

ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของเชื้อ *Streptococcus suis*

หทัยรัตน์ ธนัญชัย, และ ขวัญจิต ดวงสงค์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ และนิวโทรฟิล ของเชื้อ *Streptococcus suis* (S. suis) ซีโรไทป์ 2 และซีโรไทป์ 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ S. suis เทียบกับสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติและสุกรป่วย

วิธีการศึกษา ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยนำเชื้อ S. suis สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ยังมีชีวิต เชื้อที่ถูกทำลายด้วยความร้อน และส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) มาทำการบ่มร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาว โมโนนิวเคลียร์เซลล์ หรือนิวโทรฟิล จากนั้นตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่ตาย

ผลการศึกษา จากการศึกษาพบว่าเชื้อ S. suis ซีโรไทป์ 2 และ ซีโรไทป์ 14 ที่มีชีวิตสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย รวมถึงส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีความเป็นพิษต่อโมโนนิวเคลียร์เซลล์สูงกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงแม้ว่าจะเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้าง suislysin ส่วนเชื้อที่ถูกทำลายด้วยความร้อนนั้นไม่พบว่ามีพิษต่อเซลล์หรือมีความเป็นพิษน้อยมาก นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อ S. suis ที่มีชีวิตบางสายพันธุ์ก็ยังมีพิษต่อนิวโทรฟิลด้วยเช่นกัน

สรุปผลการศึกษา ในการศึกษาเบื้องต้นนี้พบว่าเชื้อ S. suis และส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำให้เกิดการตายของเม็ดเลือดขาวทั้งชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์และนิวโทรฟิล ปัจจุบันพบว่าเซลล์โฮสต์ที่ตายจะมีการหลั่ง damage-associated molecular pattern (DAMP) ออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งโมเลกุลของ DAMP นี้สามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง proinflammatory cytokine จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ด้วยเหตุนี้ความสามารถของเชื้อที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการก่อโรคของเชื้อ เช่นการก่อให้เกิดภาวะ streptococcal toxic shock syndrome (STSS) ซึ่งเป็นผลมาจากการหลั่ง proinflammatory cytokine จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเป็นจำนวนมากเมื่อมีการติดเชื้อในกระแสเลือด **เชียงใหม่เวชสาร 2559;55(ฉบับเสริม 1):55-65.**

คำสำคัญ: สเตรปโตคอคคัส ซูอิส กลุ่มอาการที่ออกซิกซ็อก นิวโทรฟิล โมโนนิวเคลียร์เซลล์

บทนำ

Streptococcus suis (*S. suis*) เป็นเชื้อก่อโรคที่ติดต่อจากสัตว์มาสู่คน ก่อให้เกิดอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบและการติดเชื้อในกระแสเลือด รวมไปถึง streptococcal toxic shock syndrome (STSS) ในคนที่สัมผัสใกล้ชิดกับสุกรที่ติดเชื้อหรือผลิตภัณฑ์จากสุกรที่ปนเปื้อนเชื้อ^[1] สามารถจำแนกเชื้อโดยอาศัยความแตกต่างของ capsular polysaccharides ออกได้เป็น 33 ซีโรไทป์ โดยเชื้อซีโรไทป์ 2 เป็นสายพันธุ์ที่พบได้บ่อยที่สุดที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในคน^[1-3] นอกจากเชื้อซีโรไทป์ 2 แล้ว ในประเทศไทยยังมีรายงานผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 14 จำนวน 12 ราย^[4]

ปัจจัยที่ทำให้เชื้อ *S. suis* ก่อโรครุนแรงยังไม่มี การจำแนกอย่างแน่ชัด การที่เชื้อมีการสร้างแคปซูลทำให้หลบหลีกจากการถูกกินโดยแมคโครฟาจ แต่เชื้อ *S. suis* บางสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคตามธรรมชาติก็มีการสร้างแคปซูลเช่นกัน ดังนั้นเชื้อจึงน่าจะมีปัจจัยอื่นที่สำคัญในการก่อโรค^[5] มีรายงานว่า suilysin (SLY), muramidase-released protein (MRP) และ extracellular factor (EF) เป็นปัจจัยในการก่อโรคของเชื้อ ที่น่าสนใจคือเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ก่อโรคที่แยกได้จากประเทศในทวีปยุโรปพบการสร้างโปรตีนทั้ง 3 ชนิด (MRP⁺, EF⁺, SLY⁺) แต่กลับไม่พบการสร้างในสายพันธุ์ก่อโรคที่แยกได้จากอเมริกา (MRP⁻, EF⁻, SLY⁻) ฟิโนไทป์ที่พบทั้งสองแบบนี้ยังมีโนไทป์ที่ต่างกันด้วย^[6] ดังนั้นกลไกการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของเชื้อ 2 กลุ่มนี้อาจแตกต่างกัน^[7] อีกทั้งการวิเคราะห์โปรตีนที่หลั่งจากเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ *sly*⁺ ที่ก่อโรครุนแรง SH-08 และไม่รุนแรง SH-YH07 ยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ SH-08 เท่านั้นที่มีการหลั่ง *suilysin* ออกมาในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture

supernatant)^[8]

Septic shock เป็นภาวะที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด สาเหตุเกิดจากการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยส่วนประกอบของเชื้อ ทำให้มีการหลั่งของ proinflammatory cytokine ต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก เป็นผลให้มีการทำลายเนื้อเยื่อ เกิดภาวะเป็นกรด ความดันโลหิตลดต่ำลง อวัยวะต่าง ๆ ไม่ทำงาน และรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้^[9] นอกจากส่วนประกอบของเชื้อแล้ว ปัจจุบันพบว่าโปรตีนบางชนิดที่หลั่งมาจากเซลล์โฮสต์ที่บาดเจ็บหรือตายด้วยกระบวนการเนโครซิส (necrosis) หรือที่เรียกว่า damage-associated molecular pattern (DAMP) สามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้มีการหลั่ง proinflammatory cytokine ได้เช่นเดียวกัน^[10,11] แม้ว่าเชื้อ *S. suis* จะสามารถก่อให้เกิดภาวะ septic shock ได้ แต่กลไกการก่อให้เกิดภาวะนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากไม่พบว่าเชื้อมีการสร้างซูเปอร์แอนติเจน^[12] ด้วยเหตุนี้จึงเป็นไปได้ว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อ โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด จะส่งผลให้มีการหลั่งของ DAMP ออกมาภายนอกเซลล์ และทำหน้าที่เป็นปัจจัยเสริมในการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้มีการหลั่งของ proinflammatory cytokine ออกมาจำนวนมาก จนนำไปสู่ภาวะ septic shock ได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและโมโนนิวเคลียร์เซลล์ของเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 และซีโรไทป์ 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. suis* เทียบกับสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติและสุกรป่วย

วิธีการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 และซีโรไทป์ 14 สายพันธุ์ ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. suis* ที่แสดงอาการแตกต่างกัน สายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติและจากสุกรป่วย ดังแสดงในตารางที่ 1

การเตรียมเชื้อ *S. suis* เพื่อใช้ในการทดสอบ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. suis* ทั้ง 9 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Todd-Hewitt broth (THB) (Oxoid, UK) 10 มล. ขำคั้นที่อุณหภูมิ 37 °ซ ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วย THB ให้ได้ความขุ่น 0.05 ที่ OD 600 นม. ดูดเชื้อจำนวน 500 มคล. ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่มี THB 10 มล. แล้วนำไปบ่มเพาะต่อที่อุณหภูมิ 37 °ซ ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ ประมาณ 3-6 ชั่วโมงจนได้ความขุ่น 0.4 ที่ค่า OD 600 นม. (เชื้อประมาณ 10⁸ colony forming unit/มล.) จากนั้นทำการล้างและปรับปริมาณของเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์

RPMI1640 (Gibco, USA) การเตรียมเชื้อตายทำโดยการนำเชื้อไปต้มที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นทำการล้างและปรับปริมาณของเชื้อด้วย RPMI1640 สำหรับส่วนใสของอาหารเลี้ยงเซลล์เตรียมโดยปั่นเชื้อแบคทีเรียให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบ

การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

ทำการเจาะเลือดจากอาสาสมัคร 3 คนใส่ในสารกันเลือดแข็งตัว แล้วนำมาแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลและโมโนนิวเคลียร์เซลล์ (peripheral blood mononuclear cell) ด้วยวิธี Ficoll-Hypaque gradient centrifugation โดยใช้สารละลาย Polymorphprep™ (AXIS-SHIELD, Norway) และสารละลาย Lymphoprep™ (AXIS-SHIELD, Norway) ตามลำดับ การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตารางที่ 1. สายพันธุ์ของเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 และ ซีโรไทป์ 14 ที่นำมาใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์	ซีโรไทป์	แหล่งที่มาของเชื้อ	ยีนที่สัมพันธ์กับการก่อโรค
TSK 10.4	2	แยกจากสุกรปกติ	<i>cps2J</i> ⁺ / <i>sly</i> ⁻ / <i>epf</i> ⁻ / <i>mrp</i> ⁺
P1/7	2	แยกจากสุกรป่วย meningitis/สุกรเสียชีวิต	<i>cps2J</i> ⁺ / <i>sly</i> ⁺ / <i>epf</i> ⁻ / <i>mrp</i> ⁺
LPH 210/53	2	แยกจากผู้ป่วย septicemia	<i>cps2J</i> ⁺ / <i>sly</i> ⁺ / <i>epf</i> ⁻ / <i>mrp</i> ⁺
LPH 12	2	แยกจากผู้ป่วย septic shock/ผู้ป่วยเสียชีวิต	<i>cps2J</i> ⁺ / <i>sly</i> ⁻ / <i>epf</i> ⁻ / <i>mrp</i> ⁺
MNCM 10	2	แยกจากผู้ป่วย septicemia	<i>cps2J</i> ⁺ / <i>sly</i> ⁻ / <i>epf</i> ⁻ / <i>mrp</i> ⁺
MNCM 51	2	แยกจากผู้ป่วย septicemia/ผู้ป่วยเสียชีวิต	<i>cps2J</i> ⁺ / <i>sly</i> ⁻ / <i>epf</i> ⁻ / <i>mrp</i> ⁺
MNCM 55	2	แยกจากผู้ป่วย septic shock/ผู้ป่วยเสียชีวิต	<i>cps2J</i> ⁺ / <i>sly</i> ⁻ / <i>epf</i> ⁻ / <i>mrp</i> ⁺
TD 2.2	14	แยกจากสุกรปกติ	<i>cps1J</i> ⁺ / <i>sly</i> ⁺ / <i>epf</i> ⁻ / <i>mrp</i> ⁺
MNCM 07	14	แยกจากผู้ป่วย meningitis/ผู้ป่วยเสียชีวิต	<i>cps1J</i> ⁺ / <i>sly</i> ⁺ / <i>epf</i> ⁻ / <i>mrp</i> ⁺

cps2J, capsule gene; *sly*, suislysin gene; *epf*, extracellular factor gene; *mrp*, muramidase-released protein
+, positive; -, negative

หนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เลขที่ 429/2011

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (cytotoxicity test)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำโดยตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยชุดทดสอบ Cytotoxicity Detection Kit plus (LDH) (Roche Applied Science, Germany) ตามขั้นตอนที่บริษัทแนะนำดังนี้ นำเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลหรือโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่แยกได้มาปรับปริมาณเซลล์ด้วย RPMI1640 ให้เป็น 2×10^5 เซลล์ต่อมล. ส่วนเชื้อ *S. suis* ที่มีชีวิต และเชื้อที่ถูกฆ่าด้วยความร้อน นำมาปรับปริมาณของเชื้อให้เป็น 4×10^7 เซลล์ต่อมล. นำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *S. suis* ที่มีชีวิต ที่ปริมาณ MOI 200 เชื้อที่ถูกฆ่าด้วยความร้อน ด้วยปริมาณเดียวกัน หรือส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในถาดหลุม 96 หลุม โดยให้มีปริมาตรสุดท้าย เป็น 100 มคล. นำถาดหลุมไปปั่นที่ 800 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำถาดหลุมไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °ซ ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ครบเวลาเติมสารละลายขับสเตรทหลุมละ 100 มคล. บ่มถาดหลุมที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 5-10 นาที นำถาดหลุมไปปั่นที่ความเร็ว 2,300 g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใส 50 มคล. ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ ความเป็นพิษต่อเซลล์โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{Experimental value} - \text{Low control} \times 100}{\text{High control} - \text{Low control}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดสอบที่อิสระจากกัน 3 ครั้ง จากนั้นทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของผลการทดสอบที่ได้โดยใช้ Student's unpaired *t*-test หากได้ค่า *p* น้อยกว่า 0.05 ถือว่าความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

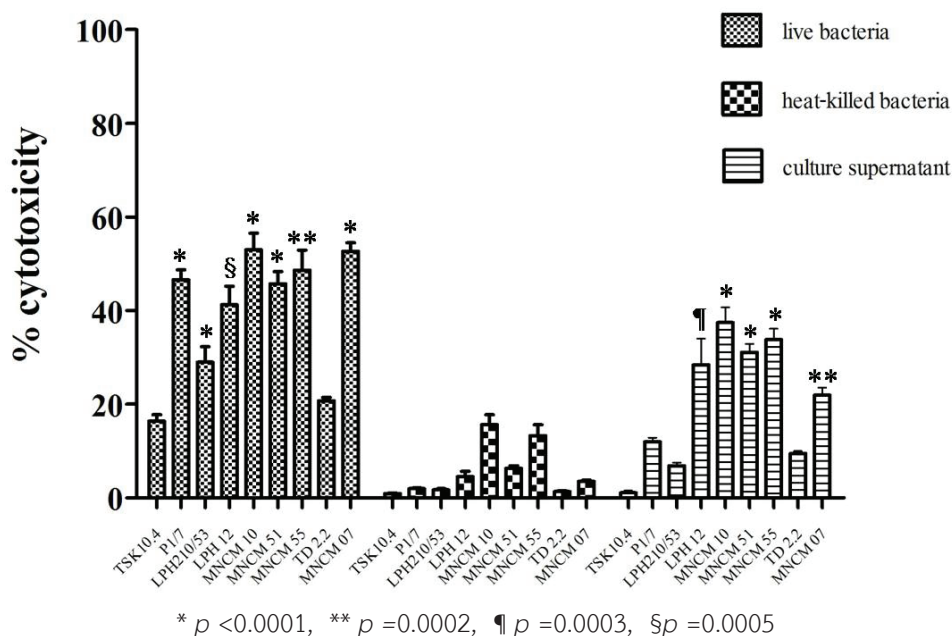
ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อโมโนนิวเคลียร์เซลล์

ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ของเชื้อ *S. suis* ทำโดยตรวจวัดจากการทำงานของเอนไซม์ LDH ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่ถูกทำลาย พบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยหรือสุกรป่วย และสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติที่ยังมีชีวิตอยู่ มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ แต่เมื่อเชื้อถูกทำลายด้วยความร้อนจะมีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ลดลงอย่างชัดเจน (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 1) โดยเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรป่วย P1/7 (ร้อยละ 46.16) และสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย LPH210/53 (ร้อยละ 28.98), LPH12 (ร้อยละ 41.25), MNCM10 (ร้อยละ 52.95), MNCM51 (ร้อยละ 45.69) และ MNCM55 (ร้อยละ 48.68) สามารถทำลายเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ได้มากกว่าเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติคือ TSK10.4 (ร้อยละ 16.40) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1) ในทำนองเดียวกัน เชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย MNCM07 (ร้อยละ 52.64) สามารถทำลายเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ได้มากกว่าเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติคือ TD2.2 (ร้อยละ 20.75) อย่างมีนัย

ตารางที่ 2. ความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ของเชื้อ *S. suis* ที่มีชีวิต เชื้อที่ถูกทำลายด้วยความร้อน หรือส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สายพันธุ์ของเชื้อ	ซีโรไทป์/sly	ร้อยละความเป็นพิษต่อโมโนนิวเคลียร์เซลล์		
		เชื้อมีชีวิต	เชื้อที่ถูกทำลายด้วยความร้อน	ส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ
TSK 10.4	2/sly ⁻	16.40±1.36	0.88±0.18	1.11±0.45
P1/7	2/sly ⁺	46.61±2.11	2.00±0.16	11.97±0.91
LPH210/53	2/sly ⁺	28.98±3.30	1.73±0.25	6.84±0.67
LPH 12	2/sly ⁻	41.25±3.98	4.53±1.17	28.42±5.59
MNCM 10	2/sly ⁻	52.95±3.62	15.65±2.11	37.46±3.26
MNCM 51	2/sly ⁻	45.69±2.67	6.27±0.61	31.14±1.73
MNCM 55	2/sly ⁻	48.68±4.21	13.32±2.29	33.82±2.32
TD 2.2	14/sly ⁺	20.75±0.72	1.35±0.16	9.48±0.53
MNCM 07	14/sly ⁺	52.64±1.85	3.56±0.24	21.98±1.61



รูปที่ 1. ความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ของเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ร่วมกับเชื้อที่ยังมีชีวิต (live bacteria) เชื้อที่ถูกทำลายด้วยความร้อน (heat-killed) และส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) จากนั้นตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ LDH (ผลการทดลองได้จากการทดสอบ 3 ครั้ง) คำนวณความแตกต่างทางสถิติระหว่างเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรป่วย กับเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติโดย Student's unpaired *t* test

สำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1)

ปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *S. suis* คือการที่เชื้อสามารถสร้างและหลั่งสาร *suilysin* ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุ (epithelial cell)^[13], brain microvessel endothelial cell^[14,15] และเซลล์แมโครฟาจ^[16] เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยนั้นมีบางสายพันธุ์ที่ไม่มียีนที่ควบคุมการสร้างสาร *suilysin* จึงน่าสนใจว่านอกเหนือจาก *suilysin* แล้ว เชื้อมีการสร้างและหลั่งสารอื่นที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่ เมื่อนำเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์มาบ่มร่วมกับส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้าง *suilysin* ได้แก่ สายพันธุ์ LPH12 (ร้อยละ 28.42), MNM10 (ร้อยละ 37.46), MNM51 (ร้อยละ 31.14) และ MNM55 (ร้อยละ 33.82) มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์สูงกว่าสายพันธุ์ TSK10.4 (ร้อยละ 1.11) ที่แยกได้จากสุกรปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย MNM07 (ร้อยละ 21.98) มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์สูงกว่า เชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติคือ TD2.2 (ร้อยละ 9.48) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะมียีนที่ควบคุมการสร้าง *suilysin* เช่นเดียวกัน

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิล

นอกจากเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์แล้ว เม็ดเลือดขาวที่พบมากในกระแสเลือดคือนิวโทรฟิล ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะทดสอบความ

เป็นพิษของเชื้อ *S. suis* ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มนี้ด้วยเช่นกัน จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 ที่มีชีวิตบางสายพันธุ์ ได้แก่ P1/7 (ร้อยละ 19.67), LPH210/53 (ร้อยละ 14.56) และ MNM10 (ร้อยละ 15.72) มีความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิลสูงกว่าเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติคือ TSK10.4 (ร้อยละ 16.40) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 2) ในทำนองเดียวกัน เชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย MNM07 (ร้อยละ 21.95) สามารถทำลายนิวโทรฟิลได้มากกว่าเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติคือ TD2.2 (ร้อยละ 4.36) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิลสูงกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติ แม้ความแตกต่างจะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 2) อย่างไรก็ตามทั้งเชื้อ *S. suis* ที่มีชีวิตและส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นก็มีความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิลน้อยกว่าเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์อย่างเห็นได้ชัดเจน (ตารางที่ 3 และรูปที่ 2)

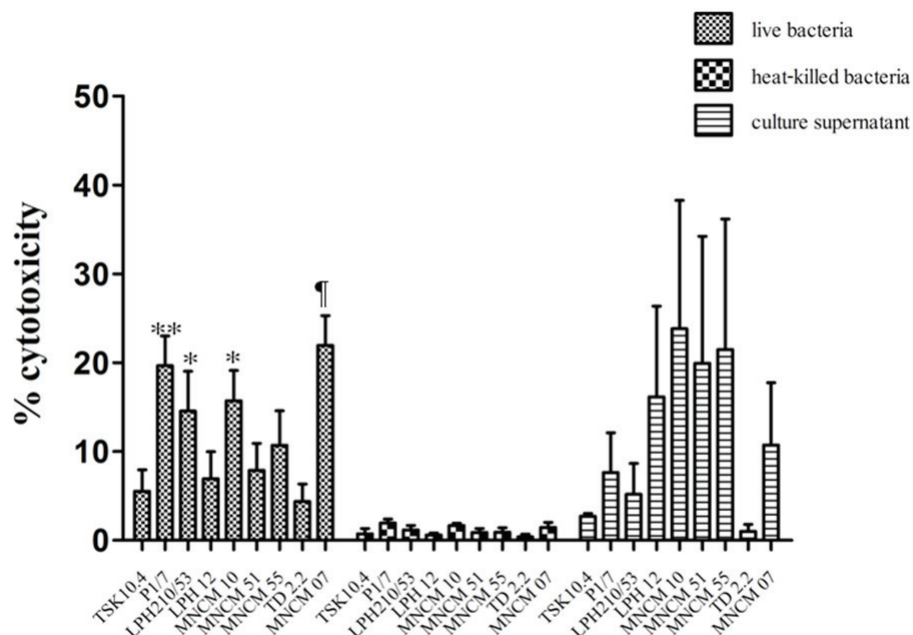
อภิปรายผลการศึกษา

S. suis เป็นเชื้อก่อโรคที่ติดต่อกันจากสัตว์มาสู่คน ก่อให้เกิดอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด รวมไปถึง STSS ในคนที่สัมผัสใกล้ชิดกับสุกรที่ติดเชื้อ หรือผลิตภัณฑ์จากสุกรที่ปนเปื้อนเชื้อ อย่างไรก็ตามกลไกในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของเชื้อยังไม่ทราบแน่ชัด^[1]

DAMP เป็นโมเลกุลที่หลั่งมาจากเซลล์โฮสต์ที่บาดเจ็บหรือตายด้วยกระบวนการเนโครซิส และสามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้มีการ

ตารางที่ 3. ความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิลของเชื้อ *S. suis* ที่มีชีวิต เชื้อที่ถูกทำลายด้วยความร้อน หรือ ส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สายพันธุ์ของเชื้อ	ซีโรไทป์/sly	ร้อยละความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิล		
		เชื้อมีชีวิต	เชื้อที่ถูกทำลายด้วยความร้อน	ส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ
TSK 10.4	2/sly ⁻	5.53±2.41	0.73±0.61	2.70±0.33
P1/7	2/sly ⁺	19.67±3.35	1.95±0.45	7.62±4.50
LPH210/53	2/sly ⁺	14.56±4.48	1.73±0.25	5.20±3.46
LPH 12	2/sly ⁻	6.94±3.05	0.60±0.23	16.16±10.20
MNCM 10	2/sly ⁻	15.72±3.41	1.69±0.25	23.84±14.44
MNCM 51	2/sly ⁻	7.88±3.05	0.88±0.45	19.94±14.30
MNCM 55	2/sly ⁻	10.69±3.89	0.92±0.52	21.46±14.70
TD 2.2	14/sly ⁺	4.36±1.99	0.40±0.30	1.03±0.76
MNCM 07	14/sly ⁺	21.95±3.34	1.46±0.56	10.74±7.01



* $p < 0.05$, ** $p = 0.0004$, † $p = 0.0014$

รูปที่ 2. ความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิลของเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลร่วมกับเชื้อที่ยังมีชีวิต (live bacteria) เชื้อที่ถูกทำลายด้วยความร้อน (heat-killed) และส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) จากนั้นตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ LDH (ผลการทดลองได้จากการทดสอบ 3 ครั้ง) คำนวณความแตกต่างทางสถิติระหว่างเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรป่วย กับเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติโดย Student's unpaired *t* test

หลัง proinflammatory cytokine ได้ ตัวอย่างของ DAMP ได้แก่ high-mobility group box 1 (HMGB1)^[10,11,17,18] การศึกษาโดย Wang และคณะ^[19] พบว่า HMGB1 มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการตายของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด endotoxemia และการศึกษาในผู้ที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด พบว่าผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงจะมีระดับของ HMGB1 ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับซีรัมของคนปกติ^[19-21] ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เชื้อ *S. suis* ก่อโรครุนแรงคือการที่เชื้อสามารถสร้าง suilysin ที่มีความเป็นพิษต่อ Porcine brain microvascular endothelial cell^[14], Human brain microvascular endothelial cells^[15] หรือ Murine macrophage cell line (J774)^[16] ซึ่งการตายของเซลล์นั้นก็สามารถทำให้มีการหลั่ง HMGB1 ออกมาได้^[17] การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ของเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 และซีโรไทป์ 14 สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงหรือจากสุกรป่วยและเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติ ซึ่งพบว่าเชื้อมีชีวิตสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนหรือสุกรที่แสดงอาการของโรคสามารถทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ได้มากกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. suis* ที่มีชีวิตสามารถรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ได้เช่นเดียวการรุกรานเข้าสู่ endothelial cell และแมโครฟาจ เนื่องจากการทดสอบโดยใช้เชื้อ *S. suis* มีชีวิตสายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้าง suilysin ก็มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์เช่นเดียวกับสายพันธุ์ที่มีการสร้าง suilysin ซึ่งผลที่ได้นี้ต่างจากการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้าง suilysin ที่แยกได้จากสุกรไม่มีความเป็นพิษต่อ murine macrophage cell line^[16] หรือ

human brain microvascular endothelial cells^[15] ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์แต่ละชนิดมีความไวต่อการถูกทำลายโดยเชื้อ *S. suis* แตกต่างกัน หรือเชื่ออาจมีการสร้างสารอื่นที่เป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ ดังจะเห็นได้จากการที่ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้าง suilysin ก็มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ด้วย การที่เม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ถูกทำลายนี้อาจเป็นผลให้มีการปล่อย DAMP เช่น HMGB1 ออกมาจากเซลล์ แล้วกระตุ้นให้โมโนไซต์ แมโครฟาจ และเดนดริติกเซลล์ หลัง proinflammatory cytokine ต่าง ๆ ที่จะส่งเสริมให้เกิดกลุ่มอาการที่อวกซิกซ็อกขึ้น

การก่อให้เกิดอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบและการติดเชื้อในกระแสเลือด เชื้อ *S. suis* จำเป็นต้องมีชีวิตรอดอยู่ในกระแสเลือด นิวโทรฟิลเป็นเม็ดเลือดขาวที่พบมากที่สุดในการติดเชื้อและเป็นด่านแรกในการทำลายเชื้อจุลชีพ ด้วยเหตุนี้นิวโทรฟิลอาจจะมีบทบาทในการเกิดพยาธิสภาพที่พบในการติดเชื้อ *S. suis* เนื่องจากพบนิวโทรฟิลและโมโนไซต์มาชุมนุมบริเวณเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ^[22] Chabot-Roy และคณะ^[23] ทำการศึกษาโดยใช้นิวโทรฟิลที่แยกจากสุกร พบว่า เชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ที่สร้าง suilysin ทั้งที่มีแคปซูลและไม่มีแคปซูลมีความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิลอย่างมาก ในขณะที่สายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้าง suilysin ทั้งที่มีแคปซูลและไม่มีแคปซูล นั้นไม่มีความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิลเลย ผลการทดสอบที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อ *S. suis* น่าเป็นผลมาจาก suilysin การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบความเป็นพิษของเชื้อ *S. suis* ต่อนิวโทรฟิลที่แยกจากคน พบว่าเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบมีความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิลของคนในระดับต่ำ ๆ ทั้งนี้เนื่องจากว่าเชื้อที่นำมาทำการศึกษาทุกสายพันธุ์มีการสร้างแคปซูลและ

บางสายพันธุ์ไม่มีการสร้าง suilysin อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าเชื้อสายพันธุ์ที่มียีนที่ควบคุมการสร้าง suilysin จะมีความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิลสูงกว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มียีนที่ควบคุมการสร้าง suilysin ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทดสอบโดยใช้นิวโทรฟิลที่แยกจากสุกร

ผลการทดสอบด้วยส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่พบว่า ส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้าง suilysin มีความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิลเช่นเดียวกับโมโนนิวเคลียร์เซลล์ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาครั้งนี้จะมีการสร้างสารอื่นที่มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวทั้งสองกลุ่ม จึงน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปว่าในเชื้อสามารถสร้างสารอื่นที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือไม่

สรุปผลการศึกษา

ในการศึกษาเบื้องต้นนี้พบว่าเชื้อ *S. suis* และส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำให้เกิดการตายของเม็ดเลือดขาวทั้งชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์และนิวโทรฟิล ปัจจุบันพบว่าเซลล์โฮสต์ที่ตายจะมีการหลั่ง DAMP ออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งโมเลกุลของ DAMP นี้สามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง proinflammatory cytokine จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันด้วยเหตุนี้ความสามารถของเชื้อที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการก่อโรคของเชื้อ เช่น การก่อให้เกิดภาวะ STSS ซึ่งเป็นผลมาจากการหลั่ง proinflammatory cytokine จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเป็นจำนวนมากเมื่อมีการติดเชื้อในกระแสเลือด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้อนุเคราะห์เชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สัญญารับทุนเลขที่ พค./2554-155

เอกสารอ้างอิง

1. Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. Lancet Infect Dis 2007;7:201-9.
2. Segura M. *Streptococcus suis*: an emerging human threat. J Infect Dis 2009;199:4-6.
3. Wertheim HFL, Nghia HDT, Taylor W, Schultz C. *Streptococcus suis*: An emerging human pathogen. Clin Infect Dis 2009;48:617-25.
4. Kerdin A, Oishi K, Sripakdee S, et al. Clonal dissemination of human isolates of *Streptococcus suis* serotype 14 in Thailand. J Med Microbiol 2009;58(Pt11):1508-13.
5. Segura M, Vanier G, Al-Numani D, Lacouture S, Olivier M, Gottschalk M. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;47:92-106.
6. Gottschalk M, Lebrun A, Wisselink H, Dubreuil JD, Smith H, Vecht U. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. Can J Vet Res 1998;62:75-79.
7. Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. Vet Microbiol 2000;75:59-71.
8. Yang XW, Li C, Yang ZB, Wu LP, Hua XG. Differentiation of secreted proteins from a virulent and an avirulent strain of *Streptococcus suis* serotype 2. Thai J Vet Med 2013;43:57-67.

9. **Angus DC, van der Poll T.** Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013;369:840-51.
10. **Rubartelli A, Lotze MT.** Inside, outside, upside down :damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol* 2007;28:429-36.
11. **Da Silva FP, Nizet V.** Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis* 2009;14:509-21.
12. **Feng Y, Zhang H, Ma Y, Gao GF.** Uncovering newly emerging variants of *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent. *Trends Microbiol* 2010;18:124-31.
13. **Norton PM, Rolph C, Ward PN, Bentley RW, Leigh JA.** Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of *suilysin*. *FEMS Immunol Med Mic* 1999;26:25-35.
14. **Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, Gottschalk M.** Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 2004;72: 1441-48.
15. **Charland N, Nizet V, Rubens CE, Kim KS, Lacouture S, Gottschalk M.** *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human microvascular endothelial cells. *Infect Immun* 2000;68:637-43.
16. **Segura M, Gottschalk M.** *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: Adhesion and cytotoxicity. *Infect Immun* 2002;70:4312-22.
17. **Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME.** Release of chromatin protein HMGB1 by necrosis cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418:191-5.
18. **Sim GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ.** HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010;28:367-88.
19. **Wang H, Bloom O, Zhang M, et al.** HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285(5425):248-51.
20. **Sunden-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, et al.** Persistent elevation of high mobility group box-1 (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2005;33:564-73.
21. **Gibot S, Massin F, Cravoisy A, et al.** High-mobility group box 1 protein plasma concentrations during septic shock. *Intensive Care Med* 2007;33:1347-53.
22. **Salles MW, Perez-Casal J, Willson P, Middleton DM.** Changes in the leucocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt epithelium of pigs in response to *Streptococcus suis* type 2 infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87:51-63.
23. **Chabot-Roy G, Willson P, Mariela S, Lacouture S, Gottschalk M.** Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb Patho* 2006;41:21-32.

Cytotoxic effect of *Streptococcus suis* on peripheral white blood cells

Hathairat Thananchai, and Kwanjit Duangsonk

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Objective To investigate cytotoxicity of *Streptococcus suis* (*S. suis*) serotype 2 and serotype 14 isolated from healthy pigs, diseased pig and *S. suis* infected patients to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and neutrophils.

Method Cytotoxicity of *S. suis* to PBMCs or neutrophils were performed by measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity.

Results The results demonstrated that live bacterial strains isolated from patients and their culture supernatants were found to be more cytotoxic to PBMCs than strains isolated from healthy pigs significantly. Interestingly, the suilysin-negative strains were cytotoxic as the suilysin-positive strains, whereas heat-killed bacteria had little or no toxic effect on both types of leukocytes. In addition, cytotoxicity to neutrophils was also observed in some bacterial strains.

Conclusion Our preliminary study showed that *S. suis* and their culture supernatant were toxic to both mononuclear cells and neutrophils. We postulated that the ability of bacteria to stimulate the secretion of proinflammatory cytokines from immune cells in combination with the ability to cause cell death which will result in the secretion of damage-associated molecular patterns (DAMPs) may be involved in streptococcal toxic shock syndrome (STSS) caused by *S. suis* infection. Since DAMP also stimulates the release of proinflammatory cytokines from immune cells. **Chiang Mai Medical Journal 2016; 55(Suppl 1):55-65.**

Keywords: *Streptococcus suis*, toxic shock syndrome, neutrophil, peripheral blood mononuclear cell

