

รูปแบบ *emm* gene ของเชื้อสเตรปโตคอคคัส group C และ group G จากผู้ป่วยไทย  
โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบส

นางสาว ภัทราภรณ์ อรไทรวรรณ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-0862-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EMM TYPING OF *STREPTOCOCCUS* GROUP C AND GROUP G FROM THAI PATIENTS  
BY SEQUENCING METHODS

Miss Phattaraporn Orataiwun



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology  
Inter – Department of Medical Microbiology

Graduate school  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2002  
ISBN 974-17-0862-9

Thesis title            *Emm* Typing of *Streptococcus* Group C and Group G from  
Thai Patients by Sequencing Methods  
By                            Miss Phattaraporn Orataiwun  
Field of Study            Medical Microbiology  
Thesis advisor           Nattiya Hirankarn, M.D., Ph. D  
Thesis co-advisor       Associate Professor Pongpun Nunthapisud, M. Sc


---

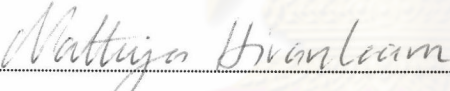
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Master' s degree

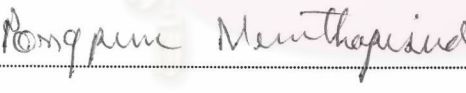
\_\_\_\_\_  
Dean of Graduate School

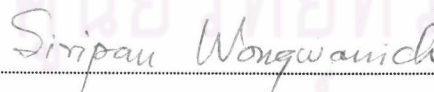
(Professor Suchada Kiranandana, Ph. D)

Thesis committee

 Chairman  
\_\_\_\_\_  
(Anan Chongthaleong, M.D.)

 Thesis Advisor  
\_\_\_\_\_  
(Nattiya Hirankarn, M. D., Ph. D)

 Thesis Co-Advisor  
\_\_\_\_\_  
(Associate Professor Pongpun Nunthapisud, M. Sc.)

 Member  
\_\_\_\_\_  
(Siripan Wongwanich, M. Sc.)

ภัทรภรณ์ อรโรวรรณ : รูปแบบ *emm* gene ของเชื้อสเตรปโตคอคคัส Group C และ Group G จากผู้ป่วยไทย โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบส (*Emm* Typing of *Streptococcus* Group C and Group G from Thai Patients by Sequencing Methods). อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์แพทย์หญิงดร. ณัฐฐิยา หิรัญญาญจน์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ผ่องพรรณ นันทากิสุทธิ์ 131 หน้า. ISBN 974-17-0862-9

M protein เป็น virulence factor ที่สำคัญในการก่อโรค ที่ถูก encode โดย *emm* ยีนซึ่งเป็นยีนที่พบในเชื้อสเตรปโตคอคคัส Group A, C, และ G ซึ่งก่อให้เกิดโรคหลายอย่างในมนุษย์ ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการวิเคราะห์ความหลากหลายของ *emm* ยีน ใน Group C และ Group G ในผู้ป่วยไทย และเปรียบเทียบลำดับเบสของ *emm* ยีน ระหว่างตัวอย่าง non-invasive และ invasive โดยมีจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาดังนี้ Group G 60 ตัวอย่าง และ Group C 52 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างนำมาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปี 1995 ถึง 2000 โดยในแต่ละ Group แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ non-invasive และ invasive ซึ่งแบ่งตามบริเวณที่มีการติดเชื้อ วิธีการศึกษาชนิดของ *emm* ยีนทำตามวิธีการของ Beall และคณะ

จากการศึกษาลำดับเบสของ *emm* ยีน พบว่า Group G จากทั้งหมด 60 ตัวอย่าง มีชนิดของ *emm* ยีนหลากหลายชนิด โดยมีทั้งหมด 28 ชนิด (47%) รวมทั้งได้มีการค้นพบ *emm* variant 6 ชนิด (18%) และ *emm* ชนิดใหม่ 10 ชนิด (26%) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชนิดของ *emm* ยีนที่พบมีความหลากหลายมาก ชนิดที่พบบ่อยได้แก่ STC6979 (7 isolates, 12%) และ STC5345 (6 isolates, 10%) สำหรับ Group C มีเพียง 24 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 52 ตัวอย่าง ที่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสได้ โดยพบ *emm* ยีน 12 ชนิด (50%) ซึ่งมีการค้นพบชนิดใหม่ 7 ชนิด (38%) และมีชนิดที่พบบ่อยได้แก่ ST245 (9 isolates, 42.8%) เป็นที่น่าสนใจว่า มี *emm* ยีนบางชนิดใน Group G ที่พบเหมือนกับใน Group A และใน Group C เหมือนกับใน Group G ซึ่งแสดงให้เห็นว่า มีการถ่ายทอดยีนระหว่าง Group A, C และ G หรือที่เรียกว่า horizontal gene transfer เมื่อทำการเปรียบเทียบชนิดของ *emm* ยีนระหว่าง non-invasive และ invasive พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสรุปแล้ว ผลจากการศึกษาดังนี้พบความหลากหลายของ *emm* ยีน และไม่พบว่ามี *emm* ชนิดใดชนิดหนึ่งที่พบบ่อย อย่างไรก็ตาม ข้อมูลของรูปแบบ *emm* ยีน ที่พบใน Group C และ Group G ในผู้ป่วยไทย จากการศึกษาดังนี้ อาจเป็นประโยชน์ โดยเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวัคซีนต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัสในประเทศไทย

สหสาขาวิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อผู้นิสิต.....ภัทรภรณ์ อรโรวรรณ  
 สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
 ปีการศึกษา 2545..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....



## 4289686620 : MAJOR : MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORD : Group C and group G streptococci / M protein / *emm* typing

PHATTARAPORN ORATAIWUN : THESIS TITLE : EMM TYPING OF  
*STREPTOCOCCUS* GROUP C AND GROUP G FROM THAI PATIENTS BY  
 SEQUENCING METHODS. THESIS ADVISOR : NATTIYA HIRANKARN, MD.  
 Ph.D., THESIS CO – ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR PONGPUN  
 NUNTHAPISUD, M. Sc. 131 pp. ISBN 974-17-0862-9

M protein is a major virulence factor that encode by *emm* gene, which were found in group A, C, and G Streptococci that can cause a several disease in human. In this study, we are interested in the variation of *emm* gene in GCS and GGS from Thai patients and also compared the sequences of *emm* gene between non-invasive and invasive isolates. Sixty GGS clinical isolates and 52 GCS clinical isolates obtained from patient admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital between 1995 to 2000 were included in this study. These isolates were divided into two group (non-invasive and invasive) by using the different site of infections. The *emm* gene was determined by the amplification and direct sequencing method according to Beall 's protocol.

All of 60-*emm* gene from GGS isolates were amplified and sequenced. A variety of *emm* sequences (28 types, 47%) have been reported in this study including the identification of 6 (18%) *emm* variant types and 10 (26%) novel *emm* types demonstrating the diverse population of GGS isolates in Thailand. The common *emm* types of GGS isolates include *STC6979* (7 isolates, 12%) and *ST5345* (6 isolates, 10%). As for GCS, only 24 out of 52-*emm* gene can be amplified and sequenced. Twelve (50%) different *emm* types including 7 (38%) novel *emm* types were identified in GCS. The most common *emm* types is *ST245* (9 isolates, 42.8%). Interestingly, some *emm* types of GGS isolates were similar to GAS and GCS were similar to GGS databases suggesting the evidence of horizontal transfer of *emm* genes among GAS, GCS, and GGS. Different *emm* types seem to be associated with invasive compared to non-invasive group. However, these differences are not statistically significant. In conclusion, *emm* sequences types of GGS and GCS isolates in Thailand are diverse and unique. This information of the *emm* gene pattern from GCS and GGS in Thai patients will be useful in vaccine development to *Streptococcus* in Thailand.

Inter-Department Medical Microbiology Student's signature ..... Phattaraporn Orataiwun  
 Field of study Medical Microbiology ..... Advisor's signature ..... Nattiya Hirankarn  
 Academic year 2002..... Co-Advisor's signature ..... Pongpun Nunthapisud

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep gratitude to the following individuals who helped in making this thesis possible:

Nattiya Hirankarn, M.D., Ph.D., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her kindness and indispensable help in supervising this thesis.

Associate Professor Pongpun Nunthapisud, M. Sc., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and my co – advisor, for her valuable advice and assistance.

Anan Chongthaleong, M.D., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and Siripan Wongwanich, M. Sc., Section of Laboratory Accreditation, Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, the member of thesis committee for their constructive criticism.

Special thanks go to Kanitta Phattarakul, M.D., Ph.D., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her kindness and indispensable help in supervising and equipment.

Graduate school and Research Affairs, Chulalongkorn University, for research assistant grant.

Sincere thanks go to the staffs of the Department of Microbiology and the fellow students for providing facilities and encouragement.

Finally, I am deeply indebted to my parents and brother for their love, concern, help, encouragement and understanding.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## CONTENTS

	page
ABSTRACT (THAI) .....	iv
ABSTRACT (ENGLISH) .....	v
ACKNOWLEDGEMENTS .....	vi
CONTENTS .....	vii
LIST OF TABLES .....	viii
LIST OF FIGURES .....	x
ABBREVIATIONS .....	xi
CHAPTER I INTRODUCTION .....	1
II OBJECTIVES .....	4
III REVIEW OF THE LITERATURES .....	5
IV MATERIALS AND METHODS .....	37
V RESULTS .....	46
VI DISCUSSION .....	95
VI CONCLUSION .....	98
REFERENCES .....	100
APPENDICES .....	113
APPENDIX I .....	114
APPENDIX II .....	116
BIOGRAPHY .....	119

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## LIST OF TABLES

Table	page
1 : Identification of GCS and GGS.....	15
2 : Principle streptococcal antibody tests.....	24
3 : Normal limits of streptococcal antibody titers .....	24
4 : Relationship of T patterns to M types .....	26
5 : The number of GCS and GGS isolates used in this study from each year .....	38
6 : The general characteristics of the non-invasive GGS specimens included in this study .....	48
7 : The general characteristics of the invasive GGS specimens included in this study .....	49
8 : The general characteristics of the non-invasive GCS specimens included in this study .....	51
9 : The general characteristics of the invasive GCS specimens included in this study .....	53
10 : The Streptococcus species of 19 non-invasive GCS isolates, which are non-amplified for <i>emm</i> gene .....	61
11 : The Streptococcus species of 9 invasive GCS isolates, which are non-amplified for <i>emm</i> gene .....	62
12 : <i>Emm</i> types from non-invasive GGS isolates .....	64
13 : <i>Emm</i> types from invasive GGS isolates .....	66
14 : <i>Emm</i> variant types of GGS isolates .....	67
15 : Novel <i>emm</i> types of GGS isolates .....	72
16 : The frequencies of <i>emm</i> types from invasive and non-invasive, which found in this study .....	80
17 : <i>Emm</i> types from non-invasive GCS isolates .....	82
18 : <i>Emm</i> types from invasive GCS isolates .....	83
19 : Novel <i>emm</i> types of GCS isolates .....	84
20 : Sites of infections and <i>emm</i> types of GGS non-invasive isolates .....	89



## LIST OF TABLES (continued)

Table		page
21	: Sites of infections and <i>emm</i> types of GGS invasive isolates .....	90
22	: Sites of infections and <i>emm</i> types of GCS non-invasive and invasive isolates .....	91
23	: The number of isolates and <i>emm</i> types of GGS isolates divided by year .....	93
24	: The number of isolates and <i>emm</i> types of GCS isolates divided by year .....	94



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

Figure	page
1 : Structure and cellular compositions of GAS .....	12
2 : The structure of M protein .....	28
3 : The A, B, C, and D repeat region of M protein .....	28
4 : Opsonization of GAS by M type specific antibody and complement ...	29
5 : Streptococcal adherence and inhibition of adherence to the mucosa by specific antibody .....	31
6 : Complication of <i>vir</i> regulon structure .....	34
7 : The structure and location of <i>emm</i> gene .....	34
8 : Determination of <i>emm</i> amplification from different groups of reference strains as positive and negative controls .....	55
9 : A representative picture of <i>emm</i> gene amplification of non-invasive GGS isolates .....	56
10 : A representative picture of <i>emm</i> gene amplification of invasive GGS isolates .....	57
11 : A representative picture of <i>emm</i> gene amplification of non-invasive GCS isolates .....	58
12 : A representative picture of <i>emm</i> gene amplification of invasive GCS isolates .....	59
13 : The nucleotide alignment of <i>emm</i> variant types of GGS isolates (A-F).	68
14 : The nucleotide alignment of novel <i>emm</i> types of GGS isolates (A-J)...	73
15 : Frequencies of <i>emm</i> types that were found in more than 1 isolate compared between invasive and non-invasive GGS isolates .....	81
16 : Frequencies of <i>emm</i> types in non-invasive GCS isolates .....	83
17 : The nucleotide alignment of novel types of GCS isolates (A-G) .....	85

## ABBREVIATIONS

AGN	Acute glomerulonephritis
ARF	Acute rheumatic fever
ASO	Antistreptolysin O
bp	base pair
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CSF	Cerebrospinal fluid
DNA	Deoxyribonucleic acid
GAS	<i>Group A Streptococcus</i>
GBS	<i>Group B Streptococcus</i>
GCS	<i>Group C Streptococcus</i>
GFS	<i>Group F Streptococcus</i>
GGG	<i>Group G Streptococcus</i>
Kb	kilo base pair
LTA	Lipoteichic acid
LVR	Long vir regulon
MAP	M-associated protein
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
NADase	Nicotinamide adenine dinucleotidase
NSRT	The National Streptococcal Reference Center in Thailand
PCR	Polymerase chain reaction
pmole	Picomole
rpm	Round per minute
SLO	Streptolysin O
SLS	Streptolysin S
SOF	Serum opacity factor
STSS	Streptococcal toxic shock syndrome

## ABBREVIATIONS (continued)

TSR	Template suppressor reagent
U	Unit
UVR	Unusual vir regulon
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
ng	Nanogram
nm	Nanometer
$\mu$ g	Microgram
$\mu$ l	Microliter
$\mu$ M	Micromolar
$\mu$ m	Micrometer



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย