

<b>Thesis Title</b>	Genetic Characterization and Analysis of Immunogenic Proteins of <i>Streptococcus suis</i> Isolated from Patients	
<b>Author</b>	Miss Kanreuthai Wongsawan	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Microbiology)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Assoc.Prof. Prasit Tharavichitkul	Chairperson
	Dr. Anusorn Boonthum	Member
	Dr. Volaluck Supajatura	Member
	Asst.Prof.Dr. Khemika Lomthaisong	Member

### ABSTRACT

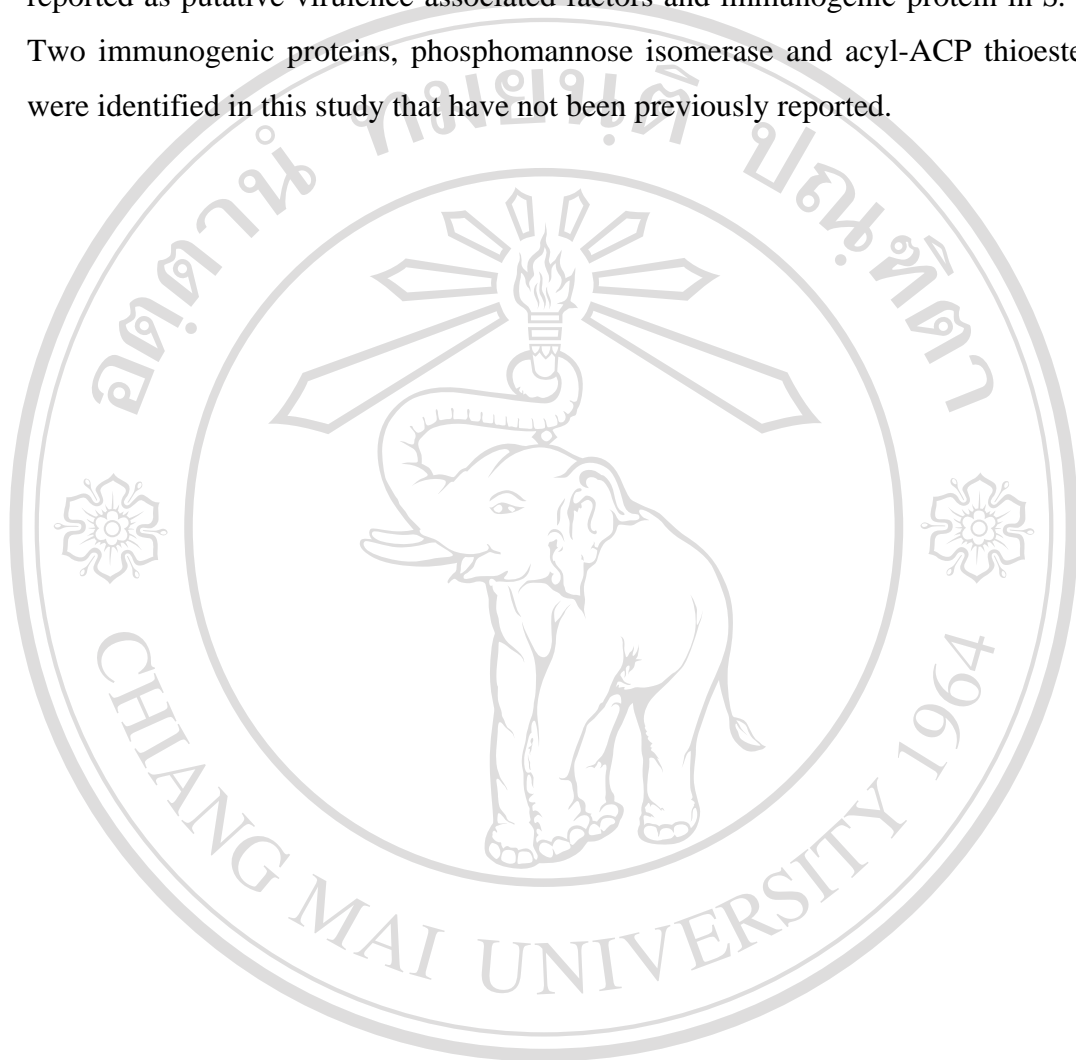
*Streptococcus suis* is recognized worldwide as an important swine pathogen, which occasionally infects humans and causes fatal illness. In this study, *S. suis* from patients and healthy pigs were characterized by serotyping, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and three putative virulence genes (*mrp*, *epf*, and *sly*). Seventy-three out of 110 *S. suis* isolates were serotyped as type 1, 1/2, 2 and 14 by serotyping, including 67 patient and 6 healthy pig isolates. Serotype 2 was the most frequently found from human isolates (92.5%). To investigate the genetic diversity, a total of 71 serotypeable isolates were analyzed by PFGE. Macrorestriction patterns generated with *Sma*I enzymes revealed 36 different pulsotypes indicate a great genetic diversity of *S. suis* isolates. At 66% similarity, *S. suis* isolates were divided into five groups, named A, B, C, D, and E. Most of *S. suis* serotype 2 isolated from patients belonged to PFGE group A (67.2%). All of healthy pig isolates analyzed exhibiting the same PFGE groups to those of isolates from patients in groups A and D. Using the PCR assay, the 3 genes (*mrp*, *epf*, and *sly*) were determined in the 71 isolates and 4 different genotypes ( $mrp^+epf^+sly^+$ ,  $mrp^+epf^*sly^+$ ,  $mrp^+epf^-sly^-$ ,  $mrp^-epf^-sly^+$ ) were obtained. Fifty-two of 67 (77.6 %) *S. suis* isolated from patients presented the

