

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ เปรียบเทียบวิธีการ typing ของเชื้อ
สะเตร็ปโตคอคไคกลุ่มเอ

โดย ผศ.ดร. สุมาลี พฤษภากร

สิงหาคม 2545



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ เปรียบเทียบวิธีการ typing ของเชื้อ
สะเตร์ปโตคอคโคกลุ่มเอ

โดย ผศ.ดร. สุมาลี พฤษภากร

สิงหาคม 2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ เปรียบเทียบวิธีการ typing ของเชื้อ
สะเตร็ปโตคอคไคกลุ่มเอ

โดย ผศ.ดร. สุมาลี พฤษภากร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
สัญญาเลขที่ BGJ/17/2543

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์นายแพทย์ นพพร สิทธิสมบัติ ที่ช่วยให้คำแนะนำ
ในการทำ PCR-RFLP, และการหาลำดับเบสของเชื้อสเตรปโตคอคโคกลุ่มเอ รวมทั้งให้
คำแนะนำและตรวจแก้ manuscript ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ พิชชาติ อุปราญ
เคราะห์ ที่ให้คำแนะนำในการทำ PCR-ELISA Dr. Colleen Olive ในการให้คำแนะนำ
และตรวจแก้ manuscript จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	2
Abstract	3
บทนำ	4
วิธีการทดลอง	6
ผลการทดลอง	8
บทวิจารณ์	38
หนังสืออ้างอิง	40
Output	43

Abstract

Project Code: BGJ43-8-00017

Project Title: Comparison of group A streptococcal typing methods

Investigator: Assist. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn

Department 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 ของเชื้อสเตรปโตคอคไคกลุ่มเอ

ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร. สุมาลี พงกษากร

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 antisera ที่มีอยู่ 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 *AfuI* 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

บทนำ

เชื้อสเตรปโตคอคโคกลุ่มเอ (GAS) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม ซึ่งสามารถก่อโรคในคนได้หลายโรค (Lancefield, 1962; Kaplan et al., 1989) เช่น คออักเสบ ไข้ดำแดง ผื่นหนัง อักเสบ โลหิตเป็นพิษ ปอดบวม ไฟลามทุ่ง toxic shock-like syndrome บางรายอาจมีอาการตามหลังการติดเชื้อ เช่น ไข้รูมาติก (ARF) โรคหัวใจรูมาติก (RHD) และ acute glomerulonephritis (AGN) และพบว่า virulence factor ที่สำคัญของ GAS คือ M protein (Cunningham and Russel, 1983; Dale and Beachey, 1986a; Cunningham et al., 1988; Fenderson et al., 1989) เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ ยาวประมาณ 500 อังสตรอม แต่ความยาวก็แตกต่างกันไปแล้วแต่ M type (van de Rijn and Fischetti, 1981; Fischetti, et al., 1985) M protein จะถูกควบคุมโดยยีนที่เรียกว่า *emm* โดยการผลิตโปรตีนนี้จะถูกควบคุมอีกต่อหนึ่งจากโปรตีนที่ผลิตโดย *virR* gene (Bessen and Fischetti, 1992) ซึ่งยีนนี้มีความแตกต่างกันในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (Hollingshead et al., 1993) M protein มีบทบาทป้องกันตัวเชื้อจากการกินของเม็ดเลือดขาว เนื่องจากที่ N-terminal มีประจุเป็นลบ ทำให้เกิดการผลักกันระหว่างตัวเชื้อและเม็ดเลือดขาว M protein ประกอบด้วย A, B และ C-region A-region เป็นส่วนที่อยู่ทางด้าน N-terminal ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนจำเพาะในแต่ละ M type (Manjula et al., 1986; Haanes-Fritz et al., 1988) และภูมิคุ้มกันต่อส่วนนี้สามารถป้องกันการเกิดโรคกลับซ้ำได้ แต่เป็นแบบจำเพาะต่อสายพันธุ์นั้นๆ เท่านั้น (Beachey, et al., 1973; Jones and Fischetti, 1988) การศึกษาทางระบาดวิทยาของการติดเชื้อ GAS ในปัจจุบันเป็นการศึกษาโดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนของ A-region นี้ในการทำ M typing โดยวิธี gel diffusion กับ specific antisera ปัจจุบันสามารถ type ได้มากกว่า 80 M types (Facklam and Edwards, 1979; Fischetti, 1991) ส่วน B-region อยู่ถัดไปทาง C-terminal จะมีกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันเป็นบางส่วนในแต่ละสายพันธุ์ (semi-conserved) ถัดไปจะเป็น C-region ซึ่งอาจจะไม่พบในบาง M type ถ้าพบจะมีความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนมากกว่า 80 % (Miller et al., 1988; Khandke et al., 1990) และปัญหาสำคัญของการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาคือในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่ามากกว่า 80% ของ GAS ที่พบ เป็นแบบ M-nontypeable (Pruksakorn et al., 1990; Kaplan et al., 1992) แต่สามารถตรวจพบ M protein gene โดยการทำให้ DNA sequencing (Pruksakorn et al., 2000) อีกทั้งวิธีการทำ M typing ที่ใช้ M-antisera ค่อนข้างยุ่งยากมาก เนื่องจากมีมากกว่า 80 M types และห้องปฏิบัติการที่มี M-antisera ครบทุก M type มีเพียงไม่กี่แห่งในโลก (Fox, 1974; Kaplan et al., 1992) จึงเป็นข้อจำกัดอย่างมากในการทำ M typing โดยใช้ serotyping

ต่อมาจึงได้มีการคิดค้นวิธีการใหม่ๆ ที่จะนำมาใช้แทนวิธีการทำ M typing โดยวิธี serotyping เช่น การตัด DNA ของ GAS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วดู band ที่ถูกตัดโดยการ run electrophoresis gel เรียก Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งวิธีนี้

สามารถนำมาใช้สำหรับ typing GAS ได้ดี (Cleary et al., 1988; Bingen et al., 1992) แต่ก็มีข้อจำกัด คือการอ่าน pattern ของ fragments ค่อนข้างยาก เพราะจะได้ band ออกมามากมาย และการ run gel ก็มีปัญหาด้าน resolution ของ band อาจจะไม่ชัดเจนพอ อีกวิธีหนึ่งคือ Ribotyping จะอ่านผลได้ง่ายกว่า RFLP แต่ความสามารถในการแยกระหว่างสายพันธุ์จะต่ำกว่า RFLP และอีกวิธีที่นิยมใช้คือ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เนื่องจากทำได้เร็วและง่ายกว่าวิธีอื่นๆ (Seppala et al., 1994) ต่อมาได้มีผู้ใช้ Oligonucleotide probe ที่มีความจำเพาะกับ M protein gene ไป hybridize กับ chromosomal DNA ของ GAS พบว่ามีความไวและความจำเพาะดีมาก (Kaufhold et al., 1992) แต่ probe เพียงหนึ่ง probe ไม่สามารถ typing ได้ทุก M type และอีกวิธีที่นำมาใช้คือ vir-Typing ซึ่งพบว่าสามารถใช้ในการ typing ได้ดี (Gardiner et al., 1995) แต่ต้องใช้ chromosomal DNA ที่มีคุณภาพสูงและการทำ long-PCR ซึ่งต้องปรับสภาวะของ reaction ให้เหมาะสมในแต่ละช่วงของความยาวของ PCR products ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงมาก ส่วนวิธีที่ให้ผลแม่นยำที่สุด คือการหาลำดับเบส (DNA sequencing) แต่เสียค่าใช้จ่ายสูงและเครื่องมือราคาแพง

ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการที่จะพัฒนาวิธีการทำ M typing ขึ้นมาเพื่อให้สามารถ typing เชื้อ GAS ได้มากที่สุด มีค่าใช้จ่ายถูกและสามารถทดลองได้ในทุกประเทศ โดยจะทำการเปรียบเทียบกับวิธี typing อื่นๆ ด้วย เพื่อประโยชน์ในการศึกษาด้านระบาดวิทยาของเชื้อ GAS ในประเทศที่กำลังพัฒนา และเป็นแนวทางในการที่จะพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ GAS ซึ่งจำเป็นต้องทราบถึง M type ของเชื้อ GAS ที่ระบาดอยู่ในท้องถิ่นด้วย จึงจะได้วัคซีนที่ป้องกันเชื้อได้ทุก M type หรือเกือบทุก M type ที่ระบาดอยู่ในท้องถิ่น

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการทดสอบวิธีการทำ M typing โดยวิธี PCR-ELISA และ PCR-RFLP เปรียบเทียบกับ DNA sequencing เพื่อหาลำดับเบสของ M protein gene เพื่อยืนยันความถูกต้องของการทำ M typing ซึ่งเป็นวิธีการที่แน่นอน โดยทดสอบกับเชื้อสะเตร็ปโตคอคคัสกลุ่มเอ ซึ่งเป็น M typeable และ M nontypeable ที่แยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย จำนวน 192 สายพันธุ์

วิธีการทดลอง

1. เชื้อสะเตริปโตคอคโคกลุ่มเอ ที่ใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ทราบ M type และเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 192 สายพันธุ์

2. การแยกดีเอ็นเอ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Todd-Hewitt broth (THB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ ข้ามคืน แล้วปั่นล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออก 3 ครั้ง ด้วย PBS pH 7.4 ทำการย่อยเซลล์ด้วยไลโซไซม์ 500 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณไลโซไซม์อยู่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาย่อยโปรตีนด้วย 20% sodium dodecyl sulfate 200 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตร ของ Proteinase K ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 58⁰ซ ข้ามคืน จากนั้นตกตะกอนเอาส่วนโปรตีนออกด้วย 1/3 volume ของ saturated sodium chloride นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4⁰ซ 30 นาที นำมาปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตูดเอาน้ำใสส่วนบนมาใส่ในหลอดใหม่ที่ปราศจากเชื้อเดิม absolute alcohol ที่แช่ไว้ที่ -20⁰ซ ปริมาณ 3 เท่า เอียงหลอดไปมาเบาๆ จนเห็นตะกอนของดีเอ็นเอ เป็นสายใสๆ แล้วล้างดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol อีก 1 ครั้ง ใช้ tip ที่งอปลายแล้วเกี่ยวเอาสายดีเอ็นเอออกมา ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำสายดีเอ็นเอที่ได้มาละลายใน Tris-ethylenetetraacetate (TE) buffer pH 8.0 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วเก็บที่ -20⁰ซ

3. การทดสอบวิธีการทำ M typing โดยอาศัยหลักการ PCR-RFLP

3.1 ทำ PCR เพื่อ amplify ส่วน M protein gene โดยใช้ primers ที่สามารถ amplify M protein gene ของเชื้อ GAS ได้ทุกสายพันธุ์ โดยใช้เชื้อที่ทราบ M type แล้ว ซึ่งส่วนผสมของ reaction ประกอบด้วย sense primer ซึ่งมีลำดับเบสเป็น CAGTATTCGCTTAGAAAATTA AAA และ antisense primers ซึ่งมีลำดับเบสเป็น CCCTTACGGCTTGCTTCTGA, Taq DNA polymerase, dNTP mix, buffer, MgCl₂ และ template คือ ดีเอ็นเอที่แยกได้จากข้อ 1 จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermocycler (Perkin Elmer model 480)

3.2 นำ PCR product ที่ได้มา run polyacrylamide gel electrophoresis เทียบกับ 100 bp standard marker จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide ถ่ายภาพเปรียบเทียบขนาดของ PCR product

3.3 นำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อ 4 เบส (4-base cut restriction endonuclease) โดยเลือกใช้เอนไซม์ *AluI*

3.4 นำ fragment ที่ได้มา run polyacrylamide gel electrophoresis เทียบกับ 100 bp standard marker จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide ถ่ายภาพเปรียบเทียบกัน

3.5 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ PCR-ELISA

4. การทดสอบวิธีการทำ M typing โดยอาศัยหลักการ PCR-ELISA

4.1 นำดีเอ็นเอที่แยกได้ในข้อ 1 มาทำ PCR โดยใช้ primers คู่เดียวกับในข้อ

3.1

4.2 ทำการ coat ELISA plate ด้วย PCR product ที่ได้โดยจะปรับปริมาณให้เหมาะสม (vary concentration)

4.3 นำดีเอ็นเอของเชื้อที่ไม่ทราบ M type มาทำ PCR โดยใช้ primer คู่เดียวกับข้อ 3.1 แต่ติดด้วย Biotin ในขั้นตอนการสังเคราะห์

4.4 นำ PCR product ที่ติดด้วย Biotin มา hybridize กับ PCR product ที่ติดกับ solid phase ในแต่ละหลุม ถ้า PCR product ทั้งคู่เป็น M type เดียวกันก็จะสามารถ hybridize กันได้ เมื่อล้างส่วนที่ไม่จับกันออกไป ก็จะสามารถทราบว่า เชื้อที่ไม่ทราบ M type นั้นเป็น type ใดได้ โดยเติม streptavidin ที่ติดไว้ด้วย Horse Radish Peroxidase (HRP) โดย streptavidin จะจับกับ Biotin ได้อย่างจำเพาะ จากนั้นล้าง streptavidin ที่ไม่จับกับ Biotin ออกเมื่อเติม substrate (H_2O_2 และ ABTS) ทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm หลุมใดที่เกิดสีแสดงว่า PCR product ของเชื้อที่เราต้องการจะทราบ type สามารถเข้าคู่ได้กับ PCR ของเชื้อที่ทราบ type ในหลุมนั้น ซึ่งน่าจะเป็น type เดียวกัน

5. การหาลำดับเบสของ M protein gene ของเชื้อสะเตร็ปโตคอคโคกลุ่มเอ

5.1 นำดีเอ็นเอที่แยกได้ในข้อ 1 มาทำ PCR โดยใช้ primers คู่เดียวกับในข้อ 3.1

5.2 นำ PCR product ที่ได้มา purify โดยใช้ low melting agarose gel electrophoresis แล้วตัดเอา band ที่อยู่ล่างสุดมา purify โดยใช้ Prep A Gene purification Kit (Bio-Rad Laboratory, USA) จากนั้น run gel เพื่อหาปริมาณ

5.3 ทำการหาลำดับเบสโดยวิธี cycle sequencing โดยใช้ Dye-terminator sequencing kit ของ Perkin-Elmer (Perkin-Elmer Corporation) นำ product ที่ได้มาตกตะกอนด้วย sodium acetate ล้างด้วย ethanol ทำให้แห้ง แล้ว resuspend ใน template suppressor reagent จากนั้นนำไปผ่านเครื่อง automate DNA sequencer (Perkin-Elmer Corporation – ABI 310) เพื่อให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันตามความสั้นยาวของสายและแปลผลว่าสายใดมีส่วนปลายเป็นเบส adenine (A), cytosine (C), thymine (T) หรือ guanine (G) โดยมีแสงเลเซอร์เป็นตัวตรวจจับสายดีเอ็นเอ

