

Thesis Title Detection of *Streptococcus suis* in Hemoculture by
Polymerase Chain Reaction Method

Author Miss Wannisa Raksamat

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Prasit Tharavijitkul	Advisor
	Dr. Anusorn Boonthum	Co-advisor
	Dr. Kwanjit Duangsonk	Co-advisor

ABSTRACT

Streptococcus suis, an important swine and human pathogen, causes severe illness especially meningitis, septicemia and toxic shock syndrome. *S. suis* serotype 2 is the most frequently reported worldwide. The presence of *S. suis* in patient's blood is usually detected by hemoculture, morphological characteristics, and routine biochemical tests. These characteristics cause many laboratories to misidentify as Viridans streptococci. Therefore, for rapid and accurate identification of this pathogen from streptococcal-positive hemocultures, PCR technique based on 16S rRNA and *gdh* genes were used to detect it. The standard cultural and identification methods were also performed to confirm this organism. Moreover, serotypes of *S. suis* were identified by coagglutination using specific anti-serum, duplex PCR and monoplex PCR using serotype specific primers for each serotype (1 or 14 and 2 or

1/2). In the present study, a total of 304 streptococcal-positive hemocultures collected during September 2009 to August 2011 were investigated. Forty six (15.1%) *S. suis* isolates were detected by using 16S rRNA primers while 35 (11.5%) isolates were identified by using *gdh* primers. However, the latter result correlated well with the standard culture method indicating that the *gdh* primers gave more specificity than 16S rRNA primers. Of 35 *S. suis* isolates, serotyping targeted to *cps* gene revealed 34 (97.1%) isolates were serotype 2 or 1/2 and 1 (2.9%) isolate was serotype 14. This result corresponds to coagglutination test. In conclusion, the PCR technique targeted to *gdh* gene can be used to directly detect *S. suis* in positive hemocultures as accurate as culture method. Moreover, it can rapidly identify in 5 hours whereas over 40 hours by using conventional culture method.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การตรวจหาเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส จากฮีโมคัลเจอร์
ด้วยวิธีโพลีเมอเรสเชนรีแอกชัน

ผู้เขียน

นางสาววันนิศา รักษามาตย์

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ประสิทธิ์ ธาราจิตรกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ดร. อนุสรณ์ บุญธรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร. ขวัญจิต ดวงสงค์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

Streptococcus suis จัดเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญทั้งในหมูและคน ที่สามารถก่อโรครุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อหุ้มสมองอักเสบ ภาวะโลหิตเป็นพิษและ toxic shock syndrome เชื้อซีโรไทป์ 2 เป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานการพบบ่อยที่สุดทั่วโลก เชื้อ *S. suis* ในเลือดของผู้ป่วยมักตรวจพบโดยวิธีการเพาะเชื้อในเลือด ตรวจดูรูปร่างลักษณะที่จำเพาะ และการทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป คุณลักษณะเหล่านี้มักทำให้ห้องปฏิบัติการต่างๆ รายงานผลผิดเป็นเชื้อ Viridans streptococci ดังนั้นเพื่อตรวจหาเชื้อ *Streptococcus suis* โดยตรงจาก hemoculture ของผู้ป่วยซึ่งตรวจพบเชื้อ streptococci จากการย้อมสีแกรมให้ได้ผลอย่างรวดเร็วและแม่นยำ จึงได้นำเทคนิค PCR ที่อาศัยความจำเพาะของยีนของเชื้อ *S. suis* มาตรวจหาเชื้อนี้โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA และยีน *gdh* ของเชื้อ *S. suis* พร้อมกับการเพาะเลี้ยงและวินิจฉัยเชื้อด้วยวิธีตรวจตามมาตรฐานทางจุลชีววิทยา และจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *S. suis* (1 หรือ 14 และ 2 หรือ 1/2) โดยวิธี coagglutination ด้วย specific anti-serum เทคนิค duplex PCR และ monoplex PCR ซึ่ง

มีไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *cps* ของเชื้อซีโรไทป์นั้นๆ มายืนยันผลการทดสอบที่ได้ การศึกษานี้ได้นำ hemoculture ที่ยอมพบการติดเชื้อ Streptococci จำนวนทั้งสิ้น 304 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บในช่วงเดือนกันยายน ค.ศ.2009 ถึงเดือนสิงหาคม ค.ศ.2011 มาตรวจด้วยเทคนิค PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ของเชื้อ *S. suis* ตรวจพบเชื้อ *S. suis* จำนวน 46 (15.1%) isolates ขณะที่การใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gdh* ตรวจพบเชื้อ *S. suis* 35 (11.5%) isolates อย่างไรก็ตามโดยวิธีตรวจตามมาตรฐานทางจุลชีววิทยาให้ผลสอดคล้องกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gdh* มีความจำเพาะมากกว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA การตรวจหาซีโรไทป์ของเชื้อ *S. suis* จำนวน 35 isolates ด้วยการเพิ่มปริมาณยีน *cps* พบเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 หรือ 1/2 จำนวน 34 (97.1%) isolates และพบเชื้อซีโรไทป์ 14 จำนวน 1 (2.9%) isolate ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดสอบโดยวิธี coagulination โดยสรุปเทคนิค PCR ที่ใช้ตรวจหา ยีน *gdh* สามารถนำไปตรวจหาเชื้อ *S. suis* โดยตรงจาก hemoculture ที่พบว่ามีเชื้อเจริญได้แม่นยำเท่ากับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้วิธีนี้ยังสามารถตรวจได้รวดเร็วในเวลาเพียง 5 ชั่วโมง ขณะที่วิธีตรวจตามมาตรฐานทางจุลชีววิทยาใช้เวลามากกว่า 40 ชั่วโมง