*mrp*<sup>+</sup>*epf*<sup>-</sup>*sly*<sup>-</sup> genotype whereas healthy pig isolates (75.0%) mainly presented the *mrp*<sup>-</sup>*epf*<sup>-</sup>*sly*<sup>+</sup> genotype. All of the healthy pig isolates showed the same genotype found in the *S. suis* isolated from patients (*mrp*<sup>+</sup>*epf*<sup>-</sup>*sly*<sup>-</sup> and *mrp*<sup>-</sup>*epf*<sup>-</sup>*sly*<sup>+</sup> genotype). Correlation between PFGE groups and PCR typing revealed that PFGE group A exhibiting *mrp*<sup>+</sup>*epf*<sup>-</sup>*sly*<sup>-</sup> genotype was the most prominent features of *S. suis* isolated from patients analyzed in this study. All these results indicated the great genetic diversity of *S. suis* isolated from patients and healthy pigs and revealed the closely relationship between them.

The two *S. suis* strain, LPH02 and MNM43, isolated from patients with severe toxic shock syndrome and endocarditis were analyzed by comparative proteomics and immunoproteomics. The aim was to reveal proteins probably involve in virulence and different pathogenicity and identify the specific immunogenic proteins. Whole cell proteins were extracted from bacteria and analyzed by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). The difference of 2D proteome map of two strains was found. A total of 328 and 336 protein spots were shown in strain LPH02 and MNM43, respectively. Ten specific protein spots expressed by each strain were excised from preparative gels and identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The identified proteins were involved in cellular process, information storage and processing, metabolism and defense mechanism. Although, ambiguities still exist among these identified proteins, two significant proteins, ClpP and DnaK, found only strain LPH02 have been proposed as virulence-associated factors in other bacterial pathogens, suggesting that these proteins should be further characterized the role of pathogenesis of *S. suis* infection.

For immunoproteomic approach, 2D blots of two strains were probed against sera from *S. suis* infected patients with different clinical outcome and pools sera of *S. suis* immunized rabbits. A quite heterogeneous antigenic pattern, both from strain and sera points of view were found. Fifteen immunoreactive protein spots were identified. Most of them found were metabolism-related. Out of these, three immunoreactive protein spots were identified unambiguously. A PMF search showed that these three spots matched to *o*-acetylserine lyase, phosphomannose isomerase, and acyl-ACP thioesterase, respectively. Among these proteins, *o*-acetylserine lyase and

phosphomannose isomerase were found in both strains whereas acyl-ACP thioesterase was only recognized in MNCM43 strain. *O*-acetylserine lyase was previously reported as putative virulence-associated factors and immunogenic protein in *S. suis*. Two immunogenic proteins, phosphomannose isomerase and acyl-ACP thioesterase were identified in this study that have not been previously reported.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การหาลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์  
อิมมูโนเจนิคโปรตีนของเชื้อสเตรปโตค็อกคัสซูอิส ที่  
แยกได้จากผู้ป่วย

## ผู้เขียน

นางสาว กัญญ์ฤทัย วงศ์ยาวรรณ

## ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

## คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ประสิทธิ์ ธรวิจิตรกุล

ประธานกรรมการ

ดร. อนุสรณ์ บุญธรรม

กรรมการ

ดร. วรลักษณ์ สัจจาตุระ

กรรมการ

ผศ. ดร. เขมิกา สงแจ้ง

กรรมการ

## บทคัดย่อ

เชื้อสเตรปโตค็อกคัสซูอิส เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในสุกรทั่วโลกซึ่งสามารถติดต่อสู่คนและ  
ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงถึงแก่ชีวิตได้ ในการศึกษาครั้งนี้ เชื้อสเตรปโตค็อกคัสซูอิส ที่แยกได้จาก  
ผู้ป่วยและสุกรปกติได้ถูกจำแนกลักษณะโดยการตรวจหาซีโรไทป์ (serotyping), pulsed-field  
gel electrophoresis (PFGE), และการตรวจหาฮีนที่คาดว่าทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรค  
(*mrp*, *epf*, และ *sly*) เชื้อสเตรปโตค็อกคัสซูอิส จำนวนทั้งหมด 110 isolates พบว่ามี 73  
isolates ที่สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้ ประกอบด้วยซีโรไทป์ 1, 1/2, 2, และ 14 ในจำนวนนี้เป็น  
เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 67 isolates และจากสุกรปกติ 6 isolates เชื้อซีโรไทป์ 2 เป็นเชื้อที่ตรวจ  
พบได้มากที่สุดจากเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย (92.5%) เชื้อ 71 isolates ที่สามารถจำแนกซีโรไทป์  
ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดย PFGE โดยพบรูปแบบการตัด DNA  
ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I จำนวน 36 รูปแบบ (pulsotypes) และจากการจัดแบ่งกลุ่มเชื้อที่  
ความคล้ายคลึงกันที่ 66% พบว่าสามารถแบ่งเชื้อออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม A, B, C, D, และ E  
โดยพบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม A คิดเป็นร้อยละ 67.2 และเชื้อที่แยกได้จาก  
สุกรทุก isolates ที่ได้ทำการวิเคราะห์จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย คือกลุ่ม A  
และ D เมื่อทำการตรวจหาฮีนที่คาดว่าทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรค (*mrp*, *epf* และ *sly*)  
จากเชื้อ 71 isolates โดยวิธี PCR สามารถจำแนกเชื้อออกได้เป็น 4 จีโนไทป์ ( $mrp^+epf^+sly^+$ ,  
 $mrp^+epf^*sly^+$ ,  $mrp^+epf^-sly^-$ ,  $mrp^-epf^-sly^+$ ) โดยเชื้อสเตรปโตค็อกคัสซูอิสที่แยกได้จากผู้ป่วย

มีจีโนไทป์  $mrp^+epf^-sly^-$  เป็นส่วนใหญ่ คิดเป็นร้อยละ 77.6 ขณะที่เชื้อที่แยกได้จากสุกรปกติ ส่วนใหญ่ คิดเป็นร้อยละ 75.0 มีจีโนไทป์เป็น  $mrp^-epf^-sly^+$  และที่สำคัญเชื้อที่แยกได้จากสุกรปกติทั้งหมดที่ได้ทำการทดสอบมีจีโนไทป์เดียวกันกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย (จีโนไทป์  $mrp^+epf^-sly^-$  และ  $mrp^-epf^-sly^+$ ) จากการใช้ทั้งสองวิธีทำให้ พบว่า ลักษณะสำคัญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัสซุอิสที่แยกได้จากผู้ป่วยในการศึกษาคั้งนี้ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม A จากการวิเคราะห์โดย PFGE และมีจีโนไทป์เป็น  $mrp^+epf^-sly^-$  ผลที่ได้ทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อสเตรปโตค็อกคัสซุอิสที่แยกได้จากผู้ป่วยและสุกรปกติในการศึกษานี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอย่างมาก และมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด

เชื้อสเตรปโตค็อกคัสซุอิสที่แยกได้จากผู้ป่วยสองสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ LPH02 ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการ toxic shock syndrome อย่างรุนแรงและถึงแก่ชีวิต และสายพันธุ์ MNM43 แยกได้จากผู้ป่วยเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ได้ถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์ และ รูปแบบของโปรตีนที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ กับแอนติบอดี โดยมีจุดประสงค์เพื่อค้นหาโปรตีนที่อาจเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคและทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ต่างกัน และเพื่อพิสูจน์หาโปรตีนที่สามารถกระตุ้นและทำปฏิกิริยาได้ กับแอนติบอดีโดยมุ่งไปที่โปรตีนแอนติเจนที่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ โดยทำการสกัดโปรตีนทั้งหมดจากแบคทีเรียและนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการแยกโปรตีน two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) พบว่ารูปแบบโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน โดยพบจุดโปรตีนทั้งหมดจำนวน 328 จุดในสายพันธุ์ LPH02 และ พบจุดโปรตีนจำนวน 336 จุดในสายพันธุ์ MNM43 จุดโปรตีนที่พบเฉพาะในสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้นจำนวน 10 จุดถูกเจาะออกจาก 2D-gels และนำไปพิสูจน์หาชนิดโปรตีนด้วย matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) พบว่าจุดโปรตีนที่พิสูจน์หาชนิดส่วนใหญ่เป็น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานต่างๆในเซลล์ กระบวนการเผาผลาญสารอาหาร และกลไกการป้องกันตัวเอง ถึงแม้ว่าชนิดของโปรตีนที่พิสูจน์ได้จะยังนำสงสัย แต่ในจำนวนโปรตีนเหล่านี้ มีโปรตีนสองชนิดที่เด่นคือ โปรตีน ClpP และ DnaK ซึ่งพบเฉพาะในสายพันธุ์ LPH02 เนื่องจากโปรตีนทั้งสองนี้มีรายงานว่าเป็นปัจจัยก่อโรคในเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาบทบาทของโปรตีนเหล่านี้ในการก่อโรคในเชื้อสเตรปโตค็อกคัสซุอิสต่อไป

สำหรับแนวทางการศึกษารูปแบบโปรตีนที่สามารถกระตุ้นและทำปฏิกิริยาได้กับแอนติบอดีอย่างจำเพาะ (immunogenic protein) 2D blots จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ถูกทดสอบด้วยซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อและซีรัมที่ได้จากการฉีดกระตุ้นเชื้อในกระต่าย พบว่ารูปแบบโปรตีนที่

สามารถกระตุ้นและทำปฏิกิริยาได้กับแอนติบอดีค่อนข้างมีความแตกต่างกันในเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ และจากซีรัมที่ใช้ จุดโปรตีนที่สามารถกระตุ้นและทำปฏิกิริยาได้กับแอนติบอดี 15 จุด สามารถพิสูจน์ชนิดได้ ในจำนวนนี้มีจุดโปรตีนจำนวน 3 จุดที่สามารถพิสูจน์ชนิดได้อย่างไม่มีข้อสงสัย การค้นหาชนิดโปรตีนโดยอาศัยรูปแบบโปรตีนที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันจากฐานข้อมูล พบว่า จุดโปรตีน 3 จุดดังกล่าวเป็นโปรตีน *o*-acetylserine lyase, phosphomannose isomerase และ acyl-ACP thioesterase ตามลำดับ ในจำนวนโปรตีนทั้ง 3 จุด *o*-acetylserine lyase และ phosphomannose isomerase พบในเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ ส่วน acyl-ACP thioesterase พบเฉพาะในเชื้อสายพันธุ์ MNCM43 เท่านั้น *o*-acetylserine lyase ถูกพบเมื่อไม่นานมานี้ว่าเป็นโปรตีนที่สามารถกระตุ้นและทำปฏิกิริยาได้กับแอนติบอดีและคาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อเสตรปโตค็อกคัสซูอิส phosphomannose isomerase และ acyl-ACP thioesterase เป็นโปรตีนที่สามารถกระตุ้นและทำปฏิกิริยาได้กับแอนติบอดีที่พบในการศึกษานี้ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved