

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี Polymerase Chain Reaction สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อ *Legionella pneumophila*

เบญจพร หนูทอง¹ อากาศ นบมอบ² และ ศศิธร หนูทอง³

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สงขลา 90100

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภูเก็ต 83110

³มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

บทคัดย่อ เชื้อ *Legionella pneumophila* เป็นสาเหตุหลักของโรคลีเจียนแนร์ ซึ่งพบปนเปื้อนได้ในแหล่งน้ำต่าง ๆ สามารถแพร่กระจายสู่คนผ่านการสูดดมละอองฝอยที่ปนเปื้อน การเฝ้าระวังเชื้อในแหล่งน้ำจึงเป็นสิ่งจำเป็น สำหรับการตรวจหาเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐาน คือ การเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการอ่านผลและใช้เวลานาน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธี PCR สำหรับตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* ที่รวดเร็ว มีความจำเพาะสูง ไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ และสามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้ โดยใช้ยีน *macrophage infectivity potentiator (mip)* เป็นยีนเป้าหมาย เปรียบเทียบความสอดคล้องของผลที่ได้กับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ผลผลิตของวิธี PCR ที่พัฒนาได้มีขนาด 265 bp มีค่า limit of detection เท่ากับ 10^2 CFU/ml โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับ 100 ไอโซเลท ของเชื้อ *Legionella* และเชื้อแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในแหล่งน้ำ 10 ชนิด จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ตัวอย่างน้ำ พบความสอดคล้องกันในระดับค่อนข้างดี ($\kappa = 0.81$) และค่า negative predictive value ร้อยละ 100.00 นอกจากนี้เมื่อใช้โคลนเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยเป็นเชื้อ *L. pneumophila* ผลการเปรียบเทียบแสดงความสอดคล้องตรงกันอย่างสมบูรณ์ ($\kappa = 1.00$) แต่วิธี PCR ให้ผลการตรวจที่รวดเร็วกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อถึง 8 เท่า ดังนั้นวิธี PCR ที่พัฒนาขึ้นจึงเหมาะที่จะใช้เป็นวิธีทางเลือกในการควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนเชื้อในแหล่งน้ำต่าง ๆ รวมถึงสามารถนำไปใช้เป็นวิธีการตรวจยืนยันโคลนเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยเป็นเชื้อ *L. pneumophila* นอกจากวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อเดิมที่มีอยู่เพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วขึ้น

คำสำคัญ: Polymerase chain reaction, *Legionella pneumophila*, โรคลีเจียนแนร์, ยีน *mip*, แหล่งน้ำ

Corresponding author E-mail: benjaporn.n@dmsc.mail.go.th

Received: 30 May 2022

Revised: 5 September 2022

Accepted: 9 September 2022

บทนำ

Legionella pneumophila เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ที่มีแฟลกเจลลา ขนาด 2–20 ไมครอน จัดเป็น waterborne pathogen ชนิดหนึ่ง^(1,2) ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคลีเจียนแนร์ (Legionnaire's disease)⁽³⁾ ซึ่งก่อให้เกิดอาการปอดอักเสบรุนแรงเฉียบพลัน และมีผลกระทบรุนแรงต่ออุตสาหกรรมการท่องเที่ยวของหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย⁽⁴⁾ เชื้อชนิดนี้สามารถปนเปื้อนได้ทั้งในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ เช่น ห้วย หนอง คลอง บึง แม่น้ำ บ่อน้ำร้อน เป็นต้น และแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น สระว่ายน้ำ น้ำพุประดับ น้ำก๊อก หอผิงเย็น ถังเก็บน้ำ ถังน้ำร้อน เป็นต้น⁽⁵⁾ เชื้อ *L. pneumophila* สามารถแพร่กระจายเข้าสู่คนได้โดยผ่านการสูดดมเอาละอองน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไป⁽⁶⁾ ดังนั้นโรคลีเจียนแนร์จึงสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดทั้งปี และไม่มีการติดต่อจากคนสู่คน⁽⁷⁾ แต่อาจเกิดขึ้นได้ในผู้ป่วยจำนวนน้อยมาก⁽⁸⁾ โดยเฉพาะผู้สูงอายุ เด็ก ผู้ที่มีโรคประจำตัว หรือผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่ายกว่าคนทั่วไป⁽⁶⁾ สำหรับประเทศไทย มีรายงานพบผู้ติดเชื้อครั้งแรกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527⁽⁹⁾ ซึ่งรายงานส่วนใหญ่เป็นรายงานจากทางต่างประเทศที่พบนักท่องเที่ยวติดเชื้อภายหลังกลับจากการท่องเที่ยวในประเทศไทย⁽¹⁰⁾ โดยรายงานผ่านทางกระทรวงการต่างประเทศมายังกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย นำไปสู่การสอบสวนโรคและมาตรการการควบคุมโรคเพื่อกำจัดเชื้อจากแหล่งน้ำที่ได้รับการระบุเป็นที่มาของการติดเชื้อ⁽⁴⁾ ประมาณร้อยละ 10 ของผู้ติดเชื้อเสียชีวิตด้วยโรคแทรกซ้อน และประมาณร้อยละ 40–80 ของผู้ติดเชื้อป่วยจนเสียชีวิต ซึ่งความรุนแรงของอาการขึ้นกับความไวในการได้รับเชื้อของแต่ละบุคคล⁽¹¹⁾ ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันการเกิดโรคและลดความเสียหายทางธุรกิจการท่องเที่ยว รวมถึงภาพลักษณ์ของประเทศ หน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนจึงควรเฝ้าระวังโรคนี้ด้วยการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อในแหล่งน้ำต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ท่องเที่ยวที่สำคัญของประเทศ

ปัจจุบันวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *L. pneumophila* ในแหล่งน้ำที่เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) คือ วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะในการอ่านผล ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

ที่มีราคาแพง และใช้เวลานาน 10 วัน ในการดำเนินการ⁽¹²⁾ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่มีความรวดเร็ว มีความจำเพาะสูง ไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะในการอ่านผล และรองรับปริมาณตัวอย่างจำนวนมาก โดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมหลายชนิด เช่น *Escherichia coli*⁽¹³⁾, *Shigella sonnei*⁽¹⁴⁾, enteroviruses และ adenoviruses⁽¹⁵⁾ เป็นต้น เพื่อตรวจหาหัยิน macrophage infectivity potentiator (*mip*) ซึ่งเป็น major virulence factor ที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดและเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ของเชื้อ *L. pneumophila* ในตัวอย่างน้ำทางสิ่งแวดล้อม^(16–18) เปรียบเทียบความสอดคล้องกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นข้อมูลความน่าเชื่อถือสำหรับนำไปใช้เฝ้าระวังและป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อในแหล่งน้ำต่างๆ ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

เชื้อ *L. pneumophila* ATCC 33152 ถูกนำมาใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก และเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 10 ชนิด ตามรายงานของ Collins S และคณะ ปี 2015⁽¹⁷⁾ ประกอบด้วย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Burkholderia cepacia* DMST 15507, *Bacillus subtilis* ATCC 15896, *Klebsiella oxytoca* DMST 16071, *Listeria monocytogenes* DMST 17303, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, และ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ถูกใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะของวิธี โดยเชื้อแบคทีเรียจะถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง

นอกจากนี้เชื้อ *Legionella* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทางสิ่งแวดล้อม โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ⁽¹⁹⁾ และจำแนกชนิดสายพันธุ์เชื้อด้วยวิธี latex agglutination test (Oxoid, Hampshire, UK) จำนวน 100 ไอโซเลต

ประกอบด้วย *L. pneumophila* serogroup 1 จำนวน 25 ไอโซเลท, *L. pneumophila* serogroups 2-14 จำนวน 50 ไอโซเลท และ *Legionella* species จำนวน 25 ไอโซเลท เก็บรวบรวมโดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต ในปี 2562 โดยการเก็บรักษาเชื้อไว้ในกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ถูกใช้สำหรับทดสอบยืนยันความจำเพาะของวิธี PCR ที่พัฒนาขึ้น โดยเชื้อ *Legionella* จะถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด buffered charcoal yeast extract agar (BCYE) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้

ตัวอย่างไอโซเลทของเชื้อที่สงสัย *Legionella* และตัวอย่างน้ำทางสิ่งแวดล้อม

ตัวอย่างไอโซเลทของเชื้อที่สงสัยเป็นเชื้อ *Legionella* ซึ่งมีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาว ตรงกลางมีลักษณะคล้าย cut-glass ที่เพาะเลี้ยงได้จากตัวอย่างน้ำทางสิ่งแวดล้อม ระหว่างเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2562 โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต จำนวน 385 ไอโซเลท

ตัวอย่างน้ำทางสิ่งแวดล้อมที่สงสัยมีการปนเปื้อนเชื้อ *Legionella* ทั้งหมดน้ำตามธรรมชาติและแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น ห้วย หนอง คลอง บึง แม่น้ำ บ่อน้ำร้อน น้ำพุร้อน สระว่ายน้ำ น้ำพุประดับ น้ำก๊อก น้ำทิ้งอาคาร หอฝึ่งเย็น ถังเก็บน้ำ ถังน้ำร้อน เป็นต้น ซึ่งส่งตรวจ ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต ในเดือนมกราคม 2563 จำนวน 161 ตัวอย่าง

การสกัด DNA

ตัวอย่างไอโซเลทของเชื้อที่สงสัย ขนาด 2-3 มิลลิเมตร ถูกละลายลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร การสกัด DNA ทำโดยการต้ม⁽²⁰⁾ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Eppendorf, Germany) เก็บตัวอย่าง DNA ที่ได้ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สำหรับตัวอย่างน้ำทางสิ่งแวดล้อมที่สงสัยมีการปนเปื้อนเชื้อ *Legionella* ให้เตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์ตามคำแนะนำขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ

ลิจิโอเนลลาของ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ปี 2005⁽¹⁹⁾ โดยใช้แผ่นกรองชนิด polycarbonate ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร (Fisher Scientific, USA) จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมได้มาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany) ทำตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่ระบุในชุดสกัด และ DNA ที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อ *L. pneumophila* ด้วยวิธี PCR

วิธี PCR ถูกนำมาใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *L. pneumophila* ในส่วนยีน macrophage infectivity potentiator (*mip*) ความยาว 265 bp โดยชุดไพรเมอร์ถูกออกแบบจากข้อมูล GenBank accession number S42595⁽²¹⁾ ชุดไพรเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 1 PCR product ที่ได้ถูกตรวจสอบความจำเพาะโดยใช้โปรแกรม basic local alignment search tool (BLAST) และประเมินรูปแบบความจำเพาะการตัด PCR product โดยใช้เอนไซม์ *EcoRI* (Thermo Scientific, Waltham, MA) ซึ่งเลือกจากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NEBcutter (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ตัดได้ด้วยวิธี gel electrophoresis

สำหรับส่วนประกอบและสภาวะของปฏิกิริยาทั้งหมดถูกปรับให้มีสภาวะที่เหมาะสม ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X reaction buffer, 2.5 mM $MgCl_2$ (New England Biolabs, USA), 0.2 mM dNTP mix (Thermo Scientific, USA), 0.2 μ M forward primer และ reverse primer (Pacific Science, Thailand), 0.625 U Taq DNA polymerase (New England Biolabs, USA) เติมนuclease-free water ให้ครบปริมาตร 24 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมตัวอย่าง DNA 1 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองบรรจุส่วนประกอบปฏิกิริยาทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม T100™ (Bio-Red, โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยาดังนี้ initial denaturation ที่ 95°C 2 นาที และ 30 รอบ ของ denaturation ที่ 95°C 30 วินาที, USA) annealing ที่ 57°C 30 วินาที และ extension ที่ 68°C 30 วินาที จากนั้นเข้าสู่ final extension ที่ 68°C

5 นาที โดยใช้ DNA ของเชื้อ *L. pneumophila* ATCC 33152 เป็นตัวควบคุมผลบวก มี PCR product ขนาด 265 bp และ nuclease-free water เป็นตัวควบคุมผลลบ

โดยผลผลิตที่ได้ถูกตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

ตารางที่ 1 ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ สำหรับตรวจหา *mip* ของเชื้อ *L. pneumophila*

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')	ตำแหน่ง (bp)	PCR product (bp)
Forward primer	GCA TTG GTG CCG ATT TGG G	110–374	265
Reverse primer	GGC AAT ACA ACA ACG CCT GG		

การหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่ตรวจพบ (limit of detection) และความจำเพาะ (specificity)

ปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบของวิธี PCR ได้รับการตรวจสอบโดยใช้ตัวอย่างน้ำที่ปราศจากเชื้อ เดิมเชื้อ *L. pneumophila* ปริมาณ 1.5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร และทำการเจือจางแบบ serial 10-fold dilution ตั้งแต่ 10^6 ถึง 10^0 นำตัวอย่างน้ำที่เตรียมได้แต่ละความเข้มข้นไปทำการทดสอบ

สำหรับความจำเพาะของการตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อ *L. pneumophila* ถูกตรวจสอบโดยใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานอื่น จำนวน 10 ชนิด ตามรายงานของ Collins S และคณะ ปี 2015⁽¹⁷⁾ และตรวจสอบยืนยันความจำเพาะเพิ่มเติมโดยใช้เชื้อ *Legionella* ที่แยกได้จากวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ จำนวน 100 ไอโซเลต

การประเมินประสิทธิภาพของวิธี PCR และความสอดคล้องเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

วิธี PCR ได้รับการประเมินประสิทธิภาพเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ⁽¹⁹⁾ (วิธีมาตรฐาน) โดยใช้โคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยเป็นเชื้อ *Legionella* จากตัวอย่างน้ำทางสิ่งแวดล้อม จำนวน 385 ไอโซเลต

นอกจากนี้วิธี PCR ที่พัฒนาขึ้นยังได้รับการประเมินโดยใช้ตัวอย่างน้ำทางสิ่งแวดล้อม ที่สงสัยมีการปนเปื้อนเชื้อ *Legionella* จำนวน 161 ตัวอย่าง

การคำนวณทางสถิติ

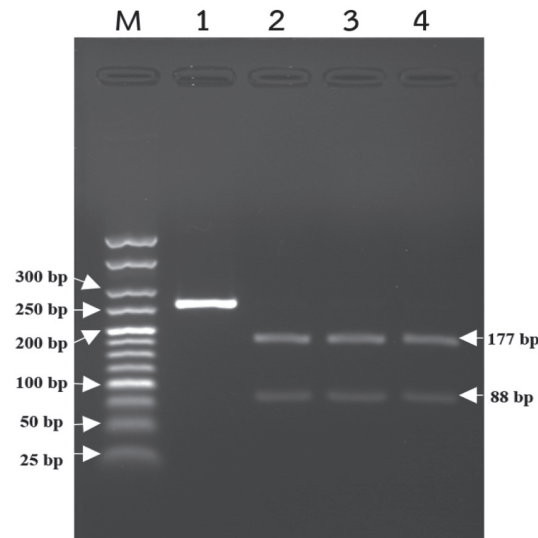
ผลของวิธี PCR ที่ได้จะได้รับการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี โดย kappa analysis และประเมินค่า sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value และ negative predictive value โดยใช้สูตรมาตรฐานตามผลของวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ผล

