สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
1871 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 0 2252 0161
โทรสาร 0 2254 0212
แฟนเพจสถานเสาวภา (สถานเสาวภา สภากาชาดไทย : Queen Saovabha Memorial Institute)
อีเมล์ qsmibulletin@gmail.com
www.saovabha.org

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
๑๐๐ ปี
เพื่อปิตุภูมิ เพื่อวิทยา เพื่อมนุษย์ชาติ

สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

ISSN 1685 - 6341

VOLUME 22, NUMBER 1 - 2 / 2023 ปีที่ 22 ฉบับที่ 1 - 2 / 2566

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

(QSMI Bulletin)

ISSN 1685 – 6341

ปีที่ 22 ฉบับที่ 1 - 2 / 2566

VOLUME 22, NO. 1 - 2 / 2023

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

Queen Saovabha Memorial Institute

สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

(QSMI Bulletin)

คณะดำเนินการ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

ที่ปรึกษา วิศิษฏ์ สิตปรีชา, ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร

บรรณาธิการ สุนุชชา สุนทรารชุน

รองบรรณาธิการ ลาวัณย์ จันทร์โฮม, บุญเลิศ ล้ำเลิศเดชา, อรวรรณ แซ่โค้ว, สุรศักดิ์ เอกโสวรรณ

กองบรรณาธิการ สุจิตรตรา ขุนทรัพย์, ธรรมนูญ ด้วงโสน, สุดา พันธุ์รินทร์, สุเมธ โพธิกุล, ทักษะ เวสารัชชพงษ์, ปณิธิ ละอองบัว, ณัฐวดี มนต์อ่อน, ชานนท์ ฝาเงิน, ศรัณยา หวังเจริญตระกูล, ศันสนีย์ กาญจนวีรวิทย์

จัดพิมพ์และเผยแพร่โดย สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
1871 ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน
กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 0 2252 0161
www.saovabha.org

ออกแบบปกโดย ศรัณยา หวังเจริญตระกูล

ISSN 1685 – 6341

---

* เนื้อหาบทความทางวิชาการในวารสารนี้เป็นความคิดเห็นและความรับผิดชอบของผู้เขียน

บทบรรณาธิการ

สารเสาวภา ได้เริ่มจัดทำขึ้น ฉบับนี้เป็นฉบับที่ 1 - 2 ของปีที่ 22 (พ.ศ. 2566) โดยเนื้อหาของสารเสาวภาจะมุ่งเน้นในการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการทางด้านวิทยาศาสตร์ตามพันธกิจของสถานเสาวภา โดยบทความทางวิชาการได้จากการวิเคราะห์ สังเคราะห์ จากผลงานวิจัยที่มีการเผยแพร่และมีการเรียบเรียงผลงานเป็นภาษาไทยที่ทำให้เข้าใจง่าย ก่อให้เกิดแนวคิดเพื่อต่อยอดการศึกษาวิจัยในอนาคต บทความอาจมีขั้นตอนการทำการทดลองหรือวิธีการอย่างย่อและบทสรุปวิเคราะห์ในตอนท้าย โดยมีกลุ่มเป้าหมายเป็นบุคคลทั่วไปที่มีความสนใจทางด้านวิทยาศาสตร์ นักวิจัยและนักวิชาการอันจะนำมาซึ่งการแลกเปลี่ยนความรู้ ความคิดเห็นและแนวคิดใหม่ๆ และนำไปสู่ความร่วมมือทั้งภายในหน่วยงานและระหว่างสถานเสาวภากับหน่วยงานอื่นๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทางด้านวิชาการที่สอดคล้องกับพันธกิจของสถานเสาวภา

สารเสาวภาฉบับนี้ มีเนื้อหาของบทความที่มีความหลากหลายและน่าสนใจสำหรับนักวิชาการและประชาชนผู้สนใจทางวิทยาศาสตร์ทั่วไป ประกอบด้วยบทความทางวิชาการ 3 เรื่อง ซึ่งเกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนจากน้ำลายสุนัขหลังการถูกสุนัขกัดหรือเลีย การประยุกต์ใช้อนุภาคเหมือนไวรัสในด้านต่าง ๆ เช่น การนำมาใช้เป็นวัคซีนหรือการนำมาใช้เป็นพาหะในการนำส่งยา และการใช้เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์เพื่อระบุตำแหน่งเอพิโทปซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์ได้ นอกจากนี้ยังมีบทความวิชาการที่สรุปมาจากงานวิจัยอีก 3 เรื่อง ได้แก่ ความสำเร็จระดับต้นน้ำในการผลิตวัคซีนเชื้อตายป้องกันโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า โดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย การพัฒนาเทคโนโลยีไฮบริโดมาเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลอิมมูโนโกลบูลินจีของม้า และการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเพื่อนำไปสู่การสร้างพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้าต่อไปในอนาคต

กองบรรณาธิการสารเสาวภา หวังเป็นอย่างยิ่งว่าสารเสาวภาฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ในทางวิชาการสำหรับผู้อ่านทุกท่าน

สุนุชชา สุนทรารชุน

บรรณาธิการ

สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

ปีที่ 22 ฉบับที่ 1 - 2 / 2566 VOLUME 22 NO. 1 - 2 / 2023 ISSN 1685 – 6341

ความสำเร็จของการพัฒนาวัคซีนต้นแบบเพื่อผลิตวัคซีนเชื้อตายป้องกันโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า โดย สถานเสาวภา สภากาชาดไทย 1 - 8

The initial succession for developing an inactivated vaccine for African horse sickness serotype 1 at the Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

สุพจน์ วัฒนะพันธ์ศักดิ์ ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร

การเตรียมเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมาเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลอิมมูโนโกลบูลินจีของม้า 9 - 14

Preparation of monoclonal equine immunoglobulins G by hybridoma technology

วชิราภรณ์ แสงสีสม สุรสีห์ อุ๋ยสุวรรณ กาญจนา เอี่ยมอัมพร สรีญา แก้มทอง อุดม ติ่งต้อย

อนุภาคเหมือนไวรัสลูกผสม: การสร้างและการประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันโรคติดเชื้อ 15 - 19

Chimeric virus-like particles: constructions and applications for infectious diseases

รพี สินเนืองนอง

แบคทีเรีย *Capnocytophaga canimorsus* เชื้ออันตรายจากน้ำลายสุนัข 21 - 25

Capnocytophaga canimorsus, the hazardous bacteria from dog saliva

ณัฐวดี มนต์อ่อน

ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าสู่การสร้างพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า 27 - 32

Assessing the efficiency of a veterinary rabies vaccine in advancing toward a rabies-free area

บุณยกร วงสกุล ณัฐวดี มนต์อ่อน ชานนท์ ฝาเงิน ชลทิพย์ พิพัฒนาบูรณ์

การใช้เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์เพื่อระบุตำแหน่งเอพิโทปและการนำมาใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์ 33 - 38

Application of phage display technology for epitope identification and utilization in medical research

ปัณณทัต อารีกุล

สารเสาวภา
Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

ความสำเร็จของการพัฒนาวัคซีนต้นแบบเพื่อผลิตวัคซีนเชื้อตายป้องกันโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า โดย สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

The initial succession for developing an inactivated vaccine for African horse sickness serotype 1 at the Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

สุพจน์ วัฒนะพันธ์ศักดิ์[1] ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร[2]

Suphot Wattanaphansak[1], Narongsak Chaiyabutr[2]

1 ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 ฝ่ายวิชาการ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

1 Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

2 Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (African Horse Sickness; AHS) เป็นโรคอุบัติใหม่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส RNA มีการระบาดในม้าครั้งแรกใน ประเทศไทยเมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2563 จึงเป็นเรื่องสำคัญที่ต้องเร่งพัฒนาการทำวัคซีนเพื่อลดปัญหาการระบาดและลดอัตราการตายของม้า กลุ่มนักวิจัยจากสถานเสาวภาและจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ร่วมศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคไวรัสอุบัติใหม่ทันทีที่มีการระบาดของโรค กระบวนการพัฒนาวัคซีนเริ่มจากการแยกเชื้อไวรัสจากอวัยวะภายในของม้าที่ตายจากโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า และเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงวีโรเซลล์ (Vero cells) เพื่อนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 (AHS serotype 1 inactivated vaccine) โดยวัคซีนเชื้อตายนี้ได้ทดสอบความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัคซีนในหนูและในม้าทดลอง โดยผลพบว่าวัคซีนเชื้อตายต้นแบบที่ได้พัฒนา มีความปลอดภัย และสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีในม้าและไม่พบผลข้างเคียงจากการอักเสบตรงบริเวณที่ฉีดวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 ม้าที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน เพื่อให้ม้ามีภูมิคุ้มกันในระดับสูงและอยู่ได้นานแนะนำให้ฉีดวัคซีนเชื้อตายเข็มกระตุ้นปีละ 2 ถึง 3 ครั้ง ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้เกิดองค์ความรู้ที่จะเป็นประโยชน์ต่อสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ในการพัฒนาผลิตวัคซีนต้นแบบชนิดอื่นที่ผลิตมาจากเซลล์เพาะเลี้ยงต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีนเชื้อตาย กาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 สถานเสาวภา ม้า

ABSTRACT: The emergence of the RNA virus disease African Horse Sickness (AHS) outbreak in Thailand in March 2020 has underscored the importance of rapidly developing a vaccine to safeguard the lives of horses and reduce the burden of the disease, including horse mortality. The mission undertaken by QSMI, Thai Red Cross Society and the collaboration with the Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for the development of a vaccine targeting this newly emerged RNA virus, AHS, commenced immediately following the outbreak. The vaccine development process included virus isolation of AHS virus serotype 1, utilization of cell culture techniques for development, and specific time schedules for assessing vaccine efficacy and safety in experimental mice and horses. These techniques facilitated the creation of an inactivated vaccine (IAV) designed for African horse sickness serotype 1, using Gel 01™ as an adjuvant. This formulation has proven to be safe and capable of inducing high antibody titers IAV. Notably, this IAV formulation has elicited a robust antibody response in horses without eliciting local reactions or causing mild systemic effects. However, it is worth noting that naïve horses still required ≥2 vaccinations, in addition to an annual booster vaccination, to attain high antibody titers. In the present study, there is much to be gained from studying the breakthroughs in vaccine development achieved at QSMI.

Keywords: Inactivated vaccine, African horse sickness serotype 1, QSMI, Horse

บทนำ

โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (African Horse Sickness; AHS) เป็นโรคติดเชื้อไวรัสที่ติดต่อร้ายแรงในสัตว์ตระกูลม้า ลา ล่อ อูฐ และม้าลาย สามารถพบการแพร่กระจายของโรคนี้ในภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลก พบครั้งแรกที่เยเมนในปี ค.ศ. 1927 ต่อมาพบโรคระบาดทั่วไปอยู่ตอนใต้ของทะเลทรายซาฮาร่า เป็นโรคติดเชื้อจากไวรัสชนิด Double–stranded RNA virus, Family Reoviridae, Genus Orbivirus ไม่มีเปลือกหุ้ม ตัวไวรัสมี 9 ซีโรไทป์ (Serotypes) ขนาด 55-70 nm โรคมีระยะฟักตัว 2-21 วัน ไวรัสถูกยับยั้งหรือทำลายด้วยความร้อน > 60°C ฟอร์มาลีน เบต้าโพรพิลิโอแลคโตน สารกัมมันตภาพรังสี อัตราการตายของม้าที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส AHS 70-95% พาหะที่นำเชื้อไวรัสสู่ม้า ได้แก่ แมลงดูดเลือด ตัวริ้น (ได้แก่ *Culicoides imicola* และ *C. bolitinos*) รวมทั้งยุงและแมลงวันดูดเลือดใน Genus *Stomoxys* และ *Tabanus* เป็นพาหะที่นำเชื้อไวรัสมาสู่ม้า โรค AHS ยังไม่พบรายงานการติดต่อจากสัตว์สู่คน การระบาดของโรค AHS ปัจจุบันพบในหลายประเทศในทวีปต่าง ๆ รวมทั้งประเทศในทวีปเอเชียด้วย สำหรับประเทศไทย เริ่มมีรายงานการพบม้าแข่งล้มตายอย่างไม่ทราบสาเหตุเป็นจำนวนมากในอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ตั้งแต่เดือนมีนาคมจนถึงพฤษภาคม พ.ศ. 2563 พบม้าตายเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ จนยอดสะสมมีมากกว่า 550 ตัว โดยประเมินมูลค่าความเสียหายมากถึงหลายร้อยล้านบาท นอกจากนี้ยังพบการตายของม้าในลักษณะเดียวกันแพร่กระจายไปยังจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (สถานีเพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯ สถานเสาวภา) เพชรบุรี และชลบุรี และเมื่อทำการชันสูตรโรคและตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา พบว่าเป็นเชื้อ AHS virus serotype 1 จึงถือว่าโรค AHS เป็นโรคไวรัสอุบัติใหม่และเป็นการระบาดของโรคนี้ครั้งแรกในประเทศไทย

ปัจจุบันไม่มีรายงานวิธีการรักษาโรค AHS ในม้าที่ได้ผลแน่นอน แต่โรคนี้สามารถป้องกันได้ด้วยการฉีดวัคซีนที่เป็นทั้งชนิดวัคซีนเชื้อเป็น (Live attenuated vaccines) Polyvalent หรือ Monovalent ที่มีซีโรไทป์ตรงกับการระบาดของโรคในพื้นที่ หรือใช้วัคซีนเชื้อตายซึ่งมีแอนติเจนตรงจำเพาะต่อไวรัสซีโรไทป์ที่ระบาดอยู่ในพื้นที่ วัคซีนเชื้อเป็นสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ Humoral immune response (HIR) และ Cell-mediated immune response (CMIR) วัคซีนเชื้อเป็นในปัจจุบันมี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด Polyvalent ที่มี 3 ซีโรไทป์ (1, 3 และ 4) อีกชนิดมี 4 ซีโรไทป์ (2, 6, 7 และ 8) วัคซีนชนิดนี้มีข้อดี คือ สามารถกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันได้เป็นระยะเวลานาน ข้อจำกัดของวัคซีนเชื้อเป็นคือ สามารถทำให้ม้าแสดงอาการทางคลินิกของโรคได้ตามซีโรไทป์ที่มีอยู่ในวัคซีนซึ่งอาจไม่ตรงกับโรค ณ ช่วงเวลานั้นไวรัสเชื้อเป็นในวัคซีนจะอยู่ในกระแสเลือดได้นานภายหลังฉีดวัคซีนให้แก่ม้า

สถานีเพาะเลี้ยงม้าฯ สถานเสาวภา เป็นสถานที่ใช้ม้าที่ให้พลาสมาดิบสำหรับผลิตเซรุ่มแก้พิษงู และเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า ซึ่งหากเกิดโรคระบาด AHS จะส่งผลทำให้ม้าเสียชีวิตเป็นจำนวนมาก และย่อมส่งผลกระทบต่อการผลิตเซรุ่มเพื่อใช้ในการให้บริการรักษาประชาชนอย่างแน่นอน ดังนั้น จึงเป็นเรื่องจำเป็นที่ต้องมีการพัฒนาวัคซีนมาใช้เองในการป้องกันการระบาดของโรค AHS แทนที่จะรอการนำเข้าวัคซีนจากต่างประเทศที่มีราคาแพงและใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน นอกจากนี้ในการกำจัดโรค AHS ให้หมดจากประเทศไทยตามนโยบายกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่มีการลงนามความร่วมมือ (MOU) ระหว่าง 17 หน่วยงานที่มีการเลี้ยงม้าในประเทศไทยร่วมมือกันในการกำจัดโรค AHS ให้หมดจากประเทศไทย โดยตามข้อเสนอของสถานเสาวภา สภากาชาดไทย จะศึกษาวิธีการป้องกันและรักษาโรค AHS จึงนำไปสู่วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยในการพัฒนาการผลิตวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 ในครั้งนี้ แม้ตามประวัติของสถานเสาวภาเคยมีการผลิตวัคซีนและเซรุ่มสำหรับสัตว์สำหรับใช้กับปศุสัตว์ในราชการทหารและในกระทรวงเกษตรมาก่อน แต่ต่อมาได้มีการยกเลิกกิจกรรมนี้ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2475 เมื่อรัฐบาลโดยทางราชการทหารและกรมปศุสัตว์เริ่มผลิตชีววัตถุได้เองแล้ว (สถานเสาวภา สภากาชาดไทย 82 ปี 2465 - 2547)

ดังนั้นเมื่อมีการระบาดของโรคอุบัติใหม่โรค AHS ใน

ม้าและจากการลงนามให้ความร่วมมือของสถานเสาวภาจึงได้ดำเนินการวิจัยและพัฒนาวัคซีนสำหรับสัตว์ เพื่อให้มีวัคซีนในม้าใช้เองในประเทศไทย โดยใช้เทคโนโลยีด้านเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส AHS ซีโรไทป์ 1 ที่ระบาดอยู่ในพื้นที่ได้จากเซลล์เนื้อเยื่อของม้าที่เป็นโรค ทำการศึกษาประสิทธิผลของวัคซีนกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันวิทยาและความปลอดภัยของวัคซีนในการป้องกันโรค AHS รายงานนี้เป็นการรายงานของกระบวนการในการผลิตวัคซีน และความสำเร็จของการผลิตวัคซีนเชื้อตายต้นแบบ เพื่อป้องกันโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า โดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย

ขั้นตอนและวิธีการ

พื้นที่ดำเนินการ ใช้สถานีเพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในกระบวนการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิตวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 **(รูปที่ 1)** โดยใช้เทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยงไวรัส AHS ซีโรไทป์ 1 ที่ระบาดอยู่ในพื้นที่ประเทศไทย วิธีการโดยย่อ เริ่มต้นด้วยการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากม้าที่ตายด้วยโรคระบาด AHS นำตัวอย่างมาวินิจฉัยโรค AHS และแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ทำการเพาะเลี้ยงไวรัสใน BHK เซลล์หรือในวีโรเซลล์ และเพิ่มปริมาณไวรัสเพื่อเลือกนำมาทำวัคซีน มีการทดสอบความบริสุทธิ์และความปลอดภัยของวัคซีนเชื้อตายต้นแบบ ทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนต้นแบบในม้าทดลองโดยศึกษาความปลอดภัยและตรวจการตอบสนองการสร้างภูมิคุ้มกัน

การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส AHS

ทำการแยกเชื้อไวรัสจากอวัยวะภายในของม้าที่ตายจากโรค AHS เช่น ม้าม ปอด และต่อมน้ำเหลือง

เพาะเลี้ยงไวรัสด้วยเซลล์ Baby hamster kidney-21 (BHK-21 cell) หรือ African green monkey kidney (Vero cell) จนไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงสังเกตได้จากการเกิด Cytopathogenic effect (CPE) **(รูปที่ 2)** นำไปทดสอบหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Plaque titration และยืนยันด้วย qPCR เก็บเซลล์เพาะเลี้ยงที่ผ่านการทดสอบไว้ที่ -80°C เพื่อใช้เป็น Master seed virus

รูปที่ 1 กระบวนการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิตวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 (African horse sickness serotype 1 inactivated vaccine)

รูปที่ 2 แสดงผลการเพาะเลี้ยงไวรัสด้วยเซลล์ โดยเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงใน African green monkey kidney (Vero cell) หรือ Baby hamster kidney-21 (BHK-21 cell) จนไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง สังเกตได้จากการเกิด Cytopathogenic effect (CPE)

การเตรียมเชื้อไวรัสสำหรับทำวัคซีนเชื้อตาย (Inactivated vaccines)

ทำการเพาะเลี้ยง Master seed virus ใน MARC-145 เป็นเวลาประมาณ 7-10 Passage แยกไวรัสออกจากเซลล์ โดย Freeze-thaw 3 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์เพื่อเก็บเฉพาะส่วนของเหลวเหนือตะกอน (Supernatant) เพื่อลดผลข้างเคียงของวัคซีน หาความเข้มข้นของไวรัสด้วยวิธี Plaque titration > 1x106 PFU/ml เชื้อไวรัสถูกทำให้ตายโดยใช้ 0.7% ฟอร์มาลีน ไวรัสถูกทำให้มีความเข้มข้นขึ้นและฟอร์มาลีนถูกกำจัดออกโดยวิธี Tangential flow filtration system (TFF)

การทดสอบ Sterility และ Safety

จำนวนไวรัสที่เพาะเลี้ยงจะถูกยืนยันว่าถูก Inactivated หมด โดยเลี้ยงไวรัสต่อเนื่องอีก 3 Passage ก่อนนำมาใช้เป็น Vaccine antigen ทำ Sterilization test เพื่อหาการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ และแบคทีเรียต่างๆ ที่อาจปนเปื้อนในกระบวนการผลิต

การทดสอบในหนูขาว และในม้า

ในขั้นตอนแรก ทำการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนที่จะเลือกใช้ โดยการทดสอบส่วนผสมแอดจูแวนท์ (Adjuvant) และส่วนประกอบอื่นๆ ที่ช่วยให้วัคซีนมีความคงตัวมากขึ้น และสามารถออกฤทธิ์ได้ดีและยาวนานขึ้น โดยทดลองเปรียบเทียบการใช้แอดจูแวนท์ 2 ชนิด คือ Carbigen™ และ Montanide™ Gel 01 เปรียบเทียบกับการใช้ PBS ที่ใช้เป็นสารเทียบในหนูขาวที่ฉีดวัคซีนเชื้อตายที่ใช้แอดจูแวนท์ ทั้ง 2 ชนิด ตรวจวัดการตอบสนองการสร้างภูมิคุ้มกันของวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 (AHS serotype 1 inactivated vaccine: IAV) ที่มีส่วนผสมแอดจูแวนท์ที่เหมาะสมก่อนเลือกนำ ไปใช้ทดสอบในม้า

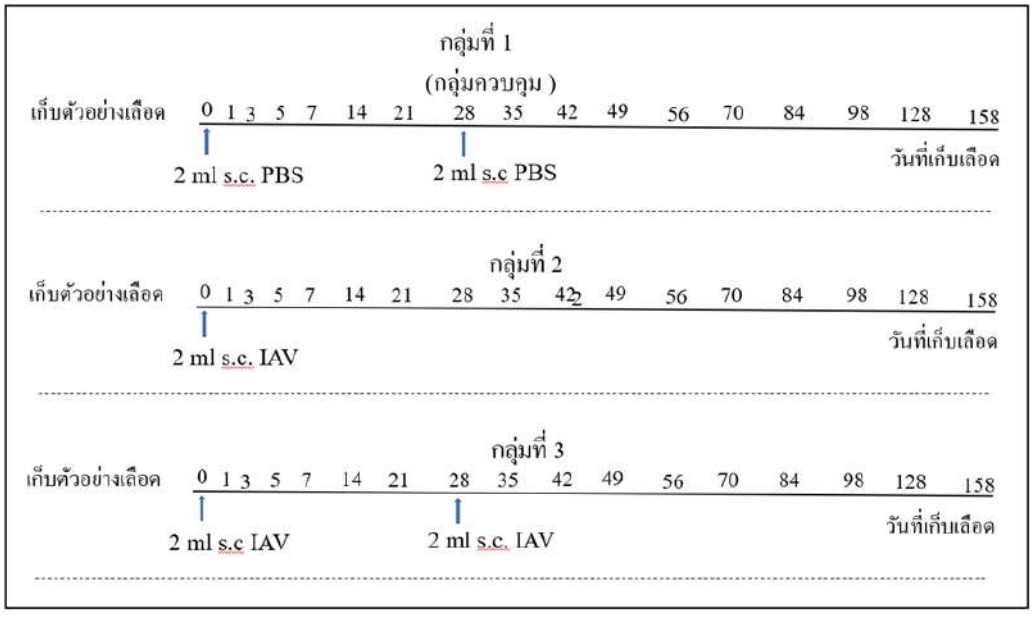
การศึกษาการตอบสนองการสร้างภูมิคุ้มกันและความปลอดภัยในการฉีดวัคซีนเชื้อตายซีโรไทป์ 1 (IAV) ในม้า

ขั้นตอนที่สอง เป็นการศึกษาในม้าโดยทำการคัดเลือกกลุ่มม้าแยกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มม้าที่มีอายุโตเต็มวัยที่เคยได้รับวัคซีน AHS และกลุ่มลูกม้าที่ไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน ขั้นตอนจากการฉีดวัคซีนและช่วงวันที่ทำการเก็บตัวอย่างเลือดมาวิเคราะห์ ดังแสดงใน **(รูปที่ 3)**

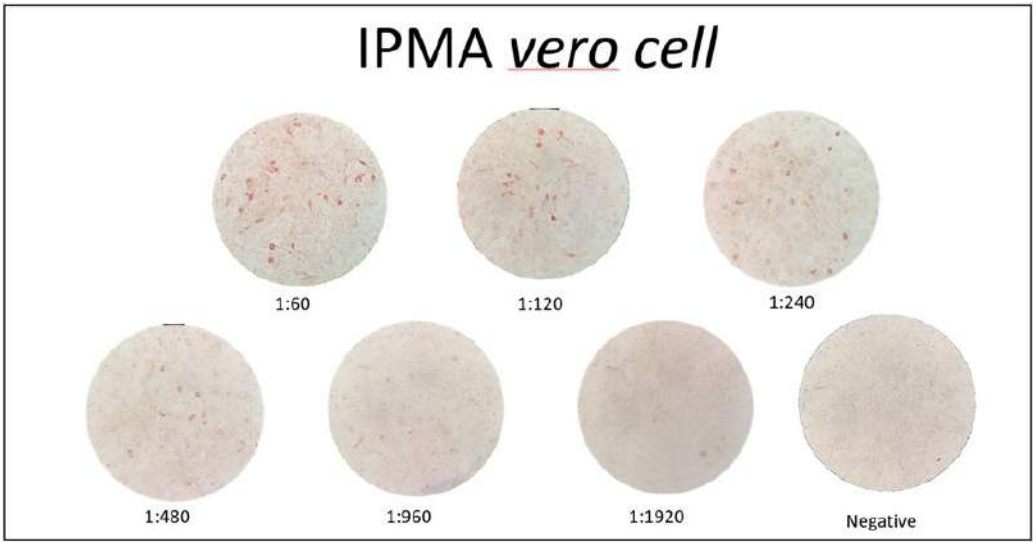
กลุ่มที่ 1 ม้าเพศเมียหรือเพศผู้ที่โตเต็มวัย ที่อายุมากกว่า 2 ปี ที่ได้ผ่านการฉีดวัคซีนเชื้อเป็น ซีโรไทป์ 1, 3, 4 มาแล้ว 1 ครั้งประมาณ 1 ปี จำนวน 15 ตัว โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว เก็บตัวอย่างเลือดม้าทุกตัวก่อนการฉีดวัคซีนเชื้อตายซีโรไทป์ 1 (IAV) โดยฉีดวัคซีนครั้งละ 2 มล. เข้าใต้ผิวหนังบริเวณแผงคอของม้า เข็มที่ 1 และ เข็มที่ 2 หลังจากฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 ในวันที่ 28 ทำการเก็บตัวอย่างเลือดติดต่อตลอดระยะการทดลองภายหลังการฉีดวัคซีน เพื่อตรวจระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) **(รูปที่ 4)**

กลุ่มที่ 2 ลูกม้าอายุ 6-7 เดือน จำนวน 12 ตัว โดยแบ่งลูกม้าออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัว เก็บตัวอย่างเลือดม้าทุกตัวก่อนการฉีดวัคซีนเชื้อตายซีโรไทป์ 1 (IAV) ครั้งละ 2 มล. เข้าใต้ผิวหนัง เข็มที่ 1 - 2 และหลังจากฉีดวัคซีนเข็มที่ 2

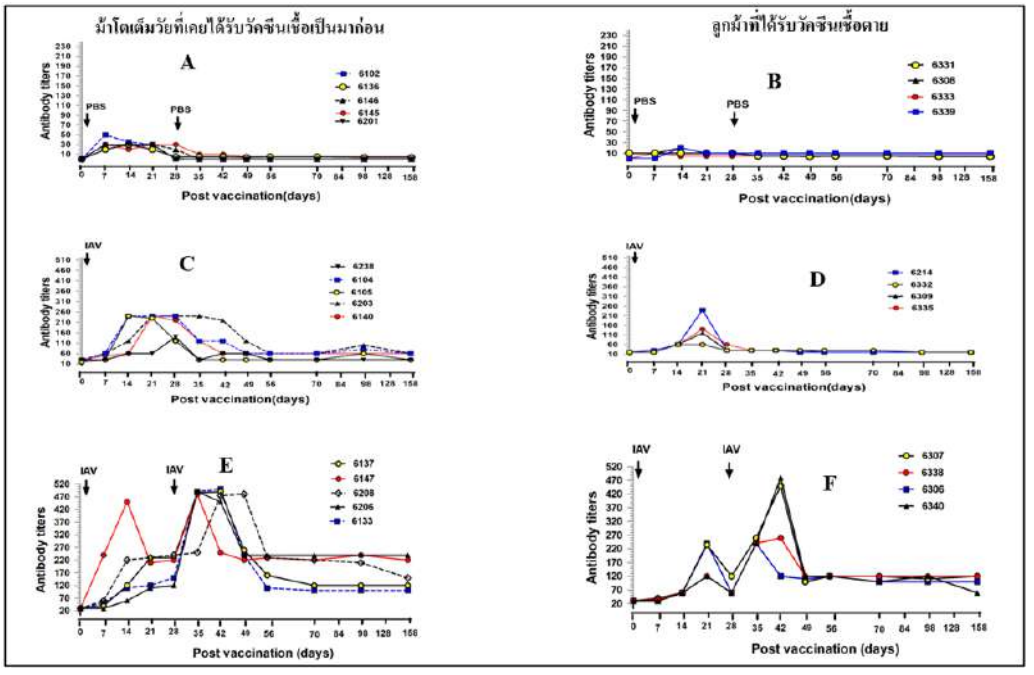
ในวันที่ 28 ทำการเก็บตัวอย่างเลือดตามช่วงวันหลังการฉีดวัคซีนตลอดระยะการทดลอง เพื่อตรวจระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี IPMA



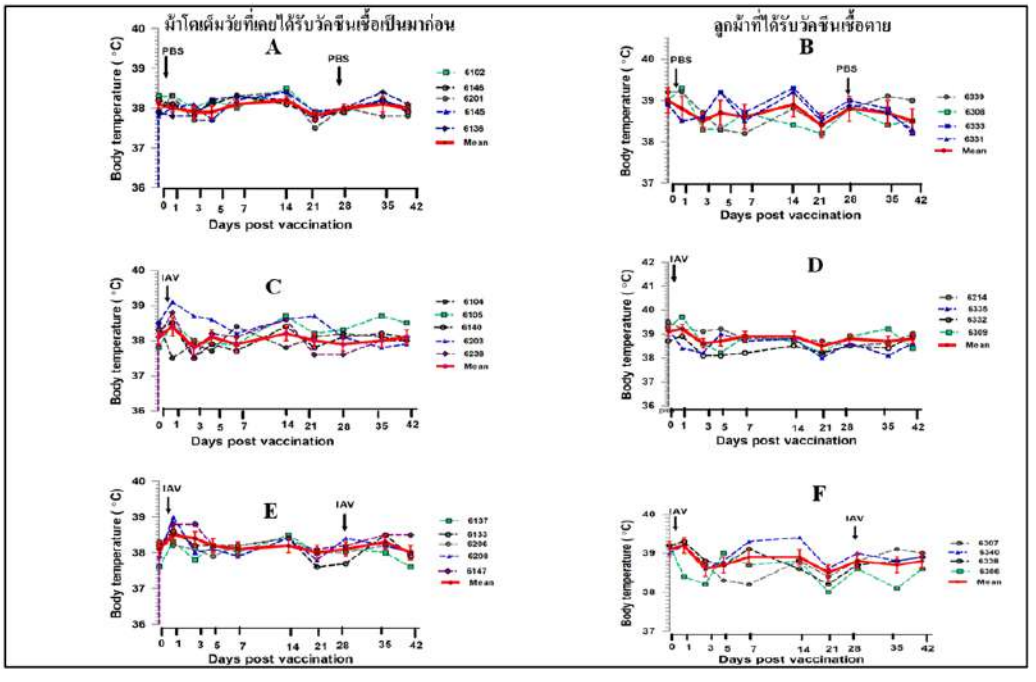
รูปที่ 3 แสดงช่วงเวลาการฉีดวัคซีนเชื้อตาย AHS serotype 1 (IAV) ครั้งละ 2 มล. เข้าใต้ผิวหนัง และการเก็บเลือดตัวอย่างจากม้าทดลองตลอดระยะการทดลองในม้า 3 กลุ่ม



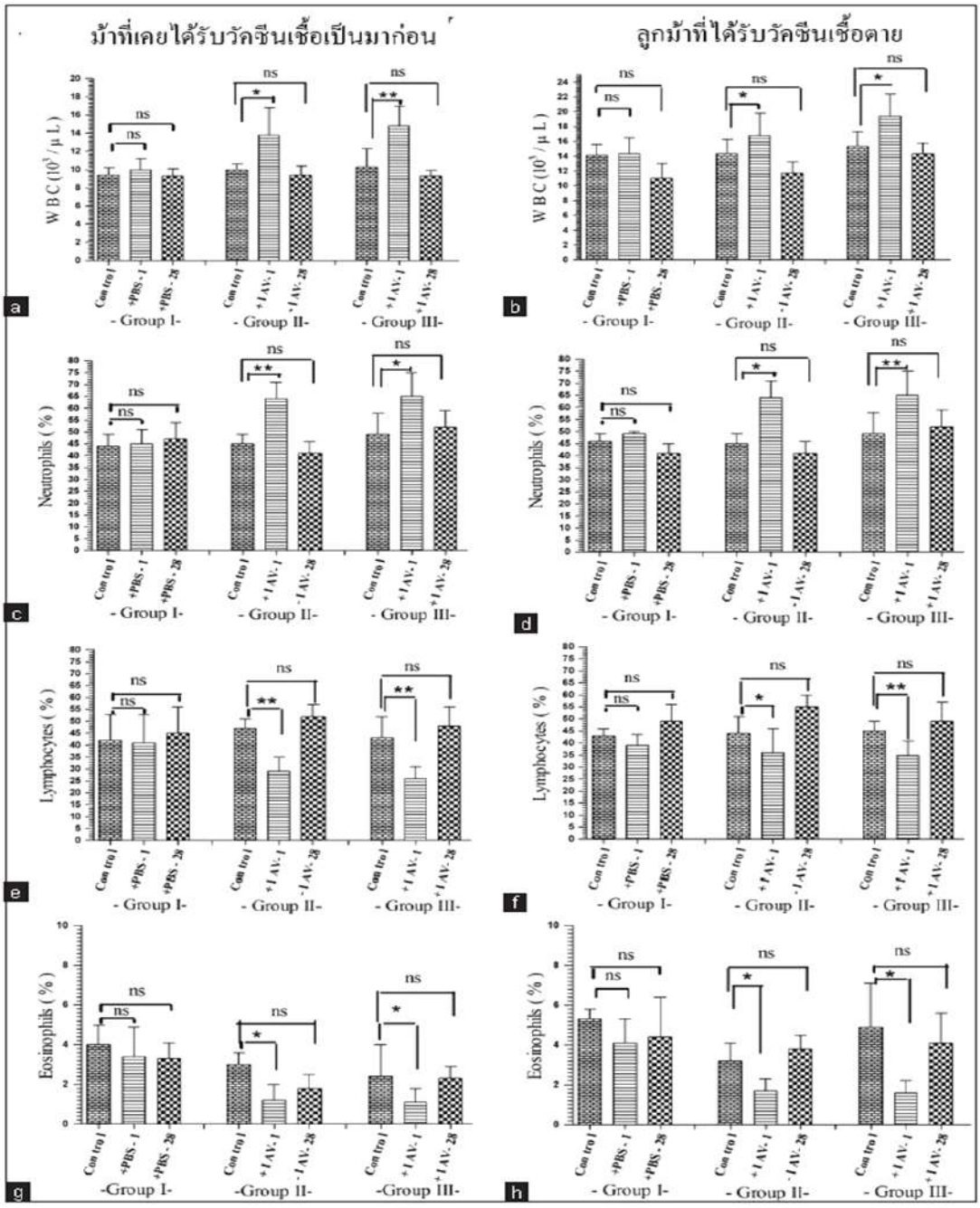
รูปที่ 4 แสดงการตรวจระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)



รูปที่ 5 ผลการศึกษา การให้วัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 (IAV) เข็มแรกในม้า 2 กลุ่ม พบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในม้าโตเต็มวัยที่เคยได้รับวัคซีนเชื้อเป็นมาก่อน **(รูป 5 C, E)** เร็วกว่าลูกม้าที่ไม่เคยรับการฉีดวัคซีนมาก่อน **(รูป 5 D, F)** ม้าทั้ง 2 กลุ่มเมื่อได้รับการฉีดวัคซีนเชื้อตายเข็มแรกแล้ว ผ่านไป 2 สัปดาห์ตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อ AHS ที่สูงในการยืนยันถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่นำมาใช้พบว่าเมื่อฉีดวัคซีนเข็มกระตุ้นเข็มที่สองในวันที่ 28 ไปแล้ว พบม้ามีการตอบสนองระดับภูมิคุ้มกันต่อ AHS สูงขึ้นภายในวันที่ 7 หลังให้วัคซีนและอยู่ในระดับสูงตลอดระยะเวลาที่ศึกษา 158 วัน



รูปที่ 6 ผลการบันทึกการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิร่างกายภายหลังการได้รับวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 (IAV) ในม้า 2 กลุ่ม ในกลุ่มม้าโตเต็มวัยที่เคยได้รับวัคซีนเชื้อเป็นมาก่อน **(รูป 6 A, C, E)** และกลุ่มลูกม้า **(รูปที่ 6 B, D, F)**



รูปที่ 7 ผลเปรียบเทียบค่าทาง Hematology ระหว่างกลุ่มม้า 3 กลุ่ม ได้แก่

Group I เป็นกลุ่มควบคุมที่ฉีด PBS แทนการให้วัคซีน

Group II เป็นกลุ่มม้าโตเต็มวัยและกลุ่มลูกม้าที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 เข็มที่ 1 อย่างเดียว (+ IAV-1)

Group III เป็นกลุ่มม้าโตเต็มวัยและกลุ่มลูกม้าที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 เข็มที่ 1 (+ IAV-1) และเข็มที่ 2 ในวันที่ 28 (+ IAV-28)

ผลและการอภิปราย

การทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวัคซีนเชื้อตายในหนูขาว พบว่าวัคซีนที่มีส่วนผสมด้วยแอดจูแวนท์ Gel 01™ และ Carbigen™ มีความปลอดภัยในหนูขาว ทั้งที่ฉีด 0.2 มล./ตัว และ 0.4 มล./ตัว แต่วัคซีนที่ผสมด้วยแอดจูแวนท์ Gel 01™ เป็นชนิดวัคซีนเชื้อตายที่ให้ระดับ antibody IgG สูงกว่าวัคซีนที่ผสมด้วยแอดจูแวนท์ Carbigen™ ดังนั้นสูตรของวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจึงเลือก Gel 01™ เป็นแอดจูแวนท์ที่เหมาะสมเพื่อผสมในการผลิตวัคซีนต้นน้ำวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1