5.4 นำลำดับเบสมาวิเคราะห์ความเหมือนระหว่าง type โดยใช้โปรแกรม DNASIS Version 5.0 และนำลำดับเบสไปหาความเหมือน (homology) กับลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานใน GenBank โดยถ้ามีลำดับเบสเหมือนกันมากกว่า 98-100 % จัดเป็น M type เดียวกัน

ผลการทดลอง

1. การทดสอบวิธีการทำ M typing โดยอาศัยหลักการ PCR-RFLP

ในการ amplify M protein gene ของ GAS โดยใช้ primer คู่นี้ พบว่า primer คู่นี้สามารถ amplify M protein gene ได้ทุก sample โดย PCR product ที่ได้มีขนาดที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ประมาณ 500 ถึง 1500 bp และมีจำนวนของ band ตั้งแต่ 1 ถึง 3 band ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 และตารางที่ 1 ซึ่งความแตกต่างนี้เกิดเนื่องจากการที่ M protein gene มี repeating unit ซึ่งในแต่ละ M type หรือแต่ละ strain ก็จะมีจำนวน repeating unit ที่แตกต่างกัน แต่ขนาดของ PCR product เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถจำแนก GAS ออกเป็น M type ต่างๆ ได้ เนื่องจากเชื้อต่างสายพันธุ์กัน ก็อาจมีขนาดของ PCR product ที่ใกล้เคียงกันหรือเท่ากันได้ ดังนั้นจึงได้นำ PCR product เหล่านี้ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* ซึ่งมี recognition site ในการตัดคือ AG↓CT เรียกเทคนิคนี้ว่า Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และด้วยความจำเพาะของการตัดด้วยเอนไซม์นี้ จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างของ GAS ที่มีลำดับเบสภายใน M protein gene ที่ต่างกันได้ โดยหลังจากตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ *AluI* แล้ว จากนั้นจะนำ fragment ที่ได้มา run 15% polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อดู RFLP-pattern ที่ได้ ดังแสดงในรูปที่ 3, 4, 5 และ 6 และตารางที่ 1 และ 2 โดยเริ่มทำ PCR-RFLP ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ทราบ M type ก่อน จากนั้นจึงนำ sample ที่ไม่ทราบ M type มาทำ PCR-RFLP เช่นเดียวกัน แล้วนำ RFLP-pattern ที่ได้มาเปรียบเทียบกับ RFLP-pattern ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ทราบ M type ที่มี pattern อยู่ก่อนแล้ว จากการทดลองหา M type ด้วยวิธีนี้พบว่า เชื้อสายพันธุ์ Potter41 พบได้บ่อยที่สุด รองลงมาคือ M1, M44 และ M25 ตามลำดับ และจากการทดลองยังพบอีกว่ามี sample ส่วนหนึ่งที่มี RFLP-pattern ที่ไม่เหมือนกับ RFLP-pattern ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ทราบ M type ซึ่งก็แสดงว่า sample เหล่านี้เป็น M type อื่นๆ นอกเหนือจากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่มีอยู่ ซึ่งในกรณีนี้ก็จะนำ sample เหล่านี้ ไปทำการหาลำดับเบสของ M protein gene เพื่อให้ทราบ M type จากนั้นก็จะได้นำเชื้อเหล่านี้มาเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ทราบ M type ต่อไป ซึ่งหาก sample ที่นำมาทดสอบมี RFLP-pattern ที่เหมือนกันกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานเหล่านี้ ก็สามารถทราบ M type ของ GAS ได้ด้วยวิธี PCR-RFLP นี้

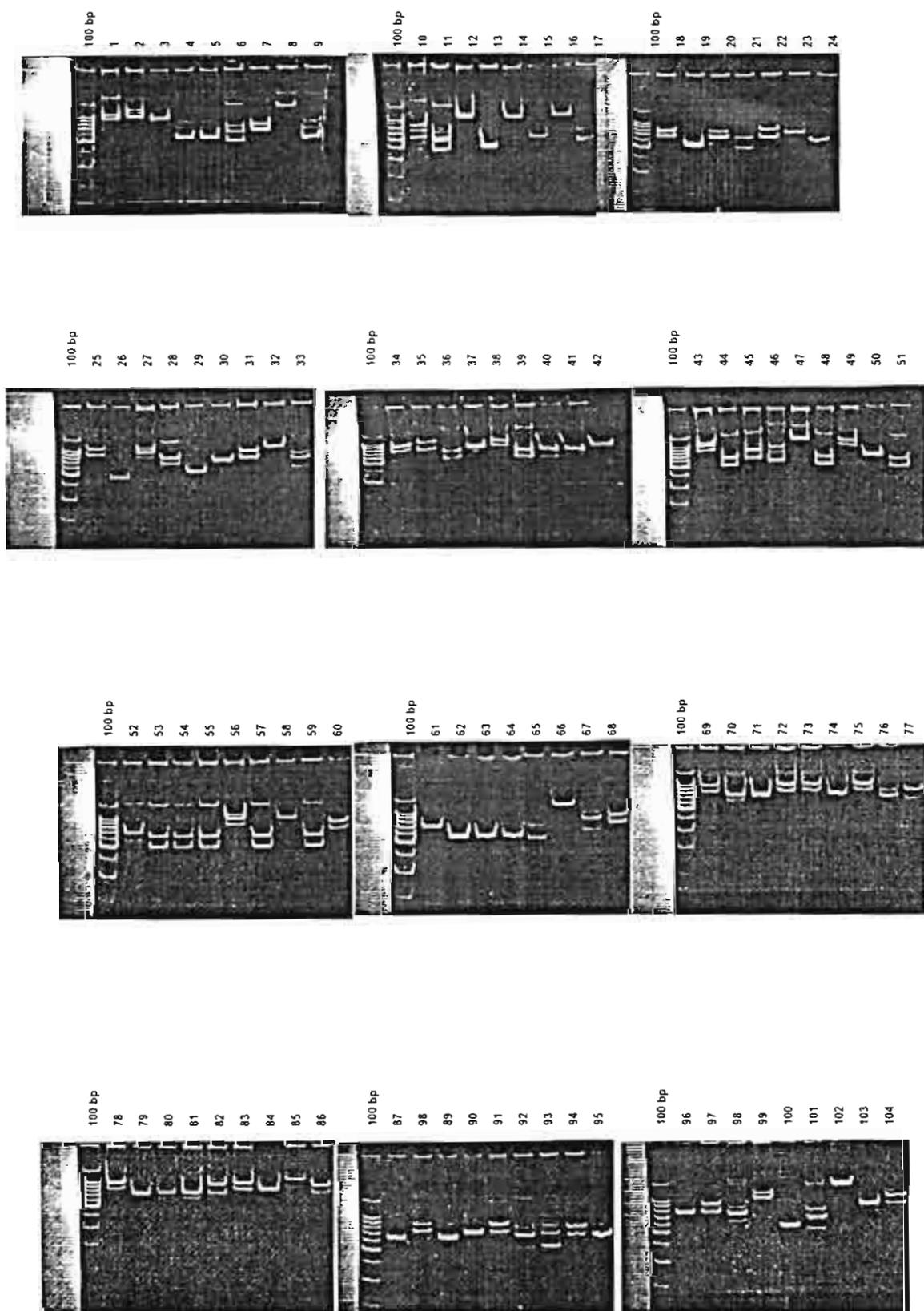
2. การทดสอบวิธีการทำ M typing โดยอาศัยหลักการ PCR-ELISA

จากการทดลองหาปริมาณที่เหมาะสมของ PCR product ที่จะใช้ในการ coat ลงใน ELISA plate และ hybridize ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 200 ng/well จากนั้นจึงนำไปทดสอบโดยทำการ hybridize ระหว่าง M type เดียวกัน และ ต่าง M type ดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7 จากการทดลองพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของการ hybridize ระหว่าง M type เดียวกัน จะมีค่ามากกว่า 1.00 ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของการ hybridize

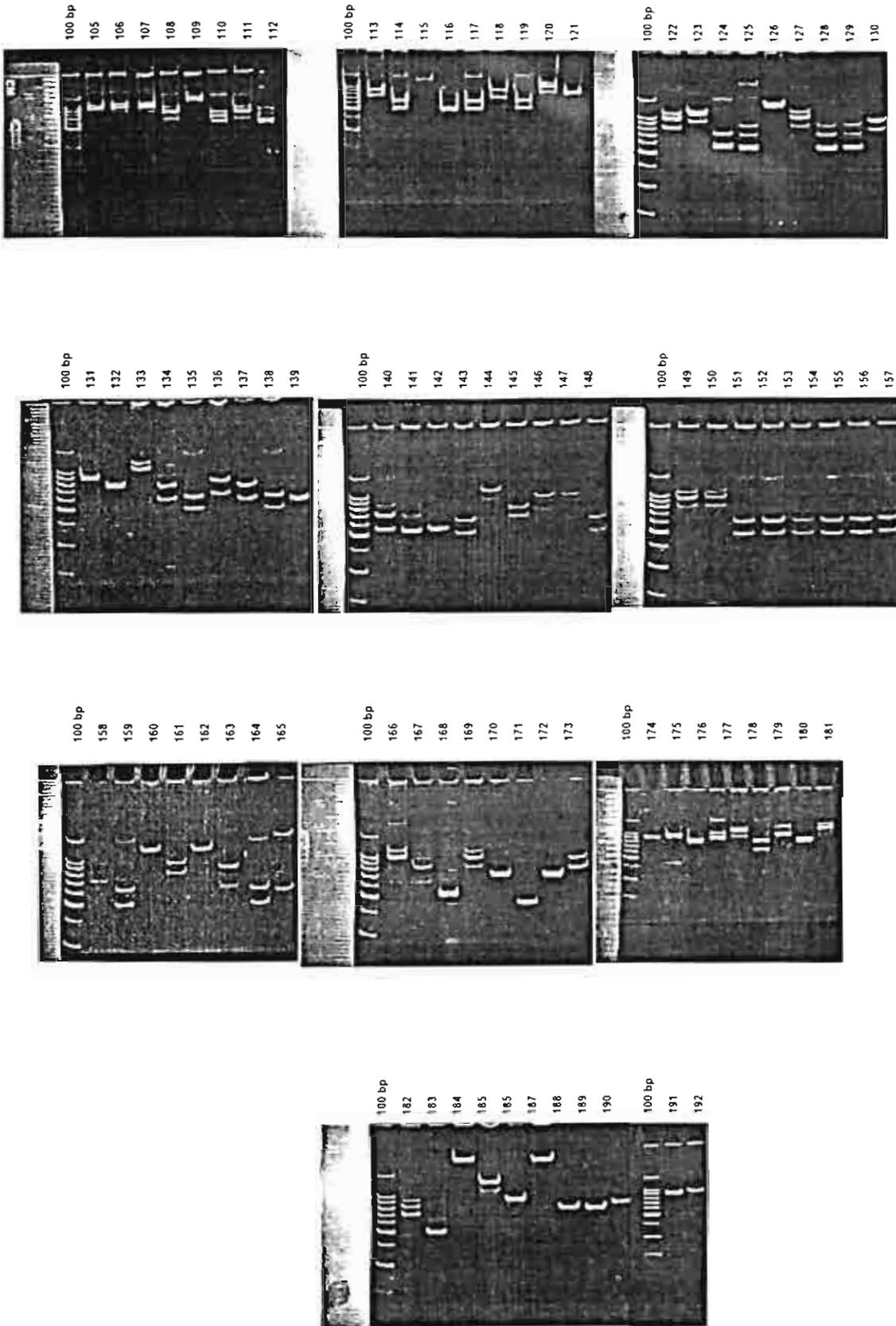
ระหว่าง M type ต่างกัน ส่วนมากจะมีค่าต่ำกว่า 1.00 แต่ในตารางที่ 7 การทดลองที่ 2 การ hybridize ระหว่าง A18 กับ H140 ซึ่งเป็นเชื้อที่ต่าง M type กัน แต่ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่ามากกว่า 1.00 แต่ก็ยังมีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าการ hybridize ระหว่าง A18 กับ A18 ที่เป็น M type เดียวกัน นอกจากนี้ ในตารางที่ 7 การทดลองที่ 3 การ hybridize ระหว่าง A18 กับ AK1 และ A5 กับ AK1 ซึ่งเป็นเชื้อที่ต่าง M type กัน แต่ก็มีค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่า 1.00 เช่นกัน แต่ก็ยังมีค่าต่ำกว่าหลุมที่ให้ผลบวก ที่เป็นการ hybridize ระหว่าง H140 กับ AK1 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงถึง 2.179 ในกรณีของการทดลองนี้ จะแปลผลว่า H140 กับ AK1 เป็น M type เดียวกัน การที่พบผลการทดลองเช่นนี้ อาจเกิดขึ้นจากการที่มีบางส่วนของ PCR product ที่นำมาทดสอบ PCR-ELISA มีส่วน leader sequence ที่คล้ายกัน จึงอาจเกิด cross hybridization ที่บริเวณนี้ขึ้นได้ แต่ถึงแม้วิธี PCR-ELISA จะไม่สามารถบอก M type ได้อย่างสมบูรณ์ แต่วิธีนี้ก็สามารถนำมาใช้ในการ screening ในเบื้องต้นได้ โดยบางตัวอย่างก็สามารถบอก M type ได้เลย แต่ก็จะมีส่วนน้อยที่จะเกิด cross hybridization ขึ้น ซึ่งหากเกิดขึ้นก็นำเฉพาะตัวอย่างที่มีปัญหาไปทำการ typing ด้วยวิธีอื่นต่อไป เช่น PCR-RFLP หรือ DNA sequencing ดังนั้นวิธีนี้ก็ช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทำ M typing ลงได้มาก

