Thesis Title Detection of Superantigen Genes and Protein Profiles of *Streptococcus suis* Isolated from Pateints

Author Ms. Pukkavadee Netsirisawan

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Asst. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn Chairperson
Dr. Anusorn Boonthum Member
Dr. Siriwoot Sookkhee Member

ABSTRACT

Streptococcus suis serotype 2 is an organism inhabited in pig, which occasionally infects humans and causes fatal illness. Very recently, *S. suis* serotype 2 has been recognized as an etiological agent for streptococcal toxic shock syndrome (STSS), which signs and symptoms are similar to STSS caused by *Staphylococcus aureus* and group A streptococci (GAS). However, the mechanisms underlying STSS are poorly understood. This study has been undertaken to find out the superantigen genes and cell-free supernatants proteins in 49 *S. suis* serotype 2 isolated from patients positive for hemoculture. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to detect 8 known superantigen genes found in GAS, *speA, speB, speC, speF, speG, speH, speJ* and *smeZ*. We found PCR products from PCR reactions using primers encoding *speF, speG* and *smeZ* in 24, 25 and 16 isolates, respectively. The results from DNA sequencing analysis showed that they were different from *speF, speG* and *smeZ* in GAS but similar to biotin carboxylase, cytosine-adenosine deaminase and hypothetical protein genes of *S. suis* serotype 2 strains 98 HAH33 and 05ZYH33, respectively. Therefore, new PCR primers specific to these 3 genes were designed and PCR reactions to amplify the genes encoding biotin carboxylase, cytosine-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

adenosine deaminase, hypothetical protein and capsular polysaccharide of *S. suis* serotype 2 (*cps-2j*) were performed. We found that biotin carboxylase, cytosine-adenosine deaminase and *cps-2j* genes were conserved among *S. suis* serotype 2. Therefore, multiplex PCR technique was then developed using two pairs of primers that targeted for the genes encoding biotin carboxylase and *cps-2j* to confirm *S. suis* serotype 2. We found that all of 49 *S. suis* serotype 2 isolates gave PCR products with both biotin carboxylase and *cps-2j* genes. These results indicated that biotin carboxylase and *cps-2j* genes were conserved in *S. suis* serotype 2 and multiplex-PCR technique can thus be used as a specific method for the detection of *S. suis* serotype 2 strains.

For SDS-PAGE analysis of cell-free supernatants proteins, we found that all of 14 *S. suis* serotype 2 isolates represented different patterns of PCR products of *speF* gave the same or similar cell-free supernatants proteins. At least five major protein bands at the molecular weight about 20, 45, 50, 55 and 70-kDa were observed in 14 isolates. In contrast, the 150-kDa protein band was observed only in 7 from14 isolates. However, the roles for pathogenesis of these proteins have to be studied in the future.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การตรวจหายีนที่กำหนดการสร้างซูเปอร์แอนติเจนและรูปแบบของการสร้างโปรตีนในเชื้อเสตร์ปโตคอคคัส ซูอิส ที่แยกได้จากผู้ป่วย
ผู้เขียน	นางสาวภัคควดี เนตรศิริสวรรค์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. สุมาลี พฤกษากร ประธานกรรมการ ดร. อนุสรณ์ บุญธรรม กรรมการ ดร. ศิริวุฒิ สุขขี กรรมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

เสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 เป็นเชื้อจุลชีพที่พบได้ในสุกร ซึ่งในบางครั้งอาจพบเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์และก่อให้เกิดการเสียชีวิตได้ โดยเมื่อเร็วๆนี้พบว่าเชื้อเสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 เป็นสาเหตุของการเกิด streptococcal toxic shock syndrome (STSS) โดยมีอาการและการดำเนินของโรคคล้ายคลึงกับ STSS ที่พบได้จากการติดเชื้อในกลุ่มสแตฟไฟโลคอคคัส ออเรียสและเสตรปโตคอคคัสกลุ่มเอ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบถึงกลไกในการเกิดโรคแบบ STSS ที่แน่ชัด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งตรวจหายีนที่กำหนดการสร้างซูเปอร์แอนติเจนและศึกษาการสร้างโปรตีนในน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ในเชื้อเสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 ที่แยกได้จากเลือดของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อทั้งหมด 49 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อทำการตรวจหายีนที่กำหนดการสร้างซูเปอร์แอนติเจน 8 ชนิดที่พบในเชื้อเสตรปโตคอคคัสกลุ่มเอ ได้แก่ *speA, speB, speC, speF, speG, speH, speJ* และ *smeZ* พบว่าเกิดผลผลิต PCR ในการตรวจหายีน *speF, speG* และ *smeZ* ในเชื้อ 24, 25 และ 16 สายพันธุ์

ตามลำดับ ซึ่งผลจากการทำ DNA sequencing analysis พบว่าผลผลิต PCR ดังกล่าวไม่มีความคล้ายคลึงกับ *speF*, *speG* และ *smeZ* ที่พบใน เชื้อเสตรปโตคอคคัสกลุ่มเอเลย แต่กลับไปคล้ายคลึงกับยีนไบโอตินคาร์บอกซิเลส ยีนไซโตซีน-อะดีโนซีน ดีอะมิเนส และยีนไฮโปเทติคอลโปรตีนในเชื้อเสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ 98HAH33 และ 05ZYH33 ตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการออกแบบ primer คู่ใหม่ที่จำเพาะต่อสามยีนดังกล่าว จากนั้นได้ใช้วิธี PCR เพื่อตรวจหายีนไบโอตินคาร์บอกซิเลส ยีนไซโตซีน-อะดีโนซีน ดีอะมิเนส ยีนไฮโปเทติคอลโปรตีนและยีนที่กำหนดการสร้างแคปซูล (*cps-2j*) ในเชื้อเสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 พบว่ายีนไบโอตินคาร์บอกซิเลส ยีนไซโตซีน-อะดีโนซีน ดีอะมิเนส และยีน *cps-2j* มีความจำเพาะในเชื้อเสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเกิดแนวคิดในการพัฒนาวิธี multiplex PCR โดยใช้ primer 2 คู่ คือ primer ที่จำเพาะต่อยีนไบโอตินคาร์บอกซิเลสและยีน *cps-2j* เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อเสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 ผลปรากฏว่ามีผลผลิต PCR เกิดขึ้นกับทั้งยีนไบโอตินคาร์บอกซิเลสและยีน *cps-2j*ในเชื้อเสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 ทั้ง 49 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่ายีนไบโอตินคาร์บอกซิเลสและยีน *cps-2j* นั้นมีความจำเพาะในเชื้อเสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 และเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นน่าจะเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อเสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2

การศึกษาโปรตีนในน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าเชื้อเสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 ทั้ง14 สายพันธุ์ที่มีผลผลิต PCR ของยีน *speF* ที่แตกต่างกัน มีการสร้างโปรตีนในน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ที่เหมือนหรือคล้ายคลึงกัน โดยพบโปรตีนอย่างน้อย 5 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 20, 45, 50, 55 และ 70 กิโลดัลตันในเชื้อทั้ง14 สายพันธุ์ แต่กลับพบโปรตีนที่มีขนาด150 กิโลดัลตันในเชื้อ 7 สายพันธุ์จากทั้งหมด14 สายพันธุ์ อย่างไรก็ตามควรจะมีการศึกษาถึงคุณสมบัติของโปรตีนเหล่านี้ต่อบทบาทในการก่อโรคของเชื้อเสตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 ต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved