

## การศึกษาการเข้าสู่เซลล์ และการยึดเกาะของเชื้อ *Streptococcus suis* ต่อเซลล์ U937

อรทัย ยินใส, ททัยรัตน์ ธัญชัย, และ ขวัญจิต ดวงสงค์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาความสามารถของ *Streptococcus suis* (*S. suis*) จำนวน 5 สายพันธุ์ ในการรุกรานเข้าสู่เซลล์ และยึดเกาะบนผิวเซลล์เพาะเลี้ยงโมโนไซต์ของมนุษย์ (U937)

**วิธีการศึกษา** การศึกษานี้ได้ทำการเพาะเลี้ยง *S. suis* จำนวน 5 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อในซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ P1/7, LPH210/53 และ TSK10.4 และ ซีโรไทป์ 14 สายพันธุ์ MNM07 และ TD2.2 ที่แยกได้จากผู้ป่วย สุนัขป่วย และสุนักรกต จากนั้นทุกสายพันธุ์จะถูกนำไปทดสอบความสามารถในการรุกรานเข้าสู่เซลล์ และการยึดเกาะบนผิวเซลล์โมโนไซต์ U937 ด้วยวิธี bacterial invasion and adhesion assay

**ผลการศึกษา** จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *S. suis* ทั้ง 5 สายพันธุ์กับเซลล์ U937 พบว่า *S. suis* มีปริมาณแบคทีเรียรุกรานเข้าสู่เซลล์เพียงประมาณร้อยละ 0.002–0.270 ของปริมาณเชื้อที่เติมลงไปทั้งหมด และพบว่าสายพันธุ์ LPH210/53 มีความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญในทุก multiplicity of infection; MOI ที่ทดสอบ ส่วนร้อยละแบคทีเรียยึดเกาะนั้น พบว่าเชื้อ *S. suis* ทั้ง 5 สายพันธุ์มีปริมาณเชื้อยึดเกาะอยู่ประมาณร้อยละ 3-14 ของปริมาณแบคทีเรียที่เติมลงไปทั้งหมด โดยสายพันธุ์ LPH210/53 และ TD2.2 มีความสามารถในการยึดเกาะมากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ MOI=10 นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบที่สายพันธุ์เดียวกัน แต่ MOI ต่างกัน พบว่า *S. suis* มีปริมาณเชื้อยึดเกาะที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นที่ MOI=10 ของสายพันธุ์ LPH210/53 และ TD2.2 มีการยึดเกาะได้มากกว่า MOI อื่นอย่างมีนัยสำคัญ

**สรุปผลการศึกษา** *S. suis* สายพันธุ์ LPH210/53 มีความสามารถในการรุกรานเข้าสู่เซลล์ U937 ได้สูงสุดที่ประมาณร้อยละ 0.270 และสายพันธุ์ LPH210/53, TD2.2 มีความสามารถยึดเกาะสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ MOI=10 ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความสามารถของ *S. suis* ในการยึดเกาะบนเซลล์โมโนไซต์นี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์แม้จะเป็นเชื้อซีโรไทป์เดียวกันหรือแยกได้จากแหล่งเดียวกันก็ตาม โดยอาจมีปัจจัยอื่นร่วมด้วย นอกจากนี้การศึกษานี้อาจช่วยสนับสนุนความเข้าใจถึงกลไกการก่อโรค และยังสามารถนำไปสู่แนวทางการรักษาโรคติดเชื้อ *S. suis* อีกด้วย **เชียงใหม่เวชสาร 2559; 55(ฉบับเสริม 1):45-54.**

**คำสำคัญ:** สเตรปโตคอคคัส ซูอิส เซลล์โมโนไซต์ แบคทีเรียรุกราน แบคทีเรียยึดเกาะ

## บทนำ

*Streptococcus suis* (*S. suis*) เป็นเชื้อก่อโรคในสุกรที่สามารถติดต่อกับมนุษย์ได้ ทำให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงได้แก่ การติดเชื้อในกระแสเลือด เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ปอดบวม และลำไส้อักเสบ รวมไปถึงจนถึง toxic shock syndrome รายงานการติดเชื้อ *S. suis* ในมนุษย์พบครั้งแรกที่ประเทศเดนมาร์ก<sup>[1]</sup> ต่อมาจึมีรายงานการติดเชื้อนี้ในหลายประเทศทั่วโลก เช่น ออสเตรเลีย ฮองกง และเนเธอร์แลนด์<sup>[2-4]</sup> รวมทั้งประเทศจีนซึ่งมีรายงานการระบาดของเชื้อ *S. suis* ครั้งแรก ปี พ.ศ. 2541 ในมณฑลเจียงซู ส่วนสถานการณ์การระบาดในประเทศไทย มีรายงานพบผู้ป่วยเป็นโรคติดเชื้อ *S. suis* ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2530 ที่โรงพยาบาลรามาริบัติ<sup>[5]</sup> และมีรายงานการตรวจพบผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อนี้มาอย่างต่อเนื่อง

สุกรเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อ โดยสุกรที่ติดเชื้อ *S. suis* อาจไม่แสดงอาการแต่เป็นพาหะของโรคได้ มนุษย์สามารถรับเชื้อเข้าสู่ร่างกายได้ ผ่านทางการรับประทานหรือการสัมผัสกับสุกรที่มีเชื้อ เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะมีการแพร่กระจายไปตามกระแสเลือด เมื่อเชื้อสามารถผ่าน blood-brain barrier หรือ blood-CSF barrier เข้าไปได้ จะทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบประสาทส่วนกลางส่งผลให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรง โดยในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่เชื้อใช้ในการหลบหลีกเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ และเคลื่อนที่ผ่านกระแสเลือดเพื่อไปยังอวัยวะเป้าหมายที่แน่ชัด แต่มีการเสนอทฤษฎี “Trojan horse” ซึ่งอธิบายว่าเชื้ออาจแฝงตัวไปกับเซลล์ฟาโกไซต์ โดยถูก phagocytosis เข้าไปอาศัยอยู่ภายใน phagosome และถูกพาไปยังส่วนต่าง ๆ ของโฮสต์ได้<sup>[6]</sup> บางครั้งเชื้ออาจไม่เข้าไปภายในเซลล์โฮสต์ แต่เชื้อจะใช้ adhesin ยึดเกาะกับ receptor บนผิวเซลล์ฟาโกไซต์ และจะถูกพาไปยังอวัยวะเป้า

หมายได้เช่นกัน เรียกกระบวนการนี้ว่า “Modified Trojan horse”<sup>[7]</sup>

ดังนั้นการเข้าไปอาศัยภายในเซลล์หรือการยึดเกาะกับเซลล์ฟาโกไซต์ของ *S. suis* อาจเป็นปัจจัยส่งเสริมให้เชื้อสามารถหลบหลีก host immune cells และช่วยให้เกิดการก่อโรคได้ง่ายขึ้น โดยในปี ค.ศ. 2000 Lalonde และคณะ ได้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 ต่อ epithelial cell lines หลายชนิดได้แก่ เซลล์เพาะเลี้ยง A549 (human lung carcinoma), HeLa (human cervix adenocarcinoma), MDCK (adult dog kidney), PK (adult pig kidney) และ LC-PK1 (juvenile pig kidney) ใช้เทคนิค invasion และ adherence assay ซึ่งพบ *S. suis* มีความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ที่ใช้ทดสอบทุกชนิด แต่เชื้อไม่สามารถบุกรุกเข้าเซลล์ได้เพราะเซลล์ที่ใช้ศึกษาเป็น epithelial cells ซึ่งไม่สามารถเกิดกระบวนการ phagocytosis ที่ดีเท่าเซลล์กลุ่มฟาโกไซต์<sup>[8]</sup> และในปี ค.ศ. 2002 Segura และ Gottschalk ได้ศึกษาความสามารถในการยึดเกาะผิวเซลล์แมคโครฟาจหนู (J774) ของ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 พบว่าปริมาณการยึดเกาะผิวเซลล์ของ *S. suis* ขึ้นกับปริมาณของเชื้อและระยะเวลาในการบ่มเชื้อกับเซลล์<sup>[9]</sup>

จากการศึกษาของ Lalonde และคณะ อีกทั้งของ Segura และ Gottschalk ทำให้ทราบว่าเชื้อ *S. suis* มีความสามารถในการยึดเกาะผิวโฮสต์เซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้ แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาการเข้าสู่เซลล์และการยึดเกาะเซลล์ฟาโกไซต์ของมนุษย์มาก่อนในการศึกษาคั้งนี้ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ และการยึดเกาะผิวเซลล์ของแบคทีเรีย *S. suis* 5 สายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์เป็นตัวแทนของซีโรไทป์ 2 และ 14 ที่แยกได้จากแหล่งที่แตกต่างกันได้แก่ จากผู้ป่วย สุกรป่วย และสุกรปกติ ในเซลล์ U937 ซึ่งเป็นเซลล์โมโนไซต์

ของมนุษย์ ที่มีการใช้ศึกษาปฏิสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรียมากในปัจจุบัน แต่ยังไม่มีการนำมาศึกษาการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ และยึดเกาะผิวเซลล์โดยเชื้อ *S. suis* การศึกษานี้จะสามารถบอกปริมาณเชื้อ และเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *S. suis* แต่ละสายพันธุ์ในการยึดเกาะบนผิวเซลล์ U937 ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยต่อไป

### วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสามารถของ *S. suis* ทั้งซีโรไทป์ 2 และ 14 จำนวน 5 สายพันธุ์ ในการเข้าสู่เซลล์ และยึดเกาะบนผิวเซลล์ U937

