RAPID QUANTIFICATION OF THE AEROSOL *LEGIONELLA* SPP. USING THE COMBINATION OF AIR SAMPLING AND REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUES

CHOMRACH SIRIGUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

(TROPICAL MEDICINE)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

2006

ISBN 974- 04-7050-5

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การตรวจอย่างรวดเร็วเพื่อหาปริมาณละอองฝอยของเชื้อลีเจียนแนร์โดยใช้เทคนิคการเก็บอากาศผ่านน้ำร่วมกับวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบบอกปริมาณ (RAPID QUANTIFICATION OF THE AEROSOL LEGIONELLA SPP. USING THE COMBINATION OF AIR SAMPLING AND REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUES)

ชมรัช ศิริกุล 4437514 TMTM/D

ปร.ด. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พงศ์ราม รามสูต D.V. M., Ph.D. (Microbiology), วรัญญา ว่องวิทย์ B. Sc., M.Sc., Ph.D. (Biochemistry), วันทนี พันธุประสิทธิ์ B.Sc., M.P.H., Ph.D., (Industrial Hygiene), วันทนา ปวีณกิตติพร, B.Sc., MS.c., (Biotechnology)

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ พัฒนาการใช้เทคนิคการเก็บอากาศร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบบอกปริมาณ เพื่อตรวจหาปริมาณละอองฝอยของเชื้อลีเจียนแนร์ โดยใช้ Primer และ Probe ที่เฉพาะกับยีน 5*S* r*RNA* ซึ่งเป็นยีนที่เฉพาะกับเชื้อในสกุลนี้ Primer และ TaqMan probe ที่ ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงเพื่อใช้เป็นตัวตรวจจับได้ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อเชื้อนี้ ผลการทดลองพบว่า primer และ probe ชุดนี้มีความไวที่สามารถตรวจดีเอ็นเอได้ที่ระดับ 10^{-15}g เมื่อเทียบกับค่าโค้งมาตรฐานแล้วจึงทำการเก็บอากาศโดยใช้เครื่องดูดอากาศเป็นเวลา 20 นาทีในเวลาเดียวกับที่มีการฉีดพ่นเชื้อนี้ ตั้งแต่ 10^{1} ถึง 10^{4} ตัว ในรูปของละอองฝอย ด้วยเครื่องพ่นละออง โดยการทดลองได้ปฏิบัติการในตู้กรองอากาศที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ2 ซึ่งมีปริมาตรภายในเท่ากับ 452.40 ลิตร ผลการทดลอง เบื้องต้นพบว่า สามารถตรวจหาละอองฝอยของเชื้อลีเจียนแนร์ได้ในระดับ 0.003 - 0.37 ตัว ต่ออากาศ 1ลิตร และหลังจากนำไปทดลองเก็บอากาศในหอผึ่งเย็นที่น้ำในถาดรองพบเชื้อลีเจียนแนร์ โดยทำการเก็บอากาศในขณะที่หอผึ่งเย็นกำลังทำงาน โดยเก็บตัวอย่างอากาศจำนวน30ตัวอย่าง ที่1ฟุตเหนือผิวน้ำในถาดรอง ด้วยความเร็วของเครื่องดูดอากาศ 25 ลิตรต่อนาทีเป็นเวลา 30นาที พบว่าสามารถตรวจหาละอองฝอยของเชื้อลีเจียนแนร์ได้ในระดับ 0.12 ถึง 8.20 ตัว/ อากาศ1ลิตร ด้วยความไว100% ความจำเพาะ 61.53% และความถูกต้อง 83.33%

98 หน้า ISBN 974-04-7050-5

RAPID QUANTIFICATION OF THE AEROSOL *LEGIONELLA* SPP. USING THE COMBINATION OF AIR SAMPLING AND REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUES.

CHOMRACH SIRIGUL 4437514 TMTM/D

Ph.D. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISOR: PONGRAMA RAMASOOTA, D.V.M., Ph.D. (Microbiology), WARANYA WONGWIT, B.Sc., MS.c., Ph.D., (Biochemistry), WANTANEE PHANPRASIT, B.Sc., M.P.H., Dr.PH. (Industrial Hygiene), WANTANA PAVEENKITTPORN, B.Sc., M.Sc., (Biotechnology)

ABSTRACT

The objective of this study was to develop and optimize the combined methods of air sampling and real time polymerase chain reaction (real-time PCR) for quantifying detection of aerosol *Legionella* spp. Primers and TaqMan hydrolysis probe based on the 5S *rRNA* gene with *Legionella* spp-genus-specific, were used to amplify an 84 bp-specific product. An impinger air sampler plus rotary vane air-sampling pump were used to collect different concentrations of aerosol *Legionella* (10^1 to 10^4 organisms) generated by nebulizer, simultaneously, for 20min. All steps were performed in a biological safety cabinet class II (BSCII) with an interior volume of 452.4 liters**.** The amplified products were quantified by comparing with external standard curves of real-time PCR, and as little as 10 fg of *Legionella* DNA per reaction could be detected. From the preliminary study, it was found that the developed method could detect aerosol *Legionella* spp. at 0.003 to 0.37 organisms /l of air. This developed method was validated, by collecting 30 air samples at 1 ft above the surface basin water from a cooling towers shown *Legionella*-positive in the water. The air-sampling pump pumped the air at a flow rate of 25l/ min for 30 min, while the cooling fan was turned on. This method could detect aerosol *Legionella* from 0.12 to 8.20 organisms/l of air, with the sensitivity, specificity and accuracy of 100, 61.53, and 83.33% respectively.

KEY WORDS: AIR SAMPLING / REAL-TIME PCR / 5S*rRNA* / TAQMAN HYDROLYSIS PROBE / AEROSOL LEGIONELLA

98 P. ISBN 974-04-7050-5