จากผลของการศึกษาในม้าที่เคยฉีดวัคซีนเชื้อเป็นซีโรไทป์ 1, 3, 4 มาแล้ว 1 ครั้งประมาณ 1 ปี เมื่อมีการฉีดวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 ที่พัฒนาเป็นวัคซีนต้นแบบพบว่ามีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเร็วกว่าม้าที่ไม่เคยได้รับวัคซีนเชื้อเป็นมาก่อน อย่างไรก็ตาม พบว่าม้าที่ได้รับการฉีดวัคซีนเชื้อตาย IAV เข็มแรกแล้วทั้ง 2 กลุ่ม ผ่านไป 2 สัปดาห์ตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อ AHS ที่สูง เป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่นำมาใช้ และพบว่าเมื่อฉีดวัคซีน IAV เข็มกระตุ้นเข็มที่สองในวันที่ 28 ไปแล้ว พบม้ามีการตอบสนองระดับภูมิคุ้มกันต่อ AHS สูงขึ้นภายในวันที่ 7 หลังให้วัคซีน และอยู่ในระดับสูงตลอดระยะเวลาที่ศึกษา 158 วัน **(รูปที่ 5)** โดยสรุปประสิทธิภาพของวัคซีนสามารถกระตุ้นสร้างภูมิคุ้มกันได้ดี จากการศึกษาความปลอดภัยของวัคซีนเชื้อตาย IAV ที่ใช้ในม้าทั้ง 2 กลุ่มไม่พบผลข้างเคียงจากการอักเสบตรงบริเวณที่ฉีดวัคซีนรวมทั้งการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิร่างกายภายหลังการได้รับวัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 **(รูปที่ 6)** และการติดตามสุขภาพม้าภายหลังการรับวัคซีนในช่วงระยะเวลา 30-42 วัน ผลการตรวจเลือดม้าทาง Hematology **(รูปที่ 7)** และระดับ Blood chemistry แสดงการทำงานของตับและไต (Chaiyabutr et al., 2022) อยู่ในระดับปกติของช่วงระยะเวลา 30 วันภายหลังการรับวัคซีน วัคซีนเชื้อตายที่ผลิตมีความปลอดภัยสูง ไม่พบการขับไวรัสออกมาในกระแสเลือดหลังฉีดวัคซีนเชื้อตาย IAV ซึ่งต่างจากการฉีดวัคซีนเชื้อเป็นที่มีรายงานพบไวรัสในกระแสเลือดมากกว่า 150 วัน และอาจทำให้ม้าปกติแสดงอาการทางคลินิกหลังฉีดวัคซีนเชื้อเป็นได้ การให้วัคซีนเชื้อตายกาฬโรคแอฟริกาในม้าซีโรไทป์ 1 สามารถกระตุ้นระดับภูมิคุ้ม กัน IgG ต่อเชื้อ AHS ให้สูงขึ้นที่ระดับ 1:120-1:240 เป็นระยะเวลามากกว่า 3 เดือน โดยกลไกการสร้างระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Chaiyabutr et al, 2022) แต่อย่างไรก็ตาม มีข้อจำกัดของวัคซีนเชื้อตาย คือ ต้องมีการฉีดวัคซีนมากกว่า 1 ครั้ง เพื่อกระตุ้นให้ร่างกายมีระดับภูมิคุ้มกัน IgG อยู่สูงตลอด จึงแนะนำให้มีการฉีดวัคซีนเชื้อตาย ปีละ 2-3 ครั้ง ผลจากการศึกษาในครั้งนี้นับว่าเป็นความสำเร็จในการผลิตวัคซีนเชื้อตายต้นแบบเพื่อป้องกันโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าในประเทศไทย ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้เกิดความรู้ที่จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนารูปแบบการทำวัคซีนต้นแบบชนิดอื่นที่ทำจากเซลล์เพาะเลี้ยงภายในสถานเสาวภา สภากาชาดไทยต่อไป

บทความวิชาการนี้เป็นส่วนหนึ่งที่ได้มีการตีพิมพ์โดย Chaiyabutr, N. et al., 2022 ในวารสาร Veterinary World. doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2022

เอกสารอ้างอิง

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ๘๒ ปี ๒๔๖๕-๒๕๔๗ สถานเสาวภา ประวัติและภารกิจ

Chaiyabutr, N., Wattanaphansak, S., Tantilerdcharoen, R., Akesowan, S., Ouisuwan, S., Narapom, D. 2022. Comparative immune responses after vaccination with the formulated inactivated African horse sickness vaccine serotype 1 between naïve horses and pretreated horses with the live-attenuated African horse sickness vaccine. Vet. World. 15 (10): 2365–2375. doi: www.doi.org/ 10.14202/vetworld.2022. 2365-2375

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับการสนับสนุนจากคณะกรรมการบริหารจัดการระบบศึกษาและวิจัยของสภากาชาดไทย (No.55/2564) โดยมีคณะนักวิจัย ศาสตราจารย์กิตติคุณ ดร. นสพ. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร นสพ. สุรศักดิ์ เอกโสวรรณ นสพ. สุรสีห์ อุ่ยสุวรรณ และ นสพ. ดามพ์ นราภรณ์ จากสถานเสาวภา ร่วมกับ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นสพ. สุพจน์ วัฒนะพันธ์ศักดิ์ และ นสพ. รชฎ ตันติเลิศเจริญ จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเสาวภา
Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

การเตรียมเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมาเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลอิมมูโนโกลบูลินจีของม้า

Preparation of monoclonal equine immunoglobulins G by hybridoma technology

วชิราภรณ์ แสงสีสม[1] สุรสีห์ อุ่ยสุวรรณ[2] กาญจนา เอี่ยมอัมพร[3] สรีญา แก้มทอง[3] อุดม ติ่งต้อย[3]
Wachiraporn Saengseesom[1], Suraseha Ouisuwan[2], Kanchana Aiemumpron[3], Sareeya Kaemthong[3], Udom Tingtoy[3]

1 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
2 สถานีเพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
3 ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรั่มและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
1 Department of research and development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society
2 Horse farm & laboratory animal breeding center, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society
3 Antiserum and standard cell preparation, Blood Centre, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: การเตรียมเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมาอิมมูโนโกลบูลินจีของม้า เริ่มจากการแยกเม็ดเลือดขาวจากเลือดม้า นำมาเปลี่ยนรูปเป็นเซลล์มะเร็งโดยใช้ ไวรัส Epstein Barr Virus (EBV) สายพันธุ์ B-958 จากนั้นตรวจหาโคลนที่สร้างอิมมูโนโกลบูลินจี ด้วยวิธี ELISA นำโคลนที่ได้มาเชื่อมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งของมนุษย์ สายพันธุ์ JMS-3 ได้เซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา เพื่อให้เกิดความเสถียรและเก็บได้นาน นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบหาอิมมูโนโกลบูลินจี ด้วยวิธี ELISA จากนั้นคัดเลือกและแยกเซลล์ที่สร้างอิมมูโนโกลบูลินจีให้เป็นเซลล์เดี่ยว ด้วยการทำ Limiting dilution คัดเลือกและทำซ้ำ จนได้เซลล์เดี่ยวที่เติบโต และสร้างอิมมูโนโกลบูลินจีตามต้องการ จากการทดลองสามารถคัดเลือกโคลนของเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมาที่สร้างอิมมูโนโกลบูลินจี ได้ทั้งหมด 8 โคลน คือ 8F1A, 8F5A, 8F3B, 8F5C, 8F3D, 5IC1, 5IIE1, 5IIF6 แสดงให้เห็นว่าการเตรียมเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของม้าที่เชื่อมรวมกับเซลล์มะเร็งของมนุษย์ สามารถผลิตโมโนโคลนอลอิมมูโนโกลบูลินจีได้

คำสำคัญ: โมโนโคลนอล อิมมูโนโกลบูลินจี เซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา ม้า

ABSTRACT: The preparation of equine monoclonal IgG was studied using the hybridoma technology. Equine B-lymphocyte from a horse was separated using Ficoll hypaque. B-lymphocyte was transformed and immortalized with Epstein Barr Virus (EBV) strain B-958. EBV-transformed B cell lines were fused with JMS-3 cancer cells using 50% polyethylene glycol (PEG) MW 1450. The hybrid cells were grown in RPMI 1640 cell culture medium. The positive hybridoma cells of equine IgG were screened and selected by ELISA method. The serial limiting dilution and expansion were performed for selecting single clones with IgG epitope. Eight hybridoma clones were recognized by equine immunoglobulin G: 8F1A, 8F5A, 8F3B, 8F5C, 8F3D, 5IC1, 5IIE1, 5IIF6. It seems likely that hybridoma cell lines secreting equine IgG could be generated from equine B-lymphocyte fused with human myeloma cell.

Keywords: Monoclonal, Immunoglobulin G, hybridoma, Equine

บทนำ

จากความรู้พื้นฐานเรื่องแอนติบอดี (Antibody) เป็นไกลโคโปรตีนที่ถูกสร้างและหลั่งโดยเซลล์บีลิมโฟซ์ไซต์ (B-lymphocyte) ทำหน้าที่จับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะ ช่วยกำจัดและสลายแอนติเจน (Neutralization) ที่เข้าสู่ร่างกายของสัตว์ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบอิมมูโนโกลบูลิน มี 5 ชนิด ได้แก่ อิมมูโนโกลบูลินเอ็ม (Immunoglobulin M; IgM) อิมมูโนโกลบูลินจี (Immunoglobulin G; IgG) อิมมูโนโกลบูลินดี (Immunoglobulin D; IgD) อิมมูโนโกลบูลินเอ (Immunoglobulin A; IgA) และ อิมมูโนโกลบูลินอี (Immunoglobulin E; IgE) (Ponsen, 2019) ซึ่งอิมมูโนโกลบูลินจีเป็นแอนติบอดีที่พบได้ประมาณ 75 เปอร์เซนต์ของแอนติบอดีในเลือดทั้งหมดมีบทบาทสำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย

โมโนโคลนอลแอนติบอดี เป็นโปรตีนสังเคราะห์ที่สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการ ทำงานคล้ายกับแอนติบอดีของมนุษย์ภายในระบบภูมิคุ้มกัน เป็นการนำเซลล์บีลิมโฟซ์ไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันเชื่อมรวมเข้ากับเซลล์มัยอิโลมา (Myeloma) ซึ่งเป็นเซลล์เนื้อร้ายที่สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่สิ้นสุด กระบวนการเชื่อมรวม (Fusion) นี้ทำให้เกิดไฮบริโดมา (Hybridoma) เซลล์ไลน์ (Cell line) ที่เป็นอมตะ สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนที่เรียกว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; Mab) โดยแอนติบอดีที่ได้นี้มีความแตกต่างจากแอนติบอดีที่ผลิตจากธรรมชาติโดยร่างกายซึ่งจดจำแอนติเจนได้หลากหลายชนิด โมโนโคลนอลแอนติบอดีได้รับการพัฒนาเพื่อกำหนดเป้าหมายและยึดติดกับจุดจับเฉพาะบนผิวของแอนติเจน (เอพิโทป; Epitope) ทำให้สามารถจดจำและเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวได้อย่างแม่นยำ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์มากมายในทางการแพทย์ (Pengsuk et al., 2010; Wangman et al., 2016) ใช้ในการรักษาโรค วินิจฉัยและรักษาโรคแบบมุ่งเป้า เพื่อยกระดับความรู้ทางการแพทย์ (Palenzuela et al., 1996)

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตโมโนโคลนอลอิมมูโนโกลบูลินจีของม้าจากเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา ซึ่งได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของม้าที่เชื่อมรวมกับเซลล์มะเร็งของมนุษย์ ซึ่งเป็นการผลิตโมโนโคลนอลอิมมูโนโกลบูลินข้ามสายพันธุ์ระหว่างม้าและมนุษย์

วิธีดำเนินการวิจัย

การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวของม้า (Separation of lymphocytes)

ทำการเจาะเลือดม้าที่มีอายุมากกว่า 1 ปี ตำแหน่งที่ใช้ในการเจาะเลือดคือ เส้นเลือดแดงที่คอ (Jugular vein) (สุรศักดิ์ เอกโสวรรณ และคณะ, 2551) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (มล.) โดยใส่สารกันเลือดแข็งชนิดเฮปพาริน (Heparin) 0.5 มล. (10 U/มล.) ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยน้ำยา Ficoll hypaque (Robbins Scientific, Norway) จะเห็นชั้นเม็ดเลือดขาว (Buffy coat) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ทีลิมโฟซ์ไซต์ (T-lymphocyte) และเซลล์บีลิมโฟซ์ไซต์ (B-lymphocyte) ทำการแยกเซลล์ทีลิมโฟซ์ไซต์ออก โดยการเติม Sheep red blood cells (SRBC) ที่ใส่สาร 2-(2-Aminoethyl) isothiourea dihydrobromide (AET) ทำให้เหลือแต่เซลล์บีลิมโฟซ์ไซต์

การเปลี่ยนรูปให้เป็นเซลล์มะเร็ง (Transformation)

นำเซลล์บีลิมโฟซ์ไซต์ที่แยกได้มาทำการเปลี่ยนรูปให้เป็นเซลล์มะเร็งโดยใช้ ไวรัส Epstein Barr Virus (EBV) สายพันธุ์ B-958 เพื่อให้เซลล์ที่ได้มีความคงทนและเก็บได้นานขึ้น (Tingtoy, 2011; Tingtoy et al., 2017)

การคัดกรอง (Screening)

เมื่อผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนรูปให้เป็นเซลล์มะเร็งได้ 3-4 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นเซลล์เจริญเป็นกลุ่มๆในอาหารเลี้ยงเซลล์ ความหนาแน่นของเซลล์แต่ละกลุ่มแตกต่างกัน น้ำเลี้ยงเซลล์มีการเปลี่ยนสีจากแดงเป็นเหลือง ทำการดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ของแต่ละหลุมมาทำการตรวจหาอิมมูโนโกลบูลินจีด้วยวิธี ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) โดยการเคลือบเพลท (Polystylene microtiter plate)

(Nunc, Denmark) ด้วย Anti-Horse IgG (Sigma, USA) (1 มก./มล. ที่เจือจาง 1:100) ผลที่ได้วัดเป็นค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; OD) นำซีรั่มม้าจากหลุมที่ให้ผลบวกต่อ Anti-Horse IgG มารวมกัน เพื่อนำไปเชื่อมเซลล์ในขั้นตอนต่อไป

การเชื่อมเซลล์ (Fusion)

นำเซลล์มะเร็งมัยอิโลมา (Myeloma cell) สายพันธุ์ JMS-3 มารวมกับเซลล์บีลิมโฟซ์ที่ถูกเปลี่ยนรูปเป็นเซลล์มะเร็งโดยมีโพลีเอทิลีนไกลคอล (Polyethyleneglycol) ซึ่งช่วยในการกระตุ้นการหลอมรวมของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้เป็นกลุ่มเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา นำไปเลี้ยงในอาหาร Fetal bovine serum (FBS) in RPMI + Hypoxanthine-Amiopterin-Thymidine (HAT)-Ouabain ($5x10^{-7}$ M Ouabain) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณลักษณะในการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา (Hybridroma)

การคัดเลือกเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา (Screening of hybridoma cell)

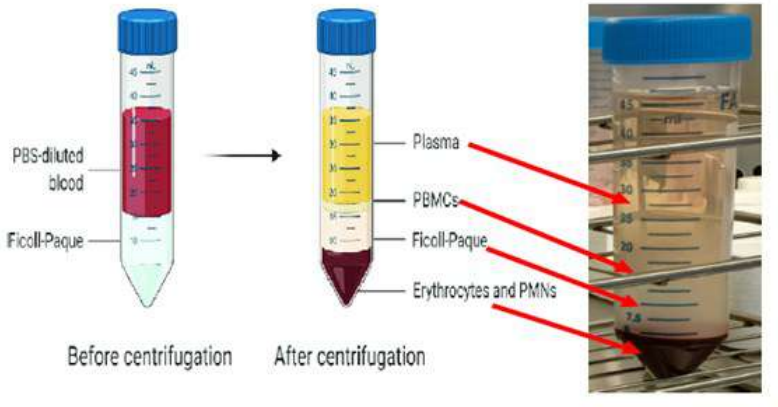
กลุ่มของเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมาที่เลี้ยงเป็นเวลา 7-14 วัน นำมาเจือจางด้วยวิธี Limiting dilution เพื่อแยกกลุ่มเซลล์ที่สร้างอิมมูโนโกลบูลินจีให้เป็นเซลล์เดี่ยว (Monoclone) นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำการทดสอบการสร้างอิมมูโนโกลบูลินจีด้วยวิธี ELISA

การเพิ่มจำนวนเพื่อการผลิต (Establishment and mass culturing)

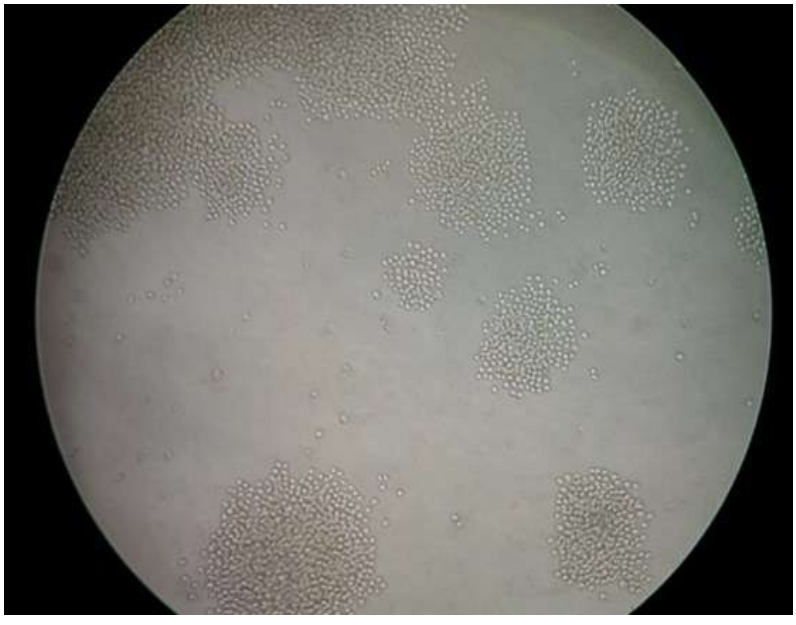
เซลล์เดี่ยวที่สร้างอิมมูโนโกลบูลินจี นำมาเพิ่มจำนวนเพื่อให้สร้างอิมมูโนโกลบูลินจีได้มากขึ้น โดยการเลี้ยงและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาตรเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ

ผลและการอภิปราย

การเตรียมโมโนโคลนอลอิมมูโนโกลบูลินจีของม้าเริ่มจากการนำน้ำเลือดมาแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว **(รูปที่ 1)** ได้เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ประกอบด้วย ที-ลิมโฟซ์ไซด์ และ บี-ลิมโฟซ์ไซด์ ทำการแยกเซลล์ทีลิมโฟซ์ไซด์ออกได้ด้วยการเติม เม็ดเลือดแดงของแกะ (Sheep red blood cells; SRBC) ที่ถูกปรับสภาพ เซลล์บีลิมโฟซ์ไซด์ที่ได้นำไปทำให้กลายเป็นเซลล์มะเร็งชนิดลิมโฟซ์มา สังเกตได้จากการเจริญเป็นกลุ่มๆในอาหารเลี้ยงเซลล์ **(รูปที่ 2)** ทำการเชื่อมรวมเซลล์มะเร็งชนิดลิมโฟซ์มา กับเซลล์มะเร็ง JMS-3 ของมนุษย์ด้วยเทคนิคไฮบริโดมาได้เป็นกลุ่มเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา ทำการแยกกลุ่มเซลล์ที่สร้างอิมมูโนโกลบูลินจีให้เป็นเซลล์เดี่ยว (Monoclone) **(รูปที่ 3)** และทดสอบการผลิตอิมมูโนโกลบูลินจีด้วยวิธี ELISA พบเซลล์ที่ผลิตอิมมูโนโกลบูลินจี จำนวน 8 โคลน ได้แก่ 8F1A, 8F5A, 8F3B, 8F5C, 8F3D, 5IC1, 5IIE1, 5IIF6 **(ตารางที่ 1)**