### วิธีการวิจัย

#### การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้จำนวน 5 สายพันธุ์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 ประกอบด้วย *S. suis* ซีโรไทป์ 2 จำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ P1/7, LPH210/53 และ TSK10.4 รวมทั้งซีโรไทป์ 14 จำนวน 2 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ MNM07 และ TD2.2 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวใน Todd Hewitt broth (THB) agar ให้ได้โคโลนีเดี่ยว แล้วนำมาเพาะเลี้ยงอีกครั้งในอาหาร THB บ่มที่ 37 °ซ ที่มี 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลาข้ามคืนเพื่อให้เชื้อเจริญ

ตารางที่ 1. แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

ซีโรไทป์	สายพันธุ์	แหล่งที่มา
2	LPH 210/53	ผู้ป่วย
	TSK 10.4	สุกรปกติ
	P1/7 (สายพันธุ์อ้างอิง)	สุกรป่วย
14	MNMC 07	ผู้ป่วย
	TD 2.2	สุกรปกติ

### การเพาะเลี้ยง และกระตุ้นเซลล์ U937

เลี้ยงเซลล์ U937 ด้วยอาหาร Roswell Park Memorial Institute (RPMI) ที่ผสม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) และ 1 mM L-glutamine ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ลบ.ซม. ด้วยอัตราส่วนเซลล์ต่ออาหาร 1:4 (v/v) บ่มที่ 37 °ซ /5% CO<sub>2</sub> เลี้ยงจนเซลล์เจริญดี จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในจานอาหารหลุมขนาด 6 หลุม และปรับปริมาณเซลล์ให้เท่ากับ 10<sup>6</sup> เซลล์ต่อมล. บั่นล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง จากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์ U937 ให้กลายเป็นแมคโครฟาจ ซึ่งทำให้ phagocytosis แบคทีเรียเกิดได้ดีขึ้น โดยเติมอาหารใหม่ที่ผสม phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ความเข้มข้น 100 นก.ต่อมล. แล้วนำไปบ่มที่ 37 °ซ ที่มี 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทำการล้างเซลล์และเปลี่ยนอาหารเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### การทดสอบความสามารถในการรุกรานและยึดเกาะเซลล์เพาะเลี้ยง U937 ของเชื้อ *S. suis* ด้วยวิธี bacterial invasion and adhesion assay

เติมเชื้อ *S. suis* ปริมาณต่าง ๆ ลงในเซลล์ U937 ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA เรียบร้อยแล้ว ให้มีอัตราส่วนของเซลล์แบคทีเรียต่อเซลล์ U937 (multiplicity of infection; MOI) เท่ากับ 10, 50 และ 100 ตามลำดับ จากนั้นนำไปปั่นที่ 2,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียสัมผัสกับเซลล์ แล้วนำไปบ่มที่ 37 °ซ/5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วบั่นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ขั้นตอนหลังจากนั้นจะทำการทดสอบแยกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดสอบความสามารถในการรุกรานเซลล์ (invasion assay) นั้น จะทำการเติม RPMI ที่ผสมยา

gentamicin (100 มกค.ต่อมล.) และ penicillin G (10 มกค.ต่อมล.) เพื่อทำลายแบคทีเรียภายนอกทั้งหมด (extracellular bacteria) ทั้งที่ยึดเกาะบนผิวเซลล์ U937 และที่ล่องลอยในอาหาร ซึ่งแบคทีเรียที่บุกรุกเข้าไป และอยู่ภายในเซลล์ (intracellular bacteria) จะสามารถรอดชีวิต ขณะที่การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ (adhesion assay) นั้น จะทำการเติมอาหาร RPMI ที่ไม่ผสมยา นำจานเพาะเชื้อเซลล์ที่เป็นการทดสอบทั้งสองไปบ่มที่ 37 °ซ/5% CO<sub>2</sub> ต่ออีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วปั่นล้าง 3 ครั้ง ก่อนทำการเก็บเซลล์โดย นำไปปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วย PBS 1 ครั้ง เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เพื่อทำให้เซลล์ U937 แดก แล้วนำของเหลวที่ได้ไปเพาะเลี้ยง บน THB agar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนับโคโลนี และคำนวณปริมาณเชื้อที่ได้ในหน่วย colony forming unit ต่อมล. โดยในหนึ่งจานอาหารจะใช้ MOI ทั้ง 3 ของเชื้ออย่างละ 2 หลุม และทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกันโดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียในเซลล์ที่ได้จากชุดการทดลองที่มีการเติมยา และปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด จากชุดการทดลองที่ไม่เติมยาจะบ่งชี้ถึงความสามารถของเชื้อ *S. suis* ในการรุกรานเซลล์แมคโครฟาจ และการยึดเกาะกับเซลล์แมคโครฟาจ ตามลำดับ โดยมีสูตรในการคำนวณดังนี้

**สูตรคำนวณปริมาณเชื้อที่รุกรานเข้าสู่เซลล์**

$$\% \text{Invasive bacteria (cfu/ml)} = \frac{\text{ปริมาณเชื้อจากชุดที่เติมยา} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เติมลงไป}}$$

**สูตรคำนวณปริมาณเชื้อยึดเกาะบนผิวเซลล์**

$$\% \text{Adherent bacteria (cfu/ml)} = \frac{(\text{ปริมาณเชื้อจากชุดที่ไม่เติมยา} - \text{ปริมาณเชื้อจากชุดที่เติมยา}) \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อทั้งหมดที่เติมลงไป}}$$

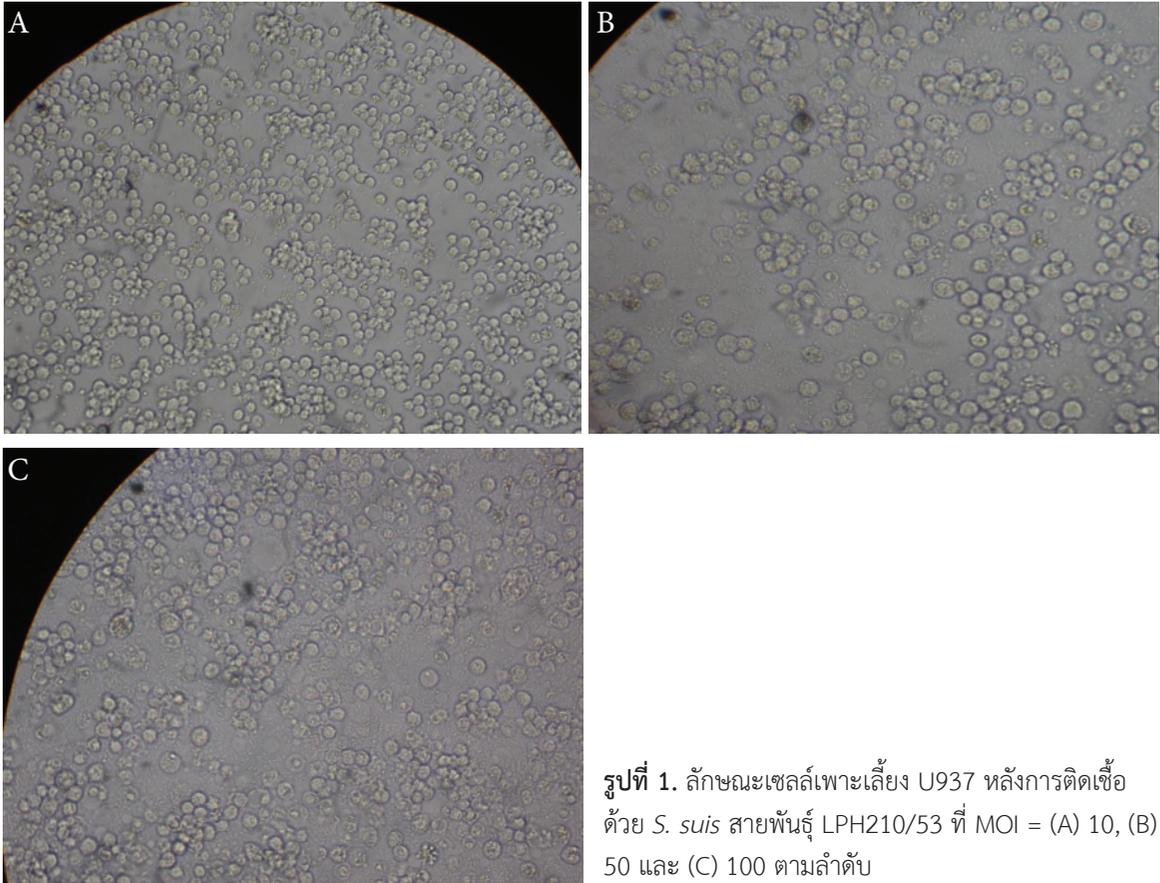
**การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

การเปรียบเทียบความแตกต่างของ %Invasive และ %Adherent bacteria ของ *S. suis* ทำโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS และใช้ ANOVA ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ %Invasive และ %Adherent bacteria โดยทำการเปรียบเทียบใน *S. suis* สายพันธุ์เดียวกันเมื่อใช้ MOI ที่ต่างกัน และเปรียบเทียบระหว่างเชื้อต่างสายพันธุ์เมื่อใช้ MOI เดียวกัน