3. การหาลำดับเบสของ M protein gene ของเชื้อสะเตร็ปโตคอคไคกลุ่มเอ

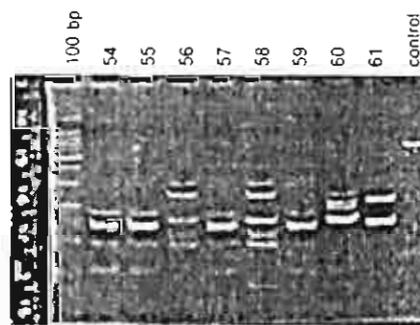
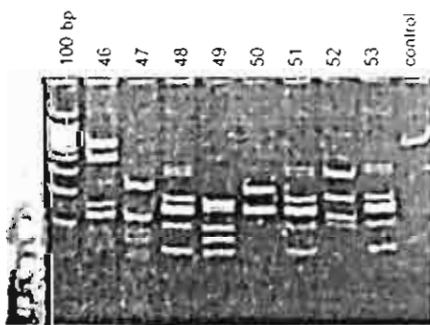
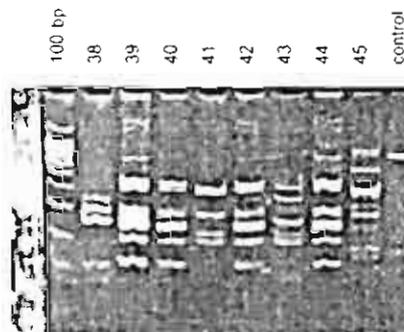
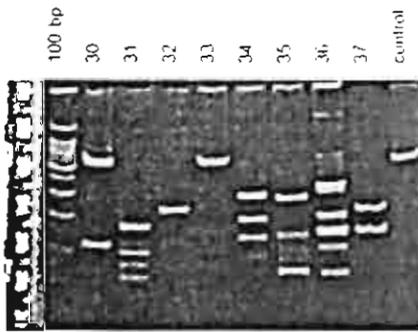
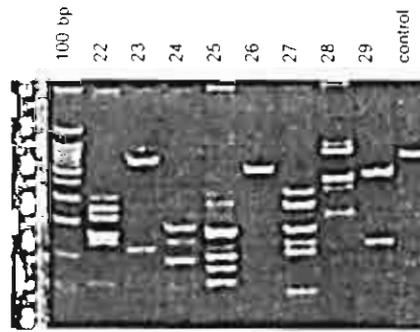
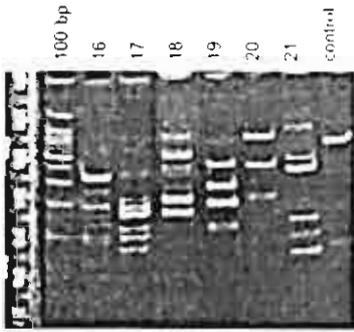
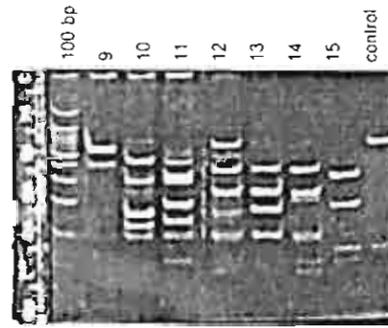
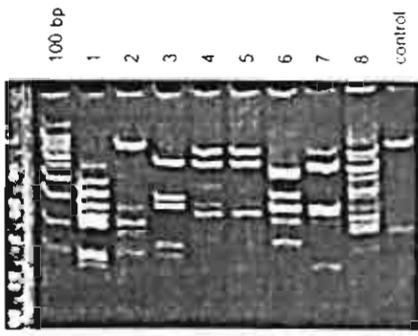
หลังจากทำ PCR-RFLP แล้ว สามารถจัดจำแนก GAS ออกเป็น M type ต่างๆ ได้ แต่เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของผลการทำ M typing ด้วยวิธี PCR-RFLP จึงได้ทำการหาลำดับเบสของ M protein gene ของเชื้อ GAS ที่มี RFLP-pattern ที่เหมือนกันและต่างกัน รวมถึง GAS ที่มี RFLP-pattern ที่ต่างจากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ทราบ M type ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งผลการทำ M typing ด้วยวิธี PCR-RFLP ให้ผลที่สอดคล้องกับการหาลำดับเบสของ M protein gene ของเชื้อ GAS แสดงว่าการทำ M typing ด้วยวิธี PCR-RFLP นี้ สามารถนำมาใช้ในการทำ M typing เชื้อ GAS ได้ และให้ผลที่ถูกต้อง ส่วน GAS ที่ไม่สามารถบอก M type ได้ ด้วยวิธี PCR-RFLP ก็สามารถทราบ M type ได้ โดยการหาลำดับเบสของ M protein gene นี้



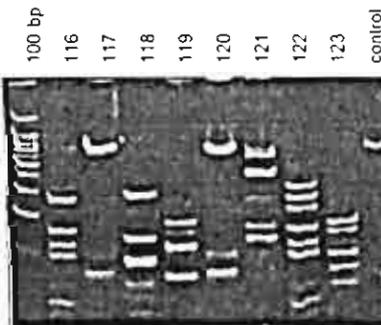
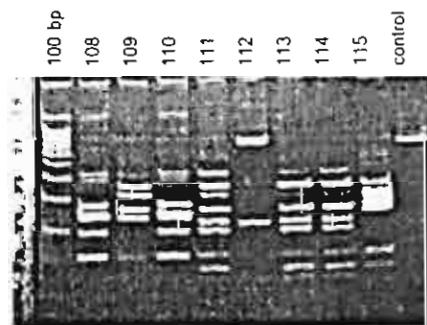
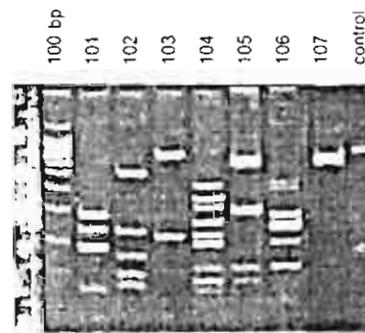
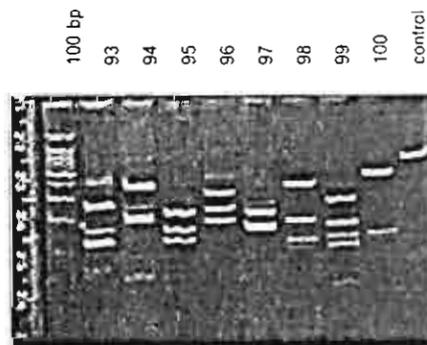
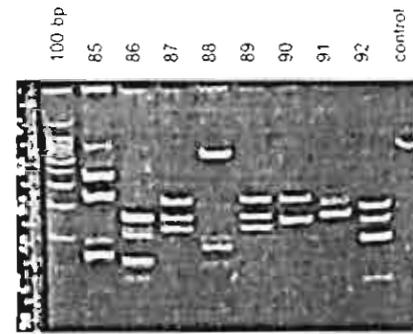
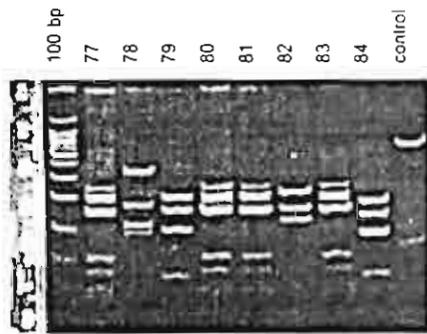
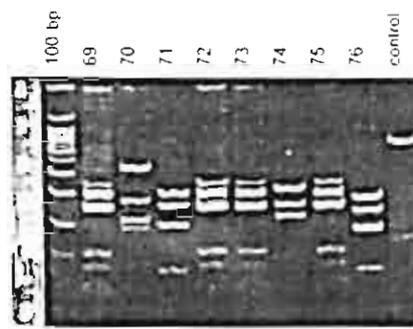
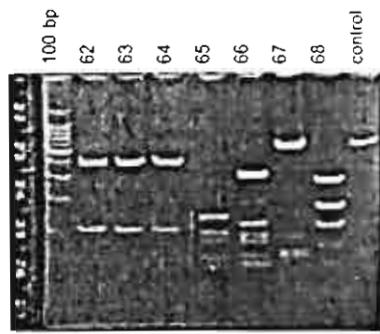
รูปที่ 1 แสดงการวิเคราะห์ผลการทำ PCR ด้วย Polyacrylamide gel electrophoresis ของตัวอย่างที่ 1-104 (รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1)



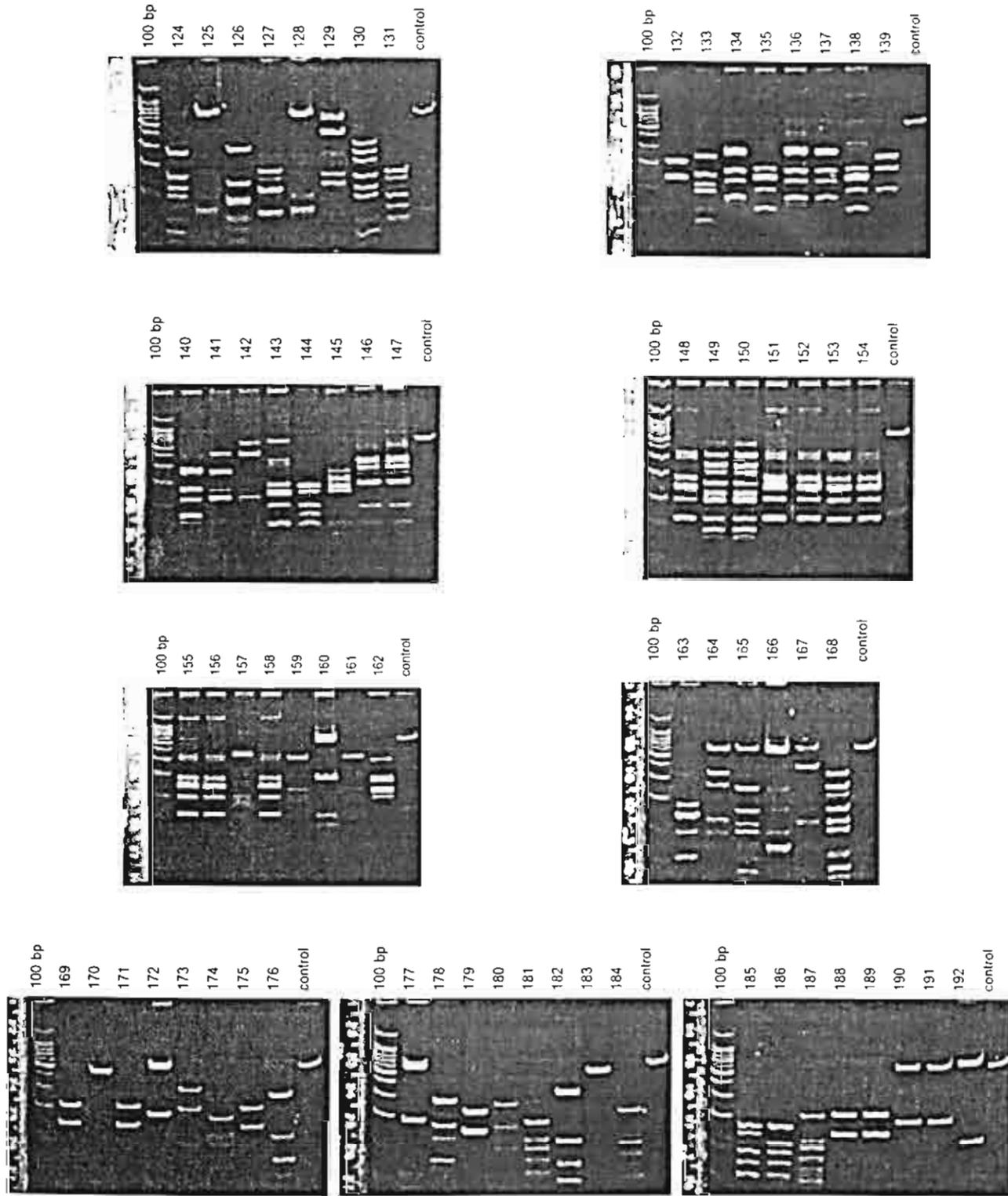
รูปที่ 2 แสดงการวิเคราะห์ผลการทำ PCR ด้วย Polyacrylamide gel electrophoresis ของตัวอย่างที่ 105-192 (รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1)



รูปที่ 3 แสดงการวิเคราะห์ผลการทำ PCR-RFLP ด้วย Polyacrylamide gel electrophoresis ของตัวอย่างที่ 1-61 (รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1)



รูปที่ 4 แสดงการวิเคราะห์ผลการทำ PCR-RFLP ด้วย Polyacrylamide gel electrophoresis ของตัวอย่างที่ 62-123 (รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1)



รูปที่ 5 แสดงการวิเคราะห์ผลการทำ PCR-RFLP ด้วย Polyacrylamide gel electrophoresis ของตัวอย่างที่ 124-192 (รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของ PCR product และชิ้นส่วนที่ได้จากการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme *AluI*

No.	GAS Strains	Size (bp) of PCR product	Size (bp) of PCR product cut with <i>AluI</i>	PCR-RFLP homology to
1	A1	1100, 950	400, 280, 200, 140, 120, 85, 47, 37, 27	M1
2	A5	1250, 1180, 1050	700, 150, 100, 85, 50	M5
3	A6	940	420, 190, 165, 60, 50	M6
4	A9	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	M11
5	A11	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	M11
6	A8	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
7	A18	820, 660	360, 160, 140	M18
8	A24	(1500), 1450	500, 420, 330, 275, 240, 200, 160, 120, 100, 85	M24
9	A39	(900, 720), 560	400, (190), 160	M39
10	A52	880, 760, 620	250, 170, 100	M52
11	X5/1	(720), 600, 480	190, 130, 100, 50	M53
12	3R	(1400), 1250	600, 350, 250	3R
13	H200	550	350, (280), 230, 160, 80	M49
14	M3	1100	350, 210, 200, 80, (45), (37)	M3
15	M4	660	300, 170, 65, 50	M4
16	M12	1250	320, 250, 190, (165, 120, 90), 80, (60), 40	M12
17	M13	760, 630	210, 180, 170, 110, 100, 80	M13
18	M25	870, 750	500, 400, 350, 270, 200, 180, 150, 55, 40	M25
19	M49	550	350, (280), 230, 160, 80	M49
20	M58	850, 750	750, 370, (230), 200	M58
21	M59	(770), 620, 490	480, 370, 160, 100, 80	M59
22	M66	870, 700	300, 230, 200, 140, 120, (50)	M66
23	M73	(960), 820	700, (140), 110	M73
24	M75	700, (520)	180, 140, 100, 50	M75
25	M76	1100, 920	320, 240, 170, 110, 90, 75, 55, (25)	M76
26	M77	470	470	M77
27	328	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
28	H92	780, 640	400, 350, 210, (120, 80)	ST2
29	K16	570	450, 110	ST4
30	H338	(920), 720	800, 600, 120	ST5