รูปที่ 1 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวของม้าด้วยน้ำยา Ficoll hipaque



รูปที่ 2 เซลล์บีลิมโฟซ์ไซต์ที่ถูกเปลี่ยนให้เป็นเซลล์มะเร็งลิมโฟซ์มา กำลังขยาย 20X

รูปที่ 3 กลุ่มเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์เดียว กำลังขยาย 20X

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินจีของโมโนโคลนอลด้วยวิธี ELISA

Clone	ELISA (OD 490 nm)
1. 8F1A	1.018
2. 8F5A	1.032
3. 8F3B	1.044
4. 8F5C	1.022
5. 8F3D	1.031
6. 5ICI	1.036
7. 5IIE1	1.076
8. 5IIF6	1.077

รูปที่ 4 การเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวนเพื่อการผลิต กำลังขยาย 20X

โมโนโคลนอลอิมมูโนโกลบูลิน (Cell line) นี้สามารถเลี้ยงให้มีการผลิตอิมมูโนโกลบูลินจีได้อย่างต่อเนื่อง นำมาเพิ่มจำนวนเพื่อให้สร้างอิมมูโนโกลบูลินจีได้มากขึ้น **(รูปที่ 4)**

การเตรียมโมโนโคลนอลอิมมูโนโกลบูลินจีของม้าด้วยเทคนิคไฮบริดโดมาเป็นการทำงานวิจัยร่วมกันระหว่างฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา และฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรั่มและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ซึ่งศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติใช้เทคนิคนี้ในการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดต่างๆบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงได้แก่ โมโนโคลนอล anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, anti-E, anti-c, anti-M, anti-N, anti-H และ anti-P เพื่อใช้เป็นน้ำยาสำหรับตรวจหมู่โลหิตชนิดต่างๆ และจำหน่ายให้แก่สถานพยาบาลและธนาคารเลือดทั่วประเทศ (อุดม ติ่งต้อย, 2563)

สถานเสาวภา สภากาชาดไทยเป็นสถานที่ผลิตเซรุ่มแก้พิษงูและเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจากเลือดม้าที่ใหญ่ที่สุดแห่งหนึ่งในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สถานีเพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มีม้าที่ใช้ในการผลิตเซรุ่มมากกว่า 300 ตัว (สุรศักดิ์ เอกโสวรรณ และคณะ, 2551) จากความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลอิมมูโนโกลบูลินจีของม้าจากเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมาจะเป็นต้นแบบในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงกับแอนติเจนและสร้างได้ปริมาณมาก สามารถนำไปใช้ในการเตรียมเป็นชุดตรวจวินิจฉัยโรคแบบรวดเร็ว สำหรับใช้ในงานด้านระบาดวิทยา ใช้เป็นสารมาตรฐานในงานด้านอิมมูโนวิทยา ใช้ในการเตรียมแอนติบอดีที่มีความจำเพาะในการรักษาโรคในม้าทำให้ประหยัดงบประมาณในการสั่งซื้อน้ำยาหรือยาจากต่างประเทศ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปต่อยอดเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

สุรศักดิ์ เอกโสวรรณ สุรสีห์ อุ่ยสุวรรณ ดามพ์ นราภรณ์ สุทธิชัย รอดรัตน์. 2551. สถานีเพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย, หน้า 33-39.

อุดม ติ่งต้อย. 2563. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต human monoclonal antibody ด้วยวิธี hybridoma Technique. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต ปีที่30 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม-กันยายน, หน้า 315- 321.

Kaewmongkol, R., Tingtoy, U., Sakuldamrongpanich, T. 2000. Production of blood grouping monoclonal anti-AB reagent. Thai J. Hematol. Transf. Med. 10, 175-181.

Kohler, G., Milstein, C. 1975. Continuous culture of fused cell secreting antibodies of predefined specified. Nature. 256, 495-497.

Palenzuela, O., SitiA-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P. 1996. Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilt head sea bream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol. 6, 81-94.

Pengsuk, C., Longyant, S, Rukpratanporn, S., Chaivisuthangkura, P., Sridulyakul, P., Sithigorngul, P. 2010. Development of monoclonal antibodies for simple detection and differentiation of *Vibrio mimicus* from *V. cholerae* and *Vibrio* spp. by dot blotting. Aquaculture 300, 17-24.

Sakuldamrongpanich, T., Tubrod, J., Saengkla, S., Tingtoy, U. 1999. Evaluation of anti-D reagent as Rh(D) blood typing. Thai J. Hematol. Transf. Med. 9, 39-48.

Ponsen, S., Phonimit, S., Premprayoon, N., Tingtoy, U. 2019. Production of anti-D human monoclonal antibody (IgM) using human monoclonal hybridoma technique. Chula Med. Bull. 2147-2154.

Wangman, P., Siriwattanarat, R., Longyant, S., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., Chaivisuthangkura, P. 2016. High sensitivity immunochromatographic strip test (ICP11 strip test) for white spot syndrome virus detection using monoclonal antibodies specific to ICP11 non-structure protein. Aquaculture 470, 25-31.

Tingtoy, U., Phonimit, S., Siripongsanusit, A., Makechay, S., Sakuldamrongpanich, T. 2008. Development of monoclonal anti-A production of National Blood Centre, Thai Red Cross Society J. Hematol. Transf. Med. 18, 11-19.

Tingtoy U. 2011. A review: monoclonal antisera for blood group serology. J. Hematol. Transf. Med. 21, 103-112.

Tingtoy, U., Makechay, S., Deesin, P., Tubrod, J. 2017. Production of human monoclonal anti-P1 by using Hybridoma technique. J. Hematol. Transf. Med. 27, 11-18.

สารเสาวภา
Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

อนุภาคเหมือนไวรัสลูกผสม: การสร้างและการประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันโรคติดเชื้อ

Chimeric virus-like particles: Constructions and Applications for Infectious Diseases

รพี สินเนืองนอง
Rapee Sinnuengnong

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
Department of research and development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: อนุภาคเหมือนไวรัสลูกผสม (cVLPs) เกิดจากการดัดแปลงผิวของโปรตีนเปลือกหุ้มของอนุภาคเหมือนไวรัส โดยเชื่อมกับโปรตีนอื่นหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรมหรือการดัดแปลงทางเคมีและนำมาใช้เป็นพาหะในการขนส่งสารชีวโมเลกุลให้มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น บทความนี้จะอธิบายถึงวิธีการสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส cVLPs การทำอนุภาคเหมือนไวรัสให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบอนุภาคเหมือนไวรัส การประยุกต์ใช้อนุภาคเหมือนไวรัสในด้านต่าง ๆ ได้แก่ การนำมาใช้เป็นวัคซีน การนำมาใช้เป็นพาหะในการนำส่งยาและการใช้อนุภาคเหมือนไวรัสสำหรับติดตามหรือถ่ายภาพ

คำสำคัญ: อนุภาคเหมือนไวรัสลูกผสม โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส การประยุกต์ใช้อนุภาคเหมือนไวรัส

ABSTRACT: Chimeric virus-like particles (cVLPs), formed by modified viral capsid protein, are conjugated with foreign antigen or bioactive compounds by genetic engineering and chemical modification methods. The cVLPs are used as a specific carrier for biomolecules delivery. Thus, this review article describes the cVLPs construction, the virus-like particle purification and the investigation of virus-like particle, the applications of virus-like particle including vaccine, vehicle for drug delivery and optical imaging.

Keywords: Chimeric virus-like particle, Viral capsid protein, Virus-like particle application

บทนำ

อนุภาคเหมือนไวรัส (Virus-like particles, VLPs) เกิดจากการรวมกลุ่มกันของโปรตีนโครงสร้างของไวรัสเกิดเป็นอนุภาคที่คล้ายคลึงไวรัสที่พบในธรรมชาติ ทั้งทางด้านโครงสร้าง ขนาดและรูปร่าง โดยที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้เนื่องจากขาดสารพันธุกรรม ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในการจำลองตัวเองของไวรัส (Zeltins, 2013) การศึกษาเกี่ยวกับอนุภาคเหมือนไวรัสเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1960 โดยมีการศึกษาอนุภาคไวรัส Hepatitis B ที่มีเพียงโปรตีนโครงสร้างของไวรัสและขาดสารพันธุกรรม พบว่าโปรตีนโครงสร้างสามารถเกิดการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคไวรัสได้ ซึ่งจากการทดลองนี้ถือเป็นการทดลองครั้งแรกที่มีการศึกษาเกี่ยวกับอนุภาคเหมือนไวรัสที่พบในธรรมชาติ (Blumberg et al., 1965) นับตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับอนุภาคเหมือนไวรัสอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบันทั้งทางด้านการเกษตร (Sinnuengnong et al., 2018; Worawittayatada et al., 2022) และด้านการแพทย์ (Grataitong et al., 2021; Garay et al., 2023) เป็นต้น

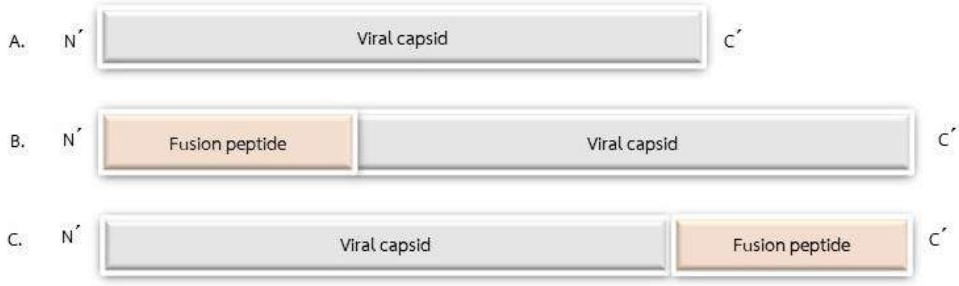
อนุภาคเหมือนไวรัสลูกผสม (Chimeric virus-like particles; cVLPs) เป็นอนุภาคเหมือนไวรัสประเภทหนึ่ง เกิดจากเชื่อมกันของโปรตีนเปลือกหุ้มของอนุภาคเหมือนไวรัสกับ foreign antigen จากเชื้อก่อโรคอื่นๆ โดยอนุภาคเหมือนไวรัสจะทำหน้าที่แสดง foreign antigen เพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันเกิดการกระตุ้นและสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ foreign antigen นั้นๆ ได้ดียิ่งขึ้น (Kheirvari et al., 2023; Grataitong et al., 2021) นอกจากนี้ cVLPs ยังสามารถเชื่อมกับสารหรือยาที่สามารถป้องกันโรค โดยอนุภาคเหมือนไวรัสจะทำหน้าที่ในการนำพาสารหรือยาดังกล่าวเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะมากยิ่งขึ้น (Grataitong et al., 2021) ดังนั้นบทความนี้ได้รวบรวมวิธีการสร้าง cVLPs การทำอนุภาคเหมือนไวรัสให้บริสุทธิ์ การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคเหมือนไวรัสและการประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เป็นต้น เพื่อให้ผู้ที่สนใจนำไปศึกษาและวิจัยต่อยอดต่อไปในอนาคต

การสร้างอนุภาคเหมือนไวรัสลูกผสม

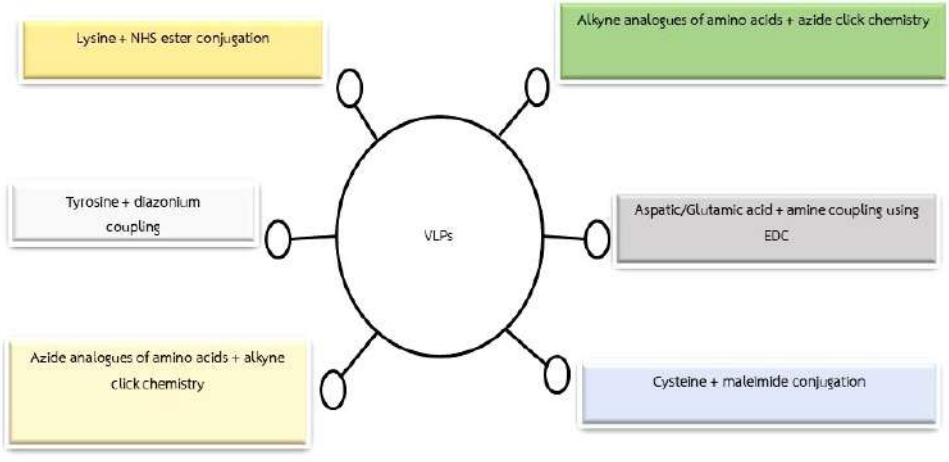
โดยทั่วไปการสร้างอนุภาคเหมือนไวรัสในรูปแบบลูกผสม สามารถสร้างได้ด้วยวิธีดังต่อไปนี้

1. การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering)

ส่วนใหญ่อนุภาคเหมือนไวรัสจะใช้วิธีการนี้ในการสร้าง โดยการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สามารถเพิ่มจำนวนและแสดงออกโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสที่เราต้องการศึกษาภายในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมได้ สำหรับอนุภาคเหมือนไวรัสลูกผสมจะมีการแทรกชิ้นส่วนของยีนที่ผลิตโปรตีนที่ต้องการศึกษาเข้ากับโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส ในกรณีนี้โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสจะมีการเชื่อมโปรตีนที่ต้องการศึกษาอยู่ในบริเวณ N- หรือ C-terminal ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส **(รูปที่ 1)** เมื่อเกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสจะมีการเชื่อมโปรตีนเข้ามาโดยอัตโนมัติและเกิดการรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสต่อไป ซึ่งในบางกรณีอาจจำเป็นต้องใส่บริเวณ Spacer เข้าไป เพื่อให้ส่งผลต่อโครงสร้างและรูปร่างของโปรตีนน้อยที่สุด (Mateu, 2016) ตัวอย่างเช่น การศึกษาอนุภาคเหมือนไวรัส *Mr*NV ที่เชื่อม GE11 peptide ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ Epidermal growth factor receptor (EGFR) ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) ของเซลล์มะเร็ง เพื่อให้เกิดความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสามารถในการห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก เพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับ Gene therapy สำหรับรักษาโรคมะเร็งต่อไป (Grataitong et al., 2021) การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโปรตีนโครงสร้าง (Matrix protein) ของไวรัส Influenza เชื่อมกับส่วนของ spike ของไวรัส COVID-19 จากนั้นทำการแสดงออกในเซลล์ HEK293T ตรวจสอบความสามารถในการรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสและความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง ซึ่งประสบผลสำเร็จในการสร้างอนุภาคเหมือนไวรัสดังกล่าว และพบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ลดความรุนแรงของการเกิดโรค COVID-19 ได้เป็นอย่างดีในหนูทดลอง (Kaewborisuth et al., 2022) เป็นต้น



รูปที่ 1 โปรตีนเปลือกหุ้มของอนุภาคเหมือนไวรัสเชื่อมกับโปรตีนที่ต้องการศึกษา
A. โปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสที่พบในธรรมชาติ
B. โปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสที่เชื่อมกับโปรตีนทางด้าน N´ terminal
C. โปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสที่เชื่อมกับโปรตีนทางด้าน C´ terminal



รูปที่ 2 บริเวณที่เกิดการดัดแปลงของโปรตีนเปลือกหุ้มของอนุภาคเหมือนไวรัสด้วยวิธี Chemical modifications (ดัดแปลงจาก Shahrivarkevishahi et al., 2022)

2. การใช้กระบวนการ (Chemical modifications)

วิธีการนี้จะใช้คุณสมบัติทางเคมีของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนเปลือกหุ้มของอนุภาคเหมือนไวรัส เพื่อให้เกิดการดัดแปลงของโปรตีนเปลือกหุ้มดังกล่าว โดยทั่วไปหมู่ Thiols amines carboxylates และหมู่ Functional group ของโปรตีนเปลือกหุ้มของอนุภาคเหมือนไวรัสจะเป็นส่วนสำคัญในการดัดแปลงโครงสร้าง **(รูปที่ 2)** เพื่อให้สามารถเชื่อมกับสาร/ยาที่ต้องการศึกษาได้ (Mateu, 2011) ตัวอย่างเช่น ในปี ค.ศ. 2011 Natilla และ Hammond ได้ทำการศึกษา cVLPs ของไวรัส Maize rayado fino virus โดยเชื่อม NHS-PEG4-Maleimide long peptide ซึ่งเป็น Neutralizing epitope ของ Newcastle disease virus เข้าไปตรงบริเวณ Free thiolic groups ของโปรตีนเปลือกหุ้มของอนุภาคเหมือนไวรัส เพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาหรือชีววัตถุได้ในอนาคต (Natilla and Hammond, 2011) การสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส *Mr*NV ที่มีการเชื่อมกับ Folic acid บริเวณ lysine ของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Mr*NV เพื่อใช้สำหรับห่อหุ้ม Doxorubicin (Dox) ซึ่งเป็นยาที่ใช้สำหรับรักษาโรคมะเร็ง (Thong et al., 2019) เป็นต้น

การทำอนุภาคเหมือนไวรัสให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคเหมือนไวรัส

โดยส่วนใหญ่อนุภาคเหมือนไวรัส cVLPs สามารถทำให้บริสุทธิ์ด้วยการปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Ultracentrifugation) ซึ่งอาศัยความหนาแน่นของอนุภาคเหมือนไวรัสในตัวกลาง Sucrose gradient หรือ $CsCl_2$ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง อนุภาคเหมือนไวรัสจะละลายอยู่ในตัวกลางที่มีความหนาแน่นเท่ากับความหนาแน่นของอนุภาคไวรัสนั้นๆ จากนั้นนำอนุภาคเหมือนไวรัสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปตรวจสอบคุณสมบัติต่อไป ในบางกรณี cVLPs อาจจะมีคุณสมบัติเฉพาะ เช่น เชื่อมกับ 6x-histidine tag ซึ่งสามารถทำอนุภาคเหมือนไวรัสให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel chromatography ได้ นอกจากนี้ยังสามารถอาศัยคุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีนเปลือกหุ้มของอนุภาคเหมือนไวรัสในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ เช่น ประจุ ขนาด เป็นต้น

สำหรับการศึกษารูปร่างของอนุภาคเหมือนไวรัสสามารถทำได้โดยการย้อมสีอนุภาคเหมือนไวรัสด้วย 1 เปอร์เซนต์ Phosphotungstatic acid หรือ 2 เปอร์เซนต์ Uranyl acetate บนแผ่น Carbon grid และตรวจสอบรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) ซึ่งวิธีการนี้จะสามารถตรวจสอบรูปร่างและขนาดของอนุภาคเหมือนไวรัสเปรียบเทียบกับไวรัสที่พบได้ในธรรมชาติ

การประยุกต์ใช้อนุภาคเหมือนไวรัส cVLPs

1. การนำมาใช้เป็นวัคซีน เนื่องจากอนุภาคเหมือนไวรัสมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับอนุภาคไวรัสที่พบได้ในธรรมชาติและมีความปลอดภัย จึงมีการนำมาใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยที่ไม่จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของแอดจูแวนท์ (Adjuvants) เช่น cVLPs ของไวรัส Maize rayado fino virus ที่เชื่อม Long peptide ที่เป็น Neutralizing epitope ของไวรัส Newcastle disease virus เพื่อนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจาก Newcastle disease virus (Natilla and Hammond, 2011) เป็นต้น

2. การนำมาใช้เป็นพาหะในการขนส่งยา เช่น อนุภาคเหมือนไวรัส MrNV ที่มีการเชื่อมกับตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เพื่อให้เกิดความจำเพาะกับเซลล์มะเร็งและนำมาใช้สำหรับห่อหุ้มยาหรือ Gene therapy สำหรับรักษาโรคมะเร็งได้อย่างจำเพาะ (Thong et al., 2019; Grataitong et al., 2021)

3. การนำมาใช้ในงานด้าน Optical imaging โดยอนุภาคเหมือนไวรัส cVLPs จะเชื่อมกับอนุภาคที่ทำให้เกิดสีเพื่อใช้สำหรับศึกษาวิเคราะห์ด้าน Biodistributions pharmacokinetics และ Biological interactions เช่น อนุภาคเหมือนไวรัส Simian virus 40 ที่เชื่อมกับ Target peptide และยา Anticoagulant นำไปใช้ในการห่อหุ้ม Near-infrared quantum dots เพื่อศึกษาการนำส่งยา Anticoagulant ในหนูทดลองที่มีชีวิตโดยใช้การติดตามสีภายใต้กล้อง Fluorescent microscope (Sun et al., 2016)

การนำอนุภาคเหมือนไวรัสลูกผสมมาประยุกต์ใช้กับภารกิจของหน่วยงานสามารถทำได้หลายแนวทาง ตัวอย่าง

เช่น การสร้างอนุภาคเหมือนไวรัสลูกผสมในการใช้เป็นวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อ เช่น โรคพิษสุนัขบ้า โรคตับอักเสบ เป็นต้น หรือนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ชีววัตถุสำหรับขนส่งยาที่สามารถรักษาโรคติดเชื้อได้

เอกสารอ้างอิง

Blumberg, B. S., Alter, H. J., Visnich, S. 1965. A “new” antigen in leukemia sera. JAMA 191(7), 541–546.