**ผลการวิจัย**

เมื่อทำให้เซลล์ U937 ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *S. suis* ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ MOI ต่าง ๆ พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ U937 เพิ่มมากขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไป โดยพบว่า ที่ MOI=10 เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย บางเซลล์มีขนาดใหญ่ และพบแกรนูล บางเซลล์หลุดออกจากพื้นผิว (รูปที่ 1A) และที่ MOI=50 เซลล์ U937 เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน โดยพบว่ามีเซลล์ขนาดใหญ่ขึ้น และสร้างแกรนูลปริมาณมากกว่าที่ MOI=10 (รูปที่ 1B) และที่ MOI=100 พบปริมาณเซลล์ขนาดใหญ่มากขึ้น เกือบทุกเซลล์พบแกรนูล เซลล์มีการหลุดลอกออกจากพื้นผิวมาก เซลล์แตก และพบเศษเซลล์เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 1C)

จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *S. suis* ทั้ง 5 สายพันธุ์กับเซลล์ U937 พบว่า เชื้อทั้ง 5



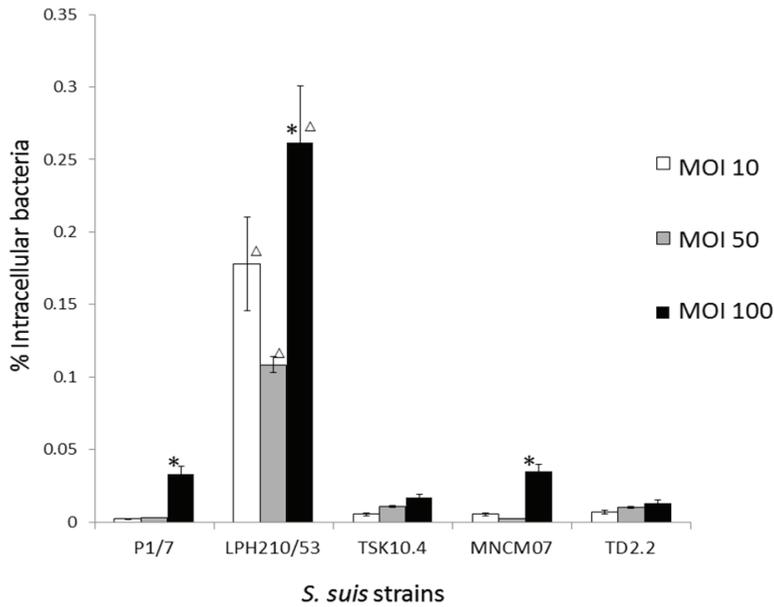
**รูปที่ 1.** ลักษณะเซลล์เพาะเลี้ยง U937 หลังการติดเชื้อด้วย *S. suis* สายพันธุ์ LPH210/53 ที่ MOI = (A) 10, (B) 50 และ (C) 100 ตามลำดับ

สายพันธุ์มีความสามารถในการรุกรานและอยู่รอดภายในเซลล์แมคโครฟาจ U937 ได้เพียงเล็กน้อย โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่อยู่รอดภายหลังจากรุกรานเข้าสู่เซลล์อยู่ที่ประมาณร้อยละ 0.002–0.027 (รูปที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติ (ANOVA;  $p < 0.05$ ) พบว่าเชื้อสายพันธุ์ LPH210/53 มีความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ U937 ได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่น และเชื้อสายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่ MOI=100 จะมีปริมาณเชื้อที่รุกรานเข้าสู่เซลล์สูงกว่า MOI อื่นอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นสายพันธุ์ TSK10.4 และ TD2.2 นั้นไม่มีความแตกต่างกันเมื่อใช้เชื้อที่ MOI ต่างกัน ส่วนปริมาณเชื้อ *S. suis* ที่สามารถยึดเกาะเซลล์ U937 ของเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์มีค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 3-13 (รูปที่ 3) โดยพบว่า LPH210/53

และ TD2.2 มีความสามารถในการรุกรานเซลล์ U937 มากกว่า *S. suis* สายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการยึดเกาะเซลล์ของ *S. suis* ในสายพันธุ์เดียวกันที่ MOI ต่าง ๆ พบว่าเชื้อเกือบทุกสายพันธุ์สามารถยึดเกาะเซลล์ได้ใกล้เคียงกันในทุก MOI ที่ทดสอบ ยกเว้นสายพันธุ์ LPH210/53 และ TD2.2 ที่ MOI=10 นั้น จะมีความสามารถในการยึดเกาะ มากกว่าที่ MOI = 50 และ 100 อย่างมีนัยสำคัญ

