วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 23 ฉบับที่ 2 มีนาคม - เมษายน 2557

Journal of Health Science
Vol. 23 No. 2 March - April 2014

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

การเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำที่ใช้ในโรงแรมหรือรีสอร์ท ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

อธิชา มหาโยธา วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท. ม. (วิทยาศาสตร์การแพทย์)
กรวิทย์ นาคนทรง วท. บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)
อภิญญา อรรคฮาต วท. บ. (จุลชีววิทยา)
อุดมเกียรติ พรรธนประเทศ วท. ม. (วิทยาศาสตร์อาหาร)
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อ *Legionella* spp. ในน้ำที่ใช้ในโรงแรมหรือรีสอร์ทในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2556 เพื่อสำรวจการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าวในแหล่งน้ำที่ใช้ในสถานประกอบการ รวมทั้งเป็นการเตรียมความพร้อมด้านความปลอดภัยจากเชื้อ *Legionella* spp. ของโรงแรมหรือรีสอร์ท ก่อนเข้าสู่ประชาคมอาเซียน ขั้นตอนเริ่มจากการสืบค้นรายชื่อโรงแรมและรีสอร์ท ประสานโครงการและยืนยันการเข้าร่วมโครงการ เก็บตัวอย่างน้ำและตรวจวิเคราะห์น้ำด้วยวิธีเพาะเชื้อและตรวจชนิดเชื้อด้วยวิธี PCR แล้วแจ้งผลการตรวจ พร้อมทั้งแนบเอกสารข้อแนะนำการปรับปรุง การบำรุงรักษาระบบน้ำ ให้กับโรงแรมหรือรีสอร์ทที่พบการปนเปื้อนเชื้อ และประสานการเก็บตัวอย่างน้ำซ้ำหลังจากทำการปรับปรุงการบำรุงรักษาระบบน้ำ ตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้งหมด 200 ตัวอย่าง จากโรงแรมและรีสอร์ท 75 แห่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ 48 ตัวอย่าง จากโรงแรมและรีสอร์ท 24 แห่ง (ร้อยละ 32) ผลการทดสอบเชื้อทั้งหมดด้วยวิธี PCR พบเป็นชนิด *L. pneumophilla* และปริมาณเชื้อที่ตรวจพบ น้อยกว่า 10^5 colony-forming unit ต่อลิตร (cfu/L) จำนวน 22 แห่ง (ร้อยละ 29.3), ปริมาณเชื้อตั้งแต่ 10^5 cfu/L แต่น้อยกว่า 10^6 cfu/L จำนวน 2 แห่ง (ร้อยละ 2.7) ข้อมูลที่ได้จากการสำรวจนี้เป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่เกี่ยวข้องในสถานประกอบการดังกล่าว นำไปดำเนินการปรับปรุงแก้ไขการบำรุงรักษาระบบน้ำตามข้อปฏิบัติของกรมอนามัย เพื่อความปลอดภัยของผู้ใช้บริการ ผู้เข้าเยี่ยมชม รวมทั้งพนักงานด้วย

คำสำคัญ: **โรคลีเจียนเนลโลสิส, การเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อ, การเพาะเชื้อ, การตรวจด้วยวิธี PCR**

บทนำ

โรคลีเจียนเนลโลสิส (legionellosis)[1] เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Legionella* spp. ลักษณะโรคมี 2 แบบ คือ ชนิดรุนแรงเรียกว่าโรคปอดอักเสบลีเจียนแนร์ (Legionnaires' disease) และชนิดไม่รุนแรงเรียกโรคไข้ปอนเตียก (Pontiac fever) ชนิดที่พบก่อให้เกิดโรคในคนบ่อยที่สุดคือ *L. pneumophila*[2,3] เชื้อ *Legionella* spp. พบได้ทั่วไป ในแหล่งน้ำที่มีอุณหภูมิ 32-45 องศาเซลเซียส สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานหลายเดือนในสิ่งแวดล้อมที่มีความชื้นสูง และแบ่งตัวในที่ที่มีสาหร่ายและอินทรีย์วัตถุ การแพร่กระจายเชื้อโดยทั่วไปผู้ป่วยจะได้รับเชื้อทางอากาศโดยการสูด

หายใจเอาเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในละอองฝอยของน้ำ เช่น น้ำจากหอผึ่งเย็นความร้อนของระบบปรับอากาศ ฝักบัว อาบน้ำ อ่างน้ำวน เครื่องมือช่วยหายใจ น้ำพุสำหรับตกแต่งอาคารสถานที่ต่าง ๆ ยังไม่พบการแพร่เชื้อจากคนไปสู่คน[4-5] จากข้อมูลรายงานผู้ป่วยโรคปอดอักเสบลิเจียนแนร์ ของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ปี พ.ศ. 2549-2553 มีรายงานผู้ป่วยจำนวน 22 ราย ซึ่งเป็นนักท่องเที่ยวชาวต่างประเทศที่เดินทางมาพักโรงแรมในประเทศไทย และจากข้อมูลของ European Legionnaires's Disease Surveillance Network (ELDSNet) ซึ่งเป็นหน่วยงานที่เฝ้าระวังเชื้อดังกล่าวในต่างประเทศ พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อจากโรงแรมในประเทศไทย ระหว่างปี 2547-2553 มีจำนวน 84 ราย[6] สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีระบบเฝ้าระวังโรคนี้ที่ชัดเจน หากแต่มีเพียงประกาศกรมอนามัย พ.ศ. 2544 เรื่อง "ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลิจิโอเนลลา ในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย"

การสำรวจเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำที่ใช้ในโรงแรมหรือรีสอร์ท โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งน้ำอุปโภค เช่น น้ำในถังเก็บน้ำ น้ำจากก๊อกน้ำหรือฝักบัวในห้องพัก แหล่งน้ำในระบบระบายความร้อนหรือหอผึ่งเย็น ตลอดจนน้ำในบริเวณแวดล้อม ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายเชื้อไปสู่คนได้มีความสำคัญอย่างยิ่ง เพราะนอกจากเป็นการเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อสกุลนี้เพื่อความปลอดภัยสำหรับผู้พักอาศัยและผู้ปฏิบัติงานในสถานประกอบการนั้น ๆแล้ว ยังเป็นการบ่งชี้กระบวนการบำรุงรักษาระบบน้ำที่มีอยู่เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพเพียงใด และควรมีการปรับปรุงแก้ไขอย่างไร เพื่อให้เป็นไปตามประกาศของกรมอนามัย 2544 ดังนั้น ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น โดยงานพยาธิวิทยาคลินิก กลุ่มชันสูตรสาธารณสุข ได้จัดทำโครงการเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำที่ใช้ในโรงแรมหรือรีสอร์ทในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2556 เพื่อสำรวจการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าวในแหล่งน้ำที่อาจมีความเสี่ยงและเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อได้ รวมทั้งเป็นการเตรียมความพร้อมด้านความปลอดภัยจากเชื้อ *Legionella* spp. ในอาคาร สถานที่ของโรงแรมหรือรีสอร์ท ก่อนเข้าสู่ประชาคมอาเซียน ในปี พ.ศ. 2558

วิธีการศึกษา

1. สำรวจข้อมูลจำนวนโรงแรม/รีสอร์ทของแต่ละจังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทางเวปไซด์การท่องเที่ยวแห่งประเทศไทย

2. คัดเลือกโรงแรม/รีสอร์ทขนาดกลางและใหญ่ของแต่ละจังหวัด พร้อมทั้งประสานโครงการทั้งทางโทรศัพท์และโทรสาร

3. แจ้งกำหนดการเก็บตัวอย่างน้ำกับโรงแรม/รีสอร์ทของแต่ละจังหวัด ที่ตอบรับเข้าร่วมโครงการ

4. การเก็บตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ

4.1 การเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมเช่น สระว่ายน้ำ บ่อน้ำพุ หรือ น้ำในห้องสปา ภาชนะที่ใช้ในการเก็บน้ำเป็นขวดแก้วที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโรคก่อนที่จะนำมาใช้ และปริมาณน้ำตัวอย่างที่เก็บปริมาตร 500 -1,000 มิลลิลิตร

4.2 การเก็บตัวอย่างน้ำจาก Cooling tower, น้ำจากฝักบัว ก๊อกน้ำ บ่อหรือถังเก็บน้ำ ระบบทำน้ำเย็นหรือน้ำอุ่น ภาชนะที่ใช้ในการเก็บน้ำเป็นขวดแก้วที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโรคก่อนที่จะนำมาใช้ และปริมาณน้ำตัวอย่างที่เก็บ ปริมาตร 500 – 1,000 มิลลิลิตร

5. ตัวอย่างน้ำที่เก็บจากสถานประกอบการแต่ละแห่งถูกเก็บในกล่องโฟมแช่เย็นขณะขนส่งตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการตรวจเชื้อ *Legionella* spp. ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น

6. ตรวจวิเคราะห์น้ำ ด้วยการเพาะเชื้อ ตาม SOP 34 02 152 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Legionella* spp. จากแหล่งน้ำ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น ซึ่งอ้างอิงตามวิธีของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และCDC[2,7]

7. ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Legionella* spp. นำโคโลนีของเชื้อมาตรวจยืนยันชนิดของเชื้อ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer 2 ชุด (ตารางที่ 1) การเพิ่มจำนวน 5S

ตารางที่ 1 ยีน และ Primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Legionella* spp.

Genes	Primers	Sequence(5' to 3')	Product size (bp)	Reference
5S rRNA	PT87	GGC GAC TAT AGC GAT TTG GAA	108	Nagai et al.(2003)
	PT163	GCG ATG ACC TAC TTT CGC ATG A		
mip	PT69	GCA TTG GTG CCG ATT TGG	168	Nagai et al.(2003)
	PT70	GCT TTG CCA TCA AAT CTT TCT GAA		

rRNA gene ด้วย primer PT87, PT163 เป็นการตรวจยืนยันจีนัส *Legionella spp.* และเพิ่มจำนวน *mip* gene ด้วย primer PT69, PT70 เป็นการตรวจยืนยัน *L. pneumophila*[8-10] โดยมีขั้นตอนดังนี้

7.1 การเตรียมตัวอย่าง DNA จากโคโลนี *Legionella* spp. เขี่ยโคโลนีเดี่ยว ๆบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE จำนวน 2 โคโลนี ลงในหลอดพลาสติกปราศจากเชื้อ ซึ่งเติม Phosphate buffer pH 7.4 ไว้แล้ว ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วดูดส่วนผสมดังกล่าวปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปสกัด DNA ด้วยชุดสกัด MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

7.2 การเพิ่มจำนวน 5S rRNA gene ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer PT87, PT163 และเพิ่มจำนวน *mip* gene ด้วย primer PT69, PT70 ดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อตรวจยืนยัน *L. pneumophila*,

7.2.1 การเตรียมน้ำยาปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวน 5S rRNA gene ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยใช้ PCR tube ขนาด 0.2 ml มีส่วนประกอบดังนี้

- 10X PCR reaction buffer 2.5 µl
- 15 mM $MgCl_2$ 2.5 µl
- 2.5 mM dNTP mixtures 2.0 µl
- 10 mM PT87 1.25 µl
- 10 mM PT163 1.25 µl
- 5 unit/µl of *Taq* DNA polymerase (i-Taq™) 0.1 µl
- Double sterile distilled water (DW) 14.4 µl

7.2.2 การเตรียมน้ำยาปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวน *mip* gene ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยใช้ PCR tube ขนาด 0.2 ml มีส่วนประกอบดังนี้

- 10X PCR reaction buffer 2.5 µl
- 15 mM $MgCl_2$ 2.5 µl
- 2.5 mM dNTP mixtures 2.0 µl
- 10 mM PT69 1.25 µl
- 10 mM PT70-R 1.25 µl
- 5 unit/µl of *Taq* DNA polymerase (i-Taq™) 0.1 µl
- Double sterile distilled water (DW) 14.4 µl

7.2.3 เติมตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้จากข้อ 7.1 จำนวน 1 µl ใส่ใน PCR tube ที่เตรียมน้ำยาแล้วในข้อ 7.2.1 และอีก 1 µl ใส่ใน PCR tube ที่เตรียมน้ำยาแล้วในข้อ 7.2.2

7.3 นำ PCR tube ที่เติมตัวอย่าง DNA แล้วในข้อ 7.2.3 ไปเพิ่มจำนวนในเครื่อง thermal cycler (Px 2) โดยมีรอบการเพิ่มปริมาณ DNA สำหรับ 5S rRNA gene ของเครื่องดังนี้

- 95 °C, 30 วินาที,
- 95 °C, 15 วินาที, 65 °C 40 วินาที, 72 °C 40 วินาที, เป็นจำนวน 30 รอบ
- 72 °C 7 นาที

สำหรับ *mip* gene รอบการเพิ่มปริมาณ DNA เหมือนกัน แต่ปรับอุณหภูมิช่วง annealing ลดลงจาก 65 °C เป็น 63 °C

7.4 ตรวจสอบ PCR products ด้วยวิธี 2% Agarose Gel electrophoresis

8. แจ้งผลการตรวจวิเคราะห์น้ำโดยจัดส่งรายงาน

การตรวจวิเคราะห์ให้กับสถานประกอบการที่เข้าร่วมโครงการ พร้อมทั้งแนบเอกสารข้อแนะนำการปรับปรุงการบำรุงรักษาระบบน้ำให้กับหน่วยงานที่ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ

9. ประสานการเก็บตัวอย่างน้ำและตรวจวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้ง หลังจากโรงแรมหรือรีสอร์ทได้ทำการปรับปรุงระบบน้ำ

10. รวบรวมผลการตรวจ วิเคราะห์ผล และสรุปผลการดำเนินงาน

11. รายงานผลการดำเนินงานให้หน่วยการที่เกี่ยวข้องรับทราบข้อมูล

ผลการศึกษา

ผลการประสานโครงการกับโรงแรมและรีสอร์ทใน 20 จังหวัด จำนวน 157 แห่ง เข้าร่วมโครงการ 75 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 47.8 จำนวนตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้งหมด 200 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) โดยแยกเป็นเขตบริการสุขภาพที่ 7 จังหวัดขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม และกาฬสินธุ์ จำนวน 10 แห่งเขตบริการสุขภาพที่ 8 จังหวัดอุดรธานี หนองคาย หนองบัวลำภู บึงกาฬ เลย สกลนคร และนครพนม จำนวน 33 แห่ง เขตบริการสุขภาพที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา สุรินทร์ บุรีรัมย์ และชัยภูมิ จำนวน 13 แห่ง และเขตบริการสุขภาพที่ 10 จังหวัดอุบลราชธานี ยโสธร อำนาจเจริญ ศรีสะเกษ และมุกดาหาร จำนวน 19 แห่ง (ตารางที่ 3) ตัวอย่างน้ำที่เก็บในพื้นที่ดังกล่าวรอบที่ 1 เป็นตัวอย่างน้ำจากหอผึ่งเย็น ก๊อกน้ำหรือฝักบัวในห้องพัก บ่อหรือถังพักน้ำ ระบบทำน้ำอุ่นหรือน้ำเย็น แหล่งอื่น ๆ เช่น ก๊อกน้ำในห้องครัว ก๊อกน้ำหรือฝักบัวอาบน้ำในห้องสปา ระบบกรองน้ำ สระว่ายน้ำ

จากผลตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Legionella* spp. พบมีการปนเปื้อนเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ 48 ตัวอย่าง จากจำนวนโรงแรมหรือรีสอร์ทจำนวน 24 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 32 ซึ่งพบปริมาณเชื้อน้อยกว่า 10^5 cfu/L จำนวน 45 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างน้ำจากหอผึ่งเย็น 10 ตัวอย่าง น้ำจากก๊อกน้ำหรือฝักบัวในห้องพัก 33 ตัวอย่าง น้ำจากเครื่องผลิตน้ำอุ่นน้ำร้อน 1 ตัวอย่าง และน้ำจากถังพัก 1 ตัวอย่าง ปริมาณเชื้อตั้งแต่ 10^5 แต่น้อยกว่า 10^6 cfu/L จำนวน 3 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำหรือฝักบัวในห้องพักทั้ง 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) เมื่อตรวจยืนยันเชื้อที่ตรวจพบทั้ง 48 ตัวอย่าง ด้วยวิธี PCR ให้ผลบวกต่อเชื้อ *Legionella* spp. และ *L. pneumophilla* ดังภาพที่ 1 และ 2 แสดง ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR ในการตรวจยืนยัน ตัวอย่างที่ 1-9

จากการตรวจตัวอย่างรอบที่ 2 (ตารางที่ 5) เพื่อประเมินการแก้ไขระบบน้ำ รวมทั้งวิธีการทำลายเชื้อด้วยผลการประสานดังกล่าว สถานประกอบการที่ได้ดำเนินการตรวจตัวอย่างน้ำรอบที่ 2 จำนวน 17 แห่ง อยู่ระหว่างดำเนินการปรับปรุงระบบ 6 แห่ง และไม่ขอรับการตรวจในรอบที่ 2 จำนวน 1 แห่ง ตัวอย่างน้ำที่เก็บในรอบนี้ทั้งหมดจำนวน 65 ตัวอย่าง ผลตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. จำนวน 9 ตัวอย่างจากโรงแรมหรือรีสอร์ท 5 แห่ง ซึ่งพบปริมาณเชื้อน้อยกว่า 10^5 cfu/L จำนวน 7 ตัวอย่าง และ ปริมาณเชื้อตั้งแต่ 10^5 แต่น้อย

