สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

ประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ได้จากการเหนี่ยวนำการสร้างด้วยโปรตีนลูกผสม Outer membrane protein H ในการทำลายเชื้อ *Pasteurella multocida* ด้วยวิธีการเหนี่ยวนำการทำลายด้วยวิถีคอมพลีเมนท์

ภาณุวัฒณ์ เทพสุขะลักษณ์[1] อุษณีย์ ก่อเกิด[1] ก่อเกียรติ ม่วงไทย[2] รัชนี อัตถิ[2] สุวิชัย โรจนเสถียร[1] และณัฐวุฒิ สถิตเมธี[1,#]

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

[2]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทคัดย่อ: Outer membrane protein H (OmpH) เป็นโปรตีนสำคัญที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *Pasteurella multocida* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียหรือโรคคอบวมในโคและกระบือ ในการศึกษานี้ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นโดยใช้โปรตีนลูกผสมจาก recombinant outer membrane protein H (rOmpH) ที่ผลิตโดยอาศัย *Escherichia coli* expression vector system เมื่อนำโปรตีนที่ได้ดังกล่าวไปทำให้บริสุทธิ์แล้วนำมาฉีดกระต่ายเพื่อผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดี พบว่าแอนติบอดีจำเพาะที่กระต่ายสร้างขึ้นสามารถต่อต้านเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียด้วยวิถีคอมพลีเมนท์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อใช้ซีรั่มของกระต่ายที่ได้รับการฉีด rOmpH เทียบกับกลุ่มที่ใช้ซีรั่มของโคที่มีแอนติบอดีและซีรั่มของโคที่ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. multocida* การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าแอนติบอดีจำเพาะที่ได้รับการเหนี่ยวนำจากโปรตีนลูกผสม rOmpH มีความสามารถทำลายเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในระดับห้องปฏิบัติการได้

คำสำคัญ: *พาสจูเรลล่า มัลโตซิดา* กระบวนการเหนี่ยวนำการทำลายด้วยคอมพลีเมนท์ โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

E-mail address: drneaw@gmail.com

Efficacy of Antibodies Conferred by the Recombinant Outer Membrane Protein H on Killing of *Pasteurella multocida* Strains by Complement-mediated Killing Assay

Panuwat Tepsukalag[1], Udsanee Korkerd[1], Korkiat Muangthai[2], Ratchanee Uthi[2], Suvichai Rojanasthien[1] and Nattawooti Sthitmatee[1,#]

[1]Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50100, Thailand
[2]Bureau of Veterinary Biologics, Department of Livestock Development,
Ministry of Agriculture and Cooperative, Pak Chong, Nakhon Ratchasima 30130, Thailand

Abstract: Outer membrane protein H (OmpH) is one of the major outer membrane protein found in membrane protein of the *Pasteurella multocida*, a causative animal pathogen of bovine hemorrhagic septicemia. In this study, we have evaluated the efficacy of antibodies which was immunized by the recombinant outer membrane protein H (rOmpH) expressed in *Escherichia coli* expression vector system. Polyclonal antibody against rOmpH was prepared in rabbit and performed as a source of antibody in the complement mediated killing assay. The results showed that there was a significant increase in killing of *P. multocida* when anti-rOmpH rabbit serum was used as the source of antibody compared with using the infected *P. multocida* bovine serum or antibody-free *P. multocida* bovine serum as the source of antibody. These results suggested that the antibody induced by the rOmpH could induce the activation of complement to destroy pathogenic strains of *P. multocida*. The killing of *P. multocida* by anti-rOmpH antibody was significant higher than serum from infected with *P. multocida* and non-vaccinated group ($P < 0.05$). In conclusion, antibody raised against rOmpH can destroy *P. multocida* strains in a laboratory level.

Keywords: *Pasteurella multocida*, Complement-mediated killing assay, Haemorrhagic septicemia

[#]Corresponding author
J. Mahanakorn Vet. Med. 2015. 10(1): 1-11.
E-mail address: drneaw@gmail.com

บทนำ

โรคคอบวมหรือโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (Hemorrhagic septicemia) ในโคและกระบือนั้นมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Pasteurella multocida* serotype B:2 (Rimler and Glisson, 1997; Rimler and Rhoades, 1989) ซึ่งสามารถพบได้ในสัตว์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้อง ม้า สุกร และอื่นๆ โดยสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดใหญ่ เช่น โคและกระบือ จะมีความไวต่อการเกิดโรคมากที่สุด โดยมักจะมีการระบาดเกิดขึ้นในช่วงฤดูฝน หรือเมื่อเกิดสภาวะเครียดต่อตัวสัตว์อันเกิดจากการจัดการต่างๆ เช่น การจัดการเคลื่อนย้ายสัตว์ เป็นต้น สัตว์ป่วยจะแสดงอาการทางคลินิกได้แก่ มีไข้สูง ซึม ไม่มีการเคี้ยวเอื้อง บริเวณหน้า คอ และหัวไหล่มีลักษณะบวมแข็ง สัตว์อาจถ่ายเป็นมูกเลือด และถ้าไม่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมตั้งแต่ช่วงแรกที่แสดงอาการสัตว์มักจะตายภายใน 4-6 วัน สำหรับในประเทศไทยพบว่ามีการระบาดอยู่เป็นระยะๆ โดยพบการระบาดสูงสุดถึง 13 ครั้งในปี พ.ศ. 2551 และล่าสุดเมื่อเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2555 ที่จังหวัดศรีสะเกษและจังหวัดสุรินทร์มีโคเสียชีวิตจากการระบาดครั้งนี้ด้วย

วัคซีนป้องกันโรคเฮโมรายิกเซฟติซีเมียที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ปัจจุบันเป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมันที่ผลิตจากเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ 6:B (Namioda:Cater) หรือ B:2,5 (Carter:Heddleston) แต่มีการใช้ในพื้นที่ไม่มากนักเนื่องจากการให้วัคซีนด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อลึกมีความลำบากในการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์หรือเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และมีผลข้างเคียง (side effect) มากในสัตว์ที่ได้รับวัคซีน เช่น บวมบริเวณที่ได้รับวัคซีน มีไข้ ซึม นอกจากนี้แล้วในการใช้วัคซีนดังกล่าวยังมักประสบปัญหา เช่น การแพ้วัคซีนทำให้การป้องกันโรคด้วยการรณรงค์ทำวัคซีนไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร แม้ว่าวัคซีนจะมีความคุ้มโรคสูงและสามารถให้ภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันโรคได้เป็นเวลานานก็ตาม ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาสูตรวัคซีนชนิดใหม่ขึ้นมาทดแทน

การศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการพัฒนาวัคซีนโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อผลิตวัคซีนลูกผสม (Recombinant protein) โดยผลิตจากยีน outer membrane protein H (*omp*H) ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนสำคัญที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *P. multocida* โดย OmpH เป็นโปรตีน porin ชนิดหนึ่งที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Chevalier *et al*., 1993) โดยโปรตีน OmpH นี้ สามารถใช้เป็นแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อต้านการติดเชื้อ *P. multocida* serotype A และ D ที่ก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกในสัตว์ปีกและโรคโพรงจมูกอักเสบในสุกรได้ตามลำดับ (Luo *et al*., 1997; Luo *et al*., 1999; Lee *et al*., 2007; Sthitmatee *et al*., 2008) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อที่จะใช้ยีน *omp*H ของเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ M-1404 (B:2) มาเป็นต้นแบบของการผลิตโปรตีนลูกผสม OmpH และนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เพื่อเหนี่ยวนำให้ร่างกายกระต่ายผลิตแอนติบอดีตอบสนอง แล้วนำแอนติบอดีในซีรั่มของกระต่ายที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการทำลายเชื้อ *P. multocida* ด้วยวิถีคอมพลีเมนท์ต่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากโคหรือกระบือในประเทศไทย ก่อนที่จะเข้าสู่ระยะการทดสอบวัคซีนในสัตว์ทดลองต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย ยีนและพลาสมิด: เชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ M-1404 (B:2) สำหรับใช้เป็นสายพันธุ์หลักอ้างอิงและ *P. multocida* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากโคและกระบือในเขตจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 2 สายพันธุ์ ซึ่งถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptose broth (TB; Difco Laboratories, MD) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนปกติ ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Dextrose starch agar (DSA; Difco) ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนปกติ สำหรับ *E. coli* ซึ่งจะใช้ในการเตรียม cDNA library จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Luria-Bertani (LB) agar หรือ broth ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

การเตรียมดีเอ็นเอ: เชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ M-1404 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth (BHI) จะถูกนำมาสกัดเอาเฉพาะ DNA ด้วยวิธี spin column (QIAprep Spin Miniprep; Qiagen, Valencia, CA, USA) หลังจากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีน *omp*H ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ตามวิธีของ Sthitmatee *et al* (2008)