Garay, E., Fontana, D., Villarraza, J., Fuselli, A., Gugliotta, A., Antuña, S., Tardivo, B., Rodríguez, M. C., Gastaldi, V., Battagliotti, J. M., Alvarez, D., Castro, E., Cassataro, J., Ceaglio, N., Prieto, C. 2023. Design and characterization of chimeric Rabies-SARS-CoV-2 virus-like particles for vaccine purposes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 107, 3495-3508.

Grataitong, K., Huault, S., Chotwiwatthanakun, C., Jariyapong, P., Thongsum, O., Chawiwithaya, C., Chakrabandhu, K., Hueber, A. O., Weerachatyanukul, W. 2021. Chimeric virus-like particles (VLPs) designed from shrimp noda virus (MrNV) capsid protein specifically target EGFR-positive human colorectal cancer cells. Sci. Rep. 11, 1-11.

Kaewborisuth, C., Wanitchang, A., Koonpaew, S., Srisutthisamphan, K., Saenboonrueng, J., Im-Erbsin, R., Inthawong, M., Sunyakumthorn, P., Thaweerattanasinp, T., Tanwattana, N., Jantraphakorn, Y., Reed, M. C., Lugo-Roman, L. A., Hunsawong, T., Klungthong, C., Jones, A. R., Fernandez, S., Teeravechyan, S., Lombardini, E. D., Jongkaewwattana, A. 2022. Chimeric virus-like particle-based COVID-19 vaccine confers strong protection against SARS-CoV-2 viremia in K18-hACE2 mice. Vaccines 10, 1-19.

Kheirvari, M., Liu, H., Tumban, E. 2023. Virus-like particle vaccines and platforms for vaccine development. Viruses 15, 1-24.

Mateu, M. G. 2011. Virus engineering: functionalization and stabilization. Protein Eng. Des. Sel. 24, 53-63.

Mateu, M. G. 2016. Assembly engineering and application of virus-based protein nanoparticles. In: Cortajarena, A. L., Grove, T. Z., (Eds.) Protein-based engineered nanostructures, Advances in experimental medicine and biology. Switzerland: Springer International Publishing, 83-120.

Natilla, A., Hammond, R. W. 2011. Maize rayado fino virus virus-like particles expressed in tobacco plants: A new platform for cysteine selective bioconjugation peptide display. J. Virol. Methods. 178, 209-215.

Shahrivarkevishahi, A., Hagge, L. M., Brohlin, O. R., Kumari, S., Ehrman, R., Benjamin, C., Gassensmith, J. J. 2022. Virus-like particles: a self-assembled toolbox for cancer therapy. Mater. Today Chem. 24, 1-16.

Sinnuengnong, R., Attasart, P., Smith, D. R., Panyim, S., Assavalapsakul, W. 2018. Administration of co-expressed *Penaeus stylirostris* densovirus-like particles and dsRNA-YHV-Pro provide protection against yellow head virus in shrimp. J. Biotechnol. 267, 63-70.

Sun, X., Li, W., Zhang, X., Qi, M., Zhang, Z., Zhang, X. E., Cui, Z. 2016. In vivo targeting and imaging of atherosclerosis using multifunctional virus- like particles of simian virus 40. Nano. Lett. 16, 6164-6171.

Thong, Q. X., Biabanikhankahdani, R., Ho, K. L., Alitheen, N. B., Tan, W. S. 2019. Thermally-responsive virus-like particle for targeted delivery of cancer drug. Sci. Rep. 9, 1-14.

Worawittayatada, J., Angsujinda, K., Sinnuengnong, R., Attasart, P., Smith, D. R., Assavalapsakul, W. 2022. Simultaneous production of a virus-like particle linked to dsRNA to enhance dsRNA delivery for yellow head virus inhibition. Viruses 14, 1-14.

Zeltins, A. 2013. Construction and characterization of virus-like particle: A Review. Mol. Biotechnol. 53, 92-107.

สถานเสาวภา
สภากาชาดไทย

๑๐๐ ปี
สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
เพื่อปิตุภูมิ เพื่อวิทยา เพื่อมนุษย์ชาติ

สารเสาวภา
Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

แบคทีเรีย *Capnocytophaga canimorsus* เชื้ออันตรายจากน้ำลายสุนัข

Capnocytophaga canimorsus, the hazardous bacteria from dog saliva

ณัฐวดี มนต์อ่อน
Nattawadee Mon-on

ฝ่ายชันสูตรและวิจัยโรคในสัตว์ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
Department of Animal Diagnosis and Investigation, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: โรคติดเชื้อระหว่างคนและสัตว์ (Zoonosis) สามารถเกิดได้จากเชื้อจุลชีพทั้งไวรัส แบคทีเรียและเชื้อรา เชื้อก่อโรคบางชนิดไม่ก่อโรคในสัตว์แต่ก่อโรคในคน เชื้อแบคทีเรีย *Capnocytophaga canimorsus เป็น*เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในช่องปากและน้ำลายของสุนัข ติดต่อเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ผ่านทางบาดแผลเปิดที่ผิวหนังจากการถูกสุนัขกัดหรือการถูกเลีย การติดเชื้อแบคทีเรียมีทั้งแบบเฉพาะที่ทำให้เกิดเนื้อตายและการติดเชื้อทั่วร่างกายในภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งทำให้เกิดความเสี่ยงในการเสียชีวิต โดยเฉพาะในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือภูมิคุ้มกันถดถอยที่มีโอกาสสัมผัสกับสุนัข

คำสำคัญ: เชื้อแบคทีเรีย โรคติดเชื้อระหว่างคนและสัตว์ สุนัข น้ำลาย ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด

ABSTRACT: Infectious diseases between humans and animals (Zoonosis) can be caused by microorganisms including virus, bacteria, and fungi. A few pathogens cause diseases in humans, not animals known as normal flora bacterial flora. *Capnocytophaga canimorsus* is a bacterial pathogen found in oral cavity and saliva of dogs. Dog biting or licking of open skin wounds could introduce bacteria into human body. Bacterial infections could be localized, resulting in necrosis, and sepsis caused by systemic infection that increase the mortality rate, especially in immunosuppressive and immunosenescent people.

Keywords: *Capnocytophaga canimorsus*, Zoonosis, Dog, Saliva, Sepsis

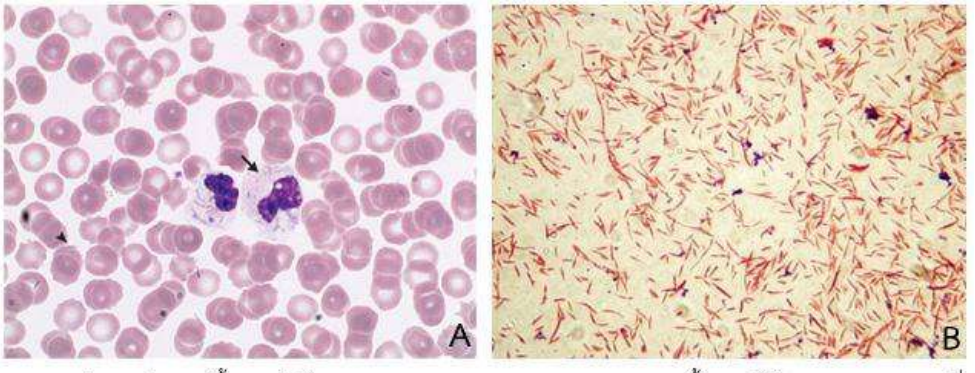
บทนำ

ในปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์เลี้ยงมีรูปแบบการเลี้ยงที่เปลี่ยนไป โดยนิยมเลี้ยงรูปแบบภายในที่อยู่อาศัยมากขึ้น ด้วยข้อดีทั้งเพื่อการดูแลสุขภาพสัตว์และเพื่อป้องกันโรคติดต่อจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ทำให้มีการสัมผัสใกล้ชิดกับสัตว์เลี้ยงมากขึ้น แต่มีโอกาสนำเชื้อก่อโรคจากสัตว์เลี้ยงเข้าสู่ร่างกาย ทั้งแบคทีเรีย ไวรัสหรือเชื้อราที่มาจากสัตว์เลี้ยงหรือปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จนเกิดโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน หรือ Zoonoses ที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพทั้งในคนและในสัตว์จนถึงแก่ชีวิตได้

ช่องทางการสัมผัสโรคระหว่างสัตว์สู่คนเกิดจากการถูกสัตว์เลี้ยงกัด พบว่ามากกว่า 90 เปอร์เซนต์ เกิดจากสุนัขและแมวกัด แผลจากการถูกสัตว์เลี้ยงกัดหรือข่วนมักเป็นแผลขนาดเล็ก มักพบบริเวณมือ เท้า ขา แขน ศีรษะ คอและลำตัวตามลำดับ แผลเกิดจากการถูกสัตว์กัดหรือข่วนถูกจัดเป็นแผลที่ไม่สะอาดเสี่ยงต่อการติดเชื้อ มีรายงานว่าแผลจากการถูกสุนัขกัดพบเชื้อแบคทีเรียถึง 80 เปอร์เซนต์ และมีโอกาสที่แผลจะติดเชื้อประมาณ 3–20 เปอร์เซนต์ ส่วนแผลที่ถูกแมวกัดมีโอกาสที่แผลจะติดเชื้ออยู่ที่ 20–50 เปอร์เซนต์ โดยพบทั้งแบคทีเรียกลุ่ม Aerobe และกลุ่ม Anaerobe การติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนจากเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในช่องปากสัตว์เลี้ยงหรือน้ำลายเกิดขึ้นได้ไม่บ่อยในกลุ่มคนที่มีสุขภาพแข็งแรง อย่างไรก็ตามตั้งแต่ปี 1976 ทั่วโลกพบการรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *Capnocytophaga canimorsus* ที่ทำให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ภาวะไข้สมองอักเสบและติดเชื้อที่บริเวณบาดแผลจนเกิดเนื้อตายรุนแรงที่มีรายงานวินิจฉัยยืนยันอยู่ที่ประมาณ 200 ราย และมากกว่า 90 เปอร์เซนต์ เป็นการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนในกลุ่มเสี่ยงที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือภูมิคุ้มกันถดถอย เช่น ผู้ป่วยพิษสุราเรื้อรัง ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดม้าม ผู้ติดเชื้อ HIV ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงได้รับเคมีบำบัดและกลุ่มผู้สูงอายุที่มีโรคเรื้อรัง ดังนั้นการติดเชื้อแบคทีเรีย *Capnocytophaga canimorsus* จึงเป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญทางสาธารณสุข โดยเฉพาะบุคคลที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดและมีประวัติโดนสัตว์เลี้ยงกัดหรือมีโอกาสได้รับเชื้อแบคทีเรียจากน้ำลายสัตว์เลี้ยง (Gaastra and Lipman, 2010; Gougeon, 2017; Jacob and Lorber, 2015)

เชื้อแบคทีเรีย *Capnocytophaga canimorsus*

Capnocytophaga spp. มีทั้งหมด 9 สปีชีส์ แบ่งเป็นแบคทีเรียที่พบเป็นเชื้อประจำถิ่นในช่องปากของคน ได้แก่ *C. gingivalis, C. granulosa, C. haemolytica, C. leadbetteri, C. ochracea* และ *C. sputigena* และแบคทีเรียที่พบในช่องปากของสัตว์เลี้ยงอย่างสุนัขและแมว



ภาพ A (ลูกศร) ภาพเชื้อแบคทีเรีย *C. canimorsus* ลักษณะรูปแท่งในเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophile ที่พบใน Blood smear (Markewitz & Graf, 2020)

ภาพ B Gram stain เชื้อแบคทีเรีย *C. canimorsus* ที่เพาะเชื้อจากแผลของกระต่ายที่โดนสุนัขกัด มีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ติดสีแดงของ Safranin (Gaastra และ Lipman, 2010)

รูปที่ 1 ภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Capnocytophaga canimorsus*

ได้แก่ *C. canimorsus, C. canis* และ *C. cynodegmi* เชื้อแบคทีเรียก่อโรค *C. canimorsus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง **(รูปที่ 1)** จัดในกลุ่ม Fastidious bacteria เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่โตช้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เวลาในการเพาะเชื้อ 2–7 วัน บน Blood agar หรือ Chocolate agar ที่อุณหภูมิ 35–37 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญเติบโตบน MacConkey agar เหมือนแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป และเป็น Capnophilic bacteria จึงต้องการบ่มในสภาวะที่มี 5-10 เปอร์เซนต์ คาร์บอนไดออกไซด์ ลักษณะโคโลนี มีขนาดเล็กแบบ Pin point โค้งนูน (Convex) ขอบเรียบ สีเหลือง และไม่มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Non hemolytic bacteria) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดง (Gaastra and Lipman, 2010)

ระบาดวิทยา

เชื้อแบคทีเรีย *C. canimorsus* สามารถพบได้ในช่องปากสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัขและแมว จากการศึกษาพบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากช่องปากสุนัขได้ 26 เปอร์เซนต์ และเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างช่องปากแมวได้ 15 เปอร์เซนต์ ของตัวอย่างทั้งหมด แต่เมื่อตรวจหาเชื้อด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *C. canimorsus* และ *C. cynodegmi* ที่ 74 เปอร์เซนต์ จากตัวอย่างจากสุนัขทั้งหมดและ 57 เปอร์เซนต์จากตัวอย่างจากแมว (Lloret et al., 2013) จึงถือว่าเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบในช่องปากของสัตว์เลี้ยงและไม่ก่อโรคในสัตว์เลี้ยง มีการรายงานการติดเชื้อบริเวณแผลที่ถูกสุนัขกัดในสัตว์ชนิดอื่น เช่น ในกระต่ายและในสุนัข แต่ไม่พบภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดจากเชื้อ *C. canimorsus* ในสัตว์ (Gaastra & Lipman, 2010)

จากการเก็บข้อมูลกรณีศึกษาของผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *C. canimorsus* พบว่าติดเชื้อจากสุนัข 84.7 เปอร์เซนต์ และติดเชื้อจากแมว 6.8 เปอร์เซนต์ โดยได้รับเชื้อจากการถูกสัตว์กัด 61 เปอร์เซนต์ จากการถูกเลียหรือสัมผัสน้ำลายสัตว์ 23.7 เปอร์เซนต์ และถูกสัตว์ข่วน 8.5 เปอร์เซนต์ แม้ว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในช่องปากของสัตว์เลี้ยงและติดต่อเข้าสู่เจ้าของผ่านการกัดสัมผัสน้ำลายหรือการข่วน (Mader et al., 2019) อย่างไรก็ตามการสำรวจในประเทศเนเธอแลนด์พบว่าโอกาสในการติดเชื้อจนเกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดอยู่ที่ 0.63 คนต่อล้านคน จากงานวิจัยพบว่าผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดเกิดจากภาวะพิษสุราเรื้อรัง เบาหวานและการใช้ยาในกลุ่มสเตียรอยด์ขนาดต่ำ ๆ ในระยะเวลายาวนาน (Van Dam and Jansz, 2011)

อาการทางคลินิก

การติดเชื้อ *C. canimorsus* จะเริ่มพบความผิดปกติจากบริเวณบาดแผลประมาณวันที่ 5 หลังจากการถูกกัดหรือในช่วง 1–14 วันหลังจากถูกสัตว์กัด พบว่าบาดแผลมีลักษณะการติดเชื้อ มีเนื้อตาย มีอาการปวดและมีหนอง ลักษณะเด่น คือ การเกิดเนื้อตาย มีสีม่วงคล้ำ (Fulminant purpura) หากเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด ผู้ป่วยจะมีไข้ (78 เปอร์เซนต์) หนาวสั่น (46 เปอร์เซนต์) ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ (31 เปอร์เซนต์) อาเจียน (31 เปอร์เซนต์) ท้องเสีย (26 เปอร์เซนต์) ปวดช่องท้อง (26 เปอร์เซนต์) วิงเวียน (26 เปอร์เซนต์) หายใจลำบาก (23 เปอร์เซนต์) สับสน (23 เปอร์เซนต์) และปวดศีรษะ (18 เปอร์เซนต์) ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อรุนแรงโดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ทำให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดเป็นหลัก (Sepsis) ร่วมกับการเกิดภาวะอื่น ๆ เช่น ภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Meningitis) ภาวะกระดูกและข้ออักเสบ (Osteomyelitis) ภาวะช่องท้องอักเสบ (Peritonitis) ภาวะเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (Endocarditis) ภาวะปอดอักเสบ (Pneumonia) และภาวะหลอดเลือดอักเสบทั่วร่างกาย (Disseminated intravascular coagulation: DIC) ซึ่งภาวะติดเชื้อรุนแรงโดยเฉพาะการติดเชื้อในกระแสเลือดทำให้มีอัตราการเสียชีวิตอยู่ที่ 30 เปอร์เซนต์ (Chesdachai et al., 2021; Mader et al., 2019; Markewitz and Graf, 2020)

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *C. canimorsus* ที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการ จากตัวอย่างเลือด น้ำไขสันหลังหรือจาก

เนื้อเยื่อ โดยสามารถพบแบคทีเรียรูปแท่งติดสีแกรมลบที่เม็ดเลือดขาวจากการทำ Buffy coat smear และสามารถพบแบคทีเรียรูปแท่งติดสีแกรมลบในน้ำไขสันหลังในผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียซึ่งทำให้เกิดภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบ สามารถตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการเพาะเชื้อจากตัวอย่างเลือดและตัวอย่างน้ำไขสันหลังบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นองค์ประกอบ เช่น Blood agar หรือ Chocolate agar และนิยมใช้วิธีระบุสปีชีส์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR และการทำ DNA sequencing (Gaastra and Lipman, 2010; Janda et al., 2006)

คุณสมบัติทางชีวเคมี

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค *C. canimorsus* มีเอนไซม์ Catalase, Oxidase, ONPG (O-nitrophenyl-b-D-galactoside) และ Arginine dihydrolase แต่ขาดเอนไซม์ Urease ไม่สามารถใช้ Nitrate lysine และ Ornithine ไม่สามารถสร้าง Indole และไม่สามารถย่อย DNase และ Gelatin ได้ แบคทีเรียใน Genus Capnocytophaga สามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด ได้แก่ Glucose Dextran Glycogen Inulin และแป้ง (Gaastra and Lipman, 2010) การใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีในการระบุสปีชีส์ของแบคทีเรียใน Genus Capnocytophaga ทำได้ยาก เนื่องจากแบคทีเรียไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ แบคทีเรียจึงโตช้า ไม่เหมาะสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี จึงนิยมใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียในการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการด้วยยีนที่จำเพาะต่อ 16S rRNA

การระบุสปีชีส์ของแบคทีเรีย

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมีความสำคัญในการระบุเชื้อก่อโรคและยืนยันการวินิจฉัยโรคจากอาการทางคลินิก ทำให้สามารถรักษาและการเลือกใช้ยาฆ่าเชื้อให้ตรงกับแบคทีเรียก่อโรค เนื่องจากการแยกแบคทีเรียและการระบุชนิดแบคทีเรียด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีไม่เหมาะสมกับเชื้อใน Genus Capnocytophaga จึงนิยมใช้วิธีการยืนยันและระบุสปีชีส์ของแบคทีเรียด้วยการระบุยีนที่จำเพาะต่อ 16S rRNA โดยสามารถระบุสปีชีส์ได้ทั้งโคโลนีจากการเพาะเชื้อหรือจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย ซึ่งสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างและเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนที่จำเพาะต่อ 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนที่มีเฉพาะในแบคทีเรียและมีโอกาสในการกลายพันธุ์น้อย (Highly conserved gene) มีความยาวประมาณ 1,500 Nucleotides หรือ 1.5 kb ซึ่งมีบางส่วนในลำดับยีนที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของชนิดแบคทีเรียได้ จึงนิยมเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ (Primer) ที่มีความจำเพาะกับส่วนที่ระบุสปีชีส์ของ *C. canimorsus* เพื่อใช้ในการถอดรหัสเพื่อระบุชนิดหรือใช้การตัดชิ้นยีนด้วยเอมไซม์จำเพาะเพื่อใช้ระบุชนิดของแบคทีเรียโดยเทียบกับฐานข้อมูลสารพันธุกรรมของแบคทีเรียหรือเทียบกับแบคทีเรียมาตรฐาน (Church et al., 2020; Martins-Baltar et al., 2022)

การรักษา

การให้ยาปฏิชีวนะ โดยยาปฏิชีวนะกลุ่มแรกที่นิยมใช้ในการรักษา คือ ยาในกลุ่ม β-lactams เช่น Penicillin และ β-lactamase inhibitor (amoxicillin–clavulanate acid) และ Cephalosporins (Ceftriaxone) ในภาวะที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดมักพิจารณาให้ยาปฏิชีวนะแบบเดี่ยวหรือแบบผสม เช่น ให้ร่วมกับยาในกลุ่ม Glycopeptide อย่าง Vancomycin (Chesdachai et al., 2021; Mader et al., 2019)

การป้องกัน

การป้องกันเชื้อเข้าสู่ร่างกาย คือ การป้องกันการกัดหรือการข่วนจากสัตว์ ทำได้ด้วยการฝึกสัตว์เลี้ยงของตัวเองไม่ให้มีนิสัยกัดหรือข่วน และเจ้าของควรรู้วิธีการเข้าหาและควบคุมสัตว์เพื่อป้องกันสัตว์กัด รวมทั้งไม่ให้สัตว์เลี้ยงเลียหน้าหรือบาดแผล และควรรักษาสุขอนามัยของตัวเองด้วย การล้างมือหรือส่วนของร่างกายที่ถูกสุนัขเลียทุกครั้งหลังสัมผัสสุนัขด้วยสบู่และน้ำสะอาด กรณีถูกสัตว์กัดหรือข่วนให้รีบทำความสะอาดบาดแผลด้วยสบู่และน้ำสะอาดหลายครั้ง เพื่อลดปริมาณแบคทีเรีย หากเป็นแผลสัตว์กัดที่รุนแรงหรือผู้ถูกกัดมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น

ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดม้าม ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัดและภาวะโรคเรื้อรัง เช่น เบาหวาน ควรไปพบแพทย์เพื่อล้างแผลและพิจารณาให้ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นการป้องกันการติดเชื้อแทรกซ้อน (Gaastra and Lipman, 2010; Jacob and Lorber, 2015; Lefebvre et al., 2008; Lloret et al., 2013)

บทวิจารณ์

โดยทั่วไปผู้ที่เลี้ยงสุนัขและผู้ที่ถูกสุนัขกัด อาจไม่รู้จักกับแบคทีเรีย *C. canimorsus* เนื่องจากไม่มีรายงานการระบุสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียจากการถูกสุนัขกัด เมื่อถูกสุนัขกัดที่มีแผลรุนแรงจะได้รับการดูแลโดยทำความสะอาดบาดแผลอย่างถูกต้องและรับยาปฏิชีวนะเพื่อการป้องกันการติดเชื้อ โรคติดเชื้อแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อประจำถิ่นในช่องปากของสุนัข มีโอกาสเป็นเชื้อก่อโรคในคนผ่านทางการกัดหรือการเลียบริเวณที่มีบาดแผล อีกทั้งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคในสัตว์ สุนัขไม่มีอาการป่วยและการที่สุนัขเลียเป็นพฤติกรรมตามธรรมชาติของสัตว์จึงทำให้คนที่เลี้ยงสุนัขละเลยและมีความเสี่ยงในการได้รับเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะในกลุ่มคนที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือภูมิคุ้มกันถดถอยมีโอกาสติดเชื้อบริเวณบาดแผลได้ง่ายและมีโอกาสเกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด การวินิจฉัยการติดเชื้อ *C. canimorsus* ร่วมกับประวัติการสัมผัสสุนัข ทำให้สามารถเก็บตัวอย่างและตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น อีกทั้งเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาได้อย่างถูกต้อง เพื่อป้องกันการเสียชีวิตจากภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด จนทำให้เกิดภาวะไข้สมองอักเสบหรือหลอดเลือดอักเสบทั่วร่างกาย

เอกสารอ้างอิง

Chesdachai, S., Tai, D. B., Yetmar, Z. A., Misra, A., Ough, N., Saleh, O. A. 2021. The Characteristics of *Capnocytophaga* Infection: 10 Years of Experience. Infectious Disease Society of America. Open Forum Infect. Dis. 8(7), ofab175. doi: 10.1093/ofid/ofab175.

Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., Emler, S. 2020. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. Clin. Microbiol. Rev. 33(4), e00053-19. doi: 10.1128/CMR.00053-19

Gaastra, W., Lipman, L. J. 2010. *Capnocytophagacani morsus.* Vet Microbiol. 140(3-4), 339-346.

Gougeon, A. J. 2017. Capnocytophaga species. สืบค้นจาก Antimicrobe, http://www.antimicrobe.org/ b92.asp

Jacob, J., Lorber, B. 2015. Diseases Transmitted by Man's Best Friend: The Dog. Microbiol Spectrum. doi: https://doi.org/10.1128/microbi olspec.iol5-0002-2015

Janda, J. M., Graves, M. H., Lindquist, D., Probert, W. S. 2006. Diagnosing *Capnocytophaga canimorsus* Infec tions. Emerg. Infect. Dis. 12, 340-342.

Lefebvre, S. L., Peregrine, A. S., Golab, G. C., Gumley, N. R., Waltner-Toews, D., Weese, J. S. 2008. A veterinary perspective on the recently published guidelines for animal-assisted interventions in health-care facilities. J. Am. Vet. Med Assoc. 233 (3), 294-402.

Lloret, A., Egberink, H., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Frymus, T., Radford, A. D. 2013. *Capnocytophaga canimorsus* infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. J. Feline Med. Surg. 15(7), 588-590.

Mader, N., Lührs, F., Langenbeck, M., Herget-Rosenthal, S. 2019. *Capnocytophaga canimorsus*–a potent pathogen in immunocompetent humans–systematic review and retrospective observational study of case reports. Infect. Dis. 52(2), 65-74.

Markewitz, R. D., Graf, T. 2020. *Capnocytophaga canimorsus* Infection. N. Engl. J. Med. 1167.

Martins-Baltar, A., Meyer, S., Barraud, O., Garnier, F., Ploy, M.-C., Vignon, P., François, B. 2022. Routine use of 16S rRNA PCR and subsequent sequencing from blood samples in septic shock: about two case reports of *Capno cytophaga canimorsus* infection in immunocompetent patients. BMC Infect. Dis. 22(1), 355. doi: 10.1186/s12879-022-07328-z.

Van Dam, A. P., Jansz, A. 2011. *Capnocytophaga canimorsus* infections in The Netherlands: a nationwide survey. Clin. Microbiol. Infect. 17(2), 312-315.

สถานเสาวภา
สภากาชาดไทย

๑๐๐ ปี
สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
เพื่อปิตุภูมิ เพื่อวิทยา เพื่อมนุษย์ชาติ

สารเสาวภา
Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าสู่การสร้างพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า

Assessing the Efficiency of a Veterinary Rabies Vaccine in Advancing Toward a Rabies-Free Area

บุณยกร วงสกุล[1] ณัฐวดี มนต์อ่อน[1] ชานนท์ ฝาเงิน[1] ชลทิพย์ พิพัฒนาบูรณ์[2]
Boonyakorn Wongsakul[1], Nattawadee Mon-on[1], Chanon Fangoen[1], Chonlatip Pipattanaboon[2]

1 ฝ่ายชันสูตรและวิจัยโรคในสัตว์ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
2 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
1 Department of Animal Diagnosis and Investigation, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society
2 Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

บทคัดย่อ: ไวรัสพิษสุนัขบ้าหรือเรบี่ส์ไวรัส (Rabies Virus: RBV) เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษา สามารถป้องกันได้ด้วยการฉีดวัคซีนเพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน และตัวแปรสำคัญในการวัดความสำเร็จของวัคซีนพิษสุนัขบ้าคือ มีการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันถึงระดับมากกว่าหรือเท่ากับ 0.5 IU/มล. ตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก เพื่อเป็นการสร้างภูมิคุ้มกันหมู่และป้องกันการเสียชีวิต แต่ระดับภูมิคุ้มกันดังกล่าว อาจไม่ได้บ่งบอกการป้องกันการเสียชีวิตได้โดยตรง การทดลองนี้จึงได้นำวัคซีนพิษสุนัขบ้าที่มีจำหน่ายในประเทศไทย 2 ตราสินค้า (วัคซีน A และ B) มาฉีดทดสอบในไซเรียนแฮมสเตอร์ เพื่อวัดระดับ Rabies Virus Neutralization Antibody (RVNA) และอัตราการเสียชีวิตหลังได้รับวัคซีน ซึ่งผลการทดสอบพบว่า วัคซีนทั้ง 2 ตราสินค้า สามารถกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันได้ที่ระดับเกิน 0.5 IU/มล. ที่ 1 เดือนและ 3 เดือนหลังได้รับวัคซีน เมื่อถึงเวลา 6 เดือน ระดับภูมิคุ้มกันของวัคซีนทั้ง 2 ตราสินค้าลดลงไปที่ระดับต่ำกว่า 0.5 IU/มล. (ค่าเฉลี่ยภูมิคุ้มกันคือ วัคซีน A: 0.378 IU/มล. และ วัคซีน B: 0.096 IU/มล.) ทั้งสองกลุ่มทำให้หนูทดลองมีอัตรารอดชีวิตที่ 90 เปอร์เซนต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับภูมิคุ้มกันที่ 0.5 IU/มล. อย่างเดียวไม่ได้เป็นตัวชี้วัดการป้องกันการติดเชื้อไวรัสและอัตราการรอดชีวิต อย่างไรก็ตาม ระดับภูมิคุ้มกันมาตรฐานก็ยังคงมีความสำคัญในการสร้างพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้าเช่นกัน

คำสำคัญ: พิษสุนัขบ้า วัคซีน พื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า ภูมิคุ้มกัน

ABSTRACT: The Rabies Virus (RBV) is a contagious zoonotic disease without treatment method, it can be prevented by immunization. The key to successful rabies vaccination lies in the availability of high-quality vaccines capable of eliciting an immune response that reaches the adequate protective level set at 0.5 IU/ml by the World Health Organization (WHO). However, the mentioned level of immunity isn't the main factor to protect animal from fatality. Two Thai commercially available rabies vaccines were brought by this experiment and were assessed in Syrian Hamsters to determine the Rabies Virus Neutralization Antibody (RVNA) levels post-vaccination and to observe the survival rate. Both vaccines were found to induce immune responses that exceeded the protective threshold of 0.5 IU/ml at the first and third months after vaccinated. At the sixth month, both groups of hamsters exhibited a Geometric Mean Titer (GMT) of RVNA at the levels of 0.378 IU/ml (Vaccine A) and 0.096 IU/ml (Vaccine B). Both resulting in a 90% survival rate. This indicates that an immune level of 0.5 IU/ml alone may not provide sufficient protection against infection. However, a threshold of 0.5 IU/ml should still be considered when establishing rabies-free areas.

Keywords: Rabies, Vaccine, Rabies-free area, Immune

บทนำ

โรคพิษสุนัขบ้าเกิดจากไวรัสตระกูล Lyssa Virus จาก Family Rhabdoviridae เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่ยังไม่มีวิธีการรักษา มีผู้เสียชีวิตเฉลี่ยปีละ 59,000 คน (Hampson, 2015) สามารถสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจได้ถึงปีละ 5,500 ล้านดอลล่าร์ต่อปีอีกด้วย (Lopes and Gomes, 2018) ปัจจุบันหลายๆประเทศมีความต้องการที่จะทำให้ประเทศของตนเองสามารถพัฒนาไปสู่การสร้างพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า (Rabies-free area) ตามเป้าหมายขององค์การอนามัยโลก ภายในปี ค.ศ. 2030 ที่จะกำจัดการเสียชีวิตของโรคพิษสุนัขบ้าในมนุษย์ที่เกิดจากสุนัข ซึ่งการทำเช่นนั้นต้องมีการปฏิบัติงานร่วมกันของหลายฝ่าย เช่น การทำวัคซีนในสุนัขและคนอย่างสม่ำเสมอ การให้ความรู้และตระหนักรู้แก่ประชาชน การสามารถเข้าถึงวัคซีนที่มีคุณภาพและในปริมาณที่มากพอ ร่วมกับการควบคุมดูแล (Surveillance) อย่างต่อเนื่อง จะสามารถทำให้ชุมชนนั้นพัฒนาไปเป็นเขตปลอดโรคพิษสุนัขบ้าได้ (Cliquet and Wasniewski, 2018) การสร้างภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้าอย่างมีประสิทธิภาพนั้น ปัจจัยนอกจากกรรมวิธีการฉีดที่ถูกต้องแล้ว เรื่องคุณภาพของวัคซีน ซึ่งเคยมีรายงานในประเทศไทย และประเทศที่กำลังพัฒนาหลายๆประเทศว่า มีการตรวจพบวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าที่ไม่มีคุณภาพ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2022) หรือมีการเก็บรักษาที่ไม่ถูกต้องแล้วนำมาฉีดให้แก่สัตว์ ซึ่งวัคซีนเหล่านั้นไม่มีความสามารถในการกระตุ้นระดับ Neutralization antibody (NAb) มากพอที่จะผ่านระดับมาตรฐานและไม่สามารถป้องกันโรคได้ ทำให้การควบคุมโรคในชุมชนล้มเหลวตามมา

ตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้ค่า NAb ขั้นต่ำไว้ที่ 0.5 IU/มล. โดยเป็นค่ามาตรฐานของการตอบสนองของการฉีดวัคซีนทั้งในคนและสัตว์ เป็นค่าที่แต่ละประเทศให้ความสำคัญในการเคลื่อนย้ายสัตว์เข้าประเทศตามมาตรฐานทางสาธารณสุข อย่างไรก็ตามการที่มีระดับภูมิคุ้มกันที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.5 IU/มล. นั้น ไม่ได้แสดงถึงการป้องกันการติดเชื้อ (CDC: Centers for Disease Control and Prevention, 2021) หมายความว่าแม้การมีระดับภูมิคุ้มกันต่ำกว่า 0.5 IU/มล. สัตว์จะสามารถมีชีวิตรอดจากการติดเชื้อพิษสุนัขบ้าได้

การทดลองนี้เป็นการพิสูจน์ว่า การที่สัตว์ได้รับวัคซีนไประยะเวลาหนึ่ง จนภูมิคุ้มกันลดลงที่ระดับต่ำกว่าค่ามาตรฐาน 0.5 IU/มล. จะมีความสามารถในการป้องกันโรคและรอดจากการเสียชีวิตจากการติดเชื้อที่อัตราส่วนเท่าใด เพื่อในอนาคตจะได้มีประโยชน์ในการบริหารจัดการวัคซีนและโรคพิษสุนัขบ้าที่ดีและมั่นคงมากยิ่งขึ้นต่อไป

เครื่องมือและวิธีการทดสอบ

การทดลองนี้ใช้ Syrian Hamster ทั้งหมด 30 ตัว (n=30) จัดเตรียมโดย ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (Control, n=10) ซึ่งฉีด Placebo ด้วย Normal Saline Solution (NSS) กลุ่มทดลองวัคซีนตราสินค้า ที่ 1 (กลุ่ม A, n=10) และกลุ่มทดลองวัคซีนตราสินค้าที่ 2 (กลุ่ม B, n=10) วัคซีนที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็น Inactivated vaccine ที่เป็นวัคซีนที่หาได้ทั่วไปตามท้องตลาด สองตราสินค้า คือ Bayovac-R®, (Bayer Thai Co. Ltd., Bangkok Thailand) และ RABISIN® (L473278, Merial Ltd., Bangkok, Thailand)

การเก็บตัวอย่างทำโดยการเก็บเลือดด้วยวิธีการเจาะจากหัวใจ (Heart puncture) แล้วนำมาปั่นแยกซีรั่ม (Serum) ให้ได้ปริมาณอย่างน้อย 25 ไมโครลิตร เก็บเลือดทั้งหมด 4 ครั้ง คือ ก่อนการให้ วัคซีน 1 ครั้ง และหลังได้รับวัคซีนครบ 1, 3 และ 6 เดือน นำซีรั่มที่ได้มาวัดระดับภูมิคุ้มกัน Neutralizing antibodies (NAb) ด้วยวิธี Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) (Smith et al., 1976) และหลังจากการตรวจระดับภูมิคุ้มกันครั้งสุดท้ายจึงฉีดไวรัสพิษสุนัขบ้าให้แก่สัตว์ทดลอง

ไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ใช้ในการทดลองเป็นสายพันธุ์ Thai street dog ปริมาณ Titer = 107.023 LD50/มล. ที่ได้มาจากสุนัขติดเชื้อที่ได้รับการวินิจฉัยและชันสูตรจากฝ่ายชันสูตรและวิจัยโรคในสัตว์ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย โดยฉีดเชื้อไวรัสเข้าทางกล้ามเนื้อ Quadriceps หนูแฮมสเตอร์ทั้ง 3 กลุ่ม ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร

(Titer = 106.023) จากนั้นสังเกตอาการและอัตราการรอดชีวิตเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แฮมสเตอร์ที่เสียชีวิต ให้ทำการผ่าชันสูตรและเก็บตัวอย่างสมองจากซาก นำไปทำ impression smear แล้วตรวจหาเชื้อด้วยวิธี Direct fluorescent antibody test (DFA) ซึ่งเป็น Gold standard (WHO, 1996; Dean et al., 1996)

