

สภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสเตรปโตไลซิน โอ
ในอาหารเหลวทอดด์เอวิทท์



เรืออากาศโท หญิง ยิ่งวรรณ ธรรมธรานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-567-697-7

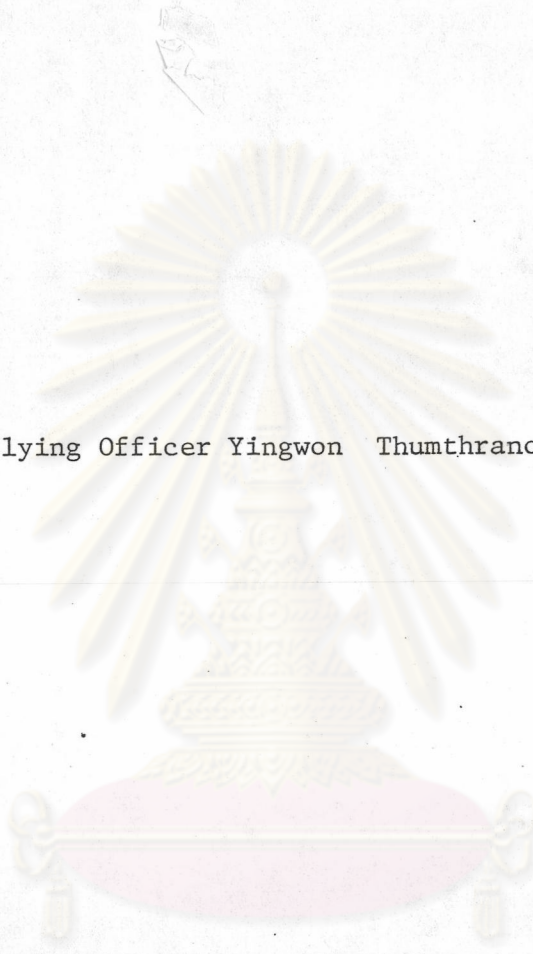
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013002

i 10292329

VARIOUS OPTIMUM CONDITIONS FOR STREPTOLYSIN O PRODUCTION

IN TODD HEWITT BROTH



Flying Officer Yingwon Thumthranon, WRTAF

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-567-697-7

Thesis Title Various Optimum Conditions for Streptolysin O
Production in Todd Hewitt Broth

By Flying Officer Yingwon Thumthranon, WRTAF

Inter-Department Medical Microbiology

Thesis Advisor Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.

Thesis Co-Advisors Professor Sodsai Vejjajiva, M.D.
Associate Professor Kannikar Kalyawong, Ph.D.



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya
..... Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Kriengsak Saitanu
..... Chairman
(Instructor Kriengsak Saitanu, D.V.M., Ph.D.)

D. Yenbutra
..... Thesis Advisor
(Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)

Sodsai Vejjajiva
..... Thesis Co-Advisor
(Professor Sodsai Vejjajiva, M.D.)

Kannikar Kalyawong
..... Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Kannikar Kalyawong, Ph.D.)

Suphanee Sarntivijai
..... Member
(Assistant Professor Suphanee Sarntivijai, M.Sc.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ สภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสเตรปโตโคคคัส โอ ใน
อาหารเหลวทอดดีเอวิทท์

ชื่อนิลิต เรืออากาศโท หญิง ยี่งวรรณ ธรรมธรานนท์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดิลก เป็นบุตร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สดใส เวชชาชีวะ
รองศาสตราจารย์ ดร.กรรณิการ์ กัลยาวงศ์

สหล่าสาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2529



บทคัดย่อ

แต่เดิมน้ำยาที่ใช้ในการตรวจหาระดับของแอนติสเตรปโตโคคคัส โอ โดยเฉพาะ
สเตรปโตโคคคัส โอ นั้นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการตรวจหาระดับของ
แอนติสเตรปโตโคคคัส โอ มีราคาสูง ภาควิชาจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จึงผลิต
น้ำยาดังกล่าวขึ้นใช้เอง แต่ในปัจจุบันนี้พบว่าสเตรปโตโคคคัส โอ ที่ผลิตได้แต่ละครั้งมีความแรง
ไม่คงที่ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยการหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสม
สำหรับการผลิตสเตรปโตโคคคัส โอ ในอาหารเหลวทอดดีเอวิทท์