การสร้างโปรตีนลูกผสม (recombinant construction): นำยีน *omp*H ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยวิธี PCR จากข้างต้นไปโคลนลงบนพลาสมิด pQE30 (Qiagen, Valencia, CA, USA) แล้วทำการตรวจสอบลำดับเบสด้วยวิธี sequencing 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) หลังจากนั้นพลาสมิดที่มีลำดับเบสถูกต้องจะถูกนำเข้าสู่เซลล์โฮสต์จำเพาะด้วยวิธีการ transformation โดยใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (Qiagen) เป็นโฮสต์ตามที่แนะนำไว้ใน instruction manual ของพลาสมิด แล้วทำการเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ที่จะใช้ในการเตรียมโปรตีนลูกผสม ตามสภาวะที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น จนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 แล้วเริ่มการทำการเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนลูกผสมด้วยการเติมสารละลาย isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Amresco, Solon, OH, USA) ความเข้มข้น 1 mM จากนั้นนำไปเพาะบ่มต่อโดยการเขย่าด้วยอัตรา 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการละลายตะกอนด้วยสารละลาย PBS (pH 7.2) ก่อนนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง ultrasonic homogenizer หลังจากนั้นทำการปั่นเพื่อแยกตะกอนทิ้ง นำสารละลายส่วนใสด้านบนไปคัดแยกโปรตีนตามขนาดที่ต้องการโดยใช้วิธี column chromatography (NATIVEN, ATTO, Tokyo, Japan) โดยการใช้เครื่องแยกโปรตีนอัตโนมัติต่อเข้ากับเครื่องรับแยกโปรตีน (Fraction collector) โดยใช้สารเคมี ขั้นตอนและวิธีการ ตามรายงานก่อนหน้านี้ (Thanasarasakulpong *et al*., 2015) หลังจากเก็บโปรตีนแล้ว นำแต่ละ fraction ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเจล SDS-PAGE แล้ววัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) โปรตีนลูกผสมที่ได้จะ

ถูกนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

การผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม: นำโปรตีนลูกผสมที่ได้มาวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) แล้วปรับความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสมเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำไปผสมกับ incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ในปริมาตรเท่ากันโดยผสมให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกัน ต่อจากนั้นนำกระต่ายพันธุ์ New Zealand White rabbit น้ำหนักประมาณ 3 กิโลกรัม ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่าปลอดแอนติบอดีต่อเชื้อก่อโรคเฮโมรายิกเซฟติซีเมียแล้วมาฉีดด้วยโปรตีนที่เตรียมไว้ทาง subcutaneous route ด้วยขนาด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนทั้งสิ้น 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 30 วัน หลังจากฉีดด้วยโปรตีนที่ผสม adjuvant ครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 15 วัน จะทำการเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่ม ซึ่งซีรั่มที่เก็บได้จะผ่านกระบวนการ absorb ด้วยแอนติเจนของโฮสต์เซลล์ (*E. coli* สายพันธุ์ M15) ก่อนที่จะนำไปทดสอบต่อไป

การทดสอบแอนติบอดีของกระต่ายด้วยวิธี Immunoblotting: ตามวิธีที่ได้รายงานไว้แล้ว (Laemmli, 1970; Sthitmatee *et al*., 2008) ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้แก่โปรตีนลูกผสมชนิดเดียวกับที่ใช้เป็นวัคซีนในกระต่ายและ 0.3% formalinized-whole cell ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา โดยใช้ SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นเจล 12.5% และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue หลังจากนั้นจะทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนจากเจลไปยังแผ่น nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences KK, Tokyo, Japan) ตามด้วยการเจือจางโพลีโคลนัลแอนติบอดีของกระต่ายที่ได้จากการทดลองก่อนหน้าข้างต้นในอัตราส่วน 1:50 ด้วยสารละลาย blocking buffer (1% skim milk, 1% bovine serum albumin , 0.1% sodium azide) เป็น primary antibody ส่วน secondary antibody จะใช้ horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Sigma) เจือจางด้วยสารละลาย blocking buffer ด้วยเช่นกันในอัตราส่วน 1:1000 และใช้ 3, 3-diaminobenzidine (DAB; Sigma) ขนาด 20 มิลลิกรัมใน PBS (pH 7.2) เป็นสารละลาย substrate **(**Sthitmatee *et al*., 2008)

การทดสอบด้วยวิธี Complement-mediated killing assay: ตามวิธีของ Ayalew *et al* (2008) และ Pandhe *et al* (1998) โดยส่วนประกอบต่างๆ ดังแสดงตารางที่ 1 นำซีรั่มกระต่ายที่ได้รับการฉีดโปรตีนลูกผสม rOmpH นำไปให้ความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อกำจัดสารต่างๆ ในระบบคอมพลีเมนท์ในซีรั่ม โดยกลุ่มควบคุมลบเป็นซีรั่มกระต่ายปลอดโรค (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล) และกลุ่มควบคุมบวกใช้ซีรั่มโคที่รอดชีวิตจากการป่วยด้วยโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียและซีรั่มโคที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย สำหรับแหล่งของสารต่างๆ ในระบบคอมพลีเมนท์ได้จาก Colostrum-deprived neonatal calf serum (CDCS)

ทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth และทำการ decapsulated ในสารละลาย PBS ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากนั้นทำการล้างด้วยสารละลาย PBS อีกครั้ง แล้วปรับความเข้มข้นด้วยสารละลาย PBS ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) = 0.5 (1:1000) ซึ่งมีค่าความเข้มข้น

ของเชื้อแบคทีเรียประมาณ 7.4×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วปรับความเข้มข้นด้วยสารละลาย PBS ให้มีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเป็น 2.8×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และ 4.76×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป นำซีรั่มและเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้จากข้างต้น จำนวน 50 ไมโครลิตร มาผสมรวมกันตามส่วนผสมในตารางที่ 1 โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียต่อปฏิกิริยาประมาณ 1.8×10^4 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเตรียมสารละลายตามสูตรข้างต้นจำนวน 2 ชุด ชุดแรกนำส่วนผสม 50 ไมโครลิตร spread ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ทันที (T_0) ส่วนชุดที่สองนั้นทำการเพาะบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (T_{30}) แล้วจึงนำส่วนผสม 50 ไมโครลิตร spread ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar เช่นกัน แล้วทำการเพาะบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาทำการคำนวณตามสูตร ดังนี้ Percent killing (%) = [(T_0 growth - T_{30} growth) / T_0 growth] × 100 โดยจะทำซ้ำแต่ละส่วนผสมจำนวน 3 ซ้ำ หลังจากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวมาการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้วิธี Student's t-test ด้วยโปรแกรม IBM SPSS statistic version 17.0 Windows

จรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์: การปฏิบัติต่อสัตว์และหัตถการที่เกิดขึ้นในการทดลองนี้ อยู่ภายใต้คำแนะนำและควบคุมโดยคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ภายใต้แนวทางปฏิบัติเกี่ยวกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ สภาวิจัยแห่งชาติ

ผลการทดลอง

SDS-PAGE และ Immunoblotting: ผลการทำ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสีย้อม Coomassie brilliant blue และ Immunoblotting พบว่าโปรตีนลูกผสม OmpH มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 39 กิโลดาลตัน (รูปที่ 1A) ซึ่งเมื่อทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนจากเจลไปยังแผ่น nitrocellulose membrane แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Immunoblotting โดยใช้ซีรั่มของกระต่ายที่ได้รับโปรตีนลูกผสม OmpH เป็น primary antibody จะพบว่าโปรตีนลูกผสมดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น antigenicity (รูปที่ 1B)

Complement-mediated killing assay: ผลการทดสอบด้วยวิธีการเหนี่ยวนำการทำลายเชื้อด้วยวิถีคอมพลีเมนท์ แสดงดังรูปที่ 3 โดยใช้ anti-rOmpH rabbit serum พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการทำลายเชื้อ *P. multocida* ได้ทั้งสามตัวอย่าง โดยพบว่ามีอัตราการทำลายที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อใช้ anti-rOmpH rabbit serum ดังกล่าวเป็นแหล่งของแอนติบอดี เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใช้ซีรั่มจากวัวที่เคยติดเชื้อ *P. multocida* และกลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) แต่ในทางตรงข้ามกับกลุ่มที่ไม่มี CDCS ซึ่งเป็นแหล่งของโปรตีนคอมพลีเมนท์จะไม่มีการทำลายเชื้อเกิดขึ้นเมื่อและเทียบกับกลุ่มที่มีการใส่ CDCS จะพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใส่เฉพาะ CDCS อย่างเดียว