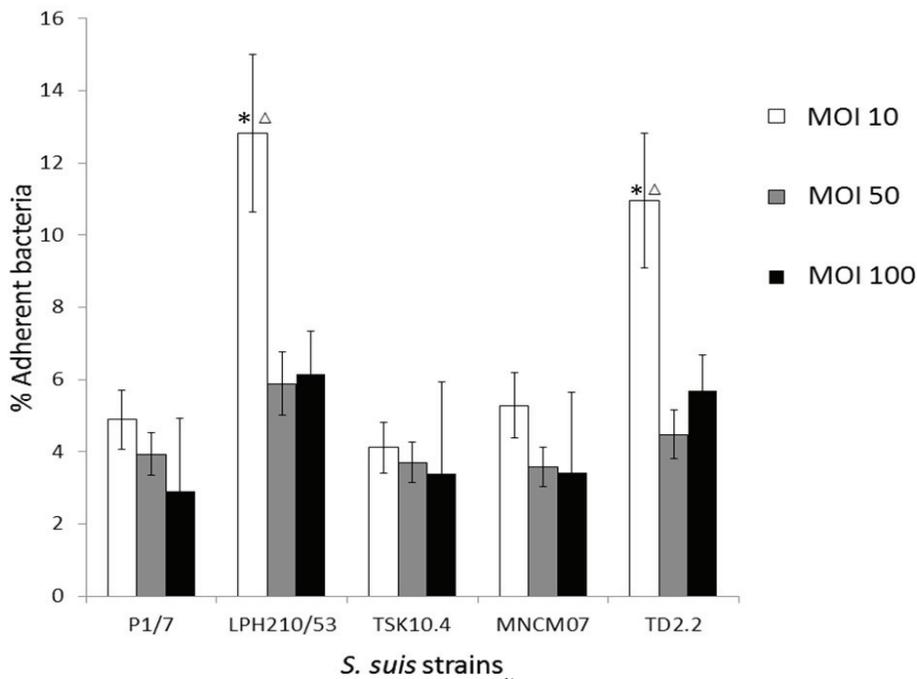
### อภิปรายผลการศึกษา

ในการศึกษาปริมาณ *S. suis* จำนวน 5 สายพันธุ์ที่รุกรานเข้าสู่เซลล์ และยึดเกาะบนเซลล์ U937 ครั้งนี้โดยใช้ค่า MOI=10-100 ที่ incubation time



หมายเหตุ \* ;  $p < 0.05$  : เปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อต่างสายพันธุ์ที่ MOI เดียวกัน; Δ ;  $p < 0.05$  : เปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่ MOI ต่างกัน

รูปที่ 2. %Invasive bacteria ของเชื้อ *S. suis* 5 สายพันธุ์ภายในเซลล์ U937



หมายเหตุ \* ;  $p < 0.05$ : เปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อต่างสายพันธุ์ที่ MOI เดียวกัน Δ ;  $p < 0.05$ : เปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่ MOI ต่างกัน

รูปที่ 3. %Adherent bacteria ของเชื้อ *S. suis* 5 สายพันธุ์บนผิวเซลล์ U937

เท่ากับ 2 ชั่วโมงซึ่งเป็นช่วง MOI และ incubation time ที่ได้เคยมีการศึกษาโดย Segura และ Gottschalk<sup>[9]</sup> ซึ่งทำการศึกษากายการยึดเกาะของเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 หลายสายพันธุ์ต่อเซลล์แมคโครฟาจหนู (J774) โดยพบปริมาณการยึดเกาะที่ MOI=100 โดยเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ  $10^6$  เซลล์ต่อมล. จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^8$  เซลล์ต่อมล. (คิดเป็นร้อยละ 1) โดยผลปริมาณแบคทีเรียยึดเกาะของ Segura และ Gottschalk นั้นอยู่ที่ประมาณ  $10^4$  เซลล์ต่อมล. จาก inoculums  $10^7$  เซลล์ต่อมล.

นอกจากการศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจหนูแล้ว ในปี ค.ศ. 2000 Lalonde และคณะ ได้ศึกษาความสามารถของเชื้อ *S. suis* ในการเข้าสู่เซลล์ และยึดเกาะ epithelial cells จำนวนทั้งสิ้น 5 ชนิด ได้แก่ A549, HeLa, MDCK, PK และ LC-PK1 โดยพบว่า *S. suis* สามารถยึดเกาะแต่ไม่สามารถรุกรานเข้าสู่ epithelial cells ทั้ง 5 ชนิดได้ เนื่องจาก epithelial cells ไม่สามารถเกิดกระบวนการ phagocytosis ที่ดีได้ และผลปริมาณแบคทีเรียยึดเกาะอยู่ที่ประมาณ  $10^5$  เซลล์ต่อมล. จาก inoculums  $10^8$  เซลล์ต่อมล. โดยสัดส่วนของแบคทีเรียยึดเกาะนั้น มีความแตกต่างกับการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งใช้เซลล์โมโนไซต์เพาะเลี้ยง U937 ของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นให้กลายเป็นแมคโครฟาจ ซึ่งอาจมีความเหมาะสมต่อการยึดเกาะของ *S. suis* มากกว่า อีกปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการยึดเกาะคือตัวเชื้อ โดยเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบบางสายพันธุ์แยกได้จากผู้ป่วย ซึ่งอาจส่งผลให้มีความจำเพาะต่อเซลล์ของมนุษย์มากกว่าและทำให้ยึดเกาะได้ดีกว่าการทดสอบที่ใช้เซลล์ชนิดอื่น ๆ เช่น J774 ที่เป็นเซลล์แมคโครฟาจของหนู โดยเชื้อก่อโรคบางชนิดเป็นเชื้อที่มีความจำเพาะต่อโฮสต์ที่อาศัย (host specific pathogens) ซึ่งมีความสามารถในการติดเชื้อเข้าไปในเซลล์โฮสต์บางชนิดได้ดีกว่า และก่อให้เกิดความรุนแรง

