RESEARCH ARTICLE

Characterization of chicken antibody against CP39-based DNA vaccine to inhibit adhesion of *Pasteurella multocida* strains to chicken embryo fibroblast cell

Nattawooti Sthitmatee[1*] Thanya Varinrak[1] Pallop Tankaew[1] and Pichayanut Poolperm[2]

Abstract

Objective - To characterize chicken specific antibody conferred by immunization with the CP39-based DNA vaccine to inhibit *Pasteurella multocida* strains adhered to chicken embryo fibroblast cells (CEF).

Materials and Methods - Sixteen-week-old, fowl cholera-antibody-free chickens were categorized into 2 groups. The experiment group was immunized with CP39-based DNA vaccine while the control group was immunized with the uninserted pcDNA plasmid. *P. multocida* strains were treated with chicken sera prior to perform the adhesion inhibition assay to CEF cells.

Results - The recombinant CP39 was expressed and the recombinant protein was able to induce specific antibody in chickens. The induced antibody against recombinant CP39 was significantly able to inhibit *P. multocida* strains adhered to CEF cells ($P<0.05$) when compared to the control sera.

Conclusion - Specific chicken antibody conferred by vaccination with CP39-based DNA vaccine was able to inhibit *P. multocida* strains adhesion to CEF cells.

KKU Vet J. 2014;24(2):145-155. *http://vmj.kku.ac.th*

Keywords: *Pasteurella multocida*, DNA vaccine, adhesion inhibition, chicken embryo fibroblast

[1]Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50100, Thailand.

[2]Faculty of Pharmacy, Payab University, Muang, Chiang Mai 50000, Thailand.

[*]**Corresponding author** E-mail: drneaw@gmail.com

คุณสมบัติของแอนติบอดีของไก่ต่อวัคซีนดีเอ็นเอ CP39 ในการยับยั้งการจับเกาะของเชื้อ *Pasteurella multocida* ต่อเซลล์ chicken embryo fibroblast

ณัฐวุฒิ สถิตเมธี[1*] ธัญญา วรินทร์รักษ์[1] พัลลพ ตันแก้ว[1] และ พิชญานุช พูลเพิ่ม[2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ - เพื่อศึกษาคุณสมบัติของวัคซีนดีเอ็นเอ CP39 ในการเหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเพื่อยับยั้งการจับเกาะของเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* ต่อเซลล์ chicken embryo fibroblast (CEF)

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ - ไก่ไข่อายุ 16 สัปดาห์ ที่ไม่มีแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีก จำนวน 2 กลุ่ม กลุ่มทดลองจะได้รับการฉีดด้วยวัคซีนดีเอ็นเอของโปรตีน CP39 และในกลุ่มควบคุมจะเป็นไก่ที่ฉีดด้วย พลาสมิด pcDNA ที่ไม่มียีนแทรก หลังจากนั้นทำการเก็บซีรั่มของไก่ เพื่อทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการจับเกาะของเซลล์แบคทีเรีย *P. multocida* ต่อเซลล์ CEF ด้วยวิธี adhesion inhibition assay

ผลการศึกษา - พบการสร้างโปรตีนลูกผสม CP39 ในร่างกายไก่และโปรตีนลูกผสมที่ได้สามารถเหนี่ยวนำร่างกายไก่ให้สร้างแอนติบอดีจำเพาะได้ ซีรั่มของไก่ต่อโปรตีนลูกผสม CP39 สามารถยับยั้งการจับเกาะของเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* ก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกต่อเซลล์ CEF ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับซีรั่มของกลุ่มควบคุม

ข้อสรุป - แอนติบอดีของไก่ที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยวัคซีนดีเอ็นเอ CP39 สามารถยับยั้งการจับเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกต่อเซลล์ CEF ได้

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2557;24(2):145-155. *http://vmj.kku.ac.th*

คำสำคัญ: *P. multocida* วัคซีนดีเอ็นเอ การยับยั้งการจับเกาะเซลล์ chicken embryo fibroblast

[1]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100

[1]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพายัพ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50000

[*]**ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** อีเมล์: drneaw@gmail.com