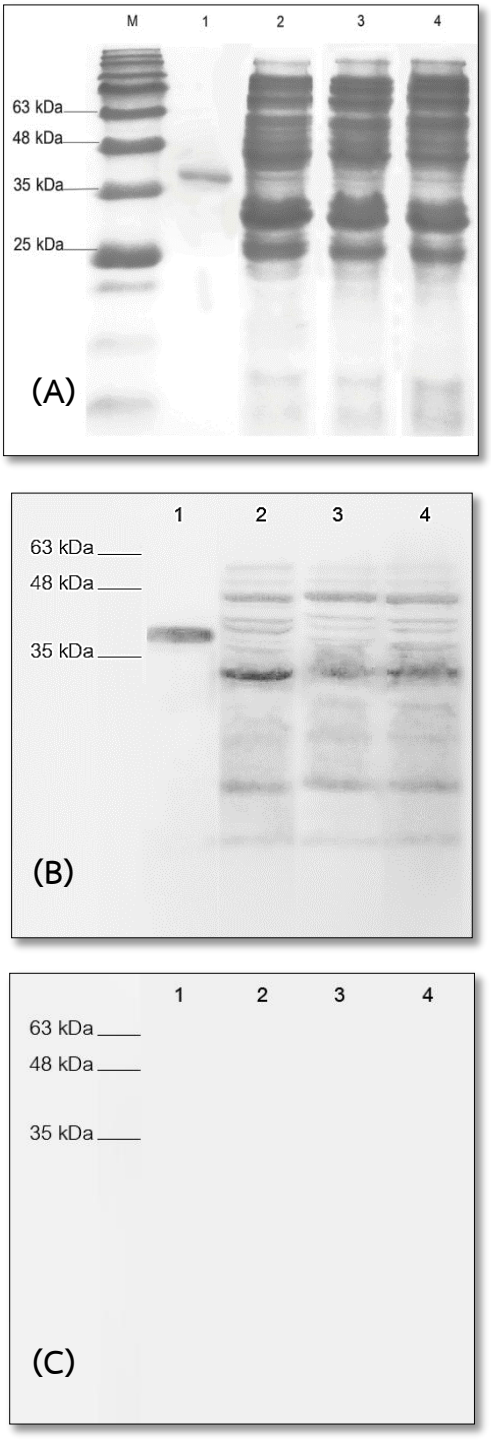
ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบในแต่ละกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

Group	Antibody (µl)	Complement: CDCS (µl)	PBS (µl)
1. Anti-rOmpH + CDCS	50	50	-
2. Anti-rOmpH	50	-	50
3. HS positive serum + CDCS	50	50	-
4. HS positive serum	50	-	50
5. Negative serum + CDCS	50	50	-
6. Negative serum	50	-	50
7. No antibody	-	50	50

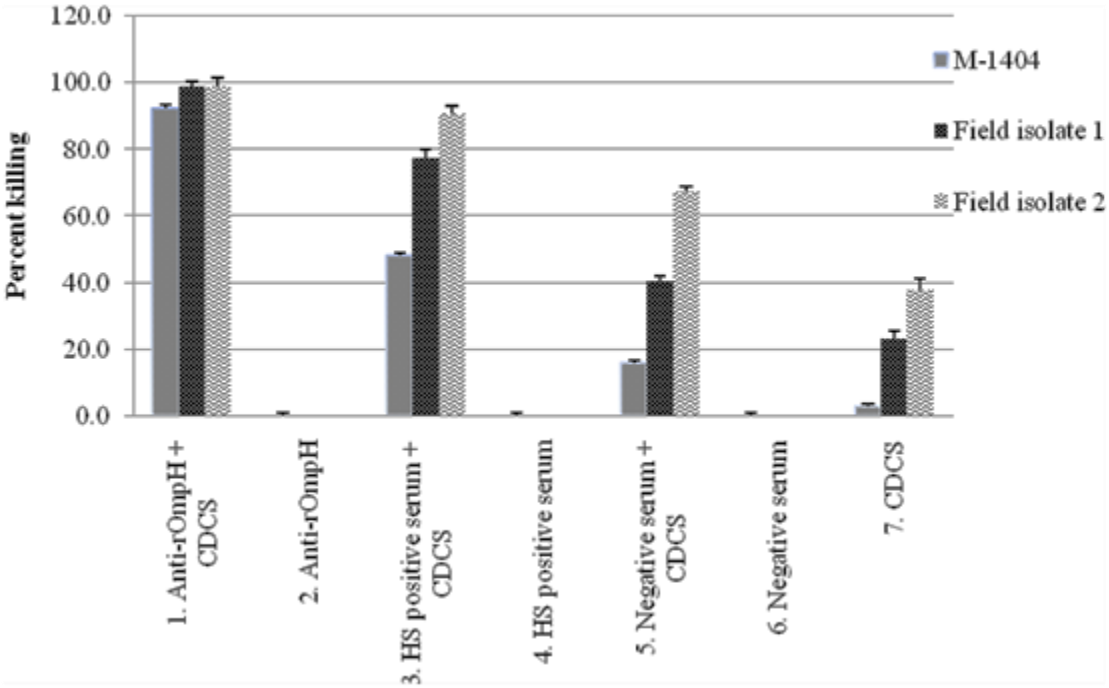
สรุปและวิจารณ์ผล

OmpH เป็นแอนติเจนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีความสามารถในการเหนี่ยวนำการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยการสร้างแอนติบอดีต่อ OmpH (Anti-OmpH) ได้ โดยในการศึกษานี้ทางคณะผู้วิจัยได้ผลิตโปรตีนลูกผสม OmpH (rOmpH) ซึ่งมีขนาดประมาณ 39 กิโลดาลตันจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย โดยเมื่อนำโปรตีนดังกล่าวไปฉีดให้กับกระต่ายทดลองเพื่อทำการผลิตพอลีโคลนัลแอนติบอดี แล้วนำเอาซีรั่มที่ได้มาทำการตรวจด้วยวิธี Immuno-blotting พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นสามารถทำปฏิกิริยากับ rOmpH และส่วนประกอบต่างๆของเชื้อ *P. multocida*ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า rOmpH ที่ผลิตได้นั้นสามารถเหนี่ยวนำให้ร่างกายกระต่ายสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อโปรตีน rOmpH ได้

Outer membrane protein (OMP) ของเชื้อ *P. multocida* ใช้เป็นต้นแบบเพื่อผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant OMP: rOMP) สำหรับเป็นวัคซีนต้นแบบเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อพาสจูเรลล่า ทั้งโรคอหิวาต์สัตว์ปีกและโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (Ayalew *et al*., 2008; Confer *et al.,* 2009; Joshi *et al*., 2013; Sthitmatee *et al*., 2008) ซึ่งแอนติบอดีต่อโปรตีนนี้ พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *P. multocida* ด้วยวิถีคอมพลีเมนท์ ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมและเป็นที่ยอมรับในการพิจารณาประสิทธิภาพของแอนติบอดี (Ayalew *et al*., 2008; Confer *et al*., 2009; McQuillen *et al*., 1994; Pandher *et al*., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าแอนติบอดีต่อ rOmpH ที่ผลิตขึ้นมามีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำวิถีคอมพลีเมนท์ในการทำลายเชื้อ *P. multocida* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้สูงกว่าทั้งจากแอนติบอดีในกลุ่มควบคุมบวกจากซีรั่มของโคที่มีแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียและแอนติบอดีของกลุ่มควบคุมลบจากซีรั่มของโคที่ไม่ได้ทำวัคซีนป้องกันโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียมาก่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า anti-rOmpH antibody มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการทำลายเชื้อด้วยวิถีคอมพลีเมนท์ได้ดีกว่าแอนติบอดีที่เกิดจากการติดเชื้อ *P. multocida* อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการเติม CDCS เพื่อเป็นแหล่งของคอมพลีเมนท์และกลุ่มที่ไม่ได้เติม CDCS ในกลุ่มการทดลองด้วยซีรั่มชนิดเดียวกันพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เนื่องจากคอมพลีเมนท์เป็นตัวการสำคัญใน



รูปที่ 1 แสดงขนาดของโปรตีนที่ถูกแยกบน SDS-PAGE (รูป A) ภายหลังจากการย้อมด้วยCoomassie brilliant blue (1) ประกอบด้วยโปรตีนลูกผสม OmpH (2) เชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ M-1404 (serovar B:2) ซึ่งเป็นสายพันธุ์หลักอ้างอิง (3 และ 4) เชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากสัตว์ป่วยในบริเวณที่เกิดการระบาดในประเทศไทยจำนวน 2 สายพันธุ์ตามลำดับ (รูป B และ C) แสดงขนาดของโปรตีนบน nitrocellulose membrane ที่ผ่านการทำการทดสอบด้วยวิธี immunoblottingโดยใช้ซีรั่มของกระต่ายที่ได้รับโปรตีนลูกผสม OmpH และซีรั่มของกระต่ายที่ไม่ได้รับโปรตีนลูกผสมตามลำดับ



รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงอัตราการทำลายเชื้อ โดยทดลองกระบวนการเหนี่ยวนำวิถีคอมพลีเมนท์ด้วยแอนติบอดีต่อ rOmpH กับเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ M-1404 (serovar B:2) และเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากสัตว์ป่วยในบริเวณที่เกิดการระบาดในประเทศไทยจำนวน 2 สายพันธุ์

การทำลายเซลล์แบคทีเรียดังกล่าว อีกทั้งเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการใช้แอนติบอดีและคอมพลีเมนท์ในการทดลองจะมีอัตราการทำลายเชื้อแบคทีเรียที่สูงกว่ากลุ่มที่ใช้เฉพาะคอมพลีเมนท์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิถีคอมพลีเมนท์ในการทำลายเชื้อ *P. multocida* นั้นจำเป็นต้องอาศัย classical pathway ที่มีการเหนี่ยวนำการทำงานของวิถีคอมพลีเมนท์โดยอาศัยการกระตุ้นโดยแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ (antigen-antibody complex) เป็นหลัก (Pandher *et al*., 1998; Taylor, 1992) กระบวนการเหนี่ยวนำการทำลายด้วยวิถีคอมพลีเมนท์ (complement-mediated lysis) นั้นเป็นกระบวนการตอบสนองของร่างกายในการควบคุมการติดเชื้อต่างๆและเชื่อว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคติดเชื้อพาสจูเรลล่า (Pasteurellosis) โดยพบว่าระดับปริมาณคอมพลีเมนท์จะลดลงในวัวที่มีความเครียดจากการขนส่ง (Purdy *et al*., 1991) และการลดลงของคอมพลีเมนท์นั้นยังสัมพันธ์กับอัตราการตายที่เพิ่มขึ้นภายหลังจากการขนส่งสัตว์ในระยะทางไกล (Purdy *et al*., 1991) อีกด้วย

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าโปรตีนลูกผสม rOmpH ที่ผลิตขึ้นมาจากยีน *omp*H ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียสามารถเหนี่ยวนำให้กระต่ายผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อrOmpH และมีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำทำให้เกิดการทำลายเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียได้ซึ่งในลำดับต่อไปจะได้ทดสอบ

ประสิทธิภาพของโปรตีนลูกผสม rOmpH ในระดับสัตว์ทดลอง ซึ่งอาจรวมถึงการใช้เป็นวัคซีนต้นแบบร่วมกับโปรตีนลูกผสมต่อ leukotoxin (Lkt) ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียร่วมด้วย ซึ่งจะทำให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันและกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดียิ่งขึ้นไปอีกด้วย (Ayalew *et al*., 2008; Confer *et al*., 2009)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการการพัฒนาวัคซีนต้นแบบเพื่อป้องกันโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดหยอดจมูก (Development of intranasal Hemorrhagic septicemia vaccine prototype) ที่สนับสนุนงบประมาณโดยสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) รหัสโครงการ CRP5605010390 และเป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยสำหรับนักศึกษาชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Ayalew, S., Confer, A.W., Payton, M.E., Garrels, K.D., Shrestha, B., Ingram, K.R., Montelongo, M.A. and Taylor, J.D. 2008. *Mannheimia haemolytica* chimeric protein composed of the major surface-exposed epitope of outer membrane lipoprotein PlpE and the neutralizing epitope of leukotoxin. *Vaccine.* 26: 4955-4961.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 284-354.

Confer, A.W., Ayalew, S., Montelongo, M., Step, D.L., Wray, J.H., Hansen, R.D. and Panciera, R.J. 2009. Immunity of cattle following vaccination with a Mannheimia haemolytica chimeric PlpE–LKT (SAC89) protein. *Vaccine*. 27: 1771-1776.

Joshi, S., Tewari, K. and Singh, R. 2013. Comparative immunogenicity and protective efficacy of different preparations of outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* (B:2) in a mouse model. *Vet. Arhiv*. 83, 665-676.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Lee, J., Kim, Y.B. and Kwon M. 2007. Outer membrane protein H for protective immunity against *Pasteurella multocida*. *J. Microbiol*. 45: 179-184.

Luo, Y., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Hancock, R.E.W., Bains, M., Cheng, I.N. and Wang, C. 1997. Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (ompH) of *Pasteurella multocida* X-73. *J. Bacteriol*. 179: 7856-7864.

