Thesis Title Protein Antigens of *Burkholderia pseudomallei* Isolated from Patients, Soil and Animals

Author Miss Suwannee Kongrat

M.S. Microbiology

Examining Committee

Asst. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn Chairman
Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul Member
Assoc. Prof. Dr. Niwat Maneekarn Member

ABSTRACT

Burkholderia psdeudomallei is a causative agent of melioidosis in animals and human living in the subtropical area. In Thailand, this organism is spreading mostly in the northeastern part and later in the southern, northern and central area. *B. pseudomallei* is a gram-negative free living in soil or water and can transmit to animals or human via inhalation or skin abrasion. There are some factors leading this organism to become virulent to animals or human in both the hosts themselves having underlying diseases and the organisms containing virulence factors such as toxins or lipopolysaccharides. In this study, 26 strains of *B. pseudomallei* isolated from patients, 11 strains from soil and 10 strains from sick animals were included for studying. All of the isolates were characterized using colonial morphology and biochemical reactions. Some of them showed smooth colonies and some showed rough colonies but these were not related with the biochemical reactions. All of the isolates gave the same positive reactions in oxidase production, citrate utilization, nitrate reduction, motility, glucose, maltose and 10%lactose oxidation. Only the arabinose utilization test could differentiate the organisms into two groups, arabinose negative and arabinose positive strains. All of the organisms isolated from patients

and animals could not utilize arabinose while the isolates from soil contained both arabinose positive and arabinose negative characters. Proteins from these organisms were isolated and characterized. Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to analyze the protein profiles. Four protein profiles were characterized. The results showed that arabinose utilizing *B. pseudomallei* contained a distinct protein at 14.3 kDa that was different from the arabinose negative strains which contained 13.5 kDa and 14.8 kDa protein bands. In the Western blot analysis using rabbit antiserum, goat antiserum immunized with whole cell of *B. pseudomallei* and pooled sera from the confirmed cases of melioidosis patients, the patterns of antigen profiles were correlated with the protein profiles in that they could differentiate arabinose positive and arabinose negative strains at the same molecular weight sizes, 14.3 kDa in the arabinose positive and 13.5 kDa and 14.8 kDa in the arabinose negative strains. These finding can lead to the future research on the identification of arabinose negative and arabinose positive *B. pseudomallei* or the research on the vaccine development if these proteins are characterized and found to induce protective antibodies in animals.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	โปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วย ดินและสัตว์
ชื่อผู้เขียน	นางสาวสุวรรณี คงรัตน์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาจุลชีววิทยา
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สุมาลี พฤกษากร ประธานกรรมการ
	รศ.ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล กรรมการ
	รศ. ดร.นิวัตน์ มณีกาญจน์ กรรมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

บทคัดย่อ

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิส ในสัตว์และในคนที่อาศัยอยู่บริเวณแถบเหนือใต้เส้นศูนย์สูตร ในประเทศไทยจะพบมากที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและพบรองลงมาในภาคใต้ ภาคเหนือและภาคกลาง เชื้อนี้มีแหล่งอาศัยอยู่ในดิน และน้ำ และสามารถติดต่อสู่คน และสัตว์ทางหายใจหรือบาดแผล ซึ่งมีปัจจัยที่ทำให้เชื้อก่อโรคในคน และสัตว์ได้เช่นคนหรือสัตว์เองมีปัจจัยเสี่ยงอย่างอื่น และเชื้อสามารถสร้างสารพิษหรือลิโปโพลีแซคคาไรด์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกเชื้อจากผู้ป่วย 26 สายพันธุ์ จากดิน 11 สายพันธุ์ และจากสัตว์ป่วย 10 สายพันธุ์ และนำมาศึกษาลักษณะโคโลนีและปฏิกิริยาชีวเคมี สามารถพบโคโลนีได้ทั้งลักษณะหยาบ และเรียบแต่ไม่สัมพันธ์กับปฏิกิริยาชีวเคมี เชื้อทุกสายพันธุ์สามารถสร้างออกซิเดสใช้ซิเตรต ไนเตรต เคลื่อนที่ได้ ออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคส มอลโตส และ10%แลคโตส มีเพียงความสามารถในการใช้น้ำตาลอะราบิโนสเท่านั้นที่แยกเชื้อออกเป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มที่ใช้น้ำตาลอะราบิโนสได้ และกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนสได้ สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย และสัตว์ป่วยทุกสายพันธุ์ไม่สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนสได้ ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินพบทั้งใช้ และไม่ใช้อะราบิโนส เมื่อแยกโปรตีนจากสายพันธุ์ทั้งหมดมาศึกษารูปแบบโดยใช้ Sodium dodecylsulfate

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบลักษณะรูปแบบของโปรตีนได้ 4 แบบ พบว่าสายพันธุ์ที่ใช้อะราบิโนสมีโปรตีนตำแหน่งที่ 14.3 กิโลดัลตันแตกต่างจากสายพันธุ์ที่ไม่ใช้อะราบิโนสซึ่งมีโปรตีนที่ตำแหน่ง 13.5 กิโลดัลตันและ 14.8 กิโลดัลตัน เมื่อนำโปรตีนเหล่านี้ไปทำ Western blot เพื่อหารูปแบบของแอนติเจน โดยทำปฏิกิริยากับเซรุ่มกระต่าย และแกะที่ฉีดด้วยเชื้อตาย และเซรุ่มผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดสิส พบว่ารูปแบบของแอนติเจนของเชื้อให้ผลตรงกับรูปแบบของโปรตีนโดยสายพันธุ์ที่ใช้อะราบิโนสจะมีแอนติเจนที่ตำแหน่ง 14.3 กิโลดัลตันแตกต่างจากสายพันธุ์ที่ไม่ใช้อะราบิโนสซึ่งมีแอนติเจนที่ตำแหน่ง 13.5 กิโลดัลตันและ 14.8 กิโลดัลตัน การค้นพบโปรตีนเหล่านี้อาจนำไปสู่การวิจัยเพื่อใช้ในการวินิจฉัยเชื้อกลุ่มที่ใช้อะราบิโนส และกลุ่มที่ไม่ใช้อะราบิโนสในอนาคตหรือการพัฒนาวัคซีนถ้าศึกษาถึงคุณสมบัติของโปรตีน และกระตุ้นให้สัตว์ทดลองมีการสร้างภูมิต้านทานที่ป้องกันการติดเชื้อได้

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University