RESEARCH ARTICLE

Protection in Chickens Conferred by In-house Recombinant Outer Membrane Protein A and H of *Pasteurella multocida* Strain X-73 based Fowl Cholera Vaccine

Thanya Varinrak[1] Pallop Tankaew[1] Boondarika Nambooppha[1] Amarin Rittipornlertrak[2] and Nattawooti Sthitmatee[1*]

Abstract

Objective - To clarify the protectivity conferred by immunization with an in-house fowl cholera vaccine-based recombinant outer membrane protein H (rOmpH) with recombinant outer membrane protein A (rOmpA) of *Pasteurella multocida* against fowl cholera-caused bacteria challenge exposure.

Materials and Methods - Sixteen-week-old, fowl cholera-antibody-free chickens were categorized into 5 groups based on vaccine types. Group 1: rOmpH (50 µg) with Freund's incomplete adjuvant, group 2: rOmpH (50 µg) with rOmpA (100 µg), group 3: rOmpH (50 µg), group 4: rOmpA (100 µg) and group 5: Freund's incomplete adjuvant. Chickens were immunized twice at two-week interval. At 21 days after last vaccination, chickens were inoculated with 10^3-10^4 CFUs of *P. multocida* strain X-73 and observed clinical signs for ten days.

Results - Chickens immunized with in-house fowl cholera vaccines (groups 1-2) gave 80-90% protection that was not significantly different between vaccine formulas. In contrast, there was significantly difference between protection conferred by in-house fowl cholera vaccines (groups 1-2) and groups 3-5 ($p<0.05$). In accordance to chicken antibody profiles, chickens immunized with these in-house fowl cholera vaccines empirically increased along the experiments in compared to antibody levels of control groups ($p<0.05$).

Conclusion - An in-house fowl cholera vaccine-based rOmpH and rOmpA of *P. multocida*, an adjuvant-free formulation, was able to induce a specific and protective chicken antibody against fowl cholera infection.

KKU Vet J. 2014;24(2):175-186. *http://vmj.kku.ac.th*

Keywords: recombinant outer membrane protein H, recombinant outer membrane protein A, fowl cholera, vaccine, adjuvant

[1]Central Laboratories, [2]Department of Veterinary Bioscience and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University Chiang Mai 50100.

***Corresponding author** Email: drneaw@gmail.com

ความคุ้มโรคในไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สัตว์ปีกที่เตรียมขึ้นเอง จากโปรตีนลูกผสม outer membrane protein A และ H ของเชื้อ *Pasteurella multocida* สายพันธุ์ X-73

ธัญญา วรินทร์รักษ์[1] พัลลพ ตันแก้ว[1] บุณฑริกา นามบุปผา[2] อัมรินทร์ ฤทธิพรเลิศรักษ์[2]
และ ณัฐวุฒิ สถิตเมธี[2*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ - เพื่อทดสอบความคุ้มโรคในไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกที่เตรียมขึ้นเองจากโปรตีนลูกผสม outer membrane protein H (rOmpH) และ outer membrane protein A (rOmpA) ของเชื้อ *Pasteurella multocida* ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีก

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ - ไก่ไข่อายุ 16 สัปดาห์ ที่ไม่มีแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีก แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ตามชนิดของวัคซีน ได้แก่ กลุ่มที่ 1 rOmpH (50 ไมโครกรัม) with Freund's incomplete adjuvant กลุ่มที่ 2 rOmpH (50 ไมโครกรัม) และ rOmpA (100 ไมโครกรัม) กลุ่มที่ 3 rOmpH (50 ไมโครกรัม) กลุ่มที่ 4 rOmpA (100 ไมโครกรัม) และกลุ่มที่ 5 Freund's incomplete adjuvant กลุ่มทดลองจะได้รับการฉีดจำนวน 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 14 วัน หลังจากนั้นอีก 21 วัน ไก่จะได้รับการฉีดเชื้อก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีก *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 จำนวน 103-104 CFUs แล้วสังเกตอาการต่อไปอีก 10 วัน

ผลการศึกษา - ไก่ที่ได้รับวัคซีนสูตรที่เตรียมขึ้นเอง (กลุ่มที่ 1 และ 2) ให้ความคุ้มโรคระหว่างร้อยละ 80-90 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในทางตรงข้ามร้อยละความคุ้มโรคของสูตรวัคซีนของกลุ่มที่ 1 และ 2 จะแตกต่างจากกลุ่มที่ 3-5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจระดับแอนติบอดีของไก่ที่ได้รับวัคซีนทั้งสองสูตรที่มีระดับแอนติบอดีในไก่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ข้อสรุป - สูตรวัคซีนอหิวาต์สัตว์ปีกที่ประกอบไปด้วย rOmpH และ rOmpA ซึ่งไม่ผสมสื่อในสูตรวัคซีน สามารถเหนี่ยวนำให้ไก่สร้างแอนติบอดีจำเพาะและให้ความคุ้มต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกได้

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2557;24(2):175-186. *http://vmj.kku.ac.th*

คำสำคัญ: โปรตีนลูกผสม outer membrane protein H โปรตีนลูกผสม outer membrane protein A โรคอหิวาต์สัตว์ปีก วัคซีน สื่อ

[1]ห้องปฏิบัติการกลาง [2]ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50100

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

บทนำ

Pasteurella multocida เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่เป็นสาเหตุของโรคอหิวาต์สัตว์ปีก (fowl cholera) [1-2] ซึ่งเชื้อ *P. multocida* serovar A:1, A:3 และ A:4 เป็นสาเหตุหลักของโรคอหิวาต์สัตว์ปีก ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่สร้างความสูญเสียในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกทั่วโลก [1,2] การควบคุมและป้องกันโรคด้วยวัคซีนเป็นที่ยอมรับและเป็นแนวปฏิบัติที่องค์กรโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศแนะนำ ในประเทศไทยมีวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดแบคทีริน ที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ วัคซีนมีความคุ้มโรคเฉพาะ serovar A:1 แต่ไม่ให้ความคุ้มโรคข้ามกันต่อเชื้อ serovar A:3 และ A:4 จากการศึกษาเบื้องต้นในการพัฒนาวัคซีนโรคอหิวาต์สัตว์ปีกโดยใช้ outer membrane protein H (OmpH) ซึ่งเป็นโปรตีน porin ชนิดหนึ่งที่พบบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ รวมทั้ง *P. multocida* [3] จากการศึกษา Borrathybay et al. [4] พบว่า OmpH ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 (serovar A:1) และสายพันธุ์ P-1059 (serovar A:3) มีความสัมพันธ์โดยตรงกับประสิทธิภาพในการเกาะยึดกับเซลล์ chicken embryo fibroblast (CEF) และยังส่งผลต่อความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียอีกด้วย [4-6] จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโน (N-terminal amino acid sequencing) และยีน *omp*H ของสายพันธุ์ X-73 และ P-1059 พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกัน [4] ต่อมา Sthitmatee et al. [7] ได้ผลิตโปรตีนลูกผสม OmpH (recombinant OmpH: rOmpH) ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 และสายพันธุ์ P-1059 โดยอาศัย *E. coli* expression vector system และทำโปรตีนลูกผสมให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography (hybrid condition) เพื่อเป็นวัคซีนต้นแบบสำหรับโรคอหิวาต์สัตว์ปีกแบบฉีดเข้ากล้ามเนื้อ [7] และทำโปรตีนลูกผสมให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี electroelution สำหรับเป็นวัคซีนแบบหยอดจมูก [8] ซึ่งวัคซีนทั้งสองรูปแบบสามารถป้องกันไก่จากการเกิดโรคอหิวาต์สัตว์ปีกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และยังสามารถให้ภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ P-1059 และ X-73 ได้เป็นอย่างดีอีกด้วย

นอกจาก OmpH ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นอิมมูโนเจน (immunogen) ที่ดีแล้ว ยังพบว่า outer membrane protein A (OmpA) ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดรวมทั้งของเชื้อ *P. multocida* สามารถที่จะกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดี [3,9] จากการศึกษาของ Jeannin et al. [9] พบว่าโปรตีนลูกผสม OmpA (recombinant outer membrane protein A: rOmpA) ของเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* สามารถที่จะกระตุ้นให้ร่างกายตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้แม้จะเป็นการกระตุ้นที่ปราศจากการผสมกับสื่อวัคซีน (adjuvant) ก็ตาม นอกจากนั้นยีน *omp*A ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบนั้นมีความใกล้เคียงกันในทางพันธุกรรมและในเชิงของความเป็นอิมมูโนเจน [3] สำหรับโปรตีน OmpA และโปรตีนลูกผสม OmpA (recombinant OmpA: rOmpA) ของเชื้อ *P. multocida* นั้นได้มีการโคลนและผลิตโปรตีนลูกผสมเพื่อใช้ในการเป็นอิมมูโนเจนมาแล้วก่อน

หน้านี้ และให้ผลในการกระตุ้นตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน รวมทั้งเป็นวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อ *Pasteurella* ในหนูได้ [10,11] ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาความเป็นไปได้ในการผนวกคุณสมบัติในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ OmpA ร่วมกับ rOmpH ของเชื้อ *P. multocida* ที่เป็นที่ยอมรับแล้วว่ามีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจนที่ดีและใช้ในการเป็นวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีก เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคโดยการฉีดเชื้อพิษทับในไก่ไข่ เพื่อเป็นการทดสอบสูตรวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกที่พัฒนาขึ้นในระดับสัตว์ทดลองก่อนจะพัฒนาไปสู่การทดสอบในระดับภาคสนามต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สายพันธุ์แบคทีเรีย อาหารและสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ที่เลือกใช้ในครั้งนี้ คือ เชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 ซึ่งจะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด brain heart infusion (BHI; Difco Laboratories, MD, USA) broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อแบคทีเรียจะถูกนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด dextrose starch agar (DSA; Difco) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป สำหรับเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการทดลองนี้ จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น selective Luria Bertani (LB) agar หรือ broth ที่มี ampicillin (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA) ขนาด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ X-gal (Sigma-Aldrich) ขนาด 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การเตรียมดีเอ็นเอและยีน *ompA* ทำการเลือกเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 เพียงหนึ่งโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BHI broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจึงใช้สารละลายเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง นำเซลล์อัดแน่นที่ก้นหลอดมาใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด High Pure PCR Template preparation kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) ตามวิธีการในเอกสารประกอบชุดสกัด หลังจากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีน *ompA* ด้วยวิธี PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ดังนี้ [10]

PmOmpA-FW; 5-GTCA<u>GGATCC</u>GGCACCACAACCTAACACATTC-3

PmOmpA-Rev; 5-GATC<u>GAATTC</u>TTATTTGTTACCTTTAACAGC-3

ในปฏิกิริยา PCR จะมีปริมาตรทั้งสิ้น 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM each primer, 1 U *Taq* polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) และ DNA template 20 ng ตามลำดับ แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง thermal cycler

ด้วยขั้นตอนดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยชุดอุณหภูมิ 35 รอบ ที่ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับ เมื่อครบจำนวนรอบแล้ว บ่มปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส อีกเป็นเวลา 10 นาที จนจบปฏิกิริยา แล้วนำผลผลิตที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเจลชนิด agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5X TBE เป็นเวลา 40 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลท์ ซึ่งจะได้ขนาดของ PCR product เท่ากับ 1,065 คู่เบส

การนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนของ PCR product ที่ได้ซึ่งมีขนาด 1,065 คู่เบสเข้ากับ TA-cloning vector (Invitrogen) ด้วยเทคนิคการเชื่อมต่อยีนด้วยชิ้นดีเอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์เชื่อมต่อแล้วนำพลาสมิดที่มียีน *omp*A เข้าสู่เซลล์โฮสท์ ซึ่งได้แก่ One Shot® TOP10 chemically competent *E. coli* (Invitrogen) ด้วยวิธี transformation แล้วจึงเติม super optimal broth (SOB) (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวมา 100 ไมโครลิตร มา spread ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ selective LB agar แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเลือกโคโลนีที่มีสีขาว เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ selective LB agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น master plate และใน selective LB broth เพื่อสกัดพลาสมิดโดยใช้ PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) เพื่อตรวจสอบลำดับเบสด้วยวิธีการ sequencing ในขั้นตอนต่อไป

การตรวจสอบลำดับเบส พลาสมิดที่ได้ข้างต้นจะถูกนำมาตรวจสอบลำดับเบส โดยใช้ BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (AB Applied Biosystems) ด้วยเครื่อง ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (AB Applied Biosystems) ลำดับเบสที่ได้จะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Applied Biosystems DNA Sequencing Analysis Software Version 5.1 (AB Applied Biosystems) เพื่อที่จะคัดเลือกเอาพลาสมิดที่มีลำดับเบสถูกต้องสำหรับการนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การเตรียมโปรตีนลูกผสม OmpA เลือก *E. coli* โคลนที่มีลำดับเบสที่ถูกต้องเพื่อเตรียมพลาสมิดสำหรับการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนลูกผสม rOmpA โดยใช้เซลล์ competent *E. coli* BL21 (DE3) pLYsS (Invitrogen) เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการรับเอาพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี transformation ต่อมา ทำการคัดเลือกโคโลนีบน selective LB agar ที่รับเอาพลาสมิดที่ถูกต้องเข้าไปมาเลี้ยงใน selective LB broth ที่เพิ่ม kanamycin ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (selective LB-K broth) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วดูดสารละลายเชื้อจำนวน 1 มิลลิลิตรมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ selective LB-K broth ปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์