Luo, Y., Zeng, Q., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Cheng, I.N. and Wang, C. 1999.

Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine.* 17: 821-831.

McQuillen, D.P., Gulati, S. and Rice, P.A. 1994. Complement-mediated bacterial killing assays. *Methods Enzymol*. 236: 137-146.

Okay, S., Ozcengiz, E., Gursel, I. and Ozcengiz, G. 2012. Immunogenicity and protective efficacy of the recombinant Pasteurella lipoprotein E and outer membrane protein H from *Pasteurella multocida* A:3 in mice. *Res. Vet. Sci*. 93: 1261–1265.

Pandher, K., Confer, A.W. and Murphy, G.L. 1998. Genetic and immunologic analyses of PlpE, a lipoprotein important in complement-mediated killing of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Infect. Immunol*. 66: 5613-5619.

Rimler, R.B., Glisson, J.R. 1997. Fowl Cholera, p.143-159. In Calnek, B.W. and Barnes, H.J. (eds.), Diseases of Poultry, 10th ed. Iowa State University Press, Ames, IA.

Rimler, R.B. and Rhoades, K.R. 1989. Pasteurella multocida and Fowl Cholera, p.37-74, 95-114.In Adlam, C. and Rutter, J.M. (eds.), Pasteurella and Pasteurellosis, 1st ed. Academic Press Limited, London.

Singh, A.P., Singh, S., Ranjan, R., Gupta, S.K., Singh, V.P. and Sharma, B. 2010. Molecular heterogeneity of plpE gene in Indian isolates of *Pasteurella multocida* and expression of recombinant PlpE in vaccine strain of P. multocida serotype B:2. *J. Vet. Sci*. 11(3): 227-233.

Sthitmatee, N., Numee, S., Kawamoto, E., Sasaki, H., Yamashita, K., Takahashi, N., Kataoka, Y. and Sawada, T. 2008. Protection of chickens from fowl cholera by vaccination with recombinant adhesive protein of *Pasteurella multocida*. *Vaccine*. 26: 2398-2407.

Taylor, P.W., 1992. Complement-mediated killing of susceptible gram-negative bacteria: an elusive mechanism. *Exp. Clin. Immunogenet*. 9: 48-56.

Thanasarasakulpong, A., Poolperm, P., Tankaew, P., Sawada, T. and Sthitmatee, N. 2015. Protectivity conferred by immunization with intranasal recombinant outer membrane protein H from *Pasteurella multocida* serovar A1 in chickens. *J. Vet. Med. Sci*. 77(3): 321–326.

โรงพยาบาลเพื่อการสอนด้านสัตว์ใหญ่

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

The Large Animal Teaching Hospital

Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology

"มุ่งมั่นบริการวิชาการ สนับสนุนการเรียนการสอนและงานวิจัยอย่างต่อเนื่อง"

ภารกิจ...

◉ บริการให้คำปรึกษาด้านสุขภาพสัตว์และการเลี้ยงดูสัตว์แก่เกษตรกร

◉ บริการตรวจวินิจฉัยโรคและรักษาสัตว์ป่วยทั้งในและนอกสถานที่โดยมีอุปกรณ์เครื่องมือที่ทันสมัย เช่น เครื่องเอกซเรย์ เครื่องอัลตราซาวนด์

◉ บริการย้ายฝากตัวอ่อนในโค

◉ บริการให้คำปรึกษาแก้ปัญหาการผสมติดยากในสัตว์

◉ บริการให้คำปรึกษาด้านการจัดตั้งศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

◉ สนับสนุนการทำงานวิจัยและการค้นคว้าเพื่อพัฒนาด้านวิชาการของคณาจารย์

◉ สนับสนุนการเรียนการสอนของนักศึกษาโดยมุ่งเน้นให้นักศึกษาเรียนรู้ได้จากประสบการณ์จริงภายใต้การดูแลของสัตวแพทย์ประจำโรงพยาบาล และคณาจารย์ที่มีความรู้ความสามารถเฉพาะด้านอย่างใกล้ชิด

"เราภูมิใจที่ได้ให้บริการ"

สถานที่ติดต่อ... 140 ถนนเชื่อมสัมพันธ์ แขวงกระทุ่มราย เขตหนองจอก กรุงเทพฯ 10530
โทร. 0-2988-3655 ต่อ 5100 website: www.vet.mut.ac.th/lah