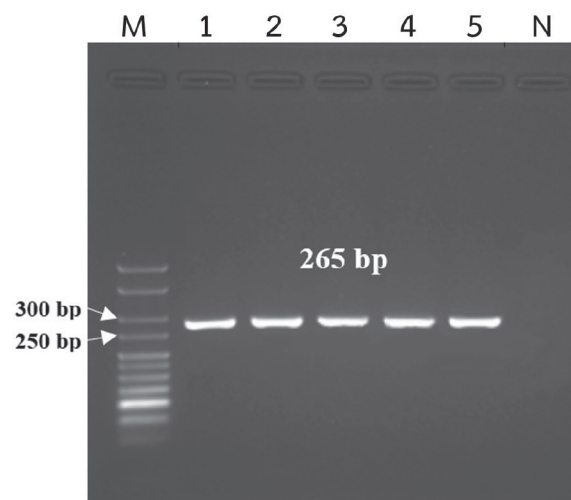
การประเมินความจำเพาะของ PCR product ที่ได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ PCR product ที่ได้ถูกประเมินผลความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NEBcutter โดยนำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *mip* ขนาด 265 bp ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ผลการประเมินพบว่า สามารถตัด PCR product ที่ได้ออกเป็น 2 ส่วน ประกอบด้วย 177 และ 88 bp ซึ่งขนาดของ PCR product ที่ตัดได้มีขนาดตรงตามผลการวิเคราะห์ที่แสดงในภาพที่ 1

การตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อ *L. pneumophila* ด้วยวิธี PCR

การตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อ *L. pneumophila* ด้วยวิธี PCR ได้รับการจัดตั้งโดยใช้ยีน *mip* เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจหา ผลผลิตของวิธีที่ได้มีขนาด 265 bp ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 1 PCR product ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* โดย Lanes M: DNA marker, 1 = เชื้อ *L. pneumophila* ขนาด 265 bp, 2-4 = ผลผลิตที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* มีขนาด 177 และ 88 bp



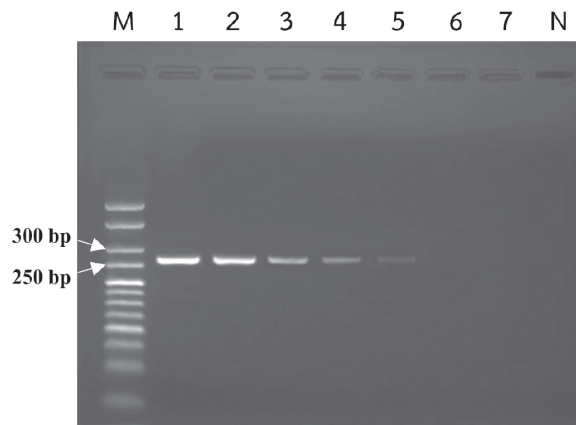
ภาพที่ 2 PCR product ของวิธีที่จัดตั้งได้ สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อ *L. pneumophila* โดย Lanes M = DNA marker, 1-5 = PCR product ของเชื้อ *L. pneumophila* เป็นตัวควบคุมผลบวกมีขนาด 265 bp, N = nuclease-free water เป็นตัวควบคุมผลลบ

ปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบด้วยวิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้น

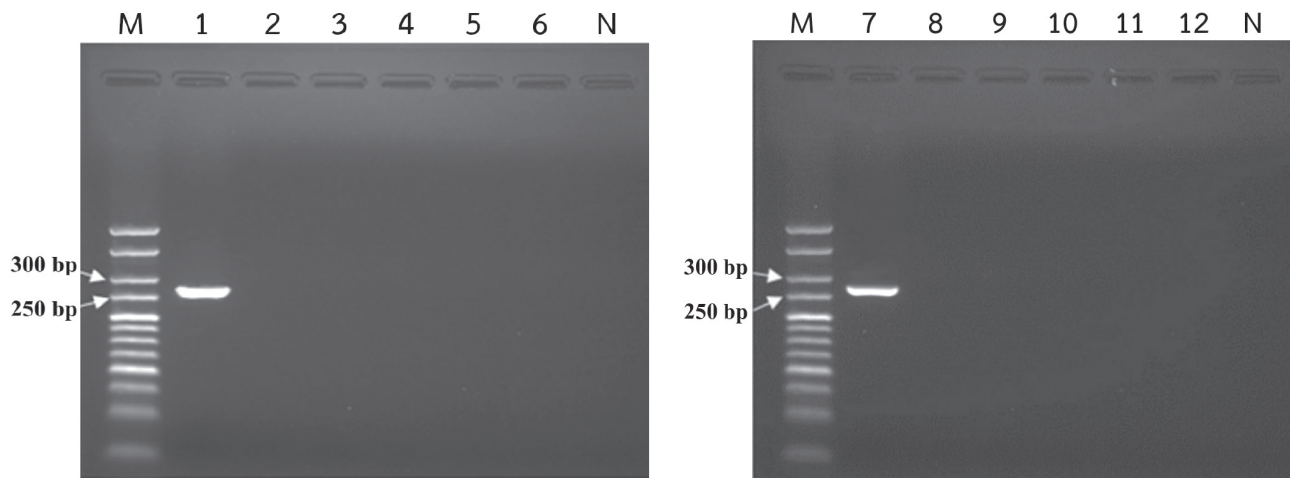
วิธี PCR ได้รับการตรวจสอบปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ โดยใช้ตัวอย่างน้ำที่เติมเชื้อ *L. pneumophila* ปริมาณ 1.5×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร นำมาเจือจาง 10 เท่า ตั้งแต่ 10^0 ถึง 10^5 ผลปรากฏความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ คือ 10^2 เซลล์/มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 3

ความจำเพาะของวิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้น

ความจำเพาะของวิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้นถูกตรวจสอบโดยใช้เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่พบได้บ่อยในน้ำจากสิ่งแวดล้อม⁽¹⁷⁾ จำนวน 10 ชนิด ผลพบยีน *mip* จากสารพันธุกรรมของเชื้อ *L. pneumophila* เพียงชนิดเดียวโดยไม่พบยีน *mip* ในสารพันธุกรรมของแบคทีเรียอื่นที่นำมาทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 ปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection) ของวิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้น โดย Lanes M = DNA marker, 1-7 = เชื้อ *L. pneumophila* ที่ปริมาณ 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 และ 10^0 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ, N = nuclease-free water เป็นตัวควบคุมผลลบ



ภาพที่ 4 ความจำเพาะของวิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้น ประเมินโดยใช้เชื้อแบคทีเรียอื่น จำนวน 10 ชนิด โดย Lanes M: DNA marker, 1 และ 7 = DNA เชื้อ *Legionella pneumophila*, 2-6 และ 8-12 = DNA เชื้อ *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Enterococcus faecalis* ตามลำดับ, N = nuclease-free water เป็นตัวควบคุมผลลบ

นอกจากนี้ความจำเพาะของวิธี PCR ที่จัดตั้งได้ ยังได้รับการตรวจสอบยืนยัน โดยใช้เชื้อ *Legionella* ที่แยกได้เพิ่มเติมอีก จำนวน 100 ไอโซเลท ประกอบด้วย *L. pneumophila* serogroup 1 (n = 25), *L. pneu-*

mophila serogroups 2–14 (n = 50) และ *Legionella* species (n = 25) ผลปรากฏพบยืนยัน *mip* เฉพาะเชื้อ *L. pneumophila* จำนวน 75 ไอโซเลท เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความจำเพาะของวิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้น ตรวจสอบยืนยันโดยใช้เชื้อ *Legionella* ที่แยกได้ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ จำนวน 100 ไอโซเลท

วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ^{a, b} (มาตรฐาน)	วิธี PCR	
	ผลบวก	ผลลบ
ผลบวก	75	0
ผลลบ	0	25

^aวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ; ผลบวก: latex agglutination test เป็น *L. pneumophila*, ผลลบ: latex agglutination test เป็น *Legionella* species

^bเชื้อ *Legionella* ที่แยกได้ ประกอบด้วย *L. pneumophila* serogroup 1 (n = 25), *L. pneumophila* serogroups 2–14 (n = 50) และ *Legionella* species (n = 25)

ผลการประเมินประสิทธิภาพวิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้น เปรียบเทียบความสอดคล้องกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

วิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้นถูกประเมินเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ⁽¹⁹⁾ (วิธีมาตรฐาน) โดยใช้โคลนเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยเป็นเชื้อ *Legionella* จำนวน 385 ไอโซเลท ผลพบเชื้อ *L. pneumophila* จำนวน 39 ไอโซเลท จากทั้งวิธี PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยสอดคล้องตรงกันทั้งสองวิธี ด้วยค่า kappa เท่ากับ 1.00 และมีค่า sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value และ negative predictive value ร้อยละ 100.00

นอกจากนี้วิธี PCR ยังได้รับการประเมินโดยใช้ตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อม ที่สงสัยมีการปนเปื้อนเชื้อ *Legionella* จำนวน 161 ตัวอย่าง ผลการตรวจหาด้วยวิธี PCR พบเชื้อ *L. pneumophila* จำนวน 17 ตัวอย่าง ขณะที่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อพบเชื้อ จำนวน 12 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4 สอดคล้องตรงกันด้วยค่า kappa เท่ากับ 0.81 มีค่า sensitivity ร้อยละ 100.00, specificity ร้อยละ 96.64, accuracy ร้อยละ 96.89, positive predictive value ร้อยละ 70.59 และ negative predictive value ร้อยละ 100.00