ต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าโดยใช้ orbital shaker ที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที จนกระทั่งเชื้อมีความเข้มข้นที่ Optical density at 600 nanometers (OD_{600}) = 0.6 แล้วเริ่มเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนด้วย IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; Takara, Shiga, Japan) ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM แล้วเขย่าต่อไปอีก 4 ชั่วโมงจึงทำการหยุดการเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการเก็บเซลล์ต่อไปโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000×g เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บเซลล์ตกตะกอนไว้เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยนำเซลล์ที่ได้ไปทำละลายด้วยสารละลาย lysis (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl และ 10 nM imidazole, pH 8.0) ในอัตราส่วนสารละลาย 5 มิลลิลิตรต่อเซลล์ตะกอน 1 กรัม แล้วเขย่าด้วย vertical shaker ที่ความเร็วรอบ 75 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนเพื่อนำไปทำโปรตีนลูกผสมให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี affinity chromatography ตามที่แนะนำไว้ใน instruction manual ของพลาสมิดแต่ละชนิด แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA) เพื่อปรับความเข้มข้นก่อนนำไปใช้ต่อไป

การเตรียมวัคซีน สำหรับอิมมูโนเจนที่จะใช้ได้แก่ โปรตีนลูกผสม rOmpH ของเชื้อ *P. multocida* (rOmpH) ด้วยขั้นตอนและวิธีการดังที่ได้รายงานไว้แล้วโดย Thanasarasakulpong et al. [8] หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้ว นำโปรตีนที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนก่อนนำไปปรับความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัมโปรตีนต่อโด้ส (1 มิลลิลิตร) โดยใช้ผสมกับสื่อชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจะเตรียมวัคซีนใช้ครั้งต่อครั้งตลอดการทดลอง สำหรับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนจะไม่ทำการฉีดหรือทำหัตถการใดๆ นอกจากการเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่ม ทั้งนี้สำหรับ rOmpA จะถูกปรับความเข้มข้นให้เป็น 100 ไมโครกรัมตามที่มีรายงานไว้แล้วโดย Dabo et al. [10]

การทดลองในสัตว์ การปฏิบัติต่อสัตว์ที่เกิดขึ้นในการทดลองนี้จะปฏิบัติตาม AVMA guideline และได้รับการรับรองและควบคุมจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สัตว์ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นไก่ไข่พันธุ์ Hi-Sex อายุ 16 สัปดาห์ (RPM Farm & Feed Co. Ltd., Chiang Mai, Thailand) และไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. multocida* (SP ratio < 0.2 โดย ProFLOK® PM ELISA test kit) การคำนวณกลุ่มตัวอย่างจะใช้โปรแกรม Win Episcope 2.0 ซึ่งในการทดลองจะใช้ไก่กลุ่มละ 10 ตัว ตามชนิดของวัคซีน (ตารางที่ 1) ไก่ในกลุ่มทดลองจะได้รับวัคซีน จำนวน 2 ครั้ง โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้ออกด้วยวิธีสะอาดห่างกัน 2 สัปดาห์ (Day 0, 14) หลังจากนั้นสังเกตอาการหลังจากได้รับวัคซีนครั้งสุดท้ายไปอีก 21 วัน (Day 35) แล้วทำการฉีดเชื้อพิษทับด้วยเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 จำนวน 10^3-10^4 CFUs [7] เข้าทางกล้ามเนื้ออกด้วยวิธีสะอาด แล้วสังเกตอาการไป

อีก 10 วัน (Day 45) เพื่อนับจำนวนไก่ที่รอดชีวิตในแต่ละกลุ่ม แล้วทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Fischer's exact test โดยไก่ในแต่ละกลุ่มจะถูกเจาะเก็บเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร ในวันที่ (Day) 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28 และ 35 ของการทดลอง เพื่อเก็บซีรั่มสำหรับการตรวจระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ตามวิธีการที่แนะนำไว้ในเอกสารคู่มือชุดตรวจสำเร็จรูป ProFLOK® PM ELISA test kit ทั้งนี้ไก่ที่มีอาการซึมหรือไม่กินอาหาร สัตวแพทย์ผู้ดูแลสัตว์จะทำการพิจารณาหยุดการทดลอง รวมทั้งไก่ที่รอดชีวิตจากการทดลอง ด้วยวิธี cervical dislocation ตามคำแนะนำของ American Veterinary Medical Association (AVMA) guideline to euthanasia 2013 แล้วทำการกำจัดซากโดยการเผา

Table 1. Experiments in chickens.