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของ PCR product และชิ้นส่วนที่ได้จากการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme *AluI*

No.	GAS Strains	Size (bp) of PCR product	Size (bp) of PCR product cut with <i>AluI</i>	PCR-RFLP homology to
31	J27	960, 800	170, (155), 120, 90, 80, 55	Not homology
32	ARF2	(1200), 1100	220, (115, 85, 70)	ST7
33	ARF1	950, 820, 610	600, (250, 170), 85, 70	ST8
34	H140	870, 700	270, 160, 100, 60, (40, 35, 23)	ST10
35	J76	1150, 840	(420, 370), 270, 140, 95, 85, 60	ST11
36	417	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
37	68	700	220, 150	M44
38	42	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	M25
39	20	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
40	38	700, (520)	180, 140, 100, 50	M75
41	64	700, (600)	290, 190, 120, 100	M70
42	52T	850	170, 110, 90, 70, 45	Not homology
43	S744	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
44	S122	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
45	H9	750, 600	250, (180), 160, 120, 70, (55)	M81
46	T006	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	M11
47	ARF3	1450	220, 115, 85, 70, 50	ST7
48	S665	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
49	ARF15	1350, 1050	160, 140, 115, 100, 70, 50	Not homology
50	ด14/5	700	220, 150	M44
51	O426	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
52	S546	700, (600)	290, 190, 120, 100	M70
53	S578	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
54	S431	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
55	S330	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
56	S219	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
57	S182	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
58	S19	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
59	S14	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
60	J59	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	M25

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของ PCR product และชิ้นส่วนที่ได้จากการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme *Alu I*

No.	GAS Strains	Size (bp) of PCR product	Size (bp) of PCR product cut with <i>Alu I</i>	PCR-RFLP homology to
61	J63A	700	220, 150	M44
62	K3	570	450, 110	ST4
63	K8	570	450, 110	ST4
64	K9	570	450, 110	ST4
65	J82A	(730), 530	135, 95, 80, 50, 35	Not homology
66	K17	1250	320, 190, 120, 90, 80, 60, 40	M12
67	J65A	950, 820, 610	600, (250, 170), 85, 70	ST8
68	AK1	870, 700	270, 160, 100, 60, 40, 35, 23	ST10
69	P26	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	M25
70	P31	(880), 760, (640)	330, 300, 170, 145, 110, 90	M33
71	P38	760	(650, 350), 200, 150, 90, 30	Not homology
72	P40	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	M25
73	P43	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	M25
74	P63	650	225, 160, 120	ST3
75	P104	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	M25
76	P127	800, 660, (530)	160, 110, 70, 27	M48
77	P157	700, 570	250, (180), 160, 120, 70, (55)	M81
78	P168	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	M25
79	P183	740	200, 160, 100, 30	Not homology
80	P209	(860), 760, (660)	330, (300), 165, (135), 110, 100	M33
81	P214	(860), 760, (660)	330, (300), 165, (135), 110, 100	M33
82	P302	950, 820, 610	600, (250, 170), 85, 70	ST8
83	P309	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	M25
84	P318	700	220, 150	M44
85	P337	(1300), 1100, (900)	760, 440, 370, 230, 100, 65, (10)	Not homology
86	P343	930, 740	150, 125, 110, 55, 25	Not homology
87	P378	650	225, 160, 120	ST3
88	P416	870, 740	560, 100, 80, 50	Not homology
89	P417	650	225, 160, 120	ST3
90	P448	700	220, 150	M44

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของ PCR product และชิ้นส่วนที่ได้จากการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme *AluI*

No.	GAS Strains	Size (bp) of PCR product	Size (bp) of PCR product cut with <i>AluI</i>	PCR-RFLP homology to
91	H510	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	M25
92	H558-559	800, 660, (530)	160, 110, 70, 27	M48
93	H886	(840), 680, 550	440, 400, 260, 155, 130, 100, 65	Not homology
94	H1621	850, 750	370, 230, 200, 50	M58
95	2433029	650	225, 160, 120	ST3
96	2450005	780	440, 300, 230, 180	M74
97	SP71	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	M25
98	SP89	(860), 770, (640)	350, 320, 190, 130, 110	M33
99	J40A	1230, 1080	(350), 260, 175, 140, 115, 55, 35, (30)	Not homology
100	U285	570	450, 110	ST4
101	GO4	800, 660, 530	160, 110, 70, 27	M48
102	ARF4	1500	400, 130, 80, 50, 30	ST9
103	H333	(960), 820	700, (140), 110	M73
104	H413	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
105	6A	1200, 1050, (860)	590, 180, 55, 40	M22
106	15A	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
107	22A	470	470	M77
108	35A	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
109	41A	870, 700	(300), 230, 200, 140, 120, (50)	M66
110	42A๗	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
111	๓45A	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
112	48	(960), 820	700, (140), 110	M73
113	49A	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
114	B55	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
115	59A	840, 700	250, 210, 200, 175, 145, 50, 40	Not homology
116	69	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
117	62	950, 820, 610	600, 85, 70	ST8
118	65	1200	250, 110, 70, 45, 35, 26, 18	M55
119	66	(780), 630, 480	240, 180, 155, 115, 100, 55	Not homology
120	67	950, 820, 610	600, (250), 85, 70	ST8

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของ PCR product และชิ้นส่วนที่ได้จากการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme *Alu I*

No.	GAS Strains	Size (bp) of PCR product	Size (bp) of PCR product cut with <i>Alu I</i>	PCR-RFLP homology to
121	70	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	M11
122	72	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
123	74	1150, 940	160, 140, (115), 100, 70, 50	Not homology
124	75	700, 570	250, (180), 160, 120, 70, (55)	M81
125	78	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	M11
126	79	1200	250, 110, 70, 45, 35, 26, 18	M55
127	80	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
128	81A	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	M11
129	85	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	M11
130	87	960, 760	680, 590, 180, (55, 40)	M22
131	88	(960), 820	700, (140), 110	M73
132	90	700	220, 150	M44
133	J41A	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
134	93	700, 570	250, (180), 160, 120, 70, (55)	M81
135	101	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
136	119	750, 600	250, (180), 160, 120, 70, (55)	M81
137	191	700, 570	250, (180), 160, 120, 70, (55)	M81
138	392	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
139	393	550	350, (280), 230, 160, 80	M49
140	400	700, 570	250, (180), 160, 120, 70, (55)	M81
141	401	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	M11
142	402	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	M11
143	403	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
144	A404	1180, (970)	160, 140, (115), 100, 70, 50	Not homology
145	406	840, 700	250, 210, 200, 175, 145, 50, 40	Not homology
146	A407	1050, 900, 800	540, 480, 310, 260, 230, 200, 105, 65	M74
147	A410	1050, 900, 800	540, 480, 310, 260, 230, 200, 105, 65	M74
148	418	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
149	S25	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
150	S178	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของ PCR product และชิ้นส่วนที่ได้จากการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme *Alu I*

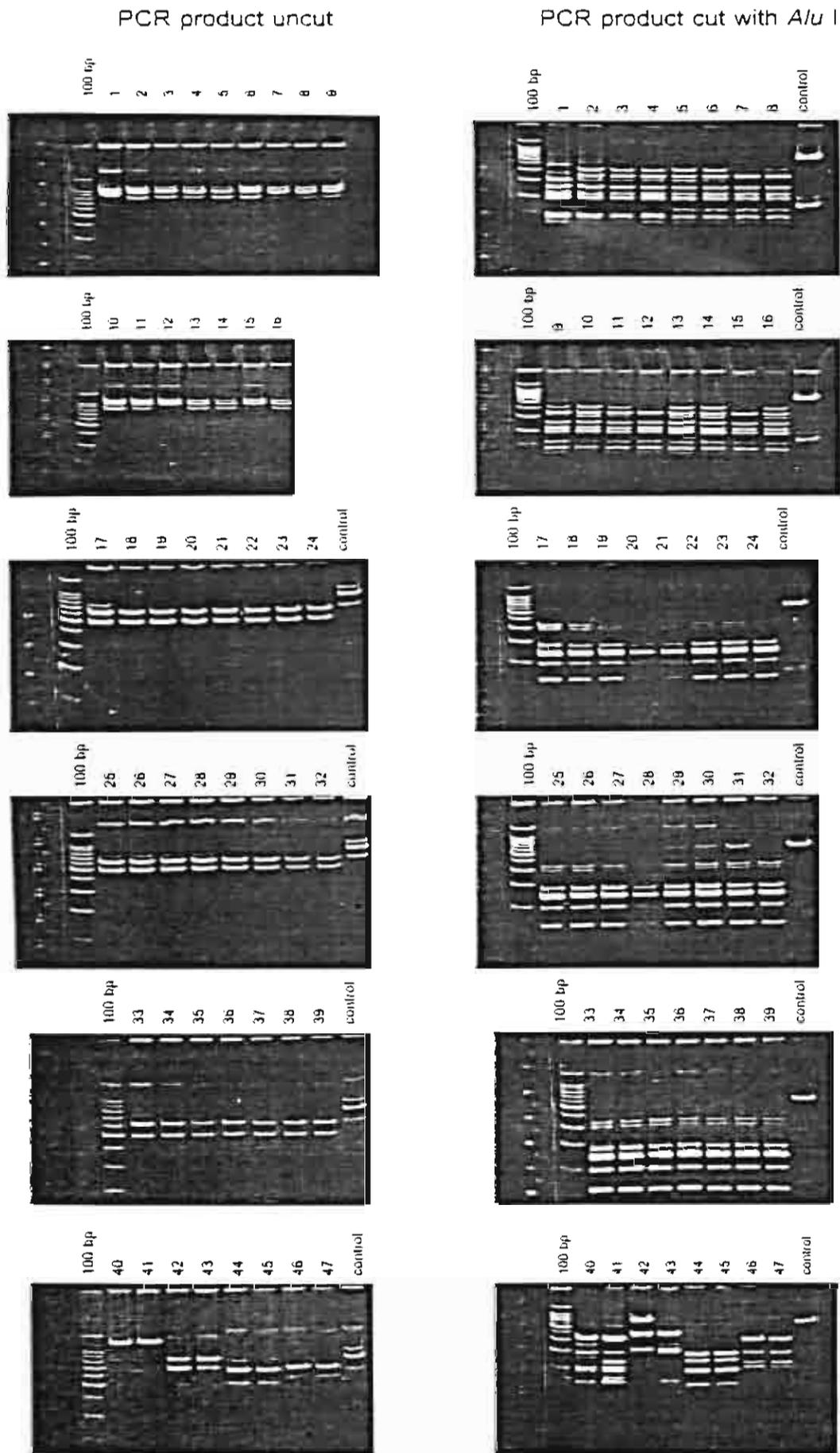
No.	GAS Strains	Size (bp) of PCR product	Size (bp) of PCR product cut with <i>Alu I</i>	PCR-RFLP homology to
151	S204	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
152	S632	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
153	S676	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
154	SP8	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
155	SP15A	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
156	SPA151	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
157	SP178	760	340, (300), 230, 150, 100, 80	Not homology
158	ปิ่นท4	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
159	020A	1300	310, 125, 110, 90, 70, 50	M12
160	068A	1000, 850	580, 180, 50, 30	Not homology
161	044A	1300	310, 125, 110, 90, 70, 50	M12
162	065A	940, (830, 680)	280, 165, 135, 90	Not homology
163	P339	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
164	P604	640	600, 320, 250, 125, 100, 70	Not homology
165	J42A	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
166	DTT061	950, 820, 610	600, (250, 170), 85, 70	ST8
167	DTT060	570	450, 110	ST4
168	DTT065	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	M1
169	DTT089	700	220, 150	M44
170	DTT093	470	470	M77
171	DTT107	700	220, 150	M44
172	DTT110	980, 820	580, 180, 50, 30	Not homology
173	DTT112	940	300, 200, 90	Not homology
174	25ปโท	960	250, 170, 110, 90, 70, 40	Not homology
175	26ปโท	700	220, 150	M44
176	ขปโท	1000, 880	260, 120, 55, 35, 30, 10	M71
177	J53A	1100, 900	580, 180, 50, 30	Not homology
178	M13.6	750, 600	250, (180), 160, 120, 70, (55)	M81
179	M1.6	1300, 1100	200, 140	M44
180	M3.6	800	(310), 240, 150, 120, 100	M71

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของ PCR product และชิ้นส่วนที่ได้จากการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme *AluI*

No	GAS Strains	Size (bp) of PCR product	Size (bp) of PCR product cut with <i>AluI</i>	PCR-RFLP homology to
181	ค20.2	1400, 1200, (1000)	(250), 170, (150), 110, 90, 80, 55	Not homology
182	ศ7.4	(920), 820, 720	460, 400, 310, 125, 100, 65, 55, 40	M71
183	21ศ	470	470	M77
184	ศ21.4	1900	210, 135, 120, 95, 65, 55, 45	Not homology
185	ศ17.6	1300, (1100)	160, 140, (115), 100, 70, 50	Not homology
186	ศ1.6	940	170, 110, 90, 70, 45	Not homology
187	ศ2.4	1900	190, 120, 100, 70, 55, 45, 40, 20	Not homology
188	J9A	700	220, 150	M44
189	J11A	700	220, 150	M44
190	J19A	870	600, 185	Not homology
191	J22A	940	600, 185	Not homology
192	J36A	(960), 820	700, (140), 110	M73

