recipient. J Clin Microbiol 1987; 25: 2120-2.
9. Mitchell RG, Pasvol G, Newnham RS. Pneumonia due to *Legionella bozemanii*: first report of a case in Europe. J Infect 1984; 8: 251-5.
10. Tang PW, Toma S, Moss CW, Steigerwalt AG, Cooligan TG, Brenner DJ. *Legionella bozemanii* serogroup 2: a new etiological agent. J Clin Microbiol 1984; 19: 30-3.
11. Mazzotta M, Salaris S, Pascale MR, Girolamini L, Cristino S. Occurrence of *Legionella* spp. in man-made water sources: isolates distribution and phylogenetic characterization in the Emilia-Romagna region. Pathogens 2021; 10: 552.
12. Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, *et al*. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. J Med Microbiol 2010; 59: 653-9.
13. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, *et al*. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. N Engl J Med 1977; 297: 1189-97.
14. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N Engl J Med 1977; 297: 1197-203.
15. Brenner DJ. Classification of the legionellae. Semin Respir Infect 1987; 2: 190-205.
16. Winn WC, Jr. Legionnaires disease: historical perspective. Clin Microbiol Rev 1988; 1: 60-81.
17. Grottola A, Forghieri F, Meacci M, *et al*. Severe pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 11, Italy. Emerg Infect Dis 2012; 18: 1911.
18. Nishizuka M, Suzuki H, Ara T, *et al*. A case of pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 12 and treated successfully with imipenem. J Infect Chemother 2014; 20: 390-3.
19. Byrne BG, McColm S, McElmurry SP, *et al*. Prevalence of Infection-Competent Serogroup 6 *Legionella pneumophila* within Premise Plumbing in Southeast Michigan. mBio 2018; 9: e00016-18.
20. Scaturro M, Rota MC, Caporali MG, *et al*. A community-acquired Legionnaires' disease outbreak caused by *Legionella pneumophila* serogroup 2: an uncommon event, Italy, August to October 2018. Euro Surveill 2021; 26: 2001961.
21. European Centre for Disease, Prevention, Control. Legionnaires' disease – Annual Epidemiological Report for 2021. European Centre for Disease Prevention and Control; 2023.
22. Office of International Cooperation, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Legionnaires' disease in Thailand. 2024 2024/02/15.
23. Pathinawin L, Thammaphornpilas P, Phurahong S, Tekhamina S, Kornkaew T, Wongchumchuay K. Legionnaires' disease investigation, Pattaya City, Chonburi Province, October 1999. J Public Health 2000; 9: 63-70.

24. Jinda A, Banburi P, Phopluk W, *et al*. An Environmental Investigation at a Hotel in a Responded from European Notification of Cluster of Legionnaires' Disease among Danish Travelers, Takuapa, Phang-nga Province, June 2008. Weekly Epidemiological Surveillance Report 2024; 39: 653-7. (in Thai)
25. Anont K, Buathong R, Bohna N, *et al*. An Environmental Investigation of Legionnaires' Disease among EU Travelers, Khuk Khak, Takuapa, Phangnga, Thailand, 2nd - 5th June 2015. Weekly Epidemiological Surveillance Report 2024; 46: 721-7. (in Thai)
26. Techasuwanna R. Legionnaires' diseases in travelers: Environmental outbreak investigation in the hotel located in Bangkok, January 2023. Weekly Epidemiological Surveillance Report 2023; 54: 305-12. (in Thai)
27. Wareewanit K, Naraart P. Travel-associated Legionnaires' disease, Upper Southern Thailand, 2010-2017. Nakhon Si Thammarat: The Office of Disease Prevention and Control Region 11; 2017. (in Thai)
28. Department of Health, Ministry of Public Health. Guidelines for the Control of *Legionella* in Cooling Towers of Buildings in Thailand. Bangkok, Thailand: Department of Health, Ministry of Public Health; 2006. Report No.: 974-8137-65-1. (in Thai)
29. Wagner C, Khan AS, Kamphausen T, *et al*. Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. Cell Microbiol 2007; 9: 450-62.
30. Leiva-Juárez MM, Kolls JK, Evans SE. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. Mucosal Immunol 2018; 11: 21-34.
31. Atlas RM. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. Environ Microbiol 1999; 1: 283-93.
32. Vickers RM, Stout JE, Yu VL, Rihs JD. Manual of culture methodology for *Legionella*. Semin Respir Infect 1987; 2: 274-9.
33. Carroll KC, Pfaller MA. Manual of clinical microbiology. 12th edition. ed. Washington, DC: ASM Press; 2019.
34. Centers for Disease, Control, Prevention. Procedures for the Recovery of *Legionella* from the Environment. Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services; 2005.
35. Bopp CA, Sumner JW, Morris GK, Wells JG. Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. J Clin Microbiol 1981; 13: 714-9.
36. Fields BS. Legionellae and Legionnaires' Disease. Manual of Environmental Microbiology 2007. p. 1005-15.
37. Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. J Clin Microbiol 1998; 36: 1560-7.
38. Gaia V, Casati S, Tonolla M. Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. Syst Appl Microbiol 2011; 34: 40-4.
39. Sedgwick AK, Tilton RC. Identification of *Legionella pneumophila* by latex agglutination. J Clin Microbiol 1983; 17: 365-8.

40. Lindsay DSJ, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GFS. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J Med Microbiol 2004; 53: 183-7.
41. Hayden RT, Uhl JR, Qian X, *et al*. Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. J Clin Microbiol 2001; 39: 2618-26.
42. Den Boer JW, Yzerman EPF. Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 871-8.
43. Berdal BP, Farshy CE, Feeley JC. Detection of *Legionella pneumonophila* antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. J Clin Microbiol 1979; 9: 575-8.
44. Kohler RB, Zimmerman SE, Wilson E, *et al*. Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease: detection and partial characterization of urinary antigen. Ann Intern Med 1981; 94: 601-5.
45. Kazandjian D, Chiew R, Gilbert GL. Rapid diagnosis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection with the Binax enzyme immunoassay urinary antigen test. J Clin Microbiol 1997; 35: 954-6.
46. Helbig JH, Uldum SA, Lück PC, Harrison TG. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax *Legionella* Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest *Legionella* Urin Antigen EIA. J Med Microbiol 2001; 50: 509-16.
47. Gosting LH, Cabrian K, Sturge JC, Goldstein LC. Identification of a species-specific antigen in Legionella pneumophila by a monoclonal antibody. J Clin Microbiol 1984; 20: 1031-5.
48. Edelstein PH. Legionnaires' disease. Clin Infect Dis 1993; 16: 741-7.
49. Haldane DJ, Peppard R, Sumarah RK. Direct immunofluorescence for the diagnosis of legionellosis. Can J Infect Dis 1993; 4: 101-4.
50. Flournoy DJ, Belobraydic KA, Silberg SL, Lawrence CH, Guthrie PJ. False positive *Legionella pneumophila* direct immunofluorescent monoclonal antibody test caused by *Bacillus cereus* spores. Diagn Microbiol Infect Dis 1988; 9: 123-5.
51. Edelstein PH. Detection of Antibodies to *Legionella*. Manual of Molecular and Clinical Lab Immunology 2006. p. 468-76.
52. Farshy CE, Klein GC, Feeley JC. Detection of antibodies to legionnaires disease organism by microagglutination and micro-enzyme-linked immunosorbent assay tests. J Clin Microbiol 1978; 7: 327-31.
53. Holliday MG. The diagnosis of Legionnaires' disease by counterimmunoelectrophoresis. J Clin Pathol 1980; 33: 1174-8.
54. Holliday MG. Use of latex agglutination technique for detecting *Legionella pneumophila* (serogroup 1) antibodies. J Clin Pathol 1990; 43: 860-2.
55. Yonke CA, Stiefel HE, Wilson DL, Wentworth BB. Evaluation of an indirect hemagglutination test for *Legionella pneumophila* serogroups 1 to 4. J Clin Microbiol 1981; 13: 1040-5.
56. Elverdal PL, Svarrer CW, Jørgensen CS, Skovsted IC, Uldum SA. Development and validation of ELISA for detection of antibodies to *Legionella pneumophila* serogroup 1, 3 and 6 in human sera. J Microbiol Methods 2011; 86: 298-303.

57. Wilkinson HW, Farshy CE, Fikes BJ, Cruce DD, Yealy LP. Measure of immunoglobulin G-, M-, and A-specific titers against *Legionella pneumophila* and inhibition of titers against nonspecific, gram-negative bacterial antigens in the indirect immunofluorescence test for legionellosis. J Clin Microbiol 1979; 10: 685-9.
58. Edelstein PH, Meyer RD, Finegold SM. Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. Am Rev Respir Dis 1980; 121: 317-27.
59. Wilkinson HW, Cruce DD, Broome CV. Validation of *Legionella pneumophila* indirect immunofluorescence assay with epidemic sera. J Clin Microbiol 1981; 13: 139-46.
60. Jaulhac B, Nowicki M, Bornstein N, *et al*. Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. J Clin Microbiol 1992; 30: 920-4.
61. Matsiota-Bernard P, Waser S, Vrioni G. Detection of Legionella pneumophila DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 223-5.
62. Welti M, Jaton K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45: 85-95.
63. Mérault N, Rusniok C, Jarraud S, *et al*. Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. Appl Environ Microbiol 2011; 77: 1708-17.
64. Paveenkittiporn W, Dejsirilert S, Kalambaheti T. Genetic speciation of environmental *Legionella* isolates in Thailand. Infect Genet Evol 2012; 12: 1368-76.
65. Ballard AL, Fry NK, Chan L, *et al*. Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. J Clin Microbiol 2000; 38: 4215-8.
66. Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J Clin Microbiol 2000; 38: 1709-12.
67. Matthews S, Trigui H, Grimard-Conea M, *et al*. Detection of diverse sequence types of *Legionella pneumophila* by legiolert enzymatic-based assay and the development of a long-term storage protocol. Microbiol Spectr 2022; 10: e02118-22.
68. Kozak-Muiznieks NA, Lucas CE, Brown E, *et al*. Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. J Clin Microbiol 2014; 52: 201-11.
69. Lee HK, Shim JI, Kim HE, Yu JY, Kang YH. Distribution of *Legionella* species from environmental water sources of public facilities and genetic diversity of *L. pneumophila* serogroup 1 in South Korea. Appl Environ Microbiol 2010; 76: 6547-54.
70. Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28: 781-91.
71. Vekens E, Soetens O, De Mendonça R, *et al*. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical isolates from Belgium between 2000 and 2010. Eurosurveill 2012; 17: 20302.
72. Den Boer JW, Bruin JP, Verhoef LP, Van der Zwaluw K, Jansen R, Yzerman EP. Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002-2006. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 459-66.

73. García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, *et al*. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. Emerg Infect Dis 2003; 9: 915-21.
74. Garcia-Nuñez M, Quero S, Catini S, *et al*. Comparative molecular and antibody typing during the investigation of an outbreak of Legionnaires' disease. J Infect Chemother 2013; 19: 896-901.
75. Sripakdee S, Boonsang K, Unahalekhaka A, Bunchan N, Paveenkittiporn W, Sangkitporn S. Genetical database of *Legionella pneumophila* in Thailand. 25th National Conference on Medical Sciences; 2017/03/22; Nonthaburi, Thailand: National Institute of Health, Department of Medical Sciences; 2017.
76. Gaia V, Fry NK, Harrison TG, Peduzzi R. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. J Clin Microbiol 2003; 41: 2932-9.
77. Zhan XY, Zhu QY. Molecular typing of Legionella pneumophila isolates from environmental water samples and clinical samples using a five-gene sequence typing and standard Sequence-Based Typing. PLoS One 2018; 13: e0190986.
78. van Belkum A, Struelens M, Quint W. Typing of *Legionella pneumophila* strains by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. J Clin Microbiol 1993; 31: 2198-200.
79. Gomez-Lus P, Fields BS, Benson RF, Martin WT, O'Connor SP, Black CM. Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction, ribotyping, and monoclonal antibody analysis for subtyping *Legionella pneumophila* serogroup 1. J Clin Microbiol 1993; 31: 1940-2.
80. Saunders NA, Harrison TG, Haththotuwa A, Taylor AG. A comparison of probes for restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Med Microbiol 1991; 35: 152-8.
81. Feddersen A, Meyer HG, Matthes P, Bhakdi S, Husmann M. GyrA sequence-based typing of *Legionella*. Med Microbiol Immunol 2000; 189: 7-11.
82. Gorzynski J, Wee B, Llano M, *et al.* Epidemiological analysis of Legionnaires' disease in Scotland: a genomic study. Lancet Microbe 2022; 3: e835-e45.
83. Edelstein PH. The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. Semin Respir Infect 1987; 2: 235-41.
84. Maiwald M, Helbig JH, Lück P. Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. J Microbiol Methods 1998; 33: 59-79.
85. Domínguez JA, Galí N, Pedroso P, *et al.* Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest *Legionella* Urin antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. J Clin Microbiol 1998; 36: 2718-22.