Abstract

Project Code: BGJ43-8-00017

Project Title: Comparison of group A streptococcal typing methods

Investigator: Assist. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn

Dapertment of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

E-mail Address: spruksak@mail.med.cmu.ac.th

Project Period: 2 years

Streptococcus pyogenes(group A streptococci, GAS) is still causing health problem in developing countries. Most of the GAS from these areas were characterized M nontypeable by serotyping method. They may be new M types or lack of expression of M proteins to react with available specific antisera. Thus the aim of this study was to identify these GAS using two technical modification methods, PCR-RFLP and PCR-ELISA. For the first method, PCR-RFLP, the A- and B- regions of *emm* genes of 192 GAS isolated from normal children and patients were amplified using one pair of primers and then digested with Alu I restriction endonuclease. Their RFLP patterns were analyzed by running on the polyacrylamide gel electrophoresis and compared with the RFLP patterns of know M serotype GAS. Some isolates that represented each PCR-RFLP patterns were confirmed by DNA sequence analysis. The results showed that most of the isolates gave the PCR-RFLP patterns and DNA sequence similar to known M types, only few of them gave distinct patterns and they were analyzed by DNA sequencing method. For the second method, PCR-ELISA, the A- and B-regions of the known M types were amplified by the same primers as the first method and then immobilized on the ELISA plate. The tested GAS *emm* genes were also amplified using biotinylated primers and hybridized with the known M type PCR products coated on the plate. After adding the streptavidine-enzyme and substrate, the signals were visualized by the optical density at the 405 nm. The results showed that some GAS can cross hybridize between the heterologous M types and difficult to discriminated from the homologous M types by giving high optical density. From these results, we suggested using the PCR-RFLP method to screen for typing of GAS in order to minimize the DNA sequencing which is still an expensive method in the developing countries. Since vaccine for GAS prevention is still under developed, cheap and feasible typing method is necessary for the epidemiological study and vaccine development for the population in the developing countries.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, group A streptococci, M typing, PCR-RFLP, PCR-ELISA

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BGJ43-8-00017
ชื่อโครงการ: เปรียบเทียบวิธีการ typing ของเชื้อสะเตร็ปโตคอคไคกลุ่มเอ
ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร. สุมาลี พฤกษากร
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เชียงใหม่ 50200
E-mail Address: spruksak@mail.med.cmu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

เชื้อ *Streptococcus pyogenes* (group A streptococci, GAS) ยังคงเป็นเชื้อก่อโรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขในประเทศกำลังพัฒนา เชื้อ GAS ที่พบในประเทศเหล่านี้ส่วนใหญ่จัดเป็นเชื้อ M nontypeable เมื่อทดสอบด้วยวิธี serotyping ซึ่งอาจเนื่องจากเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อ M type ใหม่ หรือเชื้อไม่สร้าง M protein ที่จะทำปฏิกิริยากับ specific antiseraที่มีอยู่ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการจำแนกเชื้อ GAS เหล่านี้ โดยใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้น 2 วิธี คือ PCR-RFLP และ PCR-ELISA วิธีแรกคือ PCR-RFLP เป็นการเพิ่มจำนวน A-, B-region ของ *emm* genes ของเชื้อ GAS จำนวน 192 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเด็กปกติและจากผู้ป่วย โดยใช้ primer เพียงคู่เดียว จากนั้นตัดผลผลิตที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I เมื่อนำชิ้นส่วนที่ได้จากการตัดนี้มาวิเคราะห์โดยการ run polyacrylamide gel electrophoresis จะได้ RFLP pattern จากนั้นนำ pattern ที่ได้จากเชื้อที่ทดสอบมาเปรียบเทียบกับ pattern ที่ได้จากเชื้อมาตรฐานที่ทราบ M type นอกจากนี้เชื้อบางสายพันธุ์ที่เป็นตัวแทนของแต่ละ RFLP pattern ได้นำมาทำการหาลำดับเบสเพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้จากวิธี PCR-RFLP ผลการทดลองพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ให้ผล RFLP pattern และผลการหาลำดับเบสที่เหมือนกับเชื้อมาตรฐานที่ทราบ M type มีเชื้อเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ให้ RFLP pattern ที่แตกต่างจากเชื้อมาตรฐานที่มีอยู่ ซึ่งก็ได้นำไปวิเคราะห์ต่อโดยวิธีการหาลำดับเบส สำหรับวิธีที่สอง คือ PCR-ELISA ได้ทำการเพิ่มจำนวน A-, B-region ของ *emm* genes จากเชื้อมาตรฐานที่ทราบ M type โดยใช้ primer คู่เดียวกันกับวิธีแรก จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มายึดติดไว้บน ELISA plate ส่วน A-, B-region ของเชื้อที่จะทดสอบก็จะถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้ primer ที่มี biotin ติดไว้ จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มา hybridize กับ ผลผลิตของเชื้อมาตรฐานที่ทราบ M type ที่ติดอยู่บน plate หลังจากเติม streptavidin-enzyme และ substrate แล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm เพื่อหาความเข้มของสี ผลการทดลองพบว่า เชื้อ GAS บางตัวสามารถเกิด cross hybridize ระหว่างเชื้อที่มี M type ต่างกันได้ ซึ่งจากผลการทดลองเหล่านี้ เราได้เสนอให้ใช้วิธี PCR-RFLP เพื่อตรวจหา M type ของเชื้อ GAS ในเบื้องต้น เพื่อลดปริมาณตัวอย่างที่ต้องนำไปทำ typing โดยการหาลำดับเบส ซึ่งเป็นวิธีที่มีราคาแพงสำหรับประเทศกำลังพัฒนา ในขณะที่วัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อ GAS ยังอยู่ในระหว่างการพัฒนา วิธีการ typing ที่มีราคาถูกและสามารถนำมาใช้ได้อย่างเหมาะสม จึงมีความจำเป็นในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาและการพัฒนาวัคซีนสำหรับประชากรในประเทศที่กำลังพัฒนา