Groups	No. of chickens	Vaccine formulations	No. of survivors/ total (%)
1	10	rOmpH (50 µg) with Freund's incomplete adjuvant	9/10 (90)
2	10	rOmpH (50 µg) with rOmpA (100 µg)	8/10 (80)
3	10	rOmpH (50 µg)	2/10 (20)
4	10	rOmpA (100 µg)	1/10 (10)
5	10	Freund's incomplete adjuvant	0/10 (0)

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

การผลิตโปรตีนลูกผสม จากการทดลองเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนลูกผสม rOmpH ของโคลนที่มีพลาสมิด พบว่ามีขนาดโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน (ดังภาพที่ 1) นั่นแสดงให้เห็นว่าพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถผลิตโปรตีนลูกผสม rOmpA ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 ได้

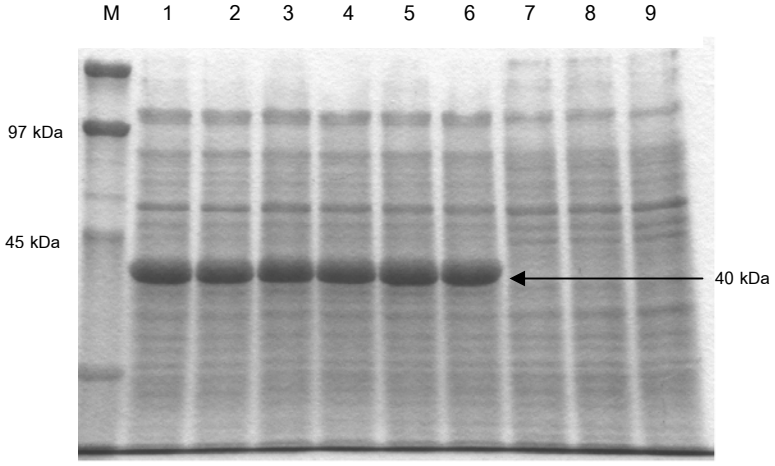

Figure 1. A 12.5% SDS-PAGE of recombinant OmpA stained with Coomassie blue.
M=molecular weight marker,
1-6 = whole cell lysate of IPTG-induced *E. coli* strains PM-rOMPA01-06,
7-9 = whole cell lysate of pre-induced *E. coli* strains PM-rOMPA07-09

ความคุ้มโรคในไก่ภายหลังการได้รับการฉีดเชื้อพิษ จากผลการศึกษาพบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน rOmpH ขนาด 50 ไมโครกรัมโปรตีนต่อโด้สที่มี Freund's incomplete adjuvant เป็นสื่อจะให้ความคุ้มโรคร้อยละ 90 ภายหลังจากการฉีดเชื้อพิษทับ ในขณะที่ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน rOmpH ขนาด 50 ไมโครกรัมโปรตีนต่อโด้ส ที่ผสม rOmpA จะให้ความคุ้มโรคร้อยละ 80 ภายหลังจากการฉีดเชื้อพิษทับ โดยไก่ที่รอดชีวิตจะไม่แสดงอาการป่วยและไม่กระทบต่อการออกไข่ จากการวิเคราะห์ทางสถิติไม่พบความแตกต่างกันในการป้องกันโรคของสูตรวัคซีนทั้งสองชนิดนี้ แต่ในทางตรงข้าม ไก่ที่ได้รับเฉพาะโปรตีนลูกผสม rOmpH หรือ rOmpA เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งนั้น ให้ผลความคุ้มโรคต่ำ โดยมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 10-20 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ากลุ่มที่ได้รับเฉพาะโปรตีนลูกผสม rOmpH หรือ rOmpA เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งนั้นให้ความคุ้มโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติ รวมทั้งไก่กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ Freund's incomplete adjuvant ด้วย ที่ไม่ให้ความคุ้มโรคเลย เมื่อวิเคราะห์ความคุ้มโรคระหว่างกลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่มพบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน rOmpH ขนาด 50 ไมโครกรัมโปรตีนต่อโด้ส ที่ใช้ Freund's incomplete adjuvant เป็นสื่อ และไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน rOmpH ขนาด 50 ไมโครกรัมโปรตีนต่อโด้ส ที่ผสม rOmpA จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อความคุ้มโรคของไก่กลุ่มซึ่งได้รับเฉพาะโปรตีนลูกผสม rOmpH หรือ rOmpA หรือ Freund's incomplete adjuvant เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ($p<0.05$)