จากการศึกษาการผลิตสเตรปโตโคคคัส โอ โดยเชื้อ Streptococcus pyogenes
(กลุ่มเอ) สายเชื้อ C 203 S ในอาหารเหลวทอดดีเอวิทท์ พบว่า เชื้อที่มีอายุประมาณ
10 - 12 ชั่วโมงเหมาะที่จะใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (starter) โดยเฉพาะเชื้อนี้ในปริมาณ 15 %
ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงในอาหารเหลวทอดดีเอวิทท์ซึ่งมีค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 7.8 บ่มไว้
โดยการตั้งนิ่ง ๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศปกติ

วิธีการผลิตสเตรปโตโคคคัส โอ ที่ได้ปรับปรุงใหม่นี้ นอกจากจะทำให้ความแรงของ
สเตรปโตโคคคัส โอ เพิ่มขึ้นแล้ว ยังเป็นวิธีการที่สะดวก ประหยัดทั้งเวลา แรงงาน และ
ค่าใช้จ่าย เหมาะสมที่จะนำไปใช้ตามห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป

Thesis Title Various Optimum Conditions for Streptolysin O
Production in Todd Hewitt Broth

Name Flying Officer Yingwon Thumthranon, WRJAF

Thesis Advisor Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.

Thesis Co-Advisors Professor Sodsai Vejjajiva, M.D.
Associate Professor Kannikar Kalyawong, Ph.D.

Inter-Department Medical Microbiology

Academic Year 1986



ABSTRACT

At the beginning, the reagents, especially streptolysin O (SLO) used for antistreptolysin O (ASO) determination, have to be imported, making the cost of this test high. The Department of Microbiology, Chulalongkorn Hospital, has prepared this antigen for routine use. At the present time, there is some problem about the inconstancy of the potency of SLO produced in the Department of Microbiology. The purpose of this study is to solve that problem by determining various optimum conditions for SLO production in Todd Hewitt broth.

It was found from the study that 15 % of fresh medium of about 10 - 12 hour-preculture were the suitable size and age of starter for SLO production by the strain C 203 S of Streptococcus pyogenes (group A) in Todd Hewitt broth. The optimal incubation period, temperature and initial pH in the step of SLO preparation were 4 hours, 37°C and about 7.8, respectively. Neither special carbondioxide tension nor agitation was required for cultivation.

The improvement of the method for SLO production, by Streptococcus pyogenes (group A) C 203 S in Todd Hewitt broth, according to various optimum conditions found from this study is satisfactory. It not only increases the level of SLO obtained but also saves time, is economical and is still quite easy to carry out at any average laboratory.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ACKNOWLEDGEMENTS

The completion of my study for the degree of Master of Science in Medical Microbiology at the Graduate School, Chulalongkorn University would never have been possible without the generosity, valuable advice and always courteous assistance of the following persons, to whom I would like to express my deepest gratitude and special appreciation :

Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my thesis advisor, for his excellent instruction, valuable advice, strong encouragement throughout my study and also recommendations for improvement of this thesis. Without his gracious help, I could not finish the study successfully. His kindness shall be long remembered.

Professor Sodsai Vejjajiva, M.D., Former Head of the Immunology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine; and Associate Professor Kannikar Kalyawong, Ph.D., Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, my thesis co-advisors, for their guidance and many valuable comments.

My superior officers and The Royal Thai Air Force for giving me the opportunity to study and for providing the financial support throughout the entire study.

All members of the Thesis Committee, for spending much of their valuable time to make this thesis more complete.

Associate Professor Kawee Pupaibul, M.D., Head of the Department of Microbiology, and Associate Professor Somjai Reinprayoon, M.D., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their kindness and for providing the space and facilities in the Unit of Bacteriology, where this study was carried out.

Associate Professor Khunying Amporn Sukonthaman, M.D., the National Streptococcal Reference Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for generously supplying the strain C 203 S of Streptococcus pyogenes (group A).

Associate Professor Pirom Kamolratanakul, M.D., Department of Preventive and Social Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University ; and Assistant Professor Suphanee Sarntivijai, M.Sc., Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, for their generosity and valuable comments.

Mrs. Salinee Panakitsuwan, M.Sc., Serology Section, Department of Pathology, Children's Hospital ; and staff of the Immunology Laboratory, Department of Pathology, Ramathibodi Hospital, for their valuable help, particularly in the collection of sera for the preparation of the standard ASO serum.

The National Blood Centre, Thai Red Cross Society, for kindly supplying fresh human blood group O, for titration of SLO, throughout the study.

Staff of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine ; the Unit of Microbiology, Department of Pathology, Faculty

of Verterinary Science ; the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University ; and staff of the Division of Pathology, Bhumibol Adulyadej Hospital, Directorate of Medical Services, Royal Thai Air Force, for their courteous assistance in providing not only facilities but also material.

Staff of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for providing needed facilities.

The committee of the Graduate School, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study.

All my friends, for their generosity and sincere help. I would especially like to thank Mrs. Sudaluck Chantrachada, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, who unselfishly gave so much of her time to help with my research. I cannot express in mere words how grateful I will always be to her for her help.

Charles B. Mehl, Ph.D., my brother-in-law, who helped correct the manuscript.

Finally, I gratefully appreciate my family for their strong encouragement and understanding, which helped me to achieve my goal of completing this study.

The kindness of these persons, shall be remembered always by me and by those who find the usefulness of this thesis.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vii
LIST OF TABLES	xiv
LIST OF FIGURES	xvi
ABBREVIATIONS	xviii
CHAPTER	
I. INTRODUCTION	1
1. Characteristic of Beta-Hemolytic Streptococci Group A	2
1.1 Morphology	2
1.2 Physiology and Cultural Condition	5
1.3 Antigenic Structure	6
1.4 Toxins and Enzymes	9
1.5 Pathogenesis and Clinical Findings	14
1.6 Diagnostic Laboratory Tests	23
2. Streptolysin O	24
2.1 Definition	24
2.2 Historical Background	25
2.3 Some Characteristics of Streptolysin O ..	26
2.4 Production of Streptolysin O	31
2.5 Titration of Streptolysin O	33
2.6 Antistreptolysin O	36

CONTENTS (Continued)

	Page
II. MATERIALS AND METHODS	41
1. Microorganism	41
2. Culture Condition	41
2.1 Preparation of Inoculum	42
2.2 Preparation of Starter	42
2.3 Preparation of Streptolysin O	42
3. Growth Cycle of <u>Streptococcus pyogenes</u> (Group A) C 203 S in Todd Hewitt Broth	43
4. Optimization for High Streptolysin O Production	47
4.1 The Effect of the Incubation Period	47
4.2 The Effect of the Age of Starter	47
4.3 The Effect of the Size of Starter	48
4.4 The Effect of Temperature	48
4.5 The Effect of the Initial pH	49
4.6 The Effect of Carbondioxide and Agitation	49
5. Titration of Streptolysin O	50
III. RESULTS	54
1. Growth Cycle of <u>Streptococcus pyogenes</u> (Group A) C 203 S in Todd Hewitt Broth	54

CONTENTS (Continued)

	Page
2. Optimization for High Streptolysin O	
Production	54
2.1 The Effect of the Incubation Period ...	54
2.2 The Effect of the Age of Starter	59
2.3 The Effect of the Size of Starter	59
2.4 The Effect of Temperature	59
2.5 The Effect of the Initial pH	62
2.6 The Effect of Carbondioxide and Agitation	62
IV. DISCUSSION	65
1. The Effect of the Incubation Period for SLO Production	65
2. The Effect of the Age of Starter for SLO Production	68
3. The Effect of the Size of Starter for SLO Production	69
4. The Effect of Temperature for SLO Production	70
5. The Effect of the Initial pH for SLO Production	71
6. The Effect of Carbondioxide and Agitation for SLO Production	71
V. SUMMARY AND FURTHER STUDIES	73