ของโรคได้มากกว่า ดังเช่น เชื้อ *S. suis* ซึ่งไม่พบการติดเชื้อโดยธรรมชาติในหนู<sup>[10,11]</sup>

นอกจากนี้ผลการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่า ปริมาณการเข้าสู่เซลล์ และการยึดเกาะของเชื้อ *S. suis* เป็นความสามารถเฉพาะสายพันธุ์ไม่เกี่ยวข้องกับซีโรไทป์ เห็นได้จากผล %Invasive bacteria ของ LPH210/53 ที่เป็นเชื้อ ซีโรไทป์ 2 เช่นเดียวกับสายพันธุ์ TSK10.4 และแยกได้จากผู้ป่วยเช่นเดียวกับสายพันธุ์ MNCM07 แต่มีความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ และการยึดเกาะเซลล์ที่แตกต่างกัน และการศึกษาวิจัยพบว่าปริมาณแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์หรือแบคทีเรียยึดเกาะของเชื้อ *S. suis* ไม่เกี่ยวข้องกับแหล่งที่แยกเชื้อ ดังแสดงในเชื้อสายพันธุ์ LPH210/53 และ TD2.2 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย และจากหมูปกติตามลำดับ จะมีปริมาณเชื้อยึดเกาะกับเซลล์แมคโครฟาจ U937 มากกว่าสายพันธุ์อื่น ส่วนในเชื้อสายพันธุ์อื่น ๆ ก็มีปริมาณการเข้าสู่เซลล์ และการยึดเกาะที่ไม่แตกต่างกันมากนัก

เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยที่อาจมีผลต่อ %Invasive และ %Adherent bacteria ของ *S. suis* สายพันธุ์ LPH210/53 และ TD2.2 ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญนั้น เชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้อาจมีปัจจัยที่สนับสนุนการยึดเกาะเซลล์ที่แตกต่างกันกับสายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งสันนิษฐานได้สองประการ คือ 1) เชื้อทั้งสองสายพันธุ์อาจมีการแสดงออกของ adhesin ที่จำเพาะกับเซลล์ U937 มากกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่น ๆ และ 2) ความสามารถในการยึดเกาะเซลล์โฮสต์ที่มากขึ้นนั้น อาจเกิดจากการขาดหายไปของ capsule ที่ปกคลุมอยู่บนผิวเซลล์ของเชื้อที่ติดค้าง adhesin ทำให้มีการเผยออกมาของ adhesin ที่มากขึ้น และจับ receptor บนผิวเซลล์โฮสต์ได้มากขึ้น ซึ่งได้แนวคิดมาจากการทดลองของ Lalonde และคณะในปี ค.ศ. 2000 ซึ่งเคยกล่าวถึงก่อนหน้า

นี้ ซึ่งได้ศึกษาการยึดเกาะ epithelial cell 5 ชนิด ของ *S. suis* สายพันธุ์ต่าง ๆ และมีสายพันธุ์ที่ได้ทำ mutation ยีนที่สร้าง capsule (unencapsulated mutant) ที่ใช้ทดสอบพร้อมด้วย ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เป็น wild type มีปริมาณการยึดเกาะเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน แต่มีเพียงสายพันธุ์ที่เป็น unencapsulated mutant ที่พบปริมาณการยึดเกาะที่มากกว่า *S. suis* สายพันธุ์ wild type และสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ<sup>[12,13]</sup> ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ LPH210/53 และ TD2.2 อาจมีการสร้าง capsule ในปริมาณที่ต่ำกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งอาจทำการยืนยันข้อสันนิษฐานดังกล่าว โดยทำการตรวจดูระดับการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้าง adhesins และแคปซูลหรือวัดปริมาณ adhesins และแคปซูลเพื่อเป็นข้อมูลต่อไป สำหรับการเข้าสู่เซลล์ นั้นอาจมีปัจจัยอื่นที่ทำให้สายพันธุ์ LPH210/53 มี %Invasive bacteria สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ซึ่งต้องมีการศึกษาทดลองเพื่อพิสูจน์ต่อไป

### สรุปผลการวิจัย

จากผลการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ *S. suis* ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เข้าสู่เซลล์ U937 พบ %Invasive bacteria สูงสุด (ร้อยละ 0.027) ในเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ LPH210/53 และใน MOI=100 ส่วนปริมาณแบคทีเรียยึดเกาะบนเซลล์ U937 พบว่าสายพันธุ์ LPH210/53 และ TD2.2 มี %Adherent bacteria มากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ใน MOI=10 และเมื่อเปรียบเทียบในสายพันธุ์เดียวกันแต่ต่าง MOI พบว่า *S. suis* สายพันธุ์เดียวกันมีปริมาณการยึดเกาะที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้น LPH210/53 และ TD2.2 ที่ MOI เท่ากับ 10 มีปริมาณเชื้อยึดเกาะมากกว่า MOI อื่นอย่างมีนัยสำคัญ การ