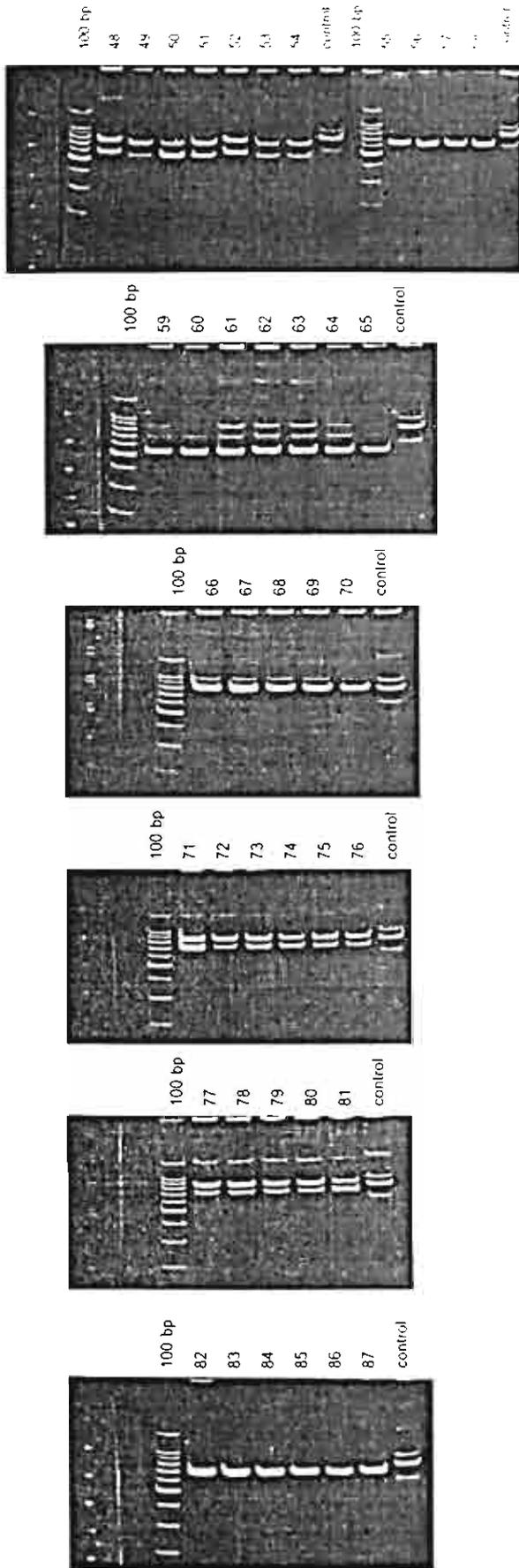
Note : ตัวเลขในวงเล็บ = ขนาดของ PCR product ที่มีความเข้มของ band ไม่ชัดเจน

Not homology = pattern ที่ได้ไม่ตรงกับ standard strain ที่มีอยู่

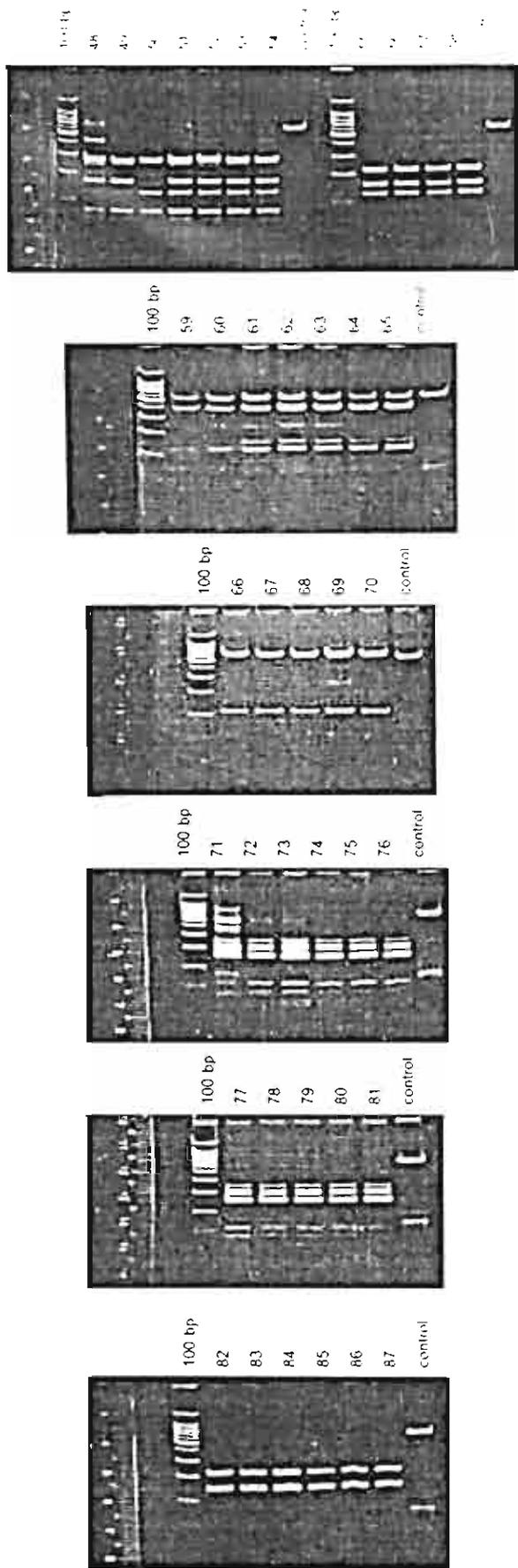


รูปที่ 6 แสดง pattern ของ PCR product ก่อนและหลังการตัดด้วย restriction enzyme *Alu* I (ตัวเลขที่ใช้มีรายละเอียดแสดงในตารางที่ 2)

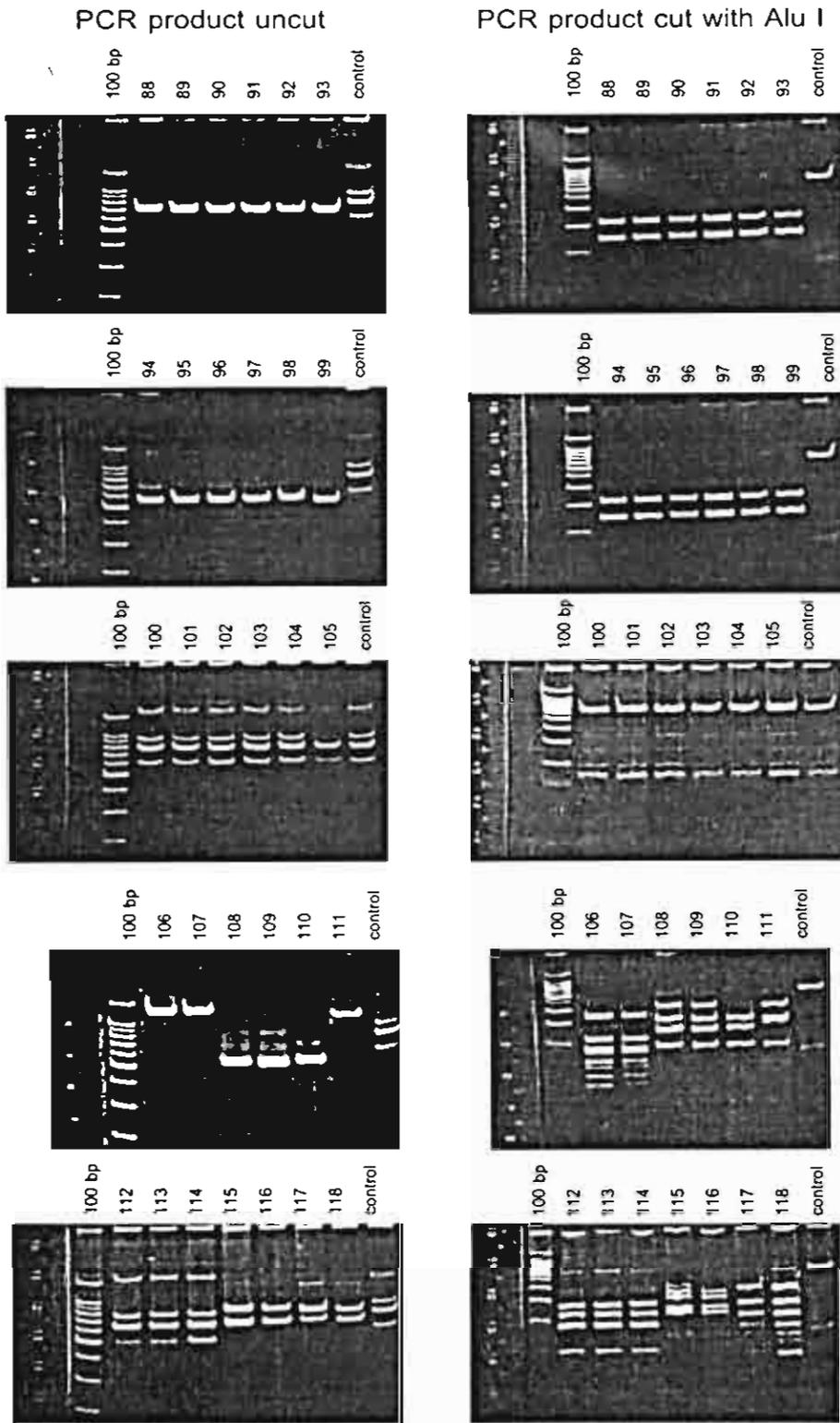
PCR product uncut



PCR product cut with *Alu* I



รูปที่ 6 แสดง pattern ของ PCR product ก่อนและหลังการตัดด้วย restriction enzyme *Alu* I (ตัวเลขที่ใช้มีรายละเอียดแสดงในตารางที่ 2)



รูปที่ 6 แสดง pattern ของ PCR product ก่อนและหลังการตัดด้วย restriction enzyme *Alu I* (ตัวเลขที่ใช้มีรายละเอียดแสดงในตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของ PCR product และชิ้นส่วนที่ได้จากการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme *Alu I* และผลการหา M type ด้วยวิธี PCR-RFLP

Number	GAS Strains	PCR product uncut (bp)	PCR product cut with <i>Alu I</i> (bp)	M type
1	A1	1100, 950	400, 280, 200, 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
2	S744	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	1
3	S219	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	1
4	S19	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 37, 27	1
5	H413	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
6	ล45A	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
7	49A	1150, 1000, 840	(300), 250, (200), 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
8	B55	1150, 1000, 840	(300), 250, (200), 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
9	69	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
10	72	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
11	80	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
12	J41A	1150, 1000, (840)	(300), 250, 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
13	S25	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
14	S178	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
15	J42A	1150, 1000, (840)	(300), 250, 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
16	DTT065	1150, 1000, 840	300, 250, 200, 140, 120, 85, 47, 37, 27	1
17	20	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
18	S122	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
19	S665	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
20	O426	650, 500	(350, 300), 180, 130, 90, 50	Potter41
21	S578	650, 500	(350, 300), 180, 130, 90, 50	Potter41
22	S431	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
23	S330	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
24	S182	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
25	S14	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
26	15A	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
27	35A	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
28	42A๓	650, 500	(350, 300), 180, 130, 90, 50	Potter41
29	101	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
30	392	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของ PCR product และชิ้นส่วนที่ได้จากการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme *Alu I* และผลการหา M type ด้วยวิธี PCR-RFLP

Number	GAS Strains	PCR product uncut (bp)	PCR product cut with <i>Alu I</i> (bp)	M type
31	403	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
32	418	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
33	S204	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
34	S632	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
35	S676	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
36	SP8	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
37	SP15A	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
38	SPA151	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
39	ปิ่นT4	650, 500	350, 300, 180, 130, 90, 50	Potter41
40	M12	1250	320, 250, 190, (165, 120, 90), 80, (60), 40	12
41	K17	1250	320, 190, 120, 90, 80, 60, 40	12
42	M58	850, 750	750, 370, (230), 200	58
43	H1621	850, 750	370, 230, 200, 50	58
44	M75	700, (520)	180, 140, 100, 50	75
45	38	700, (520)	180, 140, 100, 50	75
46	64	700, (600)	290, 190, 120, 100	70
47	S546	700, (600)	290, 190, 120, 100	70
48	H9	750, 600	250, (180), 160, 120, 70, (55)	81
49	P157	700, 570	250, (180), 160, 120, 70, (55)	81
50	75	700, 570	250, (180), 160, 120, 70, (55)	81
51	93	700, 570	250, (180), 160, 120, 70, (55)	81
52	119	750, 600	250, (180), 160, 120, 70, (55)	81
53	191	700, 570	250, (180), 160, 120, 70, (55)	81
54	400	700, 570	250, (180), 160, 120, 70, (55)	81
55	P63	650	225, 160, 120	ST3
56	P378	650	225, 160, 120	ST3
57	P417	650	225, 160, 120	ST3
58	2433029	650	225, 160, 120	ST3
59	A9	(850, 720), 570	570, 400, (150), (120)	11
60	A11	(850, 720), 570	570, 400, (150), 120	11

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของ PCR product และชิ้นส่วนที่ได้จากการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme *Alu I* และผลการหา M type ด้วยวิธี PCR-RFLP

Number	GAS Strains	PCR product uncut (bp)	PCR product cut with <i>Alu I</i> (bp)	M type
61	T006	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	11
62	70	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	11
63	78	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	11
64	85	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	11
65	402	(850, 720), 570	570, 400, 150, 120	11
66	M73	(960), 820	700, (140), 110	73
67	H333	(960), 820	700, (140), 110	73
68	48	(960), 820	700, (140), 110	73
69	88	(960), 820	700, (250), (140), 110	73
70	J36A	(960), 820	700, (140), 110	73
71	M25	870, 750	500, 400, 350, 270, 200, 180, 150, 55, 40	25
72	42	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	25
73	J59	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	25
74	P26	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	25
75	P40	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	25
76	P43	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	25
77	P104	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	25
78	P168	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	25
79	P309	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	25
80	H510	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	25
81	SP71	870, 750	270, 200, 180, 150, 55, 40	25
82	68	700	220, 150	44
83	ด14:5	700	220, 150	44
84	J63A	700	220, 150	44
85	P318	700	220, 150	44
86	P448	700	220, 150	44
87	90	700	220, 150	44
88	DTT089	700	220, 150	44
89	DTT107	700	220, 150	44
90	26ปโท	700	220, 150	44

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของ PCR product และชิ้นส่วนที่ได้จากการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme *Alu I* และผลการหา M type ด้วยวิธี PCR-RFLP

Number	GAS Strains	PCR product uncut (bp)	PCR product cut with <i>Alu I</i> (bp)	M type
91	Q16	700	220, 150	44
92	J9A	700	220, 150	44
93	J11A	700	220, 150	44
94	K16	570	450, 110	ST4
95	K3	570	450, 110	ST4
96	K8	570	450, 110	ST4
97	K9	570	450, 110	ST4
98	U285	570	450, 120	ST4
99	D11060	570	450, 120	ST4
100	ARF1	950, 820, 610	600, (250, 170), 85, 70	ST8
101	J65A	950, 820, 610	600, (250, 170), 85, 70	ST8
102	P302	950, 820, 610	600, (250, 170), 85, 70	ST8
103	62	950, 820, 610	600, 85, 70	ST8
104	67	950, 820, 610	600, (250), 85, 70	ST8
105	D11061	950, 820, 610	600, (250, 170), 85, 70	ST8
106	65	1200	250, 110, 70, 45, 35, 26, 18	55
107	79	1200	250, 110, 70, 45, 35, 26, 18	55
108	H200	850	350, (280), 230, 160, 80	49
109	M49	850	350, (280), 230, 160, 80	49
110	393	870	(350), 230, 160, 80	49
111	M3	1100	350, 210, 200, 80, (45), (37)	3
112	P127	800, 660, (530)	160, 110, 70, 27	48
113	H558-559	800, 660, (530)	160, 110, 70, 27	48
114	G04	800, 660, 530	160, 110, 70, 27	48
115	M66	870, 700	300, 230, 200, 140, 120, (50)	66
116	41A	870, 700	(300), 230, 200, 140, 120, (50)	66
117	H140	870, 700	270, 160, 100, 60, (40, 35, 23)	ST10
118	AK1	870, 700	270, 160, 100, 60, 40, 35, 23	ST10