บทนำ

Pasteurella multocida เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่เป็นสาเหตุของโรคอหิวาต์สัตว์ปีก (fowl cholera) [1] จากการสำรวจพบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิด capsular serogroup A และ somatic serotype 1, 3 หรือ 4 เป็นสาเหตุหลักของโรคอหิวาต์สัตว์ปีก [2] อาการที่พบได้ในสัตว์ปีกตั้งแต่การติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนต้นไปจนถึงอาการติดเชื้อในกระแสโลหิต จากการศึกษาพบว่าเยื่อบุทางเดินหายใจส่วนต้นเป็นตำแหน่งที่เชื้อจะสามารถแทรกเข้าสู่ร่างกายสัตว์ [1] จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าโปรตีนน้ำหนัก 39 กิโลดาลตัน หรือ CP39 ใน crude capsular extract (CCE) ของ *P. multocida* สายพันธุ์ P-1059 (serovar A:3) มีคุณสมบัติเป็น adhesive protein และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าวัคซีนที่ผลิตจากโปรตีนลูกผสม CP39 โดยอาศัยการผลิตจาก *E. coli* expression vector system [3] สามารถป้องกันไก่จากการเกิดโรคอหิวาต์สัตว์ปีกได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และยังสามารถให้ภูมิคุ้มกันข้ามกันระหว่างสายพันธุ์ P-1059 และ X-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ก่อโรคหลักอีกด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า CP39 เป็น cross protective antigen ของ *P. multocida* capsular serogroup A อีกด้วย [3] สำหรับวัคซีนดีเอ็นเอ (DNA vaccine) นั้นเป็นวัคซีนชนิดใหม่ที่กำลังได้รับการศึกษาและพัฒนาขึ้นมาอย่างแพร่หลาย หลักการในการพัฒนาวัคซีนชนิดนี้ คือ การนำยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาแทรกลงในพลาสมิด (plasmid) แล้วนำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดังกล่าวฉีดเข้าไปในตัวสัตว์เพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมา [4-6] ข้อดีคือสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันเฉพาะที่ต้องการและยังลดปัญหาการกลับมาก่อโรค (reversion of virulence) ที่เกิดขึ้นในวัคซีนชนิดเชื้อเป็นได้เป็นอย่างดีอีกด้วย ข้อดีอีกประการหนึ่งคือวัคซีนดีเอ็นเอนั้นมีประสิทธิภาพในการกระตุ้น humoral immunity และ cellular immunity ได้เป็นอย่างดี สำหรับในสัตว์ปีกโดยเฉพาะไก่ วัคซีนดีเอ็นเอโดยการแทรกชิ้นส่วนของเชื้อลงในพลาสมิดชนิด pcDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA) ได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคหลายชนิด ได้แก่ Infectious bursal disease virus vaccine, *Chlamydia psittaci* vaccine [4,6] เป็นต้น ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำโปรตีน CP39 มาพัฒนาเป็นวัคซีนดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีก โดยการแทรกยีนลงในพลาสมิดชนิด pcDNA นำไปฉีดกระตุ้นให้ไก่เพื่อให้เกิดการสร้างแอนติบอดีและทดสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีในการยับยั้งการจับเกาะของเชื้อก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกต่อเซลล์โฮสท์ในระดับห้องปฏิบัติการ

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย ยีนและพลาสมิด

เชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 และ P-1059 จะถูกเลี้ยงใน tryptose broth (TB;

Difco Laboratories, MD) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด dextrose starch agar (DSA; Difco) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในการเตรียมยีน *cp39* ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ P-1059 จะทำตามวิธีที่ได้รายงานไว้แล้วก่อนหน้านี้ [3] โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ P-1059 ไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB precipitation เพื่อนำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มจำนวนยีน *cp39* ด้วยวิธี Polymerase chain reaction ด้วยไพรเมอร์และองค์ประกอบตามที่ได้รายงานไว้แล้วก่อนหน้านี้ [3] และนำยีน *cp39* มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pcDNA 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) แล้วทำการสกัดพลาสมิด pcDNA 3.1 ที่มียีน *cp39* แทรกอยู่เพื่อใช้เป็นพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

การเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนลูกผสม

นำพลาสมิด pcDNA 3.1 ที่มีลำดับเบสของยีน *cp39* ถูกต้องและตรงตำแหน่งของลำดับการถอดรหัสโปรตีน มาตรวจสอบลำดับเบสด้วยวิธี sequencing เพื่อเลือกพลาสมิดที่มีลำดับเบสถูกต้องในการนำเข้าสู่เซลล์โฮสท์จำเพาะด้วยวิธีการ transfection และโฮสท์ตามที่แนะนำไว้ใน instruction manual ของพลาสมิดแต่ละชนิด ต่อด้วยการเหนี่ยวนำให้เซลล์โฮสท์ที่รับพลาสมิดเข้าไปสร้างโปรตีนลูกผสมและทำโปรตีนลูกผสมให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ตามที่แนะนำไว้ใน instruction manual ของ พลาสมิดแต่ละชนิดหลังจากนั้นนำโปรตีนลูกผสมที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

ไก่ทดลอง

ไก่ไข่พันธุ์ Hisex (RPM Farm & Feed Co. Ltd., Chiang Mai, Thailand) อายุ 16 สัปดาห์ และตรวจสอบแล้วว่าปลอดต่อแอนติบอดีต่อเชื้อก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกจำนวน 15 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับพลาสมิด pcDNA 3.1 ที่มียีน *cp39* จำนวน 10 ตัว และกลุ่มที่ได้รับพลาสมิด pcDNA 3.1 ที่ไม่มียีนแทรก จำนวน 5 ตัว การปฏิบัติต่อสัตว์และหัตถการที่เกิดขึ้นในการทดลองนี้ อยู่ภายใต้คำแนะนำและควบคุมโดยคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ภายใต้แนวทางปฏิบัติเกี่ยวกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ สภาวิจัยแห่งชาติ

การเตรียม Chicken antiserum

นำพลาสมิดที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นมาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอแล้วปรับความเข้มข้นของพลาสมิดเป็น 10 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้ออกของไก่ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวนทั้งสิ้น 4 ครั้ง ในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ของการทดลองโดยจะมีการเก็บตัวอย่างเลือดไก่เพื่อตรวจระดับภูมิคุ้มกันระหว่างการทดลองด้วยวิธี ELISA ในวันที่ 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 และ 49 ของการทดลอง ตามลำดับ ทำการเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่ม โดยซีรั่มที่เก็บได้จะนำผ่านกระบวนการ absorb ด้วยแอนติเจนของโฮสท์เซลล์ตามวิธีที่ได้รายงานไว้แล้ว [7] ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

Indirect Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ทำการตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป ProFLOK® (Synbiotic, Kansas City, MO, USA)

SDS-PAGE

เพื่อทำการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนลูกผสมที่สร้างขึ้น โดยจะใช้เจล SDS-PAGE ที่ความเข้มข้น 12.5% [8] แล้วนำไปย้อมสี Coomassie brilliant blue เพื่อเปรียบเทียบขนาดโปรตีนกับแถบโปรตีนมาตรฐานต่อไป

การเตรียมเซลล์ Chicken Embryo Fibroblast (CEF)

นำไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน เช็ดทำความสะอาดด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น 70% ใช้ forceps เจาะด้านช่องอากาศเปิดออกให้เห็น embryo ภายใน คีบบริเวณลำคอยกออกมาใส่ใน petri dish ที่เติม PBS ผสมยาปฏิชีวนะไว้ ใช้กรรไกร ตัดส่วนหัว ปีก และขาออก เปิดช่องท้องและลำตัว นำอวัยวะภายในออก ล้างเลือดออกจากเนื้อเยื่อที่แยกได้ ย้ายไปยัง petri dish ใหม่ ล้างด้วย PBS ผสมยาปฏิชีวนะจำนวน 1-2 ครั้ง นำเนื้อเยื่อใส่ลงในบีกเกอร์ ใช้กรรไกรสับย่อยเนื้อเยื่อจนละเอียด เทลงใน Erlenmeyer flask เติม PBS ให้ท่วมเนื้อเยื่อ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เนื้อเยื่อตกตะกอนแล้วเทส่วนบนทิ้ง 2-3 ครั้ง เติมสารละลาย trypsin 100 มิลลิลิตรนำไปปั่นย่อย นาน 30 นาที กรองเนื้อเยื่อชิ้นใหญ่ออก เติม fetal bovine serum ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้ง หลังจากนั้นละลายเซลล์ให้มีความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย DMEM ที่ผสมยาปฏิชีวนะ fetal bovine serum ความเข้มข้น 5% L-glutamine ความเข้มข้น 1%

การเตรียม cell monolayer on cover slip

จุ่ม cover slip ในสารละลาย ethyl alcohol ความเข้มข้น 95% ทิ้งไว้ให้แห้งสักครู่ก่อนนำไปลนไฟ ทิ้งไว้ให้เย็นลง จากนั้นจุ่มลงใน PBS แล้วใส่ลงใน small petri dish นำเซลล์ CEF ที่มีความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมลงไป 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 24 ชั่วโมง เซลล์จะมีลักษณะเรียงตัวกันเป็นชั้นเดียวบนแผ่น cover slip

Adhesion inhibition assay

วิธีการและสารเคมีตามรายงานของ Borrathybay et al. [9] ที่ได้รายงานไว้แล้วก่อนหน้านี้ โดยใช้เซลล์ CEF ที่เตรียมจากไข่ไก่ฟักที่มีอายุประมาณ 9 ถึง 10 วัน (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคเหนือตอนบน กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง) ซึ่งจะถูกเตรียมและเลี้ยงเป็น monolayer บน cover slip ในจานเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเล็ก หลังจากนั้นเตรียมเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ X-73 หรือ P-1059 ให้มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียประมาณ 1×10^6 CFUs ต่อมิลลิลิตร เลือกโคโลนีที่มีขนาดใหญ่มีผิวหน้ามัน ละลายลงใน DMEM ปรับความเข้มข้น

โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.1 หรือประมาณ 1×10^8 CFUs ต่อมิลลิลิตร นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปบ่มกับซีรั่มที่จะทำการทดสอบ โดยใช้สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมกับซีรั่มไก่ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งจัดให้ซีรั่มไก่ที่ได้รับวัคซีนดีเอ็นเอเป็นกลุ่มทดลอง โดยที่ใช้ PBS และ normal chicken serum เป็นกลุ่มควบคุมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000×g นาน 10 นาที เทส่วนบนทิ้ง เติม PBS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000×g นาน 10 นาที ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง หลังจากนั้นทำการละลายเชื้อแบคทีเรียด้วย DMEM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วพักไว้ ทำการล้าง monolayer cell ด้วย PBS 2-3 ครั้ง แล้วจึงเติม DMEM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงไปในจานเลี้ยง monolayer cell แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำ cover slip ออกมาล้างด้วย PBS 2-3 ครั้ง fix ด้วยสารละลาย ethyl alcohol ความเข้มข้น 95% ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปย้อมด้วยสี Giemsa เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียที่เกาะอยู่กับเซลล์ CEF จำนวน 100 เซลล์ หลังจากนั้นนำจำนวนแบคทีเรียที่นับได้ไปคำนวณเพื่อเปรียบเทียบทางสถิติ

Statistical analysis

เพื่อที่จะพิจารณาการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียต่อเซลล์ CEF จะทำการย้อมสีเซลล์ก่อนที่จะนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ยึดกับเซลล์ CEF แล้วหาค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มการทดลองทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test

ผลการศึกษา

การผลิตโปรตีนลูกผสม

จากการทดลองเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนลูกผสม CP39 ในหลอดทดลอง พบว่า โปรตีนลูกผสมที่เหนี่ยวนำขึ้นมามีขนาดโมเลกุลประมาณ 39 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นไปตามที่คาดไว้ ซึ่งขนาดโปรตีนปกติของ CP39 คือ ประมาณ 35.6 กิโลดาลตัน ซึ่งเมื่อรวมกับโปรตีนจากพลาสมิดโปรตีนลูกผสมที่ได้จะมีขนาดประมาณ 39 กิโลดาลตัน ซึ่งขนาดที่มากขึ้นของโปรตีนลูกผสมเกิดจากการรวมกันกับโปรตีนของ 6-His tagged อีกประมาณ 3 กิโลดาลตัน รวมกันเป็นขนาดโปรตีนลูกผสมที่ต้องการ (Figure 1)

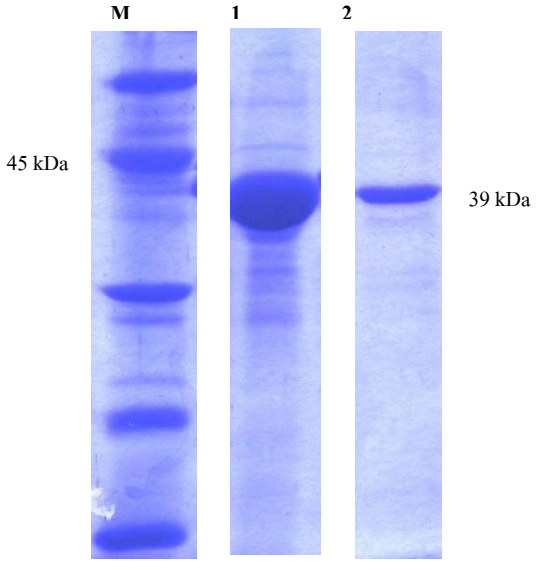

Figure1. A12.5% SDS-PAGE of recombinant CP39 stained with Coomassie blue

โดยที่ M=molecular weight marker,

1 = cell lysate suspension,

2 = purified recombinant CP39

ELISA

ซีรั่มของไก่กลุ่มที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน *cp39* แทรกอยู่จะตรวจพบระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่เพิ่มสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลอง ในขณะที่ไม่พบว่ามีความเคลื่อนไหวของระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรั่มของไก่กลุ่มที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มียีนแทรกอยู่ (Figure 2)

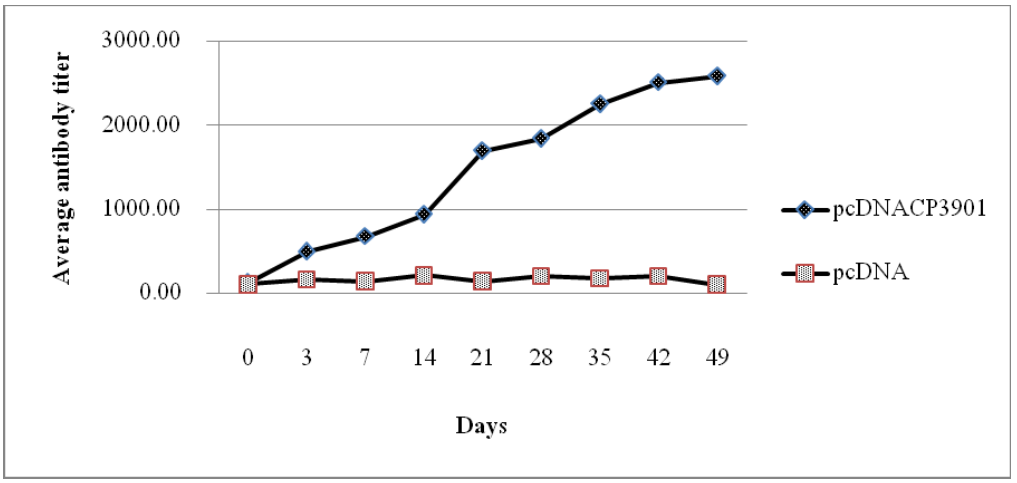

Figure 2. Average antibody titers of chicken by ELISA (ProFLOK®)

Adhesion inhibition assay

จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการบ่มเซลล์แบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ P-1059 และ X-73 ด้วยซีรั่มต่างๆ โดยมี PBS normal chicken serum และซีรั่มของไก่ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA เป็นกลุ่มควบคุม พบว่า ซีรั่มที่สร้างขึ้นจากการเหนี่ยวนำของโปรตีนลูกผสมต่างๆ ในการทดลองนี้ สามารถยับยั้งการจับเกาะของเชื้อแบคทีเรียต่อเซลล์ CEF ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) (Figures 3 และ 4) และยังพบว่าซีรั่มจากไก่ที่ได้รับพลาสมิดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการจับเกาะกับเซลล์ CEF ต่างกันกับกลุ่มควบคุม