CONTENTS (Continued)

	Page
REFERENCES	76
APPENDIX	
I. CULTURAL MEDIA	89
II. REAGENTS	91
III. QUANTITATIVE DETERMINATION OF ASO	95
IV. CALIBRATION OF SPECTROPHOTOMETER FOR SPECTROPHOTOMETRIC METHOD OF SLO TITRATION	98
BIOGRAPHY	104



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Modified Jones Criteria for the Diagnosis of Rheumatic Fever	19
2	Association of Certain Serotypes with Acute Glomerulonephritis	22
3	Gram-Positive, Bacterial Species Producing the Immunologically and Chemically Related Sulfhydryl Dependent ('Oxygen-Labile') Cytolytic Toxins	27
4	Some Characteristics of Streptolysin O	28
5	Some Parameters of Assay System at 37°C of Streptolysin O from Various Laboratories	34
6	Methodology for the Titration of SLO	52
7	Comparison of Potency of SLO, Total Growth and Final pH of the Culture at 25 and 37°C	62
8	Effect of Carbondioxide and Agitation on Growth and SLO Production	64
9	Methodology for the Determination of ASO Titers ..	97
10	Tabulated Results of Spectrophotometric Readings of Hemolysis Samples	99
11	Tabulated Calculations for the Regression Coefficient Formula	100
12	Calculation of Hemolysis Values	102

LIST OF TABLES (Continued)

Table		Page
13	Complete Inversion Table for Transmittance- Hemolysis Values	103



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Scheme of the Cellular Composition of Beta-Hemolytic Streptococci Group A	4
2	Extracellular Macromolecular Substances Identified in Culture Fluids of Group A Streptococci	9
3	Oxidation-Reduction System of Streptolysin O ..	29
4	The Overall Procedures for Streptolysin O Production	46
	Figure 4.1 Preparation of Inoculum	44
	Figure 4.2 Preparation of Starter	45
	Figure 4.3 Preparation of SLO	46
5	Growth Curve of <u>Streptococcus pyogenes</u> (Group A) C 203 S in Todd Hewitt Broth at 37 ^o C	55
6	Potency of SLO, Total Growth and Final pH of The Culture at Various Incubation Periods (0 - 10 hr)	56
7	Potency of SLO, Total Growth and Final pH of the Culture at Various Incubation Periods (6 - 24 hr)	57
8	Potency of SLO from the Culture at Various-Incubation Periods (0 - 24 hr)	58

LIST OF FIGURES (Continued)

Figure		Page
9	Potency of SLO, Growth of Starter, Total Growth and Final pH of the Culture at Various Starter's Ages	60
10	Potency of SLO, Total Growth, and Final pH of the Culture at Various Starter's Sizes	61
11	Potency of SLO, Total Growth and Final pH of the Culture Incubated at Various Initial pH	63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ABBREVIATIONS



ASO	antistreptolysin O
cm	centimeter
°C	degree celcius
DNase-B	deoxyribonuclease-B
DNA	deoxyribonucleic acid
et al.	et alii (Latin), and others
etc.	et cetera (Latin), and so on
e.g.	exempli gratia (Latin), for example
g	gram
hr	hour
i.e.	id est (Latin), that is
i.v.	intravenously
kg	kilogram
LD	lethal dose
µg	microgram
µm	micrometer
mg	milligram
ml	milliliter
mm	millimeter
min	minute
M	molar
MW	molecular weight
nm	nanometer
NSS	normal saline solution
No.	number
OD	optical density

ABBREVIATIONS (Continued)

lb	pound
RBC	red blood cells
rpm	revolutions per minute
SLO	streptolysin O
SLS	streptolysin S
T	transmittance
V/V	volume by volume



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย