

Abstract

Project Code : MRG5080209

Project Title : Molecular genetic analysis of *Streptococcus iniae* for study of pathogenesis of fish streptococcosis

Investigator : Channarong Rodkhum

Department of Veterinary Microbiology

Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

E-mail address : Channarong.R@chula.ac.th

Project Period : July 2, 2007 to July 2, 2009

Streptococcus infection or streptococcosis is the major disease of farmed Tilapia in Thailand. The common causative agents of streptococcosis isolated from farmed Tilapia in Thailand are *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae*. *S. iniae* causes meningoencephalitis and death in aquatic animal species and also has been identified as an emerging human pathogen producing fulminant soft tissue infection. This study was focused on *S. iniae* in diagnosis, characteristics, pathogenesis and molecular genetic. Ten (10) isolates of *S. iniae* were isolated from farmed Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Supanburi province, Kanchanaburi province and Prachinburi province of Thailand named SiniaeCU1-10. They were identified by both conventional biochemical method and polymerase chain reaction (PCR) with primers specific to lactate oxidase gene (*lctO* gene) of *S. iniae*. Further more, the multiplex PCR were developed for simultaneous detection and differentiation of *S. iniae* and *S. agalactiae* since Nile Tilapia in Thailand usually infected by both species either alone or mixed infection. The genomic DNA library of *S. iniae* strain SiniaeCU1 was constructed by using plasmid pUC118. The plasmid library was determined and analyzed the sequence by whole genome random sequencing procedure. To date, approximately 198 clones of plasmid genomic libraries have been randomly sequenced and subjected to homology search by BLAST algorithm. The nucleotide sequences were classified into 17 broad functional categories. Furthermore, we identified 12 potential virulence-related genes including hemolysin streptolysin S, Phosphoglucosyltransferase, M-like protein (*simA*), C5a peptidase (*scpI*), Fibrinogen binding protein, and capsule operon. The results reveal that genome analysis is a powerful method for identify of genes involved in virulence and pathogenesis of *S. iniae*. The information obtained from this study can be applied for study of virulence and pathogenesis of *S. iniae*.

บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่ MRG5080209

โครงการ: การวิเคราะห์อนุพันธุกรรมของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส อินนิเอ

เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการก่อโรคสเตรปโตค็อกคัส ในปลา

ชื่อนักวิจัย: ชาญณรงค์ รอดคำ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : Channarong.R@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 กรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึง 2 กรกฎาคม พ.ศ. 2552

การติดเชื้อสเตรปโตค็อกคัสหรือโรคสเตรปโตค็อกคัส (Streptococcosis) เป็นโรคหรือการติดเชื้อหลักที่พบในการเลี้ยงปลานิลในระดับฟาร์มของประเทศไทย สาเหตุหลักที่พิสูจน์แยกได้จากโรคนี้คือแบคทีเรียในกลุ่มสเตรปโตค็อกคัสได้แก่ สเตรปโตค็อกคัส อินนิเอ (*Streptococcus iniae*) และสเตรปโตค็อกคัส อะกาแลคติเอ (*Streptococcus agalactiae*) การศึกษานี้มุ่งเน้นที่ *S. iniae* ในเรื่องของการตรวจสอบวินิจฉัย การพิสูจน์เชื้อลักษณะของเชื้อ กระบวนการก่อโรคของเชื้อ และอนุพันธุศาสตร์ของ *S. iniae* *S. iniae* จำนวน 10 ไอโซเลท (Isolates) ถูกแยกได้จากปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ติดเชื้อจากฟาร์มในจังหวัดสุพรรณบุรี กาญจนบุรี และปทุมธานี โดยขอเรียกชื่อเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท เป็น SiniaeCU1-10 ซึ่งเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลทนี้ถูกแยกและพิสูจน์โดยวิธีมาตรฐานโดยดูจากลักษณะปรากฏและคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ รวมทั้งจากวิธีการทางอณูชีววิทยาคือวิธีปฏิกิริยาโซฟโกลีเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (primers) ที่จำเพาะกับลำดับเบสของยีนแลคเตท ออกซิเดส (lactate oxidase gene, *lctO* gene) ของ *S. iniae* นอกจากนี้วิธีปฏิกิริยาโซฟโกลีเมอเรสแบบมัลติเพลก (Multiplex PCR) ก็ได้นำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์เชื้อ *S. iniae* และ *S. agalactiae* ในคราวเดียวกัน เพื่อประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์เชื้อเมื่อมีการติดเชื้อแบบผสมเกิดขึ้น (Mixed infection) ซึ่งการติดเชื้อแบบผสมนี้ทำให้ยุ่งยากต่อการพิสูจน์ยืนยันชนิดของเชื้อ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้สร้างจีโนมิก ดีเอ็นเอ ไบรารี (Genomic DNA library) ของเชื้อ *S. iniae* ขึ้น โดยใช้ชิ้นดีเอ็นเอชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1-2 กิโลเบส (1-2 kb) เข้าไปในพลาสมิด pUC118 ไบรารีได้ถูกตรวจสอบและวิเคราะห์โดยการหาลำดับเบสของยีนที่ถูกใส่ไว้ในพลาสมิดโดยวิธีการ Sequencing จนถึงวันนี้พลาสมิดจากไลบรารีจำนวน 198 โคลน (clones) ได้ถูกหาลำดับเบสของยีนที่ใส่ไว้และนำมาวิเคราะห์หาความเหมือนหรือต่างจากข้อมูลของจุลชีพอื่นๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI database ข้อมูลของลำดับเบสของยีนที่สนใจคือยีนเอนเอ ที่ได้ถูกจำแนกตามลักษณะของหน้าที่ของยีนได้เป็น 17 จำพวก (categories) จากข้อมูลทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์พบยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรค (virulence-related genes) จำนวน 12 ยีน ได้แก่ hemolysin streptolysin S, Phosphoglucosyltransferase, M-like protein (*simA*), C5a peptidase (*scpI*), Fibrinogen binding protein, and capsule operon จากผลการศึกษาพบว่า การวิเคราะห์จีโนม (Genome analysis) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคและกระบวนการก่อโรคของ *S. iniae* อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยละเอียดในส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคและกระบวนการก่อโรคของ *S. iniae* ต่อไป