

บทคัดย่อ

Pasteurella multocida เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นทราบดีว่าก่อให้เกิดการติดเชื้อทั้งในสัตว์เลี้ยงในฟาร์มและสัตว์ป่า อัตราการเพิ่มขึ้นของการติดเชื้อนี้ที่พบว่าก่อให้เกิดโรคคหิวหวัดและการติดเชื้อในกระแสเลือด กระตุ้นความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาวัคซีนในการป้องกันโรคมากยิ่งขึ้น วัคซีนที่มีใช้ในปัจจุบันซึ่งมีทั้งแบบเชื้อตายและเชื้อเป็นก็มีข้อจำกัดในการใช้ มีการศึกษารายงานว่า *P. multocida* มีแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ป้องกันการติดเชื้อระหว่างสายพันธุ์ได้ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของฐานข้อมูล NCBI พบว่าแอนติเจนนี้มีความใกล้เคียงกับยีน *plpB* มาก ในงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบ PCR primers ที่จำเพาะกับยีน *plpB* โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. multocida* Pm70 ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูลสากล เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณยีน *plpB* ของ *P. multocida* A:1 (FC-Pakchong) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย จากการทดลองยังพบยีน *plpB* ใน *P. multocida* สายพันธุ์ NIAH DU1551/97 (A:1) และ NIAH D1275/27 (A:3,4) ซึ่งพบว่าเป็นสาเหตุให้เกิดโรคคหิวหวัดเปิด-ไก่ในประเทศไทยด้วย ยีน *plpB* ประกอบไปด้วยนิวคลีโอไทด์ 831 คู่เบสถูกนำมาเชื่อมใส่ในพลาสมิด pGEX-5X-1 ซึ่งมียีนที่สร้างโปรตีน GST อยู่ จากนั้นนำไปตรวจสอบการสร้างโปรตีน PlpB ใน *E. coli* โดยใช้ SDS-PAGE และทำการแยกโปรตีนนี้ด้วย affinity chromatography โดยใช้ glutathione พบว่า โปรตีน PlpB-GST มีขนาดตรงตามที่คาดไว้ คือ ประมาณ 63 กิโลดาลตัน ซึ่งหลังจากตัดด้วย Factor Xa จะได้โปรตีนขนาด 36 กิโลดาลตัน จากนั้นรีคอมไบแนนซ์โปรตีนดังกล่าวได้ถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษในหนูโดยทดสอบที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 ไมโครกรัม ซึ่งไม่พบความเป็นพิษใดแม้ใช้ในความเข้มข้นสูงถึง 200 ไมโครกรัม เมื่อทำการทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดรีคอมไบแนนซ์โปรตีน GST-PlpB ในหนูถีบจักร ก่อนจะฉีดเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ A:1 ในขนาด 100 เท่าของ LD₅₀ พบว่าให้ความคุ้มโรคร้อยละ 20 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน ส่วนเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ A:3,4 พบว่าให้ความคุ้มโรคร้อยละ 0-30 จากผลการศึกษาชี้ แสดงให้เห็นว่าโปรตีน PlpB นี้อาจไม่ใช่เป้าหมายที่เหมาะสมหากต้องการพัฒนาวัคซีนแบบหน่วยย่อยสำหรับป้องกันการติดเชื้อ

ABSTRACT

Pasteurella multocida is a gram-negative bacterial pathogen known to affect a wide range of domestic and wild animals. The increasing incidence of *P. multocida* isolated from cases of fowl cholera and hemorrhagic septicemia in most parts of the world has led to a renewed interest in this pathogen as well as in the development of vaccines. The currently available vaccines, bacterins and modified live vaccines, have limited efficacy. *P. multocida* has been demonstrated to express an antigen that induces cross protection against different serotypes. The purified cross-protective antigen of *P. multocida* was consistent with the *plpB* gene listed in the National Center for Biotechnology Information database for *P. multocida*. In this study, the PCR primers were designed based on the nucleotide sequence of *P. multocida*, Pm70 which was already published and used to amplify the fragment of *plpB* gene from *P. multocida* A:1 (FC-Pakchong). The *plpB* gene could also be detected in *P. multocida* NIAH DU1551/97 (A:1) and *P. multocida* NIAH D1275/27 (A:3,4); that were most associated with fowl cholera. The *plpB* gene, consisting of 831 base pairs was cloned and expressed. The purified PCR product was inserted into the pGEX-5X-1 plasmid which was carrying a gene encoding for GST protein. The expression of recombinant GST-tagged PlpB fusion protein in *Escherichia coli* was detected by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and purified by immobilized glutathione affinity column chromatography. The purified recombinant GST-PlpB fusion protein showed a major band migrated at about 63 kDa on SDS-PAGE gel which was an approximate size of the fusion protein. (After cleavage by factor Xa, GST tag was cleaved. The separated protein was presented at about 36 kDa.) Three concentrations of recombinant GST-PlpB fusion protein (50, 100, and 200 µg) were tested for the toxicity in mice. The results showed no toxicity in mice at the highest tested concentration (200 µg) of the protein. Moreover, the immunoprotective property of the recombinant GST-PlpB protein was determined in mice after subcutaneous immunization and challenge with an approximate dose of 100 LD₅₀ of *P. multocida* serotype A:1. It was demonstrated that this subunit vaccine provided a 20% survival rate whereas all of the non-immunized mice died from *P. multocida* infection. Additionally, the survival rate was about 0-30% for *P. multocida* serotype A:3,4. In conclusion, our data indicated that the PlpB protein may not be an appropriate target as a candidate subunit vaccine for *P. multocida* infection.