ตารางที่ 2 ตัวอย่างน้ำที่เก็บจากโรงแรม/รีสอร์ทที่เข้าร่วมโครงการแยกตามเขตบริการสุขภาพในรอบที่ 1

เขตบริการสุขภาพที่	โรงแรม/รีสอร์ทที่ได้ประสานโครงการ (แห่ง)	โรงแรม/รีสอร์ทที่เข้าร่วมโครงการ (แห่ง/%)	น้ำที่เก็บในรอบที่ 1 (ตัวอย่าง)	ตรวจพบการปนเปื้อน (ตัวอย่าง/แห่ง)
7	25	10 / 40.0	40	11/5
8	53	33 / 62.3	82	17/9
9	42	13 / 31.0	35	17/7
10	37	19 / 51.4	43	3/3
รวม	157	75 / 47.8	200	48/24

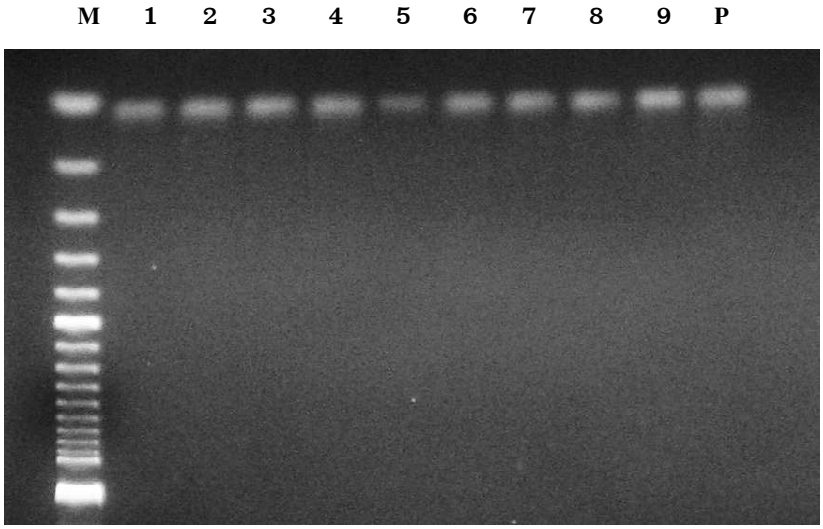
ตารางที่ 3 การตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำแยกตามเขตพื้นที่

เขตพื้นที่	โรงแรม/รีสอร์ทที่ได้ประสานโครงการ (แห่ง)	โรงแรม/รีสอร์ทที่เข้าร่วมโครงการ (แห่ง)	ตรวจพบการปนเปื้อน (แห่ง)
เขตบริการสุขภาพที่ 7			
ขอนแก่น	10	6	3
ร้อยเอ็ด	5	2	1
มหาสารคาม	5	1	1
กาฬสินธุ์	5	1	0
รวม	**25**	**10**	**5**
เขตบริการสุขภาพที่ 8			
อุดรธานี	8	6	3
หนองคาย	5	3	1
หนองบัวลำภู	5	2	0
บึงกาฬ	3	1	0
เลย	20	13	5
สกลนคร	6	3	0
นครพนม	6	5	0
รวม	**53**	**33**	**9**
เขตบริการสุขภาพที่ 9			
นครราชสีมา	19	3	2
สุรินทร์	7	3	2
บุรีรัมย์	8	2	0
ชัยภูมิ	8	5	3
รวม	**42**	**13**	**7**
เขตบริการสุขภาพที่ 10			
อุบลราชธานี	15	5	2
ยโสธร	7	5	0
อำนาจเจริญ	5	3	0
ศรีสะเกษ	5	3	0
มุกดาหาร	5	3	1
รวม	**37**	**19**	**3**
รวมทั้งหมด	**157**	**75**	**24 (32%)**

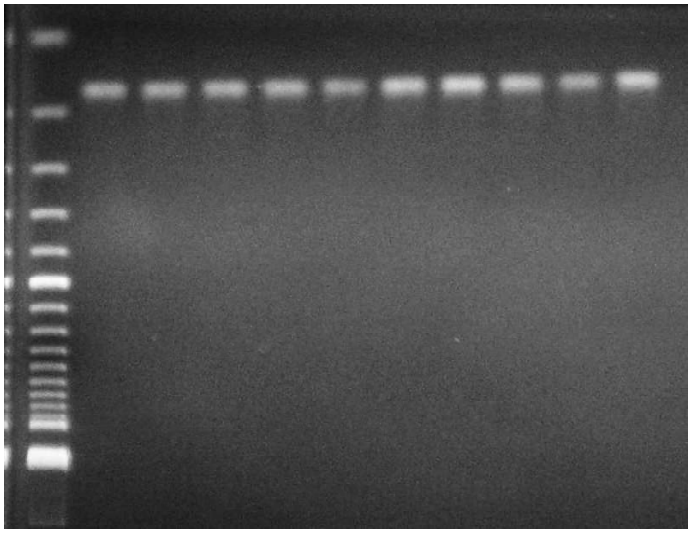
ตารางที่ 4 ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบแยกตามประเภทของแหล่งน้ำที่เก็บจากโรงแรม/รีสอร์ท