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างวิธี PCR-RFLP กับ DNA sequencing

GAS Strains	PCR-RFLP homology to	DNA sequencing homology to
A1	M1	M1
S744	M1	M1
S219	M1	M1
H413	M1	M1
ล45A	M1	M1
69	M1	M1
J41A	M1	M1
J42A	M1	M1
A9	M11	M11
A11	M11	M11
T006	M11	M11
70	M11	M11
78	M11	M11
81A	M11	M11
85	M11	M11
401	M11	M11
402	M11	M11
65	M55	M55
79	M55	M55
393	M49	M49
M3	M3	M3
M12	M12	M12
K17	M12	M12
020A	M12	M12
6A	M22	M22
87	M22	M22
M2	M25	M25
42	M25	M25

GAS Strains	PCR-RFLP homology to	DNA sequencing homology to
P26	M25	M25
P127	M48	M48
H555-559	M48	M48
GO4	M48	M48
H1-11	M58	M58
41	M66	M66
M77	M73	M73
H2	M73	M73
88	M73	M73
38	M75	M75
22	M77	M77
D7	M77	M77
21	M77	M77
D7	Not homology	ST1
U3	ST4	ST4
D7	ST4	ST4
A7	ST7	ST7
P3	ST8	ST8
67	ST8	ST8
67	ST8	ST8
D7	ST8	ST8
A7	ST9	ST9
P3	M44	M44
20	Potter 41	Potter41
17	Potter 41	Potter41
47	Potter 41	Potter41
P3	Potter 41	Potter41
H7	M81	M81
P7	M81	M81
75	M81	M81

GAG Strains	PCR-RFLP homology to	DNA sequencing homology to
93	M81	M81
11	M81	M81
409	M81	M81
๙.1315	M81	M81
P63	ST3	ST3
P37	ST3	ST3
P41	Not homology	STBSA29
A๙๙๙	Not homology	ST4532
7๙	Not homology	ST 4532
A4๙๙	Not homology	ST 4532
๙17๙	Not homology	ST 4532
H๙๙	Not homology	TR2612
J๙๙	Not homology	ST3018
0๙๙	Not homology	ST3018
E 110	Not homology	ST3018
J5๙๙	Not homology	ST3018
5๙๙	Not homology	PT2841
2๙๙๙	Not homology	M protein precursor U92492.1
๙๙๙๙	Not homology	M protein precursor U92492.1
๙๙๙๙	Not homology	M protein precursor U92492.1
5๙๙๙	Not homology	M protein precursor U92492.1
1๙๙๙	Not homology	M71
๙๙๙๙	Not homology	M71
๙๙๙๙	Not homology	M71
2๙๙๙๙	Not homology	M74
A๙๙๙๙	Not homology	M74
P๙๙๙๙	Not homology	M33
S๙๙๙๙	Not homology	M33
F๙๙๙๙	Not homology	ST6735
C๙๙๙๙	Not homology	M53

Note: Not homology = pattern ที่ได้ไม่ตรงกับ standard strain ที่มีอยู่

ตารางที่ 4 แสดงผลการทำ M typing โดยอาศัยหลักการ PCR-ELISA ทดสอบโดยใช้ M type เดียวกันในกระบวนการ hybridize

coat	probe	O.D. (405 nm)
A8	A8	2.42
A8	A18	0.25
A18	A18	1.86
A18	A8	0.27
S744	S744	1.72
M24	M24	1.63
65	65	1.37
3R	3R	1.13
M3	M3	1.27
ARF3	ARF3	1.32
ARF4	ARF4	1.49
ARF15	ARF15	2.56
DTT110	DTT110	1.45
59A	59A	2.92

ตารางที่ 5 แสดงผลการหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PCR product ในการ coat ลงใน ELISA plate และ hybridize

Experiment 1

coat A1	probe A1	200 ng/well	100 ng/well	50 ng/well	25 ng/well
200 ng/well		0.268	1.977	1.455	1.193
100 ng/well		0.31	2.011	1.572	1.284
50 ng/well		1.22	1.089	0.333	0.799
25 ng/well		0.442	0.422	0.417	0.306

Experiment 2

A11	B11	200 ng/well	100 ng/well	50 ng/well	25 ng/well
100	100	1.481	1.161	0.901	0.645
100	50	0.983	0.797	0.633	0.495
100	25	0.399	0.353	0.309	0.248
25	25	0.23	0.217	0.183	0.156

Experiment 3

c	113	200 ng/well	100 ng/well	50 ng/well	25 ng/well
100	100	1.174	0.993	0.8	0.614
100	50	0.613	0.561	0.467	0.391
100	25	0.239	0.207	0.215	0.201
25	25	0.149	0.156	0.159	0.133

ตารางที่ 6 แสดงผลการทำ M typing โดยอาศัยหลักการ PCR-ELISA ทดสอบโดยใช้ M type เดียวกันและต่าง M type ในการ hybridize

Experiment 1

coat 200 ng/well	probe 200 ng/well	O.D. (405 nm)
A1	A1	1.5265
A11	A11	1.602
A11	A13	1.475
A1	A11	0.874
A1	A18	0.545
A11	A1	0.945
A13	A1	0.7985
A1	Blank	0.1

Experiment 2

coat 200 ng/well	probe 200 ng/well	O.D. (405 nm)
A1	A1	1.6175
A11	A11	1.43
A11	A13	1.449
A1	A11	0.7775
A1	A18	0.444
A11	A1	0.904
A11	A1	0.717
A1	Blank	0.2
A13	A1	0.299
A13	A1	0.617
A11	A1	0.446
A11	A1	0.588
A11	A1	0.221
A1	A1	0.248
Blank	Blank	0.1785

ตารางที่ 7 แสดงผลการทำ M typing โดยอาศัยหลักการ PCR-ELISA ทดสอบโดยใช้ M type เดียวกันและต่าง M type ในการ hybridize

Experiment 1

coat 200 ng	probe 200 ng	O.D.(405 nm)
A1	A1	1.3745
A11	A11	2.177
A18	A18	1.7885
A1	A11	0.8325
A1	A18	0.567
A11	A1	0.7955
A18	A1	0.5245
BLANK	BLANK/A1	0.097
A5	A1	0.417
A24	A1	0.608
A52	A1	0.867
A51	A1	0.966
A	A1	0.335
3R	A1	0.458
NR	A1	0.693
D3	A1	0.428
LN	A1	0.441
A17	A1	0.4
A11	A1	0.748
D1	A1	0.721
A14	A1	0.54
NR	A1	0.501
A	A1	0.572
A15	A1	0.574
A2	A1	0.656
A16	A1	0.444
A	A1	0.79
A13	A1	0.441
A	A1	0.606
A	A1	0.871
A	A1	0.736
A	A1	0.806

Experiment 2

coat 200 ng	probe 200 ng	O.D.(405 nm)
A1	A1	1.3745
A11	A11	2.177
A18	A18	1.7885
A1	A11	0.8325
A1	A18	0.567
A11	A1	0.7955
	A1	0.5245
Blank	BLANK/A1	0.097
	A18	0.952
A1	A18	0.633
A11	A18	0.831
A18	A18	0.548
	A18	0.413
	A18	0.458
	A18	0.524
	A18	0.567
	A18	0.551
	A18	0.6
	A18	0.579
	A18	0.517
	A18	0.527
	A18	0.565
A1	A18	0.478
A11	A18	0.713
A18	A18	0.597
	A18	0.635
	A18	0.663
	A18	1.493
	A18	0.558
	A18	0.577
	A18	0.569
	A18	0.789

Experiment 3

coat 10 ng	probe 200 ng	O.D.(405 nm)
	A1	1.5075
A1	A11	2.283
A1	A18	1.8545
A1	A11	0.836
A1	A18	0.7405
A1	A1	0.7225
A1	A1	0.6325
AK1	BLANK A1	0.099
	AK1	0.597
	AK1	0.448
	AK1	1.435
	AK1	1.066
	AK1	0.844
	AK1	0.945
	AK1	0.642
	AK1	0.53
	AK1	0.567
	AK1	0.49
	AK1	0.7
	AK1	0.651
	AK1	0.676
	AK1	0.86
	AK1	0.793
	AK1	0.717
	AK1	0.836
	AK1	0.585
	AK1	0.659
	AK1	0.702
3	AK1	0.770
1	AK1	0.890
	AK1	2.179
	AK1	0.801
	AK1	0.755
	AK1	0.60
	AK1	0.690

บทวิจารณ์

ในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของเชื้อ GAS จำเป็นต้องอาศัยวิธีการ typing ที่เหมาะสม เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนต่อไปในอนาคต ซึ่งวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการ typing เชื้อ GAS คือ serotyping แต่วิธีนี้เป็นวิธีที่มีข้อจำกัด เนื่องจากความยุ่งยากในการเตรียม antisera เพราะจำนวน M type มีมากกว่า 80 M types และห้องปฏิบัติการที่มี M antisera ครอบคลุม M type มีเพียงไม่กี่แห่งในโลก และนอกจากนี้ เชื้อ GAS ที่แยกได้ในประเทศที่กำลังพัฒนา มากกว่า 80% เป็นเชื้อที่ไม่สามารถ typing ได้ด้วยวิธี serotyping ซึ่งอาจเนื่องจากเชื้อไม่สร้าง M protein หรือไม่มี M antisera ที่จำเพาะกับ M protein ของเชื้อที่ทดสอบ ดังนั้นจึงได้มีการนำวิธี genotyping มาใช้แทนวิธีดั้งเดิม และในการศึกษาครั้งนี้ เราได้พัฒนาวิธีการทำ M typing ขึ้น เพื่อที่จะสามารถ typing เชื้อดังกล่าวให้ได้มากที่สุด คือวิธี PCR-RFLP และ PCR-ELISA และเพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของทั้งสองวิธีนี้ เราได้ทำการหาลำดับเบสของ M protein gene ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลถูกต้องที่สุดในการบอก M type ของเชื้อ GAS

จากการทำ PCR-RFLP พบว่า เชื้อที่ type ได้ด้วยวิธีนี้ ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อที่มี M type ตรงกันกับเชื้อมาตรฐานที่มีอยู่ อีกทั้งผลการยืนยันด้วยการหาลำดับเบส ก็พบว่าวิธี PCR-RFLP ให้ผล M type ที่สอดคล้องกันกับการหาลำดับเบส M protein gene ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถบอก M type ได้ เนื่องจาก RFLP pattern ไม่เหมือนกันกับเชื้อมาตรฐานที่มีอยู่ ก็จะนำไปทำการหาลำดับเบสของ M protein gene ซึ่งวิธี PCR-RFLP นี้สามารถช่วยลดปริมาณตัวอย่างที่จะนำไปทำการหาลำดับเบสของ M protein gene จึงเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายในการทำ M typing ลงได้มาก นอกจากนี้ เมื่อทราบ M type ของเชื้อเหล่านี้แล้วก็สามารถนำมาเป็นเชื้อมาตรฐานต่อไป ทำให้สามารถเพิ่มความสามารถในการ typing ขึ้นได้อีก และวิธีนี้ยังเป็นการทำ M typing ที่ไม่ยุ่งยากและใช้เครื่องมือพื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไปคือเครื่อง Thermal cycler และเครื่องมือสำหรับ run polyacrylamide gel electrophoresis อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ได้ในทุกแห่งทั่วโลก ซึ่งแต่ละห้องปฏิบัติการก็จะมีเชื้อ M type ที่ระบอดอยู่แตกต่างกันไป ดังนั้นในแต่ละห้องปฏิบัติการก็จะมีเชื้อมาตรฐานของตนเอง และโดยวิธี PCR-RFLP นี้ ก็สามารถนำไปใช้ในการ typing เชื้อที่ระบอดในห้องปฏิบัติการนั้นๆ ได้

จากการทำ PCR-ELISA พบว่าสามารถใช้ในการทำ M typing ได้เช่นเดียวกัน โดยจะคล้ายกับวิธี PCR-RFLP คือสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทุกแห่งทั่วโลก โดยแต่ละห้องปฏิบัติการก็จะมีเชื้อที่ระบอดอยู่ต่าง M type กันก็จะมีเชื้อมาตรฐานที่จะนำมาทดสอบเป็นของตัวเอง หากเชื้อใดที่ type ไม่ได้ด้วยวิธีนี้ อาจนำไป typing ด้วยวิธีอื่น เช่น PCR-RFLP หรือ นำไปหาลำดับเบสของ M protein gene ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะไม่สามารถ typing เชื้อ GAS ได้ทั้งหมด แต่ก็ เป็นวิธีที่สามารถช่วยลดปริมาณตัวอย่างที่จะนำไปทำการหาลำดับเบสของ M protein gene จึงเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายในการทำ M typing ลงได้มาก เช่นเดียวกับกับวิธี PCR-RFLP อีกทั้งในการทำ PCR-ELISA เพียงครั้งเดียวใน ELISA plate ก็สามารถทราบผล M type ได้ทันที จึงเป็นวิธีที่

สะดวก สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่มีเครื่อง Thermal cycler และ ELISA plate reader ซึ่งห้องปฏิบัติการทั่วไปก็จะมีใช้อยู่แล้ว ดังนั้นวิธี PCR-ELISA นี้ จึงเป็นวิธีการทำ M typing อีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ได้จริง แต่อาจจะพบ cross hybridization ได้

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่า วิธีการทำ M typing โดยอาศัยหลักการ PCR-RFLP เป็นวิธีที่สามารถ typing เชื้อ GAS ได้ถูกต้อง ในการนำไปใช้งานจริง ในการ typing เชื้อที่ระบาดอยู่ในท้องถิ่น ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับความพร้อมของห้องปฏิบัติการนั้นๆ ว่ามีเครื่องมือที่จำเป็นต้องใช้หรือไม่ แล้วเลือกวิธีที่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการของตนเอง โดยเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ทราบ M type ที่จะนำมาใช้ในการทดสอบก็จะเป็นเชื้อที่ระบาดอยู่ในท้องถิ่นนั้นๆ จึงเป็นวิธีที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับทุกๆ แห่งทั่วโลก ซึ่งเมื่อทราบ M type ที่ระบาดในท้องถิ่นแล้ว ข้อมูลที่ได้เหล่านี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาวัคซีนที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการติดเชื้อ GAS ได้ทุก M type หรือเกือบทุก M type ที่ระบาดอยู่ในท้องถิ่นนั้นๆ

หนังสืออ้างอิง

1. Beachey, E.H., and Cunningham, M.W. (1973). Type-specific inhibition of preopsonization versus immunoprecipitation by streptococcal M proteins. **Infect. Immun.**, 8:19-24.
2. Bessen, D.E., and Fischetti, V.a. (1992). Nucleotide sequences of two adjacent M or M-like protein genes of group A streptococci: different RNA transcript levels and identification of a unique immunoglobulin A-binding protein. **Infect. Immun.**, 60: 124-135.
3. Bingen, E., denamur, E., Lambert-Zechovsky, N., Braimi, N., Elladany, M., and Elion, J, (1992a). DNA restriction fragment length polymorphism differentiates recurrence from relapse in treatment failures of *Streptococcus pyogenes* pharyngitis. **J.Med. Microbiol.**, 37:162-164.
4. Bingen, E., denamur, E., Lambert-Zechovsky, N., Boissinot, C., Brahim, N., Aujard, Y., Blot, P., and Elion, J. (1992b), Mother-to-infant vertical transmission and cross-colonization of *Streptococcus pyogenes* confirmed by DNA restriction fragment length polymorphism analysis. **J. Infect.Dis.**, 165:147-150.
5. Cleary, P.P., Kaplan, E.L., Lindahl, C., and Skjold, S. (1988). DNA fingerprints of *Streptococcus pyogenes* are M type specific. **J. Infect. Dis.**, 158: 1317-1322.
6. Cunningham, M.W., and Russell, S.M. (1983). Study of heart-reactive antibody in antisera and hybridoma culture fluids against group A streptococci. **Infect. Immune.** 42:2760-2766.
7. Cunningham, M.W., McCormack, J.M., Talaber, L.R., Harley, J.B., Ayoub, E.M., Muneer, R.S., Chun, L.T., and Reddy, D.V. (1988). Human monoclonal antibody reactive with antigens of the group A streptococcus and human heart. **J. Immunol.**, 141: 2760-2766.
8. Dale, J.B. and Beachey, E.H. (1986). Sequence of myosin- cross reactive epitopes of streptococcal M proteins. **J. Exp. Med.**, 164: 1785-1790.
9. Facklam, R.R., and Edwards, L.R. (1979). A reference laboratory's investigations of proposed M-type strains of streptococcus pyogenes, capsular types of *S. agalactiae*, and new group antigens of streptococci. In: Pathogenic Streptococci. by M.T.Parker, ed. Reedbooks Ltd., Surrey, England, p251.

10. Fenderson, P.G., Fischetti, V.A., and Cunningham, M.W. (1989). Tropomyosin shared immunologic epitopes with group A streptococcal M proteins. **J. Immunol.**, 142: 2475.
11. Fischetti, V.A., Jones, K.F., and Scott, J.R. (1985). Size variation of the M protein in group A streptococci. **J. Exp. Med.**, 161: 1384-1401.
12. Fischetti, V.A. (1991). Streptococcal M protein. **Scientific American.**, June: 32-39.
13. Fox, E.N. (1974). M proteins of group A streptococci. **Bacteriol Rev.**, 38: 57-86.
14. Gardiner, D., Hartas, J., Currie, B., Mathews, J.D., Kemp, D.J., and Sriprakash, K.S. (1995). Vir-Typing: A long-PCR typing method for group A streptococci. **PCR. Method. App.**, 4: 288-293.
15. Haanes-Fritz, E., Kraus, W., Burdett, V., Dale, J.B., and Beachey, E.H. (1988). Comparison of the leader sequence of four group A streptococcal M protein genes. **Nucleic. Acid. Res.**, 16: 4667-4677.
16. Hollingshead, S.K., Readdy, T.L., Young, D.L., and Bessen, D.E. (1993). Structural heterogeneity of the emm gene cluster in group A streptococci. **Mol. Microbiol.**, 8:707-717.
17. Jones, K.F., and Fischetti, V.A. (1988). The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A streptococci. **J. Exp. Med.**, 167: 1114-1123.
18. Kaplan, E.L., Johnson, D.J., and Cleary, P.P. (1989). Group A streptococcal serotype isolate from patients and sibling contacts during the resurgence of rheumatic fever in the United States in the mid-1980s. **J. Infect. Dis.**, 159:101-103
19. Kaplan, E.L., Johnson, D.R., Nanthapisud, P., Sililertpanrana, S., and Chumdermpadetsuk, S. (1992). A Comparison of group A streptococcal serotypes isolates from the upper respiratory tract in the USA and Thailand: Implications. **Bull. Of WHO.**, 70: 433-437.
20. Kaufhold, A., Podbielski, A., Johnson, D.R., Kaplan, E.L., and Lutticken, R. (1992). M protein gene typing of *Streptococcus pyogenes* by nonradioactively labeled oligonucleotide probes. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 2391-2397.
21. Khandke, K.M., Fairwell, T., Acharya, A.S., and Manjula, B.N. (1990). Domain structure and molecular flexibility of streptococcal M protein in situ probed by limited proteolysis. **J. Prot. Chem.** 9:511-522.
22. Lancefield, R.C. (1962). Current knowledge of type specific M antigens of group A streptococci. **J. Immunol.**, 89: 307-313.

23. Manjula, B.N., Acharya, A.S., Fairwell, T., and Fischetti, V.A. (1986). Antigenic domains of the streptococcal pep M5 protein: localization of epitopes crossreactive with type 6 M protein and identification of a hypervariable region of M molecule. **J. Exp. Med.**, 163: 129-138.
24. Miller, L., Grey, L., Beachey, E.H., and Kehoe, M.A. (1988). Antigenic variation among group A streptococcal M proteins: nucleotide sequence of serotype 5 M protein gene and its relationship with gene encoding type 6 and type 24 M protein. **J. Biol. Chem.**, 263: 5668-5673.
25. Pruksakorn, S., Phornphutkul, C., Boonchoo, S., Supasert, S., Krairojananan, M., Boonthum, A., Murai, T., Inazumi, Y., Sriburee, P., and Tharavichitkul, P. (1990). Prevalence of group A streptococci from school children and patients in Chiangmai, Thailand. **Chiangmai. Med. Bull.**, 29: 15-26.
26. Seppala, H., He, Q., Osterblad, M., and Huovinen, P. (1994a). Typing of group A streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 1945-1948.
27. Seppala, H., Vuopio-Varkila, J., Osterblad, M., Jahkola, H., Rummukainen, M., Holm, S.E., and Huovinen, P. (1994b). Evaluation of method for epidemiologic typing of group A streptococci. **J. Inf, Dis.**, 169: 519-525.
28. Van de Rijn, I., and Fischetti, V.A. (1981). Immunochemical analysis of intact M protein secreted from cell wall-less streptococci. **Infect. Immun.**, 32: 86-91.

Output

ผลงานที่กำลังส่งไปตีพิมพ์ที่ Journal of Clinical Microbiology

Rapid molecular typing of the group A streptococcal M protein gene in Thai isolates

NONGLAK YOONIM¹, NOPPORN SITTISOMBUT¹,
CHULABHORN PRUKSACHATKUNAKORN², COLLEEN OLIVE³,
AND SUMALEE PRUKSAKORN^{1*}

¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai
50200, Thailand.

²Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai
50200, Thailand.

³Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Queensland 4029, Australia.

Corresponding author: Dr. Sumalee Pruksakorn, Department of Microbiology,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

Telephone: (66)(53)945338. Fax: (66)(53)217144. E-mail: spruksak@mail.med.cmu.ac.th

Rapid molecular typing of the group A streptococcal M protein gene in Thai isolates

NONGLAK YOONIM¹, NOPPORN SITTISOMBUT¹, CHULABHORN PRUKSACHATKUNAKORN², COLLEEN OLIVE³, AND SUMALEE PRUKSAKORN^{1*}

Department of Microbiology¹ and Department of Pediatrics², Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand, and Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Queensland 4029, Australia³

A polymerase chain reaction (PCR)-based protocol was developed for molecular typing the M protein gene (*emm*) of group A streptococcus (GAS). The N-terminal region, including the A- and B-regions, of the *emm* gene from several GAS isolates was amplified by PCR prior to digestion with the restriction enzyme, *Alu* I. PCR products were then resolved by polyacrylamide gel electrophoresis. Using this protocol, 14 known GAS M types revealed different restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns. Of ninety nine GAS isolates examined from the normal Thai population and from patients with GAS-associated complications including rheumatic heart disease, all gave RFLP patterns that corresponded to the 14 known M types. Furthermore, sequencing of several of the M genotypes confirmed the RFLP data. Thus, this PCR-RFLP protocol has the potential to be a powerful tool for the rapid screening of GAS *emm* types.

Streptococcus pyogenes or group A streptococcus (GAS) causes several diseases including necrotizing fasciitis and the postinfectious sequelae- rheumatic fever (RF), rheumatic heart disease (RHD), and acute glomerulonephritis (10). The GAS surface M protein is known to prevent opsonophagocytosis and is an important virulence factor in GAS infection. The N-terminal region of the M protein is highly variable between different GAS strains and contains a type-specific moiety that is recognized by specific typing antisera in the precipitation test (10). However, there are several difficulties with the classical M serotyping method, including ambiguities in the results, the emergence of new M types and difficulties in the preparation of high titer antisera for all of the known serotypes. Therefore, serological typing is currently only used in a few International Reference Centers worldwide. Many GAS isolates are also M nontypeable, either because of a lack in M protein expression or the unavailability of specific typing antisera. As a consequence, there has recently been an interest in the development of alternative methods for M typing utilizing molecular technologies.

DNA analysis has been used for GAS M typing, including restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of total DNA (3, 5, 23), ribotyping (3, 23) and DNA-RFLP analysis with rarely cutting restriction endonucleases coupled with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (8, 24). These techniques can differentiate between strains with different M serotypes and also epidemiological distinct strains within a specific M serotype. Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) is a valuable method for the differentiation of species of pyogenic streptococci and the estimation of the genetic relationships between them (2, 13, 17). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) (22) analysis is faster, technically easier, and more economical than RFLP, PFGE, MLEE and ribotyping methods for M typing.

Oligotyping uses oligonucleotide probes corresponding to the N-terminal sequences of the *emm* gene (14, 15, 18) and provides an excellent tool for reliable strain identification. PCR-enzyme linked immunosorbant assay (21) is based on the hybridization of labeled *emm*

gene PCR amplicons to type-specific capture oligonucleotides. This method is very accurate and has a high specificity. *Vir* typing is based on PCR amplification of the *Vir* regulon of GAS (11, 12) and PCR-RFLP analysis uses PCR to amplify the gene encoding the M protein (8, 19, 25). PCR products from both methods are subsequently digested with restriction enzymes and analyzed by agarose gel electrophoresis. Oligonucleotide probes have been used as oligonucleotide primers for PCR amplification of the N-terminal region of the *emm* gene (PCR M typing) (26). The advantages of these methods are that they are relatively easy to perform, highly discriminatory, reproducible and they allow unambiguous interpretation of the results generated.

Sequencing of the M protein gene (1, 4) is particularly useful for distinguishing between strains within a given serotype and for differentiating among isolates that possess the M protein but are nontypeable by classical serotyping. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism (FAFLP) analysis is a novel PCR-based technique, which has been used for GAS DNA fingerprinting (6, 7). This method uses the automated sequencer and software in terms of data capture and quality. It requires no prior knowledge of DNA sequences and potentially offers high discriminatory power and speed. Recently, multilocus sequence typing (MLST) has been developed for GAS typing (8, 9). It has a high resolving power and can discriminate among isolates of a single *emm* type.

Each of these methods holds promise as a potential alternative to conventional serotyping. However, they can have limitations depending on the principal of each method. For example, some methods are time consuming, labor intensive, and subject to experimental variation leading to difficulties in the interpretation of data. These limit the ability to rapidly evaluate large numbers of strains. Furthermore, some methods cannot differentiate between all M serotypes. In addition, some methods require expensive instruments and reagents.

In Thailand, greater than 80% of GAS strains circulating in the population are M nontypeable by conventional M serotyping (20). It is well established that the accurate identification of GAS is an essential tool in studies relating to the epidemiology, prevention, disease pathogenesis, and therapy of streptococcal infections. However, the most appropriate method of GAS M typing, particularly in less affluent countries, has not been devised.

The purpose of this study was to analyze the N-terminal A- and B-regions of the M protein gene (*emm*) of Thai GAS isolates using a polymerase chain reaction (PCR)-RFLP protocol. PCR products were digested with an appropriate restriction enzyme and the fragments analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). We chose to analyze these regions because A-region is highly variable among M serotypes and B-region is also variable, whereas C-region is highly conserved. This method should prove useful for GAS M typing in areas where GAS are endemic and in which the majority of isolates are M nontypeable by serotyping. The data obtained from this study will be useful for epidemiological studies and vaccine development.

Bacteria: Fourteen known GAS M serotypes and 99 strains of GAS isolated from the normal Thai population, patients with sore throat, rheumatic heart disease or impetigo from 1985, 1990, 1995 and 2000 were included in this study.

DNA isolation and PCR: DNA was isolated from GAS based on the method previously described (20). The sense primer, 5' CAGTATTCGCTTAGAAAATTAAAA 3', is derived from the leader sequence of the M protein gene (16). The antisense primer, 5' CCCTTACGGCTTGCTTCTGA 3', is derived from the C-repeat region of the M protein gene (20). These primers were also used for sequencing analysis.

The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 45°C for 30 s, and extension at 72°C for 2 min for 35 cycles. The PCR products were partially purified by ethanol precipitation prior to quantitation and digestion with the *Alu* I restriction

enzyme according to the manufacturer's specifications. Digested PCR products were separated on a 15% polyacrylamide gel in 89 mM Tris (pH 7.6), 89 mM Boric Acid, 2 mM EDTA and compared to the undigested *emm* amplicon and the 100 bp standard marker following staining with ethidium bromide.