จากรายงานการศึกษาเบื้องต้นพบว่า rOmpH นั้น มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและให้ protective antibody ต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกที่ดีอีกด้วย [7,8] และ rOmpH ได้ถูกนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกในหลายสูตรวัคซีน เช่น ชนิดฉีด [7] หรือชนิดหยอดจมูก [8] เป็นต้น ซึ่งให้ผลในการป้องกันโรคได้ดี เมื่อพิจารณาจากสูตรวัคซีนที่ได้รายงานไปก่อนหน้านี้จะพบว่าสื่อวัคซีนเป็นสื่อที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น Freund's incomplete adjuvant หรือ *E. coli* enterotoxin B เป็นต้น ซึ่งในการศึกษาของผู้วิจัยครั้งนี้ได้ทดลองใช้ rOmpH ที่เป็นอิมมูโนเจนร่วมกับ rOmpA ที่ผลิตขึ้น พบว่าสามารถใช้ร่วมกันได้และให้ความคุ้มโรคภายหลังจากการฉีดเชื้อพิษทับได้ดี ใกล้เคียงกับการใช้ Freund's incomplete adjuvant และไม่มีความแตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงได้สูตรวัคซีนชนิดใหม่ที่ประกอบไปด้วยอิมมูโนเจนและสารอื่นที่ไม่ใช่สื่อที่มีจำหน่ายทางการค้า แต่ใช้ rOmpA ของเชื้อก่อโรคเองมาเป็นองค์ประกอบในสูตรวัคซีน

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า OmpA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดสามารถที่จะกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดี [3,8,12] โดยการศึกษาของ Jeannin et al. (2002) พบว่าโปรตีนลูกผสมของ OmpA ของเชื้อแบคทีเรีย *K. pneumoniae* สามารถที่จะกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีโดยไม่ต้องผสมกับสื่อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า rOmpA ที่ผลิตขึ้นสามารถใช้ผสมกับสารอิมมูโนเจนและให้ผลในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและให้ความคุ้มโรคได้ดี นอกจากนั้น Hatfaludi et al. [3] ยังรายงานว่ายีน *omp*A ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบนั้นมีความใกล้เคียงกันในทางพันธุกรรมและในเชิงของความเป็นอิมมูโนเจน ซึ่งมีการผลิต OmpA ของเชื้อแบคทีเรีย *K. pneumoniae* และได้ทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสื่อที่ผสมในวัคซีนแล้ว [13,14] มีการใช้ rOmpA ร่วมกับ crude Omp ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ 232 ในการทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันโรค Pasteurellosis ในหนูทดลอง [11] จากการทดลองพบว่าในหนูจะให้แอนติบอดีต่อ rOmpA ที่สูงแต่ให้ผลในการป้องกันโรคต่ำ จากปรากฏการณ์นี้อาจเกิดขึ้นได้จากกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ร่างกายของหนูถึงแม้จะสร้างแอนติบอดีต่ออิมมูโนเจนที่มีไตเตอร์สูงแต่แอนติบอดีที่ได้ไม่เป็น protective antibody จึงให้ความคุ้มโรคต่ำ และอีกเหตุผลหนึ่งอาจเกิดจากการสกัดอิมมูโนเจนที่ใช้ในการทดลองดังกล่าว ซึ่ง Omp นั้นจะมีโครงสร้างเป็น trimeric และเมื่อใดก็ตามที่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีน อาทิเช่น การใช้สารละลายที่เป็นกรดสูงจะส่งผลต่อคุณสมบัติในการเป็นอิมมูโนเจน [15,16] รวมทั้งจากผลการทดลองของ Dabo et al. [11] เป็นการทดลองในหนู ซึ่งเป็นสัตว์ในตระกูลสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่มีกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่างจากไก่ซึ่งเป็นสัตว์ปีก ดังนั้นจึงอาจมีความเป็นไปได้ในสายวิวัฒนาการที่อาจส่งผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ให้ผลแตกต่างกันระหว่างสองการทดลองนี้ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น น่าจะเป็นสมมติฐานที่มีความเป็นไปได้ที่ทำให้ผลการทดลองของ Dabo et al. [11] ให้ผลความคุ้มโรคแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ของผู้วิจัย ซึ่งในการศึกษาขั้นต่อไปจะได้ทำการศึกษาถึงกลไกการทำงานของภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน rOmpH เมื่อใช้ร่วมกับ rOmpA เป็นวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกต่อไป