ปริมาณเชื้อ (cfu/L)	หอผึ่งเย็น (ตัวอย่าง)	ก๊อกน้ำ/ฝักบัวในห้องพัก (ตัวอย่าง)	เครื่องผลิตน้ำอุ่น-น้ำร้อน (ตัวอย่าง)	ถังพักน้ำ/แทงค์น้ำ (ตัวอย่าง)	รวม (ตัวอย่าง)
$<10^5$	10	33	1	1	45
$\geq 10^5 - <10^6$	0	3	0	0	3
รวม	10	36	1	1	48

ภาพที่ 1 ภาพ PCR products ขนาด 108 bp ของการตรวจยืนยันจีนัส *Legionella spp.* จากโคโลนีบน BCYE ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer PT87, PT163 (5S rRNA gene), M = DNA marker, 1-9 = sample และ P = positive control



ภาพที่ 2 ภาพ PCR products ขนาด 168 bp ของการตรวจยืนยันเชื้อ *L. pneumophilla* จากโคโลนีบน BCYE ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer PT69, PT70 (*mip* gene), M = DNA marker, 1-9 = sample และ P = positive control



ตารางที่ 5 ตัวอย่างน้ำที่เก็บจากโรงแรม/รีสอร์ทหลังการปรับปรุงการบำรุงรักษาระบบ

เขตบริการสุขภาพที่	โรงแรม/รีสอร์ทที่ตรวจพบการปนเปื้อน (แห่ง)	โรงแรม/รีสอร์ทที่เก็บตัวอย่างรอบที่ 2 (แห่ง/ตัวอย่าง)	ตรวจพบการปนเปื้อน (แห่ง/ตัวอย่าง)	หมายเหตุ
7	5	4 / 17	2 / 4	กำลังปรับปรุงระบบ 1 แห่ง
8	9	8 / 32	2 / 4	ไม่ตรวจรอบสอง 1 แห่ง
9	7	2 / 4	1 / 1	กำลังปรับปรุงระบบ 5 แห่ง
10	3	3 / 12	0 / 0	
รวม	**24**	**17 / 65**	**5 / 9**	

กว่า 10^6 cfu/L จำนวน 2 ตัวอย่าง

วิจารณ์

จากผลการสำรวจข้างต้น หากยึดตามประกาศกรมอนามัย พ.ศ. 2544 เรื่อง "ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลิจิโอเนลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย" โรงแรมหรือรีสอร์ทที่พบการปนเปื้อนของเชื้อไม่เกิน 10^5 cfu/L และต้องมีการปรับปรุงการบำรุงรักษาระบบน้ำจำนวน 22 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 29.3 และพบการปนเปื้อนของเชื้อตั้งแต่ 10^5 cfu/L แต่ไม่เกิน 10^6 cfu/L ต้องแก้ไขวิธีการบำรุงรักษาระบบน้ำใหม่และแก้ไขการทำลายเชื้อให้ถูกต้องจำนวน 2 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 2.7 (ตารางที่ 6) และเมื่อตรวจแยกชนิดของเชื้อ ทั้ง 24 แห่ง พบเป็นชนิด *L. pneumophilla* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ก่อโรคในคนได้ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับการเฝ้าระวังระหว่างปี 2534-2535 โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์[3] โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งในกรุงเทพมหานครและต่างจังหวัด ซึ่งสปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *L. pneumophilla* และแหล่งน้ำที่ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อนอกจากหอผึ่งเย็นแล้ว ยังพบในแหล่งอื่น

ตารางที่ 6 โรงแรมหรือรีสอร์ทที่ต้องปรับปรุงแก้ไขการบำรุงรักษาระบบน้ำแยกตามปริมาณเชื้อที่ตรวจพบ

ปริมาณเชื้อ (cfu/L) *	**โรงแรม/รีสอร์ท (แห่ง)**	**ข้อปฏิบัติ****
$<10^5$	22 (29.3%)	- ต้องมีการแก้ไขเพิ่มเติมการบำรุงรักษา - ตรวจสอบเฝ้าระวัง และติดตามผลของระบบผึ่งเย็นให้ถูกต้อง
$\geq 10^5$ - $<10^6$	2 (2.7%)	- สภาวะที่จะมีอันตรายเกิดขึ้นได้ - ต้องประเมินผลวิธีการบำรุงรักษาใหม่ รวมทั้งกระบวนการทำลายเชื้อในน้ำที่ใช้อยู่ต้องแก้ไขให้ถูกต้อง - ตรวจสอบ เฝ้าระวัง และติดตามผล
$\geq 10^6$	0	- สภาวะที่เป็นอันตรายร้ายแรง - ต้องปิดระบบทันทีเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ทำความสะอาดและทำลายเชื้อ - ตรวจสอบ เฝ้าระวัง และติดตามผล

หมายเหตุ: *, ** = อ้างอิงตามประกาศกรมอนามัย พ.ศ. 2544 เรื่อง "ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลิจิโอเนลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย"

ด้วย จากการประสานกับผู้ที่เกี่ยวข้องในสถานประกอบการที่ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ เพื่อให้มีการดำเนินการปรับปรุงการบำรุงรักษาระบบน้ำตามข้อปฏิบัติฯ ข้างต้น และเก็บตัวอย่างซ้ำอีกครั้งเพื่อประเมินการแก้ไขระบบน้ำ รวมทั้งวิธีการทำลายเชื้อด้วย ผลการประสานดังกล่าว สถานประกอบการที่ได้ดำเนินการตรวจตัวอย่างน้ำรอบสอง และผลตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. มีจำนวน 12 แห่ง ยังคงตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อเพียง 5 แห่ง ที่ยังคงต้องปรับปรุงแก้ไขเพิ่มเติมเพื่อให้ลดการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าว จากข้อมูลการตรวจในรอบที่สองนี้เป็นตัวบ่งชี้ถึงกระบวนการตลอดจนขั้นตอนที่ได้ปฏิบัติการบำรุงรักษาระบบน้ำที่มีอยู่ ซึ่งหากได้ดำเนินการการตามข้อปฏิบัติในประกาศของกรมอนามัย ก็ช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าวได้

สรุป

จากข้อมูลการปนเปื้อนเชื้อในแหล่งน้ำที่ใช้ในโรงแรมหรือรีสอร์ท ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ถึงแม้ว่าสถานประกอบการที่เข้าร่วมโครงการยังไม่ครบทุกแห่ง เนื่องจากเป็นความสมัครใจเข้าร่วมโครงการ แต่ข้อมูลดังกล่าวสามารถแสดงให้เห็นได้ชัดว่ายังคงมีการแพร่กระจายเชื้อ *L. pneumophilla* อยู่เกือบทุกพื้นที่ที่มีการสำรวจ และเชื้อที่พบเป็นชนิดที่ก่อให้เกิดโรค Legionellosis ในคน ดังนั้นการเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อชนิดนี้ ด้วยการตรวจสอบระบบน้ำที่ใช้ในหอผึ่งเย็น จะเป็นการป้องกันการแพร่เชื้อในระบบปรับอากาศที่ใช้ในตัวอาคารได้ รวมทั้งการตรวจสอบระบบน้ำที่ใช้ในตัวอาคาร เช่น น้ำที่เก็บในถังพักน้ำ อ่างน้ำ ตลอดจนน้ำจากก๊อกน้ำหรือฝักบัวในห้องต่าง ๆ จะเป็นการช่วยลดความเสี่ยงการได้รับเชื้อของผู้เข้าพักอาศัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ซึ่งปฏิบัติงานในสถานประกอบการนั้น ๆ อีกด้วย การประสานงานกับหน่วยงานที่รับผิดชอบหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม กรมอนามัย สำนักงานควบคุมป้องกันโรค กรมควบคุมโรค เป็นต้น เพื่อแจ้งเตือนโรงแรมและรีสอร์ทให้คลอบคลุมทุกแห่งในเขตพื้นที่รับผิดชอบให้มีความตระหนักในการเฝ้าระวังเชื้อ *Legionella* spp. ในระบบน้ำที่ใช้อยู่อย่างสม่ำเสมอ ก็จะเป็นการช่วยลดความเสี่ยงการแพร่กระจายเชื้อได้เช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และการดำเนินโครงการบรรลุตามวัตถุประสงค์ได้นั้น ต้องขอขอบพระคุณผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7, 8, 9, และ 10 ที่สนับสนุนการประสานโครงการ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ผู้ประสานการเก็บตัวอย่างของแต่ละศูนย์ฯ และต้องขอบคุณผู้จัดการโรงแรมทั้ง 75 แห่ง ที่ให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างน้ำ และที่สำคัญขอขอบคุณผู้ร่วมดำเนินโครงการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ที่ร่วมกันทำงานจนบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

1. ไพรัช ศรีไสว. การศึกษาอุบัติการณ์การเกิดโรค Legionellosis. วารสารอนามัยสิ่งแวดล้อม 2542;3:45-9.
2. วันทนา ปวีณกิตติพร. ลีเจียนเน็ลล่า (*Legionella*). ใน: ไพจิตร์ วราชิต, ณัฏฐีวรรณ ปุ่นวัน, สมชาย แสงกิจพร, บรรณาธิการ. โรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่: คู่มือการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: เท็กซ์แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น; 2541.
3. Tishyadhigama P, Dejsirilert S, Srisawai P, Kusum M, Yabuuchi E, Ikedo M, et al. Environmental surveillance of *Legionella pneumophila* in Thailand. J Med Assoc Thai 1995;78:57-71.
4. สมชัย บวรกิตติ, วันทนา ปวีณกิตติพร, สุรางค์ เดชศิริเลิศ. โรคลีจิโอเนลลา. ใน: สมชัย บวรกิตติ, พลรัตน์ วิไลรัตน์, ศรชัย หลูอารีย์สุวรรณ, บรรณาธิการ. เวชศาสตร์การท่องเที่ยว ฉบับเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษามหาราชินี. กรุงเทพมหานคร: กรุงเทพเวชสาร; 2547. หน้า 265-72.
5. Winn WC Jr. *Legionella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington DC: ASM Press; 1999. p. 572-85.

6. วัชรี แก้วนอกเขา. โรคปอดอักเสบลีเจียนแนร์ ประเทศไทย ปี พ.ศ. 2548-2553. นนทบุรี: สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค; 2555.
7. National Center for Infectious Diseases. Procedures for the recovery of *Legionella* from the Environment. Atlanta GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1992; p. 1-13.
8. Paveenkittiporn W, Dejsirilert S, Kalambaheti T. Genetic speciation of environmental *Legionella* isolates in Thailand. Infection Genetics and Evolution 2012;12: 1368-76.
9. Nagai T, Hisanori S, Iwasa M, Tsuzuki T, Kura F, Amemura-Maekawa J, *et al*. Neonatal sudden death due to *Legionella pneumonia* associated with water birth in a domestic spa bath. J Clin Microbiol 2003;41:2227-9.
10. 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.

Abstract: Surveillance of *Legionella* spp. in Water Supply of Hotels and Resorts in The North-Eastern of Thailand

Athicha Mahayotha, B.Sc., M.Sc.; Korawit Nakonsong, B.Sc.; Apinya Aukkahat, B.Sc.; Udomkiat Punthanaprated, M.Sc.

Regional Medical Science Center 7, Khon kaen, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand

Journal of Health Science 2014;23:201-9.

The objective of this study was to determine the outcomes of the surveillance program for *Legionella spp.* in water supply systems in hotels and resorts in the North-Eastern of Thailand in order to assess contamination of water supply as a preparedness for the ASEAN Economic Community. It was conducted from May 2012 to September 2013, beginning with the identification of hotels and resorts from Tourism Authority of Thailand website; and seeking permission from collaborating sites to collect water samples. The samples were then transported to the Regional Medical Science Center 7 for the detection of *Legionella* spp. using culture method. For the positive samples, species typing was performed using PCR technic. There were 200 samples collected from 75 hotels and resorts; and *Legionella* spp. was detected in 48 samples from 24 hotels and resorts (32.0%); and the PCR revealed the type of the organism was solely *L. pneumophila.* Level of *Legionella* spp. was less than 10^5 cfu/L in 22 hotels/resorts. (29.3 %) and between 10^5 cfu/L and 10^6 cfu/L in the other two sites. All hotels and resorts with positive samples were notified with the results; and biosafety measures for the water supply system maintenance were operated based on the guideline from Department of Health. Thus, the *Legionella* surveillance program is a useful process to ensure that the water supply in hotels and resorts is safe for their customers, visitors and staff.

***Key words: Legionellosis*, surveillance program, culture method, PCR technique**