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* ด้วยวิธี PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยใช้โคลนเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยเป็นเชื้อ *Legionella* จากตัวอย่างน้ำทางสิ่งแวดล้อม (n = 385)

วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ^{a, b} (มาตรฐาน)	วิธี PCR		Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	PPV ^c (%)	NPV ^d (%)	Kappa
	ผลบวก	ผลลบ						
ผลบวก	39	0	100	100	100	100	100	1.00
ผลลบ	0	346						

^aวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ; ผลบวก: latex agglutination test เป็น *L. pneumophila*, ผลลบ: latex agglutination test เป็น *Legionella* species หรือผลลบ

^bเชื้อ *Legionella* ที่แยกได้ ประกอบด้วย *L. pneumophila* serogroup 1 (n = 13), *L. pneumophila* serogroups 2–14 (n = 26) และ *Legionella* species (n = 11)

^cPPV = positive predictive value

^dNPV = negative predictive value

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบความสอดคล้องการตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* ด้วยวิธี PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อมที่สงสัยมีการปนเปื้อนเชื้อ *Legionella* (n = 161)

		วิธี PCR		Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV ^c	NPV ^d	Kappa
				(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
		ผลบวก	ผลลบ						
วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ^{a, b}	ผลบวก	12	0	100	96.64	96.89	70.59	100	0.81
	(มาตรฐาน)	ผลลบ	5	144					

^a วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ; ผลบวก: latex agglutination test เป็น *L. pneumophila*, ผลลบ: latex agglutination test เป็น *Legionella* species หรือผลลบ

^b เชื้อ *Legionella* ที่แยกได้ ประกอบด้วย *L. pneumophila* serogroup 1 (n = 4), *L. pneumophila* serogroups 2–14 (n = 8) และ *Legionella* species (n = 3)

^c PPV = positive predictive value

^d NP = negative predictive value

วิจารณ์

จากผลการศึกษาพบว่าวิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้น เพื่อตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* โดยใช้ยีน *mip* เป็นยีนเป้าหมายที่มีรายงานความจำเพาะกับเชื้อ *L. pneumophila* ทั้งในตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างทางคลินิก^(12,17,18,22–25) มาใช้ออกแบบชุดไพรเมอร์ในการศึกษา ซึ่งผลผลิตที่ออกแบบได้มีขนาด 265 bp ผลการศึกษาแสดงความจำเพาะโดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับเชื้อ *Legionella* สายพันธุ์อื่น และแบคทีเรียชนิดอื่นที่พบได้บ่อยในแหล่งน้ำ สอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ และผลการวิเคราะห์โดยการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกที่มีรายงานก่อนหน้านี้^(17, 18, 23, 24–26) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกในสภาพจริง ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจตัวอย่างน้ำ^(17,18) พบว่าวิธีที่จัดตั้งขึ้นยังมีความไวน้อยกว่าและมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก แต่วิธี PCR ที่ได้นี้เป็นวิธีที่ค่อนข้างง่าย ไม่ต้องการเครื่องมือที่มีราคาสูง หรือผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ ค่า limit of detection เท่ากับ 10^2 CFU/ml ไม่ต่างจากวิธีเพาะเชื้อ และสูงกว่าวิธีการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกในสภาพจริง (5 genome unit/reaction)⁽¹⁷⁾ ข้อดี คือ เหมาะกับการนำมาใช้งานในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก งบประมาณน้อย และไม่จำเป็นต้องมีผู้เชี่ยวชาญเฉพาะในการดำเนินงาน⁽²²⁾ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีข้อจำกัด เนื่องจากจำนวนชนิดของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่พบได้บ่อยในแหล่งน้ำที่นำมาทดสอบมีจำนวนน้อย และจากการตรวจสอบความ

จำเพาะของผลผลิตที่ได้จากชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้ พบว่าให้ผลผลิตที่มีรูปแบบความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ถูกต้องตรงตามผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NEBcutter ที่วิเคราะห์ไว้ นอกจากนี้จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี PCR ที่ได้กับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ⁽¹⁹⁾ (วิธีมาตรฐาน) โดยใช้ตัวอย่างน้ำที่สงสัยการปนเปื้อนเชื้อ พบว่าให้ความสอดคล้องตรงกันระหว่าง 2 วิธี ในระดับค่อนข้างสมบูรณ์ (kappa = 0.81) โดยวิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้นพบเชื้อ จำนวน 17 ตัวอย่าง ขณะที่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อพบเชื้อ จำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่งอาจมีสาเหตุจากวิธี PCR สามารถตรวจจับเชื้อ *Legionella* ทั้งที่มีชีวิต (viable) ไม่มีชีวิต (non-viable) รวมถึงเชื้อที่มีชีวิตแต่อยู่ในระยะที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (viable but nonculturable; VBNC)⁽²⁷⁾ นอกจากนี้วิธี PCR ยังมีความไวในการตรวจจับการปนเปื้อนของเชื้อ *L. pneumophila* ที่ปริมาณเชื้อเพียง 10^2 เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยค่า negative predictive value เป็นร้อยละ 100 ซึ่งแสดงว่าไม่มีผลของวิธี PCR เป็นลบเมื่อวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นบวก ดังนั้นวิธี PCR ที่ได้จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในระบบการเฝ้าระวังแหล่งน้ำที่สงสัยมีการปนเปื้อนของเชื้อ *L. pneumophila* เพื่อการดำเนินการป้องกันก่อนเกิดการแพร่กระจายของเชื้อ หรือใช้เป็นวิธีการยืนยันโคลนเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจาก การแยกโคลนเชื้อยังเป็นวิธีการที่จำเป็นสำหรับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิต โดยจากการใช้โคลนเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยเป็นเชื้อ *Legionella* ซึ่งมีลักษณะ