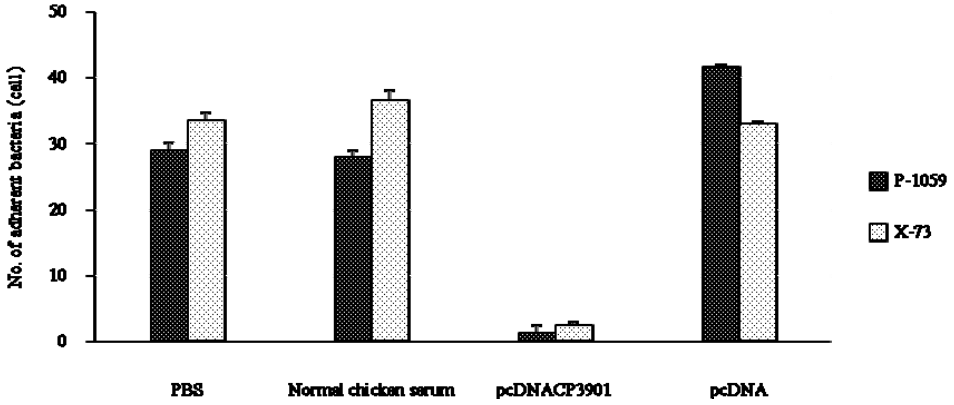

Figure 3. The mean number of adherent *P. multocida* strains to the CEF cells.

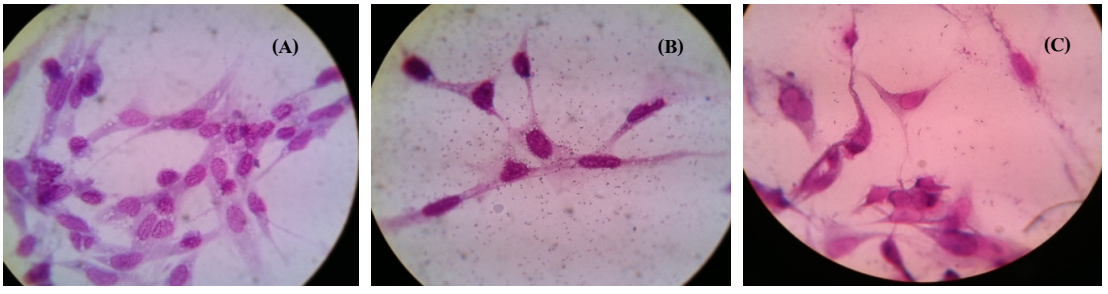

Figure 4. The photographs of *P. multocida* strains attached to the CEF cells prepared from 10-day-old embryonated chicken eggs (1,000×magnifications).

(A) normal CEF cells in DMEM medium

(B) CEF cells incubated with PBS-treated *P. multocida*

(C) CEF cells incubated with recombinant CP39 immunized chicken sera-treated *P. multocida*

วิจารณ์ และสรุป

พลาสมิดที่มียีน *cp39* แทรกอยู่ภายใน สามารถสร้างโปรตีนลูกผสม CP39 ได้ในระดับหลอดทดลอง และเมื่อทำการนำพลาสมิดดังกล่าวไปฉีดให้แก่ไก่ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีก พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้ร่างกายไก่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนลูกผสมที่พลาสมิดสร้างขึ้นมา นั่นแสดงให้เห็นว่าพลาสมิดนี้สามารถถอดรหัสยีนและผลิตโปรตีนลูกผสม CP39 ภายในร่างกายของไก่ได้ และแอนติบอดีที่ร่างกายไก่ตอบสนองขึ้นมานั้นสามารถยับยั้งการจับเกาะของเซลล์แบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ P-1059 และ X-73 ที่ก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกต่อเซลล์ CEF ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับไก่กลุ่มควบคุม

โรคติดเชื้อแบคทีเรีย อาทิเช่น โรคอหิวาต์สัตว์ปีกนั้น ลำดับขั้นตอนการเกิดโรคจะเริ่มจากการจับเกาะ (adhesion) เพิ่มจำนวน (colonization and multiplication) แทรกซึมเข้าสู่โฮสท์ (invasion) และทำลายโฮสท์ (host damage) ตามลำดับ ดังนั้น จุดเริ่มต้นที่เชื้อก่อโรคจะสัมผัสกับโฮสท์ คือ ช่วงการจับเกาะจึงมีความสำคัญ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแคปซูลของเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ P-1059 และ X-73 ที่ก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกนั้น ทำหน้าที่หลักในการจับเกาะกับเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจของโฮสท์ จากการทดลองดังกล่าวยังพบอีกว่าเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ที่มีแคปซูลหนากว่าจะมีความสามารถในการจับเกาะกับเซลล์แมคโครฟาจที่ถุงลมของไก่งวงได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีแคปซูลบางๆ [10] รวมทั้งยังพบอีกว่า outer membrane protein (OMP) ยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยในการเกาะยึดอีกด้วย [11] นอกจากนั้นจากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยยังพบอีกว่า เชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ P-1059 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างสัตว์ป่วยนั้นมีทั้งแบบที่มีแคปซูลหนาและบาง ซึ่งความหนาของแคปซูลนั้นนอกจากจะเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคแล้วยังเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการจับเกาะกับเซลล์ของโฮสท์อีกด้วย [9,12-15] และโปรตีนขนาด 39 (CP39) กิโลดาลตัน ในสารสกัดแคปซูลของเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ P-1059 นั้นพบว่าเป็น cross reactive antigen [3] และเป็น cross protective antigen ของเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีก [3] อีกด้วย นั่นแสดงให้เห็นว่าโปรตีนลูกผสมที่ได้รับการเหนี่ยวนำขึ้นมานี้สามารถที่จะกระตุ้นให้ร่างกายสัตว์สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ได้รับเข้าไป ที่ยืนยันได้จากการผลทดลองด้วยเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคทั้งสองสายพันธุ์ ได้แก่ X-73 และ P-1059 นั้น จะมีประสิทธิภาพในการจับเกาะกับเซลล์ CEF ลดลงเมื่อนำเซลล์แบคทีเรียไปบ่มด้วยซีรั่มของไก่ที่ได้รับวัคซีนดีเอ็นเอ และเป็นแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการจับเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกต่อเซลล์ CEF รวมทั้งเซลล์ของโฮสท์ได้

นอกจากนั้น จากการศึกษาของ Gong et al. [16] ได้นำยีนของ OmpH ของเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์พื้นเมืองในประเทศจีน ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pcDNA 3.1 แล้วนำพลาสมิด

ที่ได้ไปฉีดในไก่เพื่อเป็นวัคซีนดีเอ็นเอ ซึ่งเมื่อทำการฉีดเชื้อพิษทับในไก่ที่ได้รับวัคซีนดีเอ็นเอ พบว่าไก่มีแอนติบอดีที่สามารถป้องกันการเกิดโรคอหิวาต์สัตว์ปีกได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีรายงานทางระบาดวิทยาของโปรตีน CP39 ว่า โปรตีน CP39 ของสายพันธุ์ P-1059 นั้นมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ major outer membrane protein H (OmpH) ของเชื้อสายพันธุ์ P-1059 และมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้ร่างกายสัตว์สามารถสร้างแอนติบอดีที่ยับยั้งการจับเกาะของเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีก ซึ่งได้แก่ สายพันธุ์ X-73 และ P-1059 รวมทั้งยังให้ภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ก่อโรคทั้งสองสายพันธุ์อีกด้วย [3,17,18] ซึ่งตรงกับการศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้ที่วัคซีนดีเอ็นเอนั้นสามารถถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนลูกผสมในร่างกายสัตว์ และโปรตีนลูกผสมสามารถเหนี่ยวนำให้ร่างกายสัตว์สร้างแอนติบอดีจำเพาะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการจับเกาะของเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกทั้งสองสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นั่นแสดงให้เห็นว่าโปรตีนลูกผสมที่เกิดขึ้นนั้น ยังคงคุณสมบัติของการเป็น cross protective immunogen ดังเช่นในการทดลองที่ได้รายงานไว้แล้วก่อนหน้านี้ [3]

ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ในการใช้วัคซีนดีเอ็นเอที่เป็นพลาสมิดที่แทรกด้วยยีน *cp39* ที่เป็นสมาชิกของ OmpH ของเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาต่อไปเป็นวัคซีนดีเอ็นเอต้นแบบที่สร้างสรรจากเชื้อก่อโรคในพื้นที่ และใช้เป็นวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกโดยในการศึกษาขั้นต่อไปจะเริ่มในระดับห้องปฏิบัติการกับสัตว์ทดลองและการทดสอบในระดับภาคสนาม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ.2555

เอกสารอ้างอิง

1. Rimler RB, Glisson JR. 1997. Fowl Cholera, *In*Calnek BW, Barnes HJ (eds.), Diseases of Poultry, 10th ed. Iowa State University Press, Ames, IA., p.143-159.
2. Brogden KA, Packer R. A comparison of *Pasteurella multocida* serotyping systems. *Am. J. Vet. Res.* 1979; 40: 1332-135.
3. Sthitmatee N, Numee S, Kawamoto E, Sasaki H, Yamashita K, Takahashi N, Kataoka Y, Sawada T. Protection of chickens from fowl cholera by vaccination with recombinant adhesive protein of *Pasteurella multocida*. *Vaccine.* 2008; 26: 2398-2407.
4. Kim SJ, Sung HW, Han JH, Jackwood D, Kwon HM. Protection against very virulent infectious bursal disease virus in chickens immunized with DNA vaccines. *Vet. Microbiol.* 2004; 101: 39-51.

5. Tischer BK, Schumacher D, Beer M, Beyer J, Teifke JP, Osterrieder K, Wink K, Zelnik V, Fehler F, Osterrieder N. A DNA vaccine containing an infectious Marek's disease virus genome can confer protection against tumorigenic Marek's disease in chickens. *J. Gen. Virol.* 2002; 83: 2367-2376.
6. Vanrompay D, Cox E, Volckaert G, Goddeeris B. Turkeys are protected from infection with *Chlamydia psittaci* by plasmid DNA vaccination against the major outer membrane protein. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 118: 49-55.
7. Lo M, Boyce JD, Wilkie IW, Adler B.Characterization of two lipoproteins in *Pasteurella multocida. Microbes. Infection.* 2004; 6: 58-67.
8. Laemmli UK.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*1970; 227: 680-685.
9. Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, Ohtsu N, Takagi M, Nakamura S, Kawamoto E. A 39 kDa protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. *Vet. Microbiol.* 2003; 97:229-243.
10. Pruimboom IM, Rimler RB, Ackermann MR, Brogden KA.Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. *Avian Dis.* 1996; 40: 887-893.
11. Bötcher L, Lübke A, Hellmann E. *In vitro* binding of Pasteurella multocida cell wall preparation to tracheal mucus of cattle and swine and to a tracheal epithelial cell wall preparation of cattle. *J. Vet. Med.* 1991; 38: 721-730.
12. Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, Okiyama E, Kawamoto E, Amao H.Capsule thickness and amount of a 39 kDa protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlated with their pathogenicity for chickens. *Vet. Microbiol.* 2003; 97: 215-227.
13. Esslinger J, Seleim RS, Herrmann G,Bloble H. Adhesion of *Pasteurella multocida* to HeLa cells and to macrophages of different animal species. *Rev. de Med. Vet.* 1994; 14: 49-53.
14. Lübke A, Hartmann L, Schröder W, Hellmann E. Isolation and partial characterizationof the major protein of the outer membrane of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida.* Zbl. *Bakteriol.* 1994; 281: 45-54.
15. Sawada T, Borrathybay E, Kawamoto E, Koeda T, Ohta S. Fowl cholera in Japan: disease occurrence and characteristics of *P. multocida* isolates. *Bull. Nippon Vet. Anim. Sci. Univ.* 1999; 48: 21-32.
16. Gong Q, Qu N, Niu M, Qin C, Cheng M, Sun X, Zhang A. Immune responses and protective efficacy of a novel DNA vaccine encoding outer membrane protein of avian *Pasteurellamultocida. Vet. Immunol. Immunopath.* 2013; 152: 317-324.
17. Sthitmatee N, Hua XM, Kawamoto E, Pathanosophon P, Kataoka Y, Sawada T. Distribution of adhesive protein and protein gene among avian *Pasteurella multocida* strains in Japan. *J. Vet. Epidemiol.* 2008; 12(1): 43-50.
18. Borrathybay E, Sthitmatee N, Suzuki K, Shinnakasu R, Tsuchida S, Akuzawa R, Kataoka Y, Sawada T. Molecular characterization of an adhesive protein of *Pasteurella multocida* strain P-1059 and its variant strain P-1059B. *Bull. Nippon Vet. Life Sci. Univ.* 2008; 57: 90-99.