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของไก่ภายหลังได้รับวัคซีนชนิดต่างๆ ซีรั่มของไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนชนิดต่างกัน ถูกเตรียมจากเลือดที่เจาะในวันที่ (Day) 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35 ของการทดลอง และนำมาตรวจระดับแอนติบอดีไตเตอร์โดยชุดตรวจแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกสำเร็จรูป ProFLOK® PM ELISA test kit โดยมีการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในแต่ละกลุ่ม ดังแสดงใน Figure 2 จากไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน rOmpH ขนาด 50 ไมโครกรัมโปรตีนต่อโด้สที่ใช้ Freund's incomplete adjuvant เป็นสื่อ และไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน rOmpH ขนาด 50 ไมโครกรัมโปรตีนต่อโด้สที่ผสม rOmpA จะมีระดับแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกด้วยวิธี ELISA สูงขึ้นเป็นลำดับตลอดระยะเวลาของการศึกษา แต่ในทางตรงกันข้าม ระดับแอนติบอดีเฉลี่ยของไก่กลุ่มซึ่งได้รับเฉพาะโปรตีนลูกผสม rOmpH หรือ rOmpA หรือ Freund's incomplete adjuvant เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งนั้น พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกด้วยวิธี ELISA นั่นแสดงให้เห็นว่าร่างกายของไก่ไม่สร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกในไก่กลุ่มที่ได้รับเฉพาะโปรตีนลูกผสม rOmpH หรือ rOmpA หรือ Freund's incomplete adjuvant เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่ตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกได้ในไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน rOmpH ขนาด 50 ไมโครกรัมโปรตีนต่อโด้สที่ใช้ Freund's incomplete adjuvant เป็นสื่อ และไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน rOmpH ขนาด 50 ไมโครกรัมโปรตีนต่อโด้สที่ผสม rOmpA และเมื่อพิจารณาถึงความคุ้มโรคในไก่ที่ได้รับวัคซีนชนิดต่างกันในการทดลองนี้ พบว่าไก่ที่มีแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกจะให้ความคุ้มโรคได้ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าแอนติบอดีที่ไก่สร้างขึ้นจะเป็น protective antibody ที่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า ไก่ที่ได้รับวัคซีน rOmpH ไม่ว่าจะเป็นทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือทางการหยอดจมูก ร่างกายของไก่จะตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกและทำหน้าที่เป็น protective antibody ที่สามารถป้องกันการติดเชื้อก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกได้ [7,8]

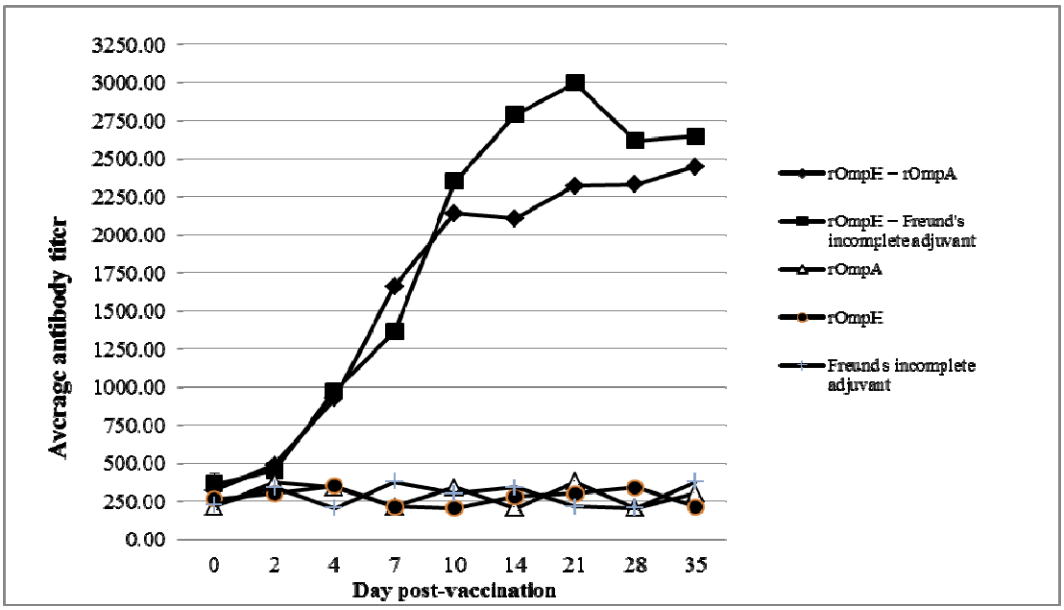

Figure 2. Average antibody titers of chicken by ELISA (ProFLOK®)

