**Thesis Title** Determinations of Toxin-genes Profile and Antibody Cross-reaction Between Group A and G Streptococci

**Author** Mr. Keng Jiamkitwattana

**Degree** Master of Science (Microbiology)

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

## ABSTRACT

*Streptococcus pyogenes* (group A streptococcus, GAS) is still causing infection in human worldwide. The number of patients of severe invasive GAS infections such as necrotizing fasciitis or streptococcal toxic shock syndrome (STSS) have been increasing in North America, Europe, and other parts of the world. Superantigenic exotoxins released from GAS may be associated with these diseases. Group G streptococcus (GGS), which has normally been known as animal pathogen, can cause severe invasive infections in human similar to GAS and some of genes encoding superantigenic exotoxins can be detected from them.

M protein-based vaccine is the most promising approach to prevent GAS infection. However, to overcome with the M type specificity problem of this vaccine type, other constituents which present in most of GAS such as conserved C-terminal of M protein, C5a peptidase or carbohydrate cell wall antigen were tested for vaccine efficacy. GAS share many virulence factors with GGS and raise possibility that whole cell GAS antigen can induce cross reactive antibodies production against multiple strains of GAS and GGS.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In this study we used PCR technique to amplify genes encoding superantigenic exotoxins *speA, speB, speC, speF, speG, speH, speJ* and *smeZ* from 16 GAS and 40 GGS isolated in A.D. 2006-2007 from patients in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital and 34 GAS isolated from sore throat, impetigo and rheumatic heart disease patients in A.D. 1985-2000. Almost of 50 GAS isolates were positive for *speB, speF* and *speG* and many of them were positive for *speA, speC, speH, speJ* and *smeZ*. GAS isolated in A.D. 2006-2007 were more frequently found genes encoding superantigenic exotoxins than GAS isolated in A.D. 1985-2000 especially *speA, speC* and *smeZ*. None of GGS strains gave expected PCR products for these 8 superantigenic exotoxins genes.

Ten GAS isolates which different in M types and 10 GGS isolates were selected as subjects for bactericidal assay. The results showed that 10 isolates of GAS and 8 isolates of GGS were killed only when they were incubated with human blood plus rabbit serum immunized with whole cell heat-killed M1 GAS. The average killing ranged from 86.78-100% for 10 isolates of GAS and ranged from 81.62-100% for 8 isolates of GGS. Two GGS isolates were killed when incubated with blood without rabbit serum. ELISA between these 2 GGS isolates antigen with donor serum may suggest that donor blood have specific antibody to these GGS isolates.

In conclusion, 8 superantigenic exotoxins genes were found in GAS population isolated in A.D. 2006-2007 from patients in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. This finding suggested that GAS may have potential to cause severe invasive infections in this area of the country. It will lead to the precaution and prevention in the future. Antibodies against whole cell heat-killed M1 GAS may help phagocytes to kill both GAS and GGS strains which will lead to an ideal vaccine approach in the future.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การพิจารณากำหนดรูปแบบของกลุ่มยีนสร้างสารพิษและปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของแอนติบอดีระหว่างเชื้อสเตรปโตคอกคัส กลุ่มเอ และ จี

**ผู้เขียน** นายเก่ง เจียมกิจวัฒนา

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

| | |
|---|---|
| ผศ.ดร. สุมาลี พฤกษากร | ประธานกรรมการ |
| อ.ดร. อนุสรณ์ บุญธรรม | กรรมการ |
| อ.ดร. ศิริวุฒิ สุขขี | กรรมการ |

## บทคัดย่อ

เชื้อ *Streptococcus pyogenes* (group A streptococcus, GAS) ยังคงเป็นเชื้อที่ก่อโรคในมนุษย์ทั่วโลก ผู้ป่วยจากโรคติดเชื้อสเตรปโตคอกคัส กลุ่มเอแบบลุกลามและรุนแรง เช่น โรคเนื้อเน่าตายหรืออาการช็อกจากพิษของเชื้อสเตรปโตคอกคัส มีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นทั้งในอเมริกาเหนือ ยุโรป และส่วนอื่นๆของโลก สารพิษซูเปอร์แอนติเจนหลายชนิดที่ถูกปล่อยออกมาจากตัวเชื้อน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคกลุ่มนี้ พบว่าเชื้อสเตรปโตคอกคัส กลุ่มจี ซึ่งปกติเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์ ก็สามารถก่อโรคที่รุนแรงในคนและมีอาการคล้ายการก่อโรคจากกลุ่มเอ โดยสามารถตรวจพบยีนสร้างสารพิษซูเปอร์แอนติเจนบางชนิดได้จากเชื้อเหล่านี้

การพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคติดเชื้อกลุ่มเอ มุ่งเน้นไปที่การใช้ M protein เป็นแกนหลัก อย่างไรก็ตามเพื่อแก้ปัญหาของวัคซีนกลุ่มนี้ที่มีข้อเสียคือใช้ป้องกันได้อย่างจำเพาะต่อ M type นั้นๆ เท่านั้น ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาส่วนประกอบอื่นๆของเชื้อที่พบได้ในเชื้อกลุ่มเอส่วนใหญ่ได้แก่ ส่วน C ของ M protein ซึ่งเป็นช่วงลำดับอนุรักษ์ (conserved region) C5a peptidase และ carbohydrate cell wall antigen มาทดสอบความสามารถในการพัฒนาเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัคซีนแทน เชื้อกลุ่มเอมีส่วนประกอบของตัวเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคหลายชนิดที่เหมือนกับเชื้อกลุ่มจี จึงมีความเป็นไปได้ที่แอนติเจนจากตัวเชื้อกลุ่มเอ (Whole cell GAS antigen) จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยาข้ามต่อเชื้อกลุ่มเอและกลุ่มจีหลายสายพันธุ์

งานวิจัยนี้ได้ใช้วิธี PCR ตรวจหายีนสร้างสารพิษซูเปอร์แอนติเจน ได้แก่ *speA, speB, speC, speF, speG, speH, speJ* และ *smeZ* จากเชื้อกลุ่มเอ 16 ไอโซเลต และกลุ่มจี 40 ไอโซเลตที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ในระหว่างปี พ.ศ. 2549-2550 และเชื้อกลุ่มเอ 34 ไอโซเลตที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคออักเสบ โรคผิวหนังชนิดเป็นตุ่มพุพองและโรคหัวใจรูห์มาติกในระหว่างปี พ.ศ. 2528-2543 พบว่าเชื้อกลุ่มเอส่วนใหญ่จากทั้งหมด 50 ไอโซเลตตรวจพบ *speB, speF* และ *speG* และเชื้อกลุ่มเอหลายไอโซเลตตรวจพบ *speA, speC, speH, speJ* และ *smeZ* โดยเชื้อกลุ่มเอที่แยกในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2549-2550 จะมีอัตราการพบยีนสร้างสารพิษซูเปอร์แอนติเจนได้มากกว่าเชื้อกลุ่มเอที่แยกในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2528-2543 โดยเฉพาะยีน *speA, speC* และ *smeZ* ในขณะที่ไม่มีเชื้อกลุ่มจีไอโซเลตใดเลยที่พบ PCR products ที่มีขนาดตรงกับขนาดที่คาดไว้ของยีนกำหนดการสร้างสารพิษซูเปอร์แอนติเจนทั้ง 8 ชนิด

เชื้อกลุ่มเอ 10 ไอโซเลตที่มี M type แตกต่างกันและ กลุ่มจี 10 ไอโซเลตได้ถูกเลือกมาทดสอบ bactericidal assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อกลุ่มเอ 10 ไอโซเลตและกลุ่มจี 8 ไอโซเลต จะถูกฆ่าได้เฉพาะเมื่อผสมอยู่ร่วมกับเลือดของมนุษย์ที่ผสมกับซีรัมของกระต่ายที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อกลุ่มเอที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนเท่านั้น โดยมีระดับการฆ่า 86.78-100% สำหรับเชื้อกลุ่มเอ 10 ไอโซเลตและมีระดับการฆ่า 81.62-100% สำหรับเชื้อกลุ่มจี 8 ไอโซเลต เชื้อกลุ่มจี 2 ไอโซเลตถูกฆ่าได้เมื่อผสมอยู่ร่วมกับเลือดของมนุษย์เพียงอย่างเดียวเท่านั้น จากการทำ ELISA ระหว่างแอนติเจนของเชื้อกลุ่มจีทั้ง 2 ไอโซเลตนี้กับซีรัมของบุคคลผู้ให้เลือดสำหรับการทดสอบ bactericidal assay กับเชื้อทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถสันนิษฐานได้ว่าเลือดที่นำมาใช้ทดลองครั้งนี้มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อกลุ่มจีทั้ง 2 ไอโซเลตนี้

โดยสรุปแล้ว ยีนกำหนดการสร้างสารพิษซูเปอร์แอนติเจนทั้ง 8 ชนิด ถูกตรวจพบได้ในประชากรเชื้อกลุ่มเอที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2549-2550 จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อกลุ่มเออาจจะมีศักยภาพในการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อสเตรปโตคอกคัสแบบลุกลามและรุนแรงในบริเวณนี้ได้ ซึ่งน่าจะเป็นข้อมูลในการระวังและป้องกันโรคในอนาคต ภูมิต้านทานต่อเชื้อกลุ่มเอน่าจะมีส่วนช่วยเม็ดเลือดขาวฆ่าเชื้อทั้งกลุ่มเอและกลุ่มจีได้ ซึ่งอาจนำไปสู่การทดสอบวัคซีนในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved