

การตรวจหาแบคทีเรีย *Legionella* spp. จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมนั้น มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

1. เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งที่ต้องการตรวจหา เช่น cooling tower ของเครื่องปรับอากาศ น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ เป็นต้น ตัวอย่างน้ำที่นำมาตรวจนั้นควรมีปริมาตรอย่างน้อย 200 มิลลิลิตร (บันทึกปริมาตรน้ำตัวอย่างด้วย) โดยบรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อ (sterile)
2. นำตัวอย่างน้ำทั้งหมดไปเพิ่มความเข้มข้น (concentration) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 16,000 g 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทส่วนใสออกให้เหลือตะกอนประมาณ 1 มิลลิลิตร ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำใสไม่มีตะกอนสามารถใช้การกรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.2 μ แทนการปั่นได้
3. นำตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปเติม acid wash solution (HCl-KCl solution pH 2.2) ในอัตราส่วนตะกอน: acid solution คือ 1:1 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที ในกรณีที่ใช้การกรองให้นำเยื่อกรองมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ใส่ลงในหลอดที่บรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมด้วย vortex mixer แล้วจึงนำมาเติม acid solution ในอัตราส่วน 1:1
4. ตะกอนที่ผ่านการเติม acid solution แล้ว นำมาปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้อยู่ในสภาพเป็นกลาง (pH 7) แล้วจึงนำไปเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) + Glycine และ BCYE + Glycine, Vancomycine, Polymyxin B, Cycloheximide (GVPC) ด้วยวิธี spread plate ที่ 2 ระดับความเจือจาง คือ undilute และ 10^{-1} ความเจือจางละ 2 ซ้ำ ป่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องที่มีความชื้น (humid chamber) เวลา 3-4 วัน
5. ตรวจผลโดยการดูลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร BCYE และ GVPC โคโลนีของ *Legionella* spp. มีสีเทาอมฟ้า เมื่อศึกษาภายใต้กล้อง stereo microscope พบลักษณะขรุขระ (ground-glass appearance) ที่ผิวโคโลนี
6. เลือกโคโลนีที่สงสัยมาเพาะแยกเชื้อด้วยการขีดแยกเชื้อ (streak) บน BCYE และ BCYE without L-cysteine (หรือใช้ Blood agar) เพื่อศึกษาความต้องการกรดอะมิโน cysteine ในการเจริญ โดย *Legionella* spp. มีความต้องการ cysteine ดังนั้นจะเจริญบน BCYE แต่ไม่เจริญบน BCYE without L-cysteine
7. ถ้าต้องการวินิจฉัยแยกสายพันธุ์ (species) ให้ทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี คือ ศึกษาความสามารถในการย่อย hippurate ซึ่งเชื้อ *Legionella pneumophila* เท่านั้น ที่จะสามารถย่อย hippurate ได้
8. นำ *L. pneumophila* ที่วินิจฉัยแยกเชื้อได้แล้วไปทดสอบหา serotype

9. ถ้าเป็นตัวอย่างอากาศที่เก็บโดยใช้เครื่องกรอง ให้นำกระดาษกรองมาแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมด้วย vortex mixer และทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วนำน้ำที่ได้ไปเพาะเชื้อเหมือนตัวอย่างน้ำต่อไป

การรายงานผล

- ไม่พบ
- พบเชื้อ คำนวณเป็น CFU/100 ml (คำนวณ undilute เป็น 1:2, 10^{-1} เป็น 1:20)

Media for isolation and identification of *Legionella* spp.

Ingredient (gram/litre)	Modified BCYE	BCYE without cyteine
Yeast extract	10	10
Activated charcoal (Norit SX 3)	1.5	1.5
Agar	15	15
ACES buffer	10	10
Alpha-ketoglutaric acid	1	-
Glycine	3	-
Adjust pH at 7.0 by adding KOH pellets		
Autoclave at 121 °C for 15 minutes		
After cooling to 60 °C add filtered sterile solution of the following		
L- cyteine – HCl (10%)	4 ml	-
Ferric pyrophosphate (10%)	2.5 ml	2.5 ml
Vancomycin (5mg/ml)	1 ml	-
Polymycin B (100,000 units/ml = 12.66 mg/ml)	1 ml	-
Amphotericin (80 mg/0.1 N KOH) หรือ Cefamandole (4.2 mg/ml)* หรือ Cyclohexamide (80 mg/ml)	1 ml	-

* ใช้ Cefamandole แทน Amphotericin B ได้

BCYE = Buffered Charcoal Yeast Extract Agar

Acid wash solution (0.2 M HCl-KCl pH 2.0)

Solution A : KCl 14.9 กรัม + น้ำกลั่น 1 ลิตร

Solution B : Conc. HCl 16.7 มล. + น้ำกลั่น 1 ลิตร

ผสม solution A : solution B 18:1 วัด pH ควรได้ 2.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

Hippurate test :

1% hippurate :

Sodium hippurate 0.1 กรัม

น้ำปราศจากเชื้อ 10 มล.

แหล่งน้ำที่มักนำมาตรวจหาแบคทีเรีย *Legionella* spp. และวิธีการเก็บตัวอย่าง

1. น้ำจากถังหล่อเย็นระบบแอร์รวม (cooling system)

เก็บน้ำที่ฉีดพ่นเป็นละออง น้ำที่ไหลซึมถัง หรือน้ำจากท่อเปิดน้ำทิ้ง ปริมาตร 500 มิลลิตร โดยเก็บหรือดูดตะกอนบริเวณที่เก็บมาด้วย

2. น้ำพุ

เก็บน้ำอย่างน้อย 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 500 มล.

3. น้ำฝักบัว ก๊อกน้ำ

ควรเก็บช่วงเช้าก่อนที่จะเปิดน้ำใช้ โดยเก็บน้ำจากฝักบัว หรือน้ำจากก๊อกน้ำ ปริมาตร 500 มิลลิตร ถ้ามีคราบตะกอนบริเวณหัวฝักบัว หัวก๊อกหรือภายในถ้ำถอดได้ ให้ใช้ไม้พันสำลี เช็ดหรือดูดคราบตะกอนมาด้วย

4. ถังน้ำระบบทำน้ำร้อน น้ำเย็น

ควรเก็บช่วงเช้าก่อนที่จะมีการเปิดน้ำใช้ โดยเก็บน้ำจากถัง และท่อเปิดของถังปริมาตร 500 มิลลิตร และถ้ามีคราบตะกอนภายในถัง ควรเก็บคราบตะกอนมาด้วย

5. แหล่งน้ำธรรมชาติ

ควรเก็บน้ำบริเวณที่เป็นน้ำนิ่ง โดยเก็บน้ำปริมาตร 500 มิลลิตร ถ้าแหล่งน้ำมีบริเวณกว้าง ควรเก็บจำนวนตัวอย่างมากขึ้นในตำแหน่งต่าง ๆ

การนำส่งตัวอย่าง

ควรนำตัวอย่างนำส่งห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุดหลังจากเก็บตัวอย่าง (ภายใน 24 ชั่วโมง) โดยขณะนำส่งควรเก็บน้ำตัวอย่างในกล่อง หรือภาชนะที่กันความร้อนจัด หรือเย็นจัด และเก็บตัวอย่างในที่อุณหภูมิระหว่าง 6-18 องศาเซลเซียส