ศึกษาครั้งนี้ยังช่วยสนับสนุนความรู้ความเข้าใจถึงกลไกการก่อโรคของเชื้อ *S. suis* ให้มากขึ้น และยังสามารถนำไปสู่แนวทางการรักษาโรคติดเชื้อ *S. suis* ที่ดีได้อีกด้วย

### กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้อนุเคราะห์เชื้อ *S. suis* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ขจรศักดิ์ ตระกูลพัฑฒ ขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ U937 และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่งานวิจัยที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

1. Perch B, Kristjansen P, Skadhauge KN. Group R streptococci pathogenic for man: two cases of meningitis and fatal case of sepsis. Acta Pathol Microbiol Scand 1968;74:69-76.
2. Sanford SE, Tilker ME. Streptococcus suis type II associated diseases in swine: observations of a one year study. J Am Vet Med Assoc 1982;181:673-6.
3. Chau PY, Huang CY, Kay R. Streptococcus suis meningitis: an important underdiagnosed disease in Hong Kong. Med J Aust 1983;1:414-7.
4. Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by Streptococcus suis in humans. Rev Infect Dis 1988;10:131-7.
5. Phuapradit P, Boongird P, Boonyakarnkul S. Meningitis caused by Streptococcus suis. Intern Med 1987;3:120-2.
6. Williams AE, Blakemore WF. Pathogenesis of meningitis caused by Streptococcus suis type

2. J Infect Dis 1990;162:474-81.
7. **Gottschalk M, Segura M.** The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. Vet Microbiol 2000;76:259-72.
8. **Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M.** Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. Microbiology 2000;146:1913-921.
9. **Segura M, Gottschalk M.** *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. Infect Immun 2002;70:4312-322.
10. **Kassen R.** The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. J Evol Biol 2002;15:173-90.
11. **Kirzinger WB M, Stavrinides J.** Host specificity determinants as a genetic continuum. Trends in Microbiology 2012;20:88-93.
12. **Bartley NS, Tzeng LY, Heel K, et al.** Attachment and invasion of *Neisseria meningitidis* to host cells is related to surface hydrophobicity, bacterial cell size and capsule. Plos One 2013; 8(2): e55798.
13. **Rubinchik S, Seddon MA, Karlyshev VA.** A negative effect of *Campylobacter* capsule on bacterial interaction with an analogue of a host cell receptor. BMC Microbiology 2014; 14:141.

## Study of *Streptococcus suis* invasion and adhesion on U937 cells

Orathai Yinsai, Hathairat Thananchai, and Kwanjit Duangsonk

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

---

**Objective** To investigate the ability of 5 *S. suis* strains in invasion and adhesion to human monocytic cell line (U937)

**Materials and methods** In this study, 5 strains of *Streptococcus suis* serotype 2 including P1/7, LPH210/53, TSK10.4, and serotype 14 including MNM07 and TD2.2 isolated from patients, diseased pig and healthy pig were cultured. All strains were used to test their invasive and adherent efficiency on U937 monocytic cells by bacterial invasion and adhesion assay.

**Results** From the study of interaction between 5 strains of *S. suis* and U937 cells reveals that *S. suis* had %Invasive bacteria ranging from only 0.002 to 0.270% of total inoculum bacteria and strain LPH210/53 significantly had the highest invasive ability at all MOI tested. For amount of adherent bacteria on U937 cells, all 5 strains of *S. suis* had %Adherent bacteria ranging from 3-14% of total inoculum bacteria. LPH210/53 and TD2.2 strains could significantly adhere with the higher amount of bacteria than other strains at MOI=10. Moreover, comparison in the same strain of *S. suis* at different MOI shows that there was no significant difference in amount of adherent bacteria except strains LPH210/53 and TD2.2, in which at MOI=10 could adhere in significantly higher amount than others MOI.

**Conclusion** *S. suis* LPH210/53 had the highest invasive ability at 0.270% of total inoculum. For ability of U937 cell surface adhesion, LPH210/53 and TD2.2 strains could significantly adhere more than other strains at MOI=10. This study indicates that each strain of *S. suis* had the ability to adhere differently on this monocytic cell line in spite of serotypes or isolated sources and other associated factors may be involved. Moreover, this study could lead to the more understanding of pathogenesis mechanisms and development of *S. suis* infection treatment. **Chiang Mai Medical Journal 2016;55(Suppl 1)45-54.**

---

**Keywords:** *Streptococcus suis*, monocytic cells, invasive bacteria, adherent bacteria