สรุป

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการผลิตโปรตีนลูกผสม rOmpA ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 และเมื่อนำไปผสมเป็นสูตรวัคซีนร่วมกับ rOmpH ที่เป็นอิมมูโนเจนแล้วนำไปฉีดไก่ สามารถเหนี่ยวนำให้ไก่สร้างแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคอหิวาต์สัตว์ปีกได้ โดยสูตรวัคซีนนี้ไม่จำเป็นต้องใช้สื่อวัคซีนร่วม โดยในการศึกษาครั้งต่อไปจะได้ทำการศึกษากลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในไก่ที่ได้รับโปรตีนลูกผสม rOmpA ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ X-73

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2556 เงินทุนวิจัยโดยบริษัทฮูเวฟาร์มา และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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. Rimler RB, Rhoades KR. 1989. *Pasteurella multocida* and Fowl Cholera, *In* Adlam C, Rutter JM (eds.), *Pasteurella and Pasteurellosis.* Academic Press Limited, London, p. 37-74, 95-114.

3. Hatfaludi T, Al-Hasani K, Boyce JD, Adler B. Outer membrane protein of *P. multocida. Vet. Microbiol.* 2010; 144: 1-17.

4. Borrathybay E, Sthitmatee N, Suzuki K, Shinnakasu R, Tsuchida S, Akuzawa R, Kataoka Y, Sawada, T. Molecular characterization of an adhesive protein of *P. multocida* strain P-1059 and its variant strain P-1059B. *Bull. Nippon Vet. Life Sci. Univ.* 2008; 57: 90-99.

5. Luo Y, Glisson JR, Jackwood MW, Hancock RE, Bains M, Cheng IH, Wang C. Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (*ompH*) of *Pasteurella multocida* X-73. J. Bacteriol. 1997; 179: 7856-7864.

6. Sthitmatee N, Kataoka Y, Sawada T. Inhibition of capsular protein synthesis of *Pasteurella multocida* strain P-1059. J. Vet. Med. Sci. 2011; 73: 1445-1451.

7. Sthitmatee N, Numee S, Yamashita K, Takahashi N, Kataoka Y, Sawada T. Protection of chickens from fowl cholera by vaccination with recombinant adhesive protein. Vaccine 2008; 26: 2398-2407.

8. Thanasarasakulpong A, Poolperm P, Tankaew, Sawada T, Sthitmatee N. Protectivity conferred by immunization with intranasal recombinant outer membrane protein H from *Pasteurella multocida* serovar A1 in chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 2015; 77: 321-326.

9. Jeannin P, Magistrelli G, Goetsch L, Haeuw JF, Thieblemont N, Bonnefoy JY, Delneste Y. Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. *Vaccine.* 2002; 20: A23-A27.

10. Dabo SM, Confer AW, Montelongo M, York P, Wyckoff III JH. Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but non-protective and deleterious Th2-type immune response in mice. *Vaccine.* 2008; 26: 4345-4351.

11. Dabo SM, Confer AW, Quijano-Blas RA. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microb. Pathog.* 2003; 35: 147-157.

12. Weiser JN, Gotschlich EC. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. Infect. Immun. 1991; 59: 2252-8.

13. Goetsch L, Gonzalez A, Plotnicky-Gilquin H, Haeuw JF, Aubry JP, Beck A, Bonnefoy JY, Corvaïa N. Targeting of nasal mucosa-associated antigen-presenting cells in vivo with an outer membrane protein A derived from *Klebsiella pneumoniae. Infect. Immun.* 2001; 69: 6434-44.

14. Rauly I, Goetsch L, Haeuw JF, Tardieux C, Baussant T, Bonnefoy JY. Carrier properties of a protein derived from outer membrane protein A of *Klebsiella pneumoniae. Infect. Immun.* 1999; 67: 5547-51.

15. Chevalier G, Duclohier H, Thomas D, Shechter E, Wroblewski H. Purification and characterization of protein H, the major porin of *Pasteurella multocida. J. Bacteriol.* 1993; 175: 266-276.

16. Rimler RB. Purification of a cross-protective antigen from *Pasteurella multocida* grown *in vitro* and *in vivo. Avian Dis.* 2001; 45: 572-580.