กลม นูน ขอบเรียบ และ cut-glass like มาตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบกันระหว่างวิธี PCR ที่ได้กับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ⁽¹⁹⁾ ผลของการตรวจวิเคราะห์แสดงค่า kappa เท่ากับ 1.00 ซึ่งบ่งชี้ความสอดคล้องตรงกันอย่างสมบูรณ์ของทั้งสองวิธี แต่วิธี PCR ให้ผลที่รวดเร็วกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อถึง 8 เท่า (3 ชั่วโมง vs 24 ชั่วโมง) จึงสามารถที่จะนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือกเพื่อตรวจเชื้อ *L. pneumophila* อย่างไรก็ดีตามควรจะมีการพัฒนาต่อเพื่อให้ครอบคลุมการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. อื่นๆ ที่ก่อโรคด้วย

สรุป

วิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้นเพื่อตรวจหาเชื้อ *L. pneumophila* โดยใช้ยีน *mip* เป็นยีนเป้าหมายในครั้งนี้มีความไว ความจำเพาะสูง ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง และผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ รวมทั้งเป็นวิธีที่สามารถรองรับปริมาณตัวอย่างจำนวนมากได้ จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือกในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก งบประมาณน้อย และไม่จำเป็นต้องมีผู้เชี่ยวชาญเฉพาะในการดำเนินงานเพื่อการควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของเชื้อ *L. pneumophila* ในแหล่งน้ำต่างๆ ทั้งแหล่งน้ำตามธรรมชาติและแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น รวมทั้งสามารถนำไปใช้เป็นวิธีการตรวจยืนยันโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยเป็นเชื้อ *L. pneumophila* แทนวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอยู่ เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์เป็นไปอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามวิธี PCR ที่จัดตั้งขึ้นในครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดที่ต้องได้รับการปรับปรุงในเรื่องของจำนวนชนิดเชื้อแบคทีเรียอื่นที่นำมาทดสอบ cross reaction เช่น *Salmonella typhi* และ *Salmonella enteritidis* ถึงแม้ *L. pneumophila* จะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคลีเจียนเนร์ แต่การพัฒนาวิธีการตรวจให้ครอบคลุม genus และให้ผลบวกเฉพาะเชื้อที่มีชีวิต ยังคงจำเป็นสำหรับการเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดโรคอย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต ทุกท่านที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเตรียมตัวอย่าง

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เป็นอย่างดี การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต

เอกสารอ้างอิง

1. Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. Ann Intern Med 1979; 90(4): 656-8.
2. Heuner K, Swanson M. Legionella: molecular microbiology. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008.
3. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, 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.
4. โรม บัวทอง, รุ่งนภา ประสานทอง, วิวัฒน์ ศิตมโนชน, ทวีศักดิ์ เนตรวงศ์, ธาธิยา เสาวรัญ, ขจรเดช จันทะยานี และคณะ. การระบาดของโรคลีเจียนเนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป ภายหลังจากการเดินทางมาท่องเที่ยวในจังหวัดภูเก็ต ธันวาคม 2549 - มกราคม 2550: บทบาทของการสอบสวนสิ่งแวดล้อมในประเทศที่เกิดเหตุ. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2556; 44: S38-46.
5. World Health Organization (WHO). Legionella and the prevention of legionellosis. Geneva: WHO; 2007.
6. Centers for Diseases Control and Prevention. Legionella (Legionnaires' disease and pontiac fever). [online]. 2021; [cited 2022 Jan 27]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/legionella/index.html>.

7. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002; 15(3): 506-26.
8. Correia AM, Ferreira JS, Borges V, Nunes A, Gomes B, Capucho R, et al. Probable person-to-person transmission of Legionnaires' disease. N Engl J Med 2016; 374(5): 497-8.
9. ไพรัช ศรีไสว, สงคราม ทรัพย์เจริญ, เบญจเพชรรักษ์, วิบูลย์ศรี พิมพ์พันธุ์, อรุณรัตน์ ร่มพฤษ. สืบโอเนลโลซิส รายงานผู้ป่วยรายแรกในประเทศไทย. สารศิริราช 2527; 36: 269-77.
10. Tishyadhigama P, Dejsieilert S, Srisawai P. Environmental surveillance of *Legionella pneumophila* in Thailand. J Med Assoc Thai 1995; 78: 57-71.
11. Dooling KL, Toews KA, Hicks LA, Garrison LE, Bachaus B, Zansky S, et al. Active bacterial core surveillance for Legionellosis United States, 2011-2013. MMWR 2015; 64(42): 1190-3.
12. Chen DJ, Procop GW, Vogel S, Yen-Lieberman B, Richter SS. Utility of PCR, culture, and antigen detection methods for diagnosis of legionellosis. J Clin Microbiol 2015; 53(11): 3474-7.
13. Yuan Y, Zheng G, Lin M, Mustapha A. Detection of viable Escherichia coli in environmental water using combined propidium monoazide staining and quantitative PCR. Water Res 2018; 145: 398-407.
14. Hsu WB, Wang JH, Chen PC, Lu YS, Chen JH. Detecting low concentrations of Shigella sonnei in environmental water samples by PCR. FEMS Microbiol Lett 2007; 270(2): 291-8.
15. Lee SH, Lee C, Lee KW, Cho HB, Kim SJ. The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture-multiplex-nested PCR procedure. J Appl Microbiol 2005; 98(5): 1020-9.
16. Wagner C, Khan AS, Kamphausen T, Schmausser B, Unal C, Lorenz U, 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(2): 450-62.
17. Collins S, Jorgensen F, Willis C, Walker J. Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of Legionella in environmental samples. J Appl Microbiol 2015; 119(4): 1158-69.
18. Gruas C, Llambi S, Arruga MV. Detection of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in water samples of Spain by specific real-time PCR. Arch Microbiol 2014; 196: 63-71.
19. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Procedures for the recovery of Legionella from the environment. Atlanta, GA: CDC; 2005.
20. Luo R, Li Y, Lin X, Dong F, Zhang W, Yan L, et al. A colorimetric assay method for *invA* gene of Salmonella using DNzyme probe self-assembled gold nanoparticles as single tag. Sens Actuator B-Chem 2014; 198: 87-93.
21. Fischer G, Bang H, Ludwig B, Mann K, Hacker J. Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPlase) activity. Mol Microbiol 1992; 6(10): 1375-83.
22. Fiume L, Sabattini BMA, Poda G. Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by species-specific real-time and nested PCR assays. Lett Appl Microbiol 2005; 41(6): 470-5.

23. Templeton KE, Scheltinga SA, Sillekens P, Crielaard JW, van Dam AP, Goossens H, et al. Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *J Clin Microbiol* 2003; 41(9): 4016-21.
24. Benitez AJ, Winchell JM. Clinical application of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Legionella* species, *Legionella pneumophila*, and *Legionella pneumophila* serogroup 1. *J Clin Microbiol* 2013; 51(1): 348-51.
25. Wilson DA, Yen-Lieberman B, Reischl U, Gordon SM, Procop GW. Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the *mip* gene. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7): 3327-30.
26. Yang G, Benson R, Pelish T, Brown E, Winchell JM, Fields B. Dual detection of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species by real-time PCR targeting the 23S-5S rRNA gene spacer region. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(3): 255-61.
27. Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, et al. A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable legionellae that can recover their cultivability. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(15): 4817-24.

Validation of Polymerase Chain Reaction Method for the Detection of *Legionella pneumophila*

Benjaporn Nuthong,¹ Aapakon Nobnor,² and Sasitorn Nuthong³

¹Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla, Department of Medical Sciences, Songkhla 90100, Thailand

²Regional Medical Sciences Center 11/1 Phuket, Department of Medical Sciences, Phuket 83110, Thailand

³Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

ABSTRACT *Legionella pneumophila*, the main cause of Legionnaires' disease, is found in various water sources. The bacterium is spread to humans through the inhalation of contaminated aerosols. Surveillance of pathogens in water sources is therefore essential. The standard method for the detection of *L. pneumophila* is culture. This requires an expert to read the results, and it takes a long time. This study aimed to develop and validate a PCR method for rapid detection of *L. pneumophila* with high specificity but without the requirement for specialists. Many samples were tested using the macrophage infectivity potentiator (*mip*) gene as the target, and the results were compared with the culture method to measure consistency. The PCR product of the developed PCR method was 265 bp, with a limit of detection equal to 10^2 CFU/mL, without cross-reactivity with 100 isolates of *Legionella* and 10 common waterborne bacteria. Comparing the effectiveness with culture using water samples, the results showed a well-correlated agreement ($\kappa = 0.81$) and a negative predictive value of 100%. In addition, when bacterial colonies suspected of being *L. pneumophila* were used, the comparison results indicated a perfect agreement ($\kappa = 1.00$). However, the PCR method provided the results eight times faster than the culture method. Thus, the developed PCR method is suitable as an alternative method for the surveillance and the control of *L. pneumophila* contamination in water resources. It can also be used as a method for the confirmation of suspected *L. pneumophila* bacterial colonies in addition to the existing culture method for faster analysis results.

Keywords: Polymerase chain reaction, *Legionella pneumophila*, Legionnaires' disease, *mip* gene, Water sources