DNA sequence analysis: PCR products were sequenced using the ABI Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit according to the manufacturer's instructions (The Perkin-Elmer Corporation) and analysed using an ABI 310 automated sequencer (The Perkin-Elmer Corporation). DNA sequences were transferred to the DNASIS program for sequence comparison between isolates. The BLAST 2 program (NCBI) was used to determine the levels of DNA homology with published sequences in the GenBank database.

PCR-RFLP analysis: PCR-RFLP measures restriction fragment length polymorphism within the N-terminus of *emm* gene. Based on the variable of this region that encodes N-terminus of M protein, PCR amplification of this region and then digestion with appropriate restriction enzyme should give different digested fragment patterns among GAS. Based on the *emm* sequences deposited in GenBank database and the analysis using restriction mapper program (www.res.ibm.com/jpetrol/), we chose a suitable restriction enzyme, *Alu* I, because almost all of these sequences contained at least one *Alu* I site in different positions in their sequences. Therefore, the *Alu* I digestion was likely to give different digested fragment patterns among GAS M types.

In total, 113 GAS isolates were studied by PCR-RFLP. When the A- and B-regions of *emm* gene from 14 known GAS M serotypes were amplified, resultant amplicons consisted of one to three bands, which varied from approximately 500 to 1200 base pairs (bp) depending on the M types and the GAS strains (Fig. 1). Faint multiple bands and/or bands longer than 1500 bp were considered non-specific PCR products as we used low temperature for the annealing step. The amplicons of 14 known GAS M serotypes could be divided into ten

different patterns because some M types resulted in *emm* amplicons of similar sizes. For example, M49 and ST4 (Lane 3 and 8 in Fig. 1), M44 and ST3 (Lane 10 and 13 in Fig. 1), and M81 and M66 (Lane 12 and 14 in Fig. 1) were indistinguishable. After digesting with *Alu* I, however, the 14 known GAS M serotypes gave 14 different RFLP patterns of two to nine distinct fragments, which ranged from approximately 25 to 700 bp (Fig. 2). The sizes of the amplicons and their *Alu* I restricted fragments are summarized in Table 1. Similar analyses revealed that *Alu* I RFLP patterns of the *emm* amplicons from 99 unknown GAS samples corresponded to the 14 known M types (Fig. 2). The number and percentage of the isolates that corresponded to the known M types are shown in Table 1.

Confirmation of the M type designation by PCR-RFLP pattern was performed by DNA sequence analysis. We sequenced 7 unknown isolates of M1-RFLP pattern, 8 isolates of M11-RFLP pattern, 2 isolates of M12-RFLP pattern, 2 isolates of M25-RFLP pattern, 1 isolate of M44-RFLP pattern, 2 isolates of M48-RFLP pattern, 1 isolate of M49-RFLP pattern, 1 isolate of M66-RFLP pattern, 2 isolates of M73-RFLP pattern, 6 isolates of M81-RFLP pattern, 3 isolates of Potter41-RFLP pattern, 1 isolate of ST3-RFLP pattern, 2 isolates of ST4-RFLP pattern, and 4 isolates of ST8-RFLP pattern. In every case the 5' sequences of the amplified products revealed a perfect correlation between PCR-RFLP designation and M type based on DNA sequence analysis.

For decades serotyping has been the method of choice in epidemiological studies of GAS. However, serotyping is not straightforward, time consuming and it is often difficult to produce high titer M type-specific antisera. Therefore, it is limited to a few laboratories in the world. To overcome these limitations, various genomic typing methods have been developed (2, 3, 11, 12, 14, 15, 18, 21, 22, 23, 24). Recently, a PCR-RFLP analysis of *emm* genes was reported (25). The results of the study showed that the RFLP patterns of the *emm* gene amplicons after PCR amplification and digestion with *Hae* III restriction enzyme were easier

to analyze than RFLP analysis of total DNA and ribotyping. PCR-RFLP analysis also revealed different RFLP patterns among GAS isolates with the same M type. Therefore, it could potentially be used to differentiate among isolates with the same M type that may originate from different geographical locations or populations.

In this study, we applied PCR-RFLP analysis for the GAS M typing of Thai isolates. PCR products derived from the amplification of the N-terminal region of the *emm* gene and digestion with *Afu* I produced different RFLP patterns among several different M types. The PCR-RFLP analysis was used to identify the M type of GAS isolated from the normal Thai population and from patients with various GAS-associated complications. All of the isolates could be typed (Table 1). These results showed that Potter41 GAS was the most common GAS strain isolated from the population studied. When the specificity of the PCR-RFLP protocol was determined by sequencing of the N-terminal region of the *emm* gene, the PCR-RFLP designation was in complete agreement with the sequencing data. In comparison with other genotyping methods based on RFLP analysis, the PCR-RFLP protocol used here has some technical advantages. Only one pair of PCR primers are required for the amplification of all of the GAS isolates, and the digested PCR products can be discriminated using ordinary polyacrylamide gel electrophoresis which is easy to perform, interpret and is less time consuming. In addition, compared with sequencing analysis, the PCR-RFLP protocol is technically less demanding and more economical. Therefore, with this simple protocol, GAS typing can be used in any laboratory in which PCR is routinely used, and is particularly useful for typing large numbers of GAS isolates.

In conclusion, PCR-RFLP analysis is a rapid and practical genotyping method for determining the M type of GAS. We suggest that this method can be used effectively in GAS typing, and since only those isolates that give new RFLP patterns would require sequencing for successful typing, the method is particularly suited to less affluent countries, such as

Thailand where GAS is endemic. The PCR-RFLP analysis may increase GAS typeability in the future and prove useful in epidemiological studies and vaccine development, especially regarding Southeast Asia, where the majority of GAS isolates are M nontypeable.

REFERENCES

1. **Beall, B., R. Faeklam, and T. Thompson.** 1996. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**:953-958.
2. **Bert, F., B. Picard, N. Lambert-Zechovsky, and P. Goulet.** 1995. Identification and typing of pyogenic streptococci by enzyme electrophoretic polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **42**:442-451.
3. **Bingen, E., E. denamur, N. Lambert-Zechovsky, C. Boissinot, N. Brahimi, Y. Aujard, P. Blot, and J. Elion.** 1992. Mother-to-infant vertical transmission and cross-colonization of *Streptococcus pyogenes* confirmed by DNA restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Infect. Dis.* **165**: 147-150.
4. **Brandt, C. M., B. Spellerberg, M. Honscha, N. D. Truong, B. Hoeverner, and R. Luttkicken.** 2001. Typing of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from throat infections in the region of Aachen, Germany. *Infection* **29**:163-166.
5. **Cleary, P. P., E. L. Kaplan, C. Lindahl, and S. Skjold.** 1988. DNA fingerprints of *Streptococcus pyogenes* are M type specific. *J. Infect. Dis.* **158**: 1317-1322.
6. **Desai, M., A. Tanna, R. wall, A. Efstratiou, R. George, and J. Stanley.** 1998. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of an outbreak of group A streptococcal invasive disease. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3133-3137.

7. **Desai, M., A. Efstratiou, R. George, and J. Stanley.** 1999. High-resolution genotyping of *Streptococcus pyogenes* serotype M1 isolated by fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1948-1952.
8. **Dicuonzo, G., G. Gherardi, G. Lorino, S. Angeletti, M. D. Cesaris, E. Fiscarelli, D. E. Bessen, and B. Beall.** 2001. Group A streptococcal genotypes from pediatric throat isolates in Rome, Italy. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1687-1690.
9. **Enright, M. C., B. G. Spratt, A. Kalia, J. H. Cross, and D.E. Bessen.** 2001. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. *Infect. Immun.* **69**:2416-2427.
10. **Fischetti, V. A.** 1989. Streptococcal M protein. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**: 286-309.
11. **Gardiner, D., J. Hartas, B. Currie, J. D. Mathews, D. J. Kemp, and K. S. Sriprakash.** 1995. Vir-Typing: A long- PCR typing method for group A streptococci. *PCR. Method. App.* **4**: 288-293.
12. **Gardiner, D. L., and K. S. Sriprakash.** 1996. Molecular epidemiology of impetiginous group A streptococcal infections in Aboriginal communities of Northern Australia. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1448-1452.
13. **Haase, A. M., A. Melder, J. D. Mathews, D. J. Kemp, and M. Adams.** 1994. Clonal diversity of *Streptococcus pyogenes* within some M-types revealed by multilocus enzyme electrophoresis. *Epidemiol. Infect.* **113**:455-462.
14. **Kaufhold, A., A. Podbielski, D. R. Johnson, E. L. Kaplan, and R. Lutticken.** 1992. M protein gene typing of *Streptococcus pyogenes* by nonradioactively labeled oligonucleotide probes. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2391-2397.
15. **Kaufhold, A., A. Podbielski, G. Baumgarten, M. Blokpoel, J. Top, and L. Schouls.** 1994. Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**:19-26.

16. **Manjula, B. N., K. M. Khandke, T. Farewell, W. A. Relf, and K. S. Sriprakash.** 1991. Heptad motifs within the distal subdomain of the coiled-coil rod region of M protein from rheumatic fever and nephritis associated serotypes of group A streptococci are distinct from each other: nucleotide sequence of the M57 gene and relation of the deduced amino acid sequence to other M protein. *J. Prot. Chem.* **10**: 369-383.
17. **Musser, J. M., B. M. Gray, P. M. Schlievert, and M. E. Pichichero.** 1992. *Streptococcus pyogenes* pharyngitis: characterization of strains by multilocus enzyme genotype, M and T protein serotype, and pyrogenic exotoxin gene probing. *J. Clin. Microbiol.* **30**:600-603.
18. **Penney, T. J., D. R. Martin, L. C. Williams, S. A. DeMalmanche, and P. L. Bergquist.** 1995. A single *emm* gene-specific oligonucleotide probe does not recognise all members of the *Streptococcus pyogenes* M type 1. *FEMS. Microbiol. Lett.* **130**: 145-450.
19. **Perea-Mejia, L. M., A. E. Inzunza-Montiel, and A. Cravioto.** 2002. Molecular characterization of group A streptococcus strains isolated during a scarlet fever outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **40**:278-280.
20. **Pruksakorn, S., N. Sittisombut, C. Phornphutkul, C. Pruksachatkunakorn, M. F. Good, and E. Brant.** 2000. Epidemiological analysis of non-M-typeable group A streptococcus isolates from a Thai population in northern Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1250-1254.
21. **Saunders, N. A., G. Hallas, E. T. Gaworzewska, L. Metherell, A. Efstratiou, J. V. Hookey, and R. C. George.** 1997. PCR-enzyme-linked immunosorbent assay and sequencing as an alternative to serology for M-antigen typing of *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2689-2691.
22. **Seppala, H., Q. He, M. Osterblad, and P. Huovinen.** 1994. Typing of group A streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* **32**:

1945-1948.

23. **Seppala, H., J. Vuopio-Varkila, M. Osterblad, H. Jalikola, M. Rummukainen, S. E. Holm, and P. Huovinem.** 1994. Evaluation of a method for epidemiologic typing of group A streptococci. *J. Infect. Dis.* **169**: 519-525.
24. **Stanley, J., D. Linton, M. Desai, A. Efstratiou, and R. George.** 1995. Molecular subtyping of prevalent M serotypes of *Streptococcus pyogenes* causing invasive disease. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2850-2855.
25. **Stanley, J., M. Desai, J. Nerry, A. Tanna, A. Efstratiou, and R. George.** 1996. High-resolution genotyping elucidates the epidemiology of group A streptococcus outbreaks. *J. Infect. Dis.* **174**:500-506.
26. **Vitali, L. A., C. Zampaloni, M. Prenna, and S. Ripa.** 2002. PCR M typing: a new method for rapid typing of group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **40**:679-681.

TABLE 1. Summary of the sizes of PCR products and their *AluI* restriction fragments and distribution of the 99 GAS isolates studied

M type	Sizes of PCR product (bp±SD)	Sizes of restriction fragment (bp±SD)	No. (%) of strains from PCR-RFLP typing
M1	1078±47, 974±37, 848±45	354±13, 257±11, 218±10, 147±7, 110±5, 87±8, 47±4, 37±3, 29±4	15 (15.15%)
M11	854±28, 726±14, 577±27	593±8, 434±15, 147±9, 117±8	8 (8.08%)
M12	1120±60	349±35, 116±1, 93±4, 78±1, 59±1, 51±1	3 (3.03%)
M25	849±23, 731±14	247±14, 203±10, 148±7, 51±4, 37±4	10 (10.10%)
M44	742±19	212±7, 133±6	11 (11.11%)
M48	797±47, 685±27	162±11, 121±10, 81±8	2 (2.02%)

TABLE 1. (Continued)

M type	Sizes of PCR product (bp±SD)	Sizes of restriction fragment (bp±SD)	No. (%) of strains from PCR-RFLP typing
M49	616±50	336±22, 252±14, 196±26, 135±22, 89±8	2 (2.02%)
M66	887±36, 729±39	252±13, 206±12, 148±7, 123±6	1 (1.01%)
M73	928±52, 834±27	674±23, 108±8	4 (4.04%)
M81	913±17, 781±27, 640±28	273±3, 155±7, 113±7, 70±5, 58±5	7 (7.07%)
Potter41	723±42, 625±34, 513±22	333±13, 296±15, 168±8, 130±6, 93±7, 53±3	23 (23.23%)
ST3	700±19	210±14, 146±6, 118±7	3 (3.03%)
ST4	594±8	435±30, 104±4	5 (5.05%)
ST8	953±55, 837±33, 669±36	596±34, 87±1, 29±7	5 (5.05%)



FIG. 1. The size differences of PCR products of the A-,B-region of *cmm* genes. The PCR products of M1, M11, M49, M12, M25, M48, M73, ST4, ST8, M44, Potter41, M81, ST3, and M66 are shown in lanes 1-14, respectively. Lanes 15-18 represent the examples of M1 isolates. Lanes 19-22 represent the examples of M25 isolates. Lanes 23-26 represent the examples of M44 isolates. Lanes 27-30 represent the examples of M81 isolates. Lanes M represent 100 bp ladder.



FIG. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of RFLP patterns, using *AflIII* enzyme. The RFLP patterns of M1, M11, M49, M12, M25, M48, M73, ST4, ST8, M44, Potter41, M81, ST3, and M66 are shown in lanes 1-14, respectively. Lanes 15-18 represent the examples of M1 isolates. Lanes 19-22 represent the examples of M25 isolates. Lanes 23-26 represent the examples of M44 isolates. Lanes 27-30 represent the examples of M81 isolates. Lanes M represent 100 bp ladder.