ผลการทดสอบ

1. กลุ่มควบคุม หรือ Placebo (รูปที่ 1)

ค่าเฉลี่ยภูมิคุ้มกัน หรือ Geometric mean (GMT) ของ NAb ที่ 0 เดือน, 1 เดือน, 3 เดือน และ 6 เดือน อยู่ที่ 0.100, 0.098, 0.098 และ 0.097 IU/มล. ตามลำดับ ทั้ง 4 รอบ ค่าภูมิคุ้มกันไม่ถึงระดับ Protection ตามค่ามาตรฐานที่ 0.5 IU/มล. ทั้งหมด ในแต่ละเดือน ระดับภูมิคุ้มกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ (all P-value = 1.00) อัตราการรอดชีวิต 0 เปอร์เซนต์ และตัวอย่างสมองได้ผล DFA เป็นบวก ทั้งหมด

2. กลุ่ม A (รูปที่ 2)

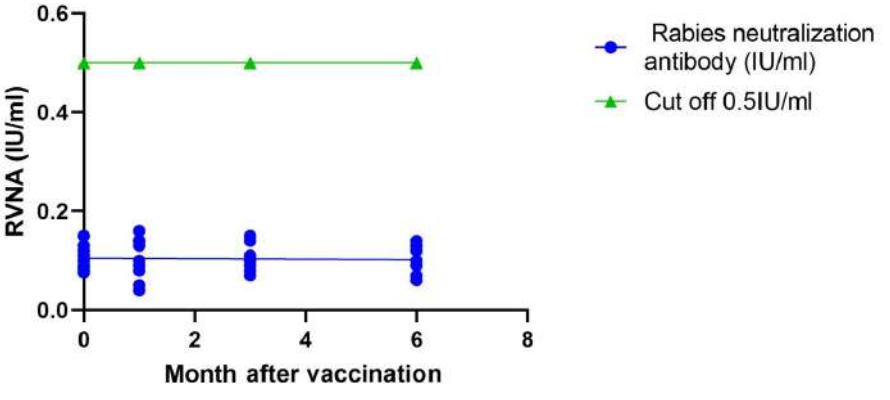
GMT ของ NAb ที่ 0 เดือน, 1 เดือน, 3 เดือน และ 6 เดือน คือ 0.129, 3.427, 1.652 และ 0.387 IU/มล. ตามลำดับ โดยระดับภูมิคุ้มกันในเดือนที่ 1 และเดือนที่ 3 หลังฉีดวัคซีน พบว่าสูงกว่าก่อนฉีดวัคซีนที่ 0 เดือนอย่างมีนัยยะสำคัญ (P-value = 0.00 และ 0.11 ตามลำดับ) รวมถึงมีค่าเฉลี่ย > 0.5 IU/มล. อย่างไรก็ตาม ในเดือนที่ 6 ระดับภูมิคุ้มกันเฉลี่ยต่ำกว่าค่า Cut off และยังคงสูงกว่าก่อนฉีดวัคซีนอย่างมีนัยยะสำคัญ (P-value = 0.01) อัตราการรอดชีวิตใน กลุ่ม A คือ 90 เปอร์เซนต์ (เสียชีวิต 1 ตัว รอด 9 ตัว) สัตว์ทดลองที่เสียชีวิตได้ผล DFA เป็นบวกทั้งหมด

3. กลุ่ม B (รูปที่ 3)

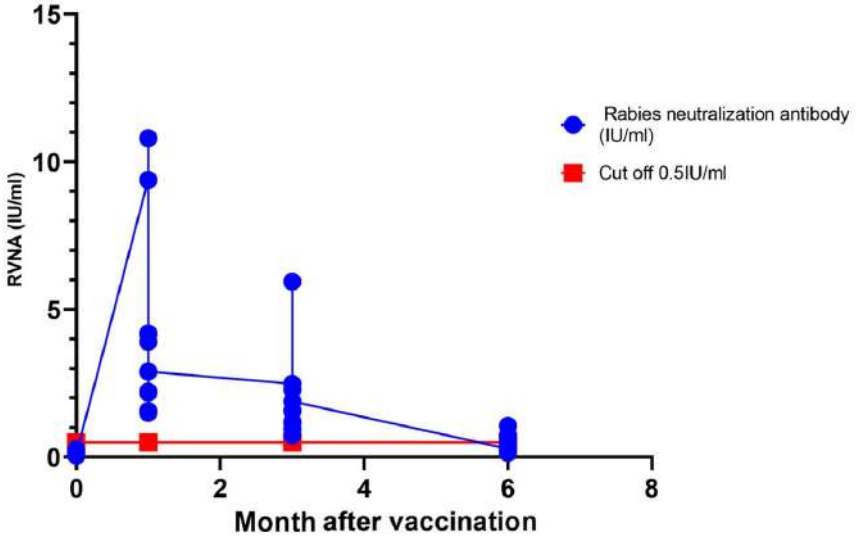
GMT ของ NAb ที่ 0 เดือน, 1 เดือน, 3 เดือน และ 6 เดือน คือ 0.204, 2.562, 0.727 และ 0.096 ตามลำดับ ในเดือนที่ 1 และ 3 หลังฉีดวัคซีนระดับภูมิคุ้มกันยังคงอยู่ที่ระดับสูงมากกว่า 0.5 IU/มล. และมีค่าสูงกว่าในเดือนที่ 0 อย่างมีนัยยะสำคัญ (P-value = 0.00 และ 0.11 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามในเดือนที่ 6 ระดับ NAb เฉลี่ยมีค่าต่ำกว่า Cut off 0.5 IU/มล. โดยค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกับก่อนฉีดวัคซีนอย่างมีนัยยะสำคัญ (P-value = 0.333) อัตราการรอดชีวิตใน กลุ่ม B คือ 90 เปอร์เซนต์ (เสียชีวิต 1 ตัว รอด 9 ตัว) สัตว์ทดลอง ที่เสียชีวิตได้ผล DFA เป็นบวกทั้งหมด

สรุปและวิเคราะห์ผล

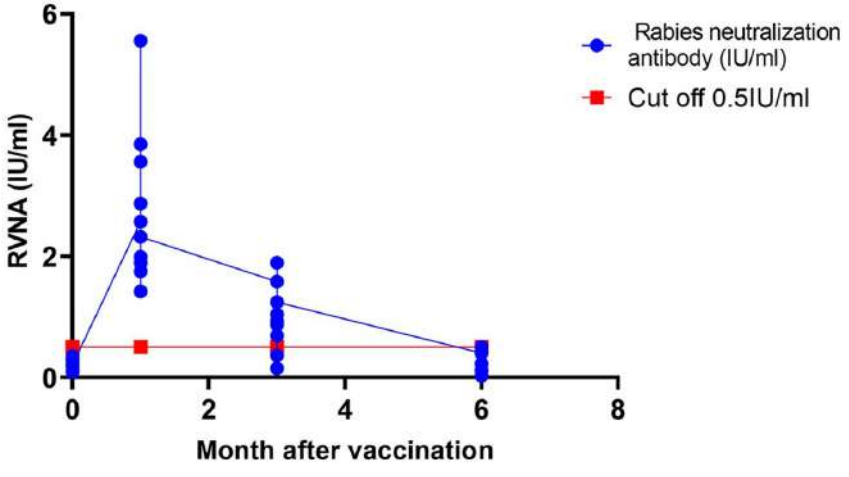
จากผลการทดลองทั้งสามกลุ่ม พบว่าวัคซีนป้องกันพิษสุนัขบ้าของทั้งสองตราสินค้าสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันในระดับที่เกิน 0.5 IU/มล. ได้ใน 1 เดือน และ 3 เดือนแรก ส่วนในเดือนที่ 6 ทั้งสองกลุ่มมีระดับภูมิคุ้มกันเฉลี่ยที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐาน (กลุ่ม A = 0.387 และ กลุ่ม B = 0.096) แสดงให้เห็นว่าระดับภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อวัคซีนทั้งสองตราสินค้า หลังการฉีดวัคซีนเข็มแรกไปแล้ว 6 เดือน อาจต้องมีการฉีดวัคซีนกระตุ้นให้ ระดับ NAb ให้สูงเกินมาตรฐาน 0.5 IU/มล. เนื่องจากค่านี้เป็นเกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาการเคลื่อนย้ายสัตว์ข้ามพื้นที่ (WHO, 2013)



รูปที่ 1 ระดับการตอบสนองภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้า กลุ่มควบคุม



รูปที่ 2 ระดับการตอบสนองภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้า กลุ่ม A



รูปที่ 3 ระดับการตอบสนองภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้า กลุ่ม B

หรือการสร้างภูมิคุ้มกันหมู่ (Herd immunity) (Chuquista-Alcarraz et al., 2023) เพื่อเป็นรากฐานการพัฒนาระดับภูมิคุ้มกันซึ่งจะนำไปสู่ชุมชนปลอดโรคพิษสุนัขบ้าได้ต่อไปในอนาคต มาตรการของประเทศไทยและประเทศอื่นที่โรคพิษสุนัขยังมีการระบาดได้แนะนำให้ฉีดวัคซีนเข็มกระตุ้น Booster หลังเข็มแรกในระยะเวลาประมาณ 1 เดือน และต่อเนื่องทุกๆ 1 ปี (WASAVA: World Small Animal Veterinary Association, 2015) ซึ่งจะทำให้ระดับ NAb คงอยู่ได้เกิน 0.5 IU/มล. เป็นระยะเวลา 1-3 ปี อย่างไรก็ตาม หากกล่าวถึงการป้องกันโรคและการเสียชีวิต แม้ว่าระดับภูมิคุ้มกันจะต่ำกว่า 0.5 IU/มล. สัตว์สามารถรอดชีวิตจากการติดเชื้อพิษสุนัขบ้าได้ถึง 90 เปอร์เซนต์ เท่ากันทั้งสองกลุ่มการทดลอง แม้ว่าทั้งสองกลุ่มจะมีค่าเฉลี่ย NAb ไม่ถึง 0.5 IU/มล. ก็ตาม ซึ่งจากข้อมูลดิบมีสัตว์ทดลองที่มีระดับ NAb ไม่ถึง 0.5 IU/มล. รอดชีวิตได้ ในขณะที่สัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีนเสียชีวิตทั้งหมด **(ตารางที่ 1)**

ตารางที่ 1 ข้อมูลดิบระดับภูมิคุ้มกันของแฮมสเตอร์ในกลุ่ม A และ B (*** เสียชีวิต)

	Month after vaccination							
	0		1		3		6	
	Gr A	Gr B	Gr A	Gr B	Gr A	Gr B	Gr A	Gr B
Antibody titer (IU ml)	0.15	0.29	9.38	2.57	2.48	1.58	0.28	0.4
	0.08	0.26	4.19	3.85	2.29	0.69	0.72	0.11
	0.18	0.22	1.5	1.75	0.74	0.11	0.2	0.03
	0.26	0.06	4.15	5.56	1.16	1.89	0.37	0.12***
	0.096	0.35	1.56	2.87	0.95	1.04	0.14	0.5
	0.14	0.31	3.9	1.89	1.2	0.87	0.74	0.11
	0.27	0.2	2.18	1.42	1.57	0.15	0.44***	0.04
	0.14	0.18	10.79	1.99	5.94	0.11	1.06	0.03
	0.04	0.039	2.21	3.56	1.56	0.93	0.21	0.22
	0.12	0.2	2.89	2.32	1.88	1.24	0.5	0.03

แม้ RVNA มีความสามารถในการจัดการไวรัสออกจาก ระบบประสาทส่วนกลางได้ที่ระดับ *In vivo* และ *In vitro* (Moore and Hanlon, 2010) ไม่ได้หมายความว่ามีความสามารถ ในการป้องกันได้โรค 100 เปอร์เซนต์ เนื่องจากระดับภูมิคุ้มกันที่ 0.5 IU/มล. เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพและความสำเร็จในการทำวัคซีนเท่านั้น ไม่ได้หมายความว่าป้องกันการติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าได้ (CDC, 2008) และทางองค์การอนามัยโลกมีข้อเสนอแนะให้ค่า 0.5 IU/มล. จะแนะนำกับบุคคลที่มีความเสี่ยงที่จะสัมผัสกับโรคพิษสุนัขบ้า เช่น เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ สัตวแพทย์และบุคลากรที่ทำงานกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ควรมีระดับภูมิคุ้มกัน 0.5 IU/มล. เมื่อระดับภูมิคุ้มกันลดลงต่ำกว่า 0.5 IU/มล. ให้ทำการฉีดวัคซีนเข็มกระตุ้น (Booster) ทันที (WHO, 1992) ชี้ให้เห็นว่า ระดับ RVNA ที่ 0.5 IU/มล. นั้นไม่สามารถนำมาใช้อ้างอิง อัตราการป้องกันโรคได้ แต่เป็นเพียงค่าอ้างอิงบ่งชี้ประสิทธิภาพและความสำเร็จในการทำวัคซีนของวัคซีนเท่านั้น ซึ่งวัคซีนที่ดีต้องสามารถกระตุ้นระดับ RVNA ได้ถึง 0.5 IU/มล. ดังที่ได้กล่าวไป

สัตว์แต่ละชนิด มีค่า cut off ของภูมิคุ้มกันพิษสุนัขบ้าที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาที่ผ่านมา ค่า Protection RVNA ของสัตว์แต่ละชนิดมี Cut off value ที่ไม่เท่ากัน เช่น ในสุนัขและแมว ค่า Cut off ที่ทำให้สุนัขและแมวรอดชีวิตคือ 0.2 IU/มล. และ 0.1 IU/มล. ตามลำดับ (Aubert, 1992) เช่นเดียวกับการทดสอบในสัตว์ป่าปี 2017 โดยใช้ Oral vaccine กับ แรคคูน จิ้งจอกแดง และสกั๊ง ระดับภูมิคุ้มกันที่วัดด้วยวิธี RFFIT ที่ 28 วันก่อน Challenge เชื้อไวรัส พบว่าค่าเฉลี่ยของ RVNA ของสัตว์ที่รอดชีวิตจะอยู่ในช่วงระหว่าง 0.25 – 0.5 IU ซึ่งไม่ได้มากกว่า 0.5 แต่อย่างใด (Moore et al, 2017)

ความสำเร็จในการทำวัคซีน นำพาไปสู่การสร้างพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า

แม้ว่าระดับ RVNA อาจจะไม่สามารถบอกระดับของการป้องกันโรคได้ อย่างไรก็ตาม หลายๆภาคส่วนยังให้ความสำคัญต่อระดับภูมิคุ้มกันที่ 0.5 IU/มล. ที่ตรวจด้วยวิธี RFFIT เพราะคือค่าที่บ่งบอกถึงความสำเร็จในการให้วัคซีน ซึ่งก่อให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อพิษสุนัขบ้า นำไปสู่การสร้างพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า (Briggs and Schweitzer, 2001) นอกจากนี้ยังต้องมีความร่วมมือกันจากทั้งหลายหน่วยงาน เพื่อการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ การสำรวจระดับภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง การฉีดวัคซีนในวงกว้าง (Mass vaccination) นอกจากในสัตว์แล้วยังต้องมีมาตรการในมนุษย์ด้วย เช่นการทำวัคซีน Human prophylaxis อย่างสม่ำเสมอ การสร้างความตระหนักรู้ให้แก่ประชาชน โดยใช้หลักการ One health โดยมาตรการเหล่านี้สามารถนำไปสู่

พื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า ตามคุณสมบัติขององค์การอนามัยโลกได้ (Cliquet and Wasniewski, 2018) ฉะนั้น ค่า RVNA ที่ 0.5 IU/มล. ยังคงต้องให้ความสำคัญต่อไป โดยคำนึงถึงจุดประสงค์ในการควบคุม เคลื่อนย้ายตัวสัตว์ การสร้าง Herd immunity และการป้องกันการติดเชื้อ ซึ่งทำให้การบริหารจัดการวัคซีนมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และนำไปสู่การสร้างพื้นที่ปลอดโรคพิษสุนัขบ้าต่อไปในอนาคต

บทความวิชาการนี้เป็นส่วนหนึ่งที่ได้มีการตีพิมพ์โดย Wongsakul, B. et al., 2023 ในวารสาร Journal of Veterinary and Marine Research

เอกสารอ้างอิง

Aubert, M. F. 1992. Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs. Revue Scientifique et Technique 11, 735 - 760.

Briggs, D. J., Schweitzer, K. 2001. Importation of dogs and cats to rabies-free areas of the world. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 31, 573–583.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention. 2021. Rabies serology. จาก www. cdc.gov/rabies/specific_groups/hcp/serology.html fbclid=IwAR07E76gDzdAn4ddD38UdpxCY CVcu2RjetotXqVrVjBkZANB-pupr2yxUS8

Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Human rabies prevention-United States, 2008. Morbidity and mortality weekly report. 57, 1- 26.

Chuquista-Alcarraz, O., Falcón, N., Vigilato, M. A. N., Rocha, F., Toledo-Barone, G., Amorim-Conselheiro, J., Recuenco, S. E., Castillo-Neyra, R. 2023. Dog population rabies immunity before a mass vaccination campaign in Lima, Peru: vulnerabilities for virus reestablishment. Am. J. Trop. Med. Hyg. 109(2), 420 - 428.

Cliquet, F., Wasniewski, M. 2018. Maintenance of rabies-free areas. Revue Scientifique et Technique, 37(2), 691-702. https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2834

FDA Thailand: Food and Drug Administration of Thailand. 2022. https://www.fda.moph.go.th/SitePages/News.aspx?IDitem=132

Hampson, K., Coudeville, L., Lembo, T., Sambo, M., Kieffer, A., Attlan, M., Barrat, J., Blanton, J. D., Briggs, D. J., Cleaveland, S., Costa, P., Freuling, C. M., Hiby, E., Knopf, L., Leanes, F., Meslin, F. X., Metlin, A., Miranda, M. E. G., Müller, T., Nel, L. H., Zinsstag, J. 2015. Estimating the global burden of endemic canine rabies. PLoS Negl. Trop. Dis. 9 (4), e0003786. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003786

Lopes, T., Gomes, A. 2018. Review on economic importance of rabies in developing countries and its controls. Arch. Prev. Med. doi:10.17352/APM.000007

Moore, S. M., Hanlon, C. A. 2010. Rabies-specific antibodies: Measuring surrogates of protection against a fatal disease. PLoS Negl. Trop. Dis. 4(3), e595. https://doi.org/10.1371/journal.pnt2. d.0000595

Moore, S. M., Gilbert, A., Vos, A., Freuling, C. M., Ellis, C., Kliemt, J., Müller, T. (2017). Rabies virus antibodies from oral vaccination as a correlate of protection against lethal infection in wildlife. Trop. Med. Infect. Dis. 2(3), 31. https://doi.org/10.3390/tropicalmed2030031

Smith J. S., Yager P. A., Baer G. M. 1973. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull. World Health Organ. 48, 535 - 541.

Wongsakul, B., Monon, N., Fangoen, C., Pipattanaboon, C. 2023. Efficiency evaluation of commercially veterinary rabies vaccine after the primary immunization against fatality. J. Vet. Marine. Res., 3 (1), 1-7.

World Health Organization. 1992. World Health Organization expert committee on rabies: Eighth report. Report Series, 824.

World Health Organization. 1996. Dean, D. J., Abelseth, M. K., Atanasiu, P. The fluorescent antibody test (4th ed.). Geneva, Switzerland.

World Organization for Animal Health Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013. สืบค้นวันที่ 22 กันยายน 2566, https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/

WSAVA: World Small Animal Veterinary Association. 2015. Guidelines for the vaccination of dogs and cats. สืบค้นวันที่ 28 มิถุนายน 2564, https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/01/WSAVA-Vaccination-Guidelines-2015.pdf

สารเสาวภา
Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

การใช้เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์เพื่อระบุตำแหน่งเอพิโทปและการนำมาใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์

Application of phage display technology for epitope identification and utilization in medical research

ปัณณทัต อารีกุล

Pannatat Areekul

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

Department of research and development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: เอพิโทปเป็นตำแหน่งจำเพาะบนผิวของแอนติเจนที่องค์ประกอบของภูมิคุ้มกันทั้งแอนติบอดี เซลล์บีลิมโฟไซต์และ/หรือเซลล์ที่รู้จักเข้าจับ ถือเป็นตำแหน่งในการจดจำระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน การนำเทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์มาใช้เพื่อหาตำแหน่งเอพิโทป อาศัยการใส่ชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจเข้าไปในสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอฟาจ เพื่อผลิตเปปไทด์สายสั้นหลายรูปแบบ และแสดงออกบนผิวของฟาจ จากนั้นใช้กระบวนการในการคัดเลือกเปปไทด์ที่จำเพาะต่อแอนติบอดี แล้วนำเปปไทด์จำเพาะเหล่านั้นมาศึกษาความสัมพันธ์และวิเคราะห์เพื่อหาตำแหน่งเอพิโทป เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์เป็นวิธีการที่มีข้อดีหลายประการ คือ ใช้เวลาน้อย ต้นทุนไม่สูง และใช้แรงงานน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ เป็นวิธีการทางเลือกที่ควรพิจารณาเป็นอันดับแรก ในการนำมาใช้ศึกษาการจับระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน บทความนี้จะกล่าวถึงหลักการโดยทั่วไปของเทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ พร้อมตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเอพิโทป การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย การพัฒนาวัคซีนที่มีการระบุเอพิโทปของแอนติเจนที่จะทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันมีประสิทธิภาพสูง รวมถึงตัวอย่างการศึกษาเอพิโทปบนไกลโคโปรตีนของไวรัสพิษสุนัขบ้า

คำสำคัญ: เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ เอพิโทป แอนติบอดี แอนติเจน ฟาจ

ABSTRACT: Epitope study is the study of recognition sites that antibody acts to antigen. There are many methods, one is phage display, a technique that is used to map the site of the epitope. This technique involves inserting a piece of the DNA molecule into the genetic material of phage to produce a variety of short peptides. Then, peptides will be expressed on the phage surface. These peptides are screened using the process that proteins which specific-bind to antibody are selected. The relationship of DNA binding peptides is then analyzed and the epitope is determined. Phage display is a method that has advantages compared to other methods, such as less time of the process, inexpensive, and extensive labor is not required. This method should be considered first to study the antibody-antigen binding. This article describes the general principle of phage display and related researches about the development of diagnostic methods, epitope-based vaccines, including epitopes of G protein on the rabies virus.

Keywords: Phage display technology, epitope, antibody, antigen, phage

บทนำ

แอนติบอดี (Antibody) จัดเป็นหนึ่งในกลไกของระบบภูมิคุ้มกันในการป้องกันโรคติดเชื้อของร่างกาย โดยมีการตรวจพบแอนติบอดีชนิดที่เรียกว่า Neutralizing antibodies: Nab เป็นแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อโรคก่อนที่เชื้อจะรุกรานเซลล์เป้าหมาย โดยอาศัยคุณสมบัติการจดจำอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีและเอพิโทป (Epitope) บนแอนติเจน (Antigen) ความเข้าใจในปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและเอพิโทปของแอนติเจน มีประโยชน์ในการศึกษาวัคซีนที่มีการระบุเอพิโทปของแอนติเจน (Epitope-based vaccine) มีเป้าหมายเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะ Nab ที่มีประสิทธิภาพ ปัจจุบันการศึกษาเอพิโทปมีหลายวิธีการ เช่น เทคนิคในการผลิตอนุภาคโคคริสตอล (Co-crystallization) เป็นวิธีมาตรฐานแต่มีข้อจำกัด เช่น มีโอกาสผิดพลาดสูง ใช้ต้นทุนสูง ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อน สิ้นเปลืองเวลาและแรงงาน เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ นับเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายและมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีการอื่นหลายประการดังจะกล่าวต่อไป

เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ (Phage display technology)

แบคเทอริโอฟาจ (Bacteriophage) หรือ ฟาจ (Phage) คือกลุ่มของไวรัสที่มีคุณลักษณะในการรุกรานเซลล์แบคทีเรีย ได้ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยและมีบทบาทสำคัญอย่างแพร่หลาย เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ถูกอธิบายครั้งแรกโดย George P. Smith (1985) เป็นการผลิตโปรตีนโพลีเปปไทด์โดยให้มีการแสดงออกบนผิวของฟาจโดยการใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าไปในดีเอ็นเอของแบคเทอริโอฟาจที่มีรูปร่างเป็นสายยาว หรือเป็นแท่ง (Filamentous phage) (The editors of Encyclopaedia Britannica., 2023) บทบาทของฟาจดิสเพลย์ นอกจากใช้ในเชิงภูมิคุ้มกันบำบัดต่อโรคมะเร็ง (Cancer immunotherapies) โดยการเป็นตัวพาแอนติเจนของเนื้อร้าย (Tumor antigen) เข้าสู่ร่างกายเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immune response) (Hess and Jewell, 2020) แล้ว ฟาจดิสเพลย์ยังมีประโยชน์อย่างมากในการทำแผนที่เอพิโทป (Epitope mapping) และการวิเคราะห์ปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ M13 filamentous phage โดยมีหลักการคือ การผลิตโพลีเปปไทด์สายสั้นที่มีความหลากหลายสูงให้มีการแสดงออกแบบสุ่มบนผิวอนุภาคฟาจ เรียกว่า Phage display random-peptide library จากนั้นทำการคัดเลือกอนุภาคเปปไทด์จากฟาจ (Peptide-phage) ที่สามารถจับกับเป้าหมายที่ต้องการศึกษา (Specific phage) แล้วนำเปปไทด์บนผิวฟาจที่ได้ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งเอพิโทป (Pande et al., 2010)

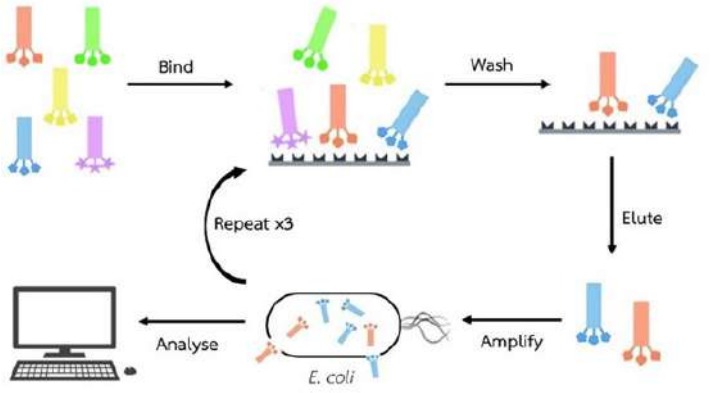
การแสดงออกแบบสุ่มของเปปไทด์บนผิวอนุภาคฟาจ (Phage display random-peptide library)

การแสดงออกแบบสุ่มของเปปไทด์บนผิวอนุภาคฟาจ เป็นกลุ่มความหลากหลายของโปรตีนโพลีเปปไทด์ เกิดจากการใช้ฟาจเป็นเวคเตอร์ (Vector) สำหรับใส่นิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ เช่น 21 เบส เข้าไปในตำแหน่งปลาย 5’ ของ Gene III หรือ Gene IIIV ที่กำหนดการสร้างโปรตีน PIII หรือ PIIIV ของฟาจ ตามลำดับ โดยหลังจากผ่านกระบวนการ Translation แล้วจะได้โปรตีนโพลีเปปไทด์ความยาว 7-codon (Heptapeptides) ติดอยู่กับโปรตีน PIII หรือ PIIIV เป็นต้น ชนิดของเบสทั้งสี่ (ATCG) จะถูกเรียงลำดับในแต่ละตำแหน่งแบบสุ่ม ซึ่งความเป็นไปได้ทั้งหมดในการจัดเรียงของเบสทำให้สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนทุกรูปแบบที่เป็นไปได้ **(รูปที่ 1)**

การใช้ฟาจดิสเพลย์ในการหาตำแหน่งเอพิโทป

จากความสามารถในการจับกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (Protein-protein interaction) การหาตำแหน่งเอพิโทปของแอนติเจน จะอาศัยความสามารถในการจับกันอย่างจำเพาะระหว่าง Monoclonal antibody (mAb) ที่ต้องการศึกษากับโปรตีนของแอนติเจนนั้น เราสามารถคัดแยก Peptide-link phage protein ที่จับกับ mAb ที่สนใจออกจาก Random-peptide library แล้วนำมาอ่านลำดับกรดอะมิโนด้วยการทำ DNA sequencing วิธีการใช้เทคนิคฟาจดิสเพลย์ในการระบุตำแหน่งเอพิโทปที่จำเพาะต่อ mAb ขั้นแรกเป็นการตรึงอนุภาค mAb ที่ต้องการหาเอพิโทปลง

รูปที่ 1 แสดง M13 phage libraries โดยมีอนุภาคฟาจเชื่อมต่อกับ Heptapeptide (X7) บริเวณโปรตีน PIII สามารถแสดงความหลากหลายของเปปไทด์ได้ถึง 1.28 x 109 แบบ โดยมี Gly-Gly-Gly-Ser เชื่อมระหว่างสายเปปไทด์และโปรตีน PIII (Ph.D.TM Phage Display Libraries Instruction Manual, New England Biolabs, Inc.)



รูปที่ 2 การใช้ Phage display random-peptide library ในการหาตำแหน่งเอพิโทปของโปรตีน

บนพื้นผิววัสดุแข็ง จากนั้นเติม Phage-displayed random peptide library เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับอนุภาค mAb ที่ตรึงไว้ กระบวนการนี้เรียกว่า Biopanning ขั้นตอนนี้จะมีเปปไทด์จำนวนหนึ่งที่มีการเรียงตัวบางตำแหน่งสอดคล้องกับเอพิโทปและสามารถจับกับ mAb จากนั้นล้างเอาเปปไทด์จากฟาจที่ไม่ทำปฏิกิริยาหรือทำปฏิกิริยาได้เพียงเล็กน้อยออก คงเหลือเฉพาะเปปไทด์จากฟาจที่มีความจำเพาะสูงต่อ mAb นั้น แล้วนำอนุภาคฟาจที่ได้ไปหาลำดับของเปปไทด์ที่แสดงออก และทำการวิเคราะห์รูปแบบของเอพิโทปต่อไป **(รูปที่ 2)** (Gershoni et al. 2007) อย่างไรก็ตาม จำนวนรูปแบบของเปปไทด์ที่คัดเลือกได้จาก Biopanning ไม่จำเป็นจะต้องมีความสอดคล้องกับแอนติเจนทั้งหมด โดยฟาจหนึ่งอนุภาคสามารถจับกับ mAb ได้บางตำแหน่งเท่านั้น

การใช้ฟาจดิสเพลย์กับงานวิจัยทางการแพทย์

ในปัจจุบันมีงานวิจัยทางการแพทย์จำนวนมากที่ใช้เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ เพื่อพัฒนาเป็นชีววัตถุสำหรับการรักษาโรคในผู้ป่วย (Therapeutic agent) หรือนำมาใช้ในการระบุตำแหน่งเอพิโทป เพื่อนำไปผลิตโปรตีนเลียนแบบเอพิโทป (Mimotope) มีประโยชน์ในการใช้ตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ รวมถึงใช้ในการผลิตเป็นวัคซีนที่ระบุเอพิโทป (Epitope-based vaccine) ด้วย

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้ Phage display random-peptide ในการผลิต Mimotope peptide สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค Human African trypanosomiasis (HAT) โดยปกติแล้วการวินิจฉัยโรคนี้จะใช้วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ ซึ่งต้องใช้โปรตีน Variant surface glycoproteins (VSGs) ที่ได้จากตัวเชื้อ *Trypanosoma brucei* (T.b.) *gambiense* เป็นตัวตรวจจับ โปรตีนนี้มีข้อจำกัดในภาคการผลิตซึ่งมีความยากและยังประกอบด้วยส่วนของเอพิโทปแบบไม่จำเพาะ (Non-specific) มีโอกาสให้ผลการตรวจแบบ Cross-reaction งานวิจัยนี้ได้ใช้ Mimotope peptide เพื่อจำลองเอพิโทปของ *T. b. gambiense* VSGs แล้วนำมาใช้แทนโปรตีน VSGs ในการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ การทดลองนี้ใช้ Mouse mAbs ที่จำเพาะต่อโปรตีน VSGs (LiTat 1.3 และ LiTat 1.5) เป็นตัวคัดเลือก หลังจากทดสอบ

ด้วยวิธี Biopanning แล้วสามารถคัดเลือกเปปไทด์ได้ 37 แบบที่สอดคล้องกับ Linear LiTat 1.5 VSG epitope และ 17 แบบที่สอดคล้องกับ Discontinuous LiTat 1.3 VSG epitope หลังจากนำมาทดสอบพบว่ามี 17 เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งการจับระหว่าง mAb ที่จำเพาะต่อ VSG LiTat 1.5 หรือ LiTat 1.3 ในขณะที่ HAT sera สามารถยับยั้งการจับอย่างจำเพาะระหว่าง mAb ต่อ Mimotope peptide ของ LiTat 1.5 และ LiTat 1.3 รวมทั้งหมด 9 เปปไทด์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (Van Nieuwenhove et al., 2011)

ในทำนองเดียวกัน จากงานวิจัยปี พ.ศ. 2561 อุปสรรคหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae (M. pneumoniae)* คือการขาดวิธีตรวจทางภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพในคลินิก หลังจากทดสอบการคัดเลือก Mimotope peptide ด้วยวิธี Biopanning โดยใช้ซีรั่มของผู้ป่วยเป็นตัวคัดเลือก เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของ Positive phage แล้วทำการผลิต Phage-heptapeptides นำมาทดสอบการจับกับซีรั่มของ *pneumonia*-positive ด้วยวิธี Indirect ELISA จนสามารถคัดเลือกเปปไทด์ ได้ 2 โคลน (Clone) ที่มีความสอดคล้องกันมาก (High homologies) ต่อ *M. pneumoniae* antigen เมื่อนำมาทดสอบความไว (Sensitivity) ในการตรวจผู้ป่วย *M. pneumonia* ให้ผลเท่ากับ 90.1 และ 80.0 เปอร์เซนต์ และความแม่นยำ (Specificity) เท่ากับ 94.3 และ 97.1 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (Shi et al., 2018)

นอกจากการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ ในการช่วยระบุตำแหน่งของเอพิโทปบน Antigen-specific mAb แล้ว จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสามารถใช้เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์เป็นอนุภาคตัวนำโปรตีนเสมือนเอพิโทปแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยสามารถกระตุ้นการหลั่ง Nab ที่มีประสิทธิภาพอย่างจำเพาะ มีผลในการลดอัตราการตาย และลดพยาธิสภาพของการก่อโรคได้ รวมไปถึงการคิดค้นพัฒนาวัคซีนที่ระบุเอพิโทปอีกด้วย ตัวอย่างเช่น การศึกษาการใช้เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *Candida albicans* เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาโรค Candidiasis ที่มีประสิทธิภาพอย่างทั่วถึง การผลิตเอพิโทปเปปไทด์ YGKDVKDLFDYAQE บนอนุภาคฟาจ บริเวณ pIII หรือ pVIII (Recombinant phage) และนำมาฉีดหนูทดลองแทนวัคซีน เพื่อดูประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อ โดยหลังจากทำการฉีดกระตุ้น หนูจะถูกฉีดเชื้อ *C. albicans* เข้าสู่กระแสเลือด ผลการทดลองพบว่า Recombinant phage ที่ผลิตขึ้น มีคุณสมบัติในการเพิ่มภูมิคุ้มกันทั้งระบบ Humoral- และ Cellular immune response อย่างชัดเจน ส่งผลในการลดการติดเชื้อ ลดความเสียหายของไตหนูที่ติดเชื้อ และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตอย่างมีนัยยะ (Shi et al., 2018)

งานวิจัยปี พ.ศ. 2561 การศึกษาการระบุตำแหน่งเอพิโทปบริเวณ N2N3 subdomain ของโปรตีน FnBPA บนผิว *Staphylococcus aureus* โดยเริ่มจากการผลิต mAbs (3C3) ต่อ N2N3 ด้วยเทคนิคการสร้างเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา (Hybridoma) และนำมาใช้คัดเลือก 12-codon peptide library ด้วยวิธี Biopanning หลังจากทำการทดสอบเปปไทด์จากฟาจที่คัดเลือกด้วยวิธี Immunofluorescence assay (IFA) และ Infection assay ทำให้ได้เปปไทด์เส้นตรงที่มีความสัมพันธ์สอดคล้องกันที่กรดอะมิโน 5 ตำแหน่งหลักบน เอพิโทป IETFNKANNRFSH ที่จำเพาะต่อ mAb 3C3 **(ตารางที่ 1)** จากการทดสอบพบว่าเอพิโทปเปปไทด์นี้ปรากฏอยู่บนผิวของ *S. aureus* และสามารถนำมาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สำเร็จในหนูทดลอง (Ma et al., 2018.)

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตวัคซีนที่ระบุเอพิโทปเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสก็มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น การหาตำแหน่งเอพิโทปของโปรตีน A33 ที่จำเพาะต่อ mAb 1G10 ในการยับยั้งไวรัส Vaccinia ในการแพร่กระจายระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ (He et al., 2012.) การหาตำแหน่งเอพิโทป K310 บริเวณ E-DIII ของไวรัสเดงกี่ (Dengue) ซึ่งจับกับ Neutralizing mAb ต่อเดงกี่ 4 สายพันธุ์ (Li et al., 2012) เป็นต้น และงานวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง (Gazarian et al., 2011)

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา มีความสนใจที่จะใช้ Phage display random-peptide library ในการศึกษาเอพิโทปบนโปรตีน G ของไวรัสพิษสุนัขบ้า ที่จำเพาะต่อ Neutralizing mAb โดยคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มองค์ความรู้ในการผลิตเอพิโทปเปปไทด์สำหรับฉีดกระตุ้น

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเปปไทด์ของเฟจที่คัดเลือกได้จาก Biopanning โดยใช้ mAb 3C3 เป็นตัวคัดเลือกโดยมีเปปไทด์ IETFNKANNRFSH บน N2N3 เป็นเอพิโทปเปปไทด์

mAbs	Phage	Sequence
3C3	1	…GSGSEGTKRFSW…
3C3	2	…HDNLLSRTNNRF…
3C3	3	…ISPKTFPDRFGS…
3C3	4	…SEFKDWLQTRFS…
3C3	5	…YAFPGPTRFSYV…
3C3	6	…QDFARDSHTRFS…
3C3	7	…DMGPTTTWRFSF…
3C3	8	…GLSRFGPNRFQD…
3C3	9	…STIFRFSDV-EAH…
3C3	10	…FGDWSKLAGRFS…
N2N3		…IETFNKANNRFSH…

ภูมิคุ้มกันต่อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ Whole antigen ในวัคซีน และเพื่อพัฒนาไปสู่วัคซีนที่ระบุเอพิโทปต่อไป ทั้งในรูปแบบวัคซีนป้องกัน (Pre-exposure) หรือวัคซีนในการรักษาหลังสัมผัสเชื้อ (Post-exposure prophylaxis; PEP) ทั้งนี้จากการทดลองใช้ mAb ที่จำเพาะต่อไวรัสพิษสุนัขบ้าเป็นตัวคัดเลือกเปปไทด์จาก Heptapeptides phage library เริ่มด้วยการตรึง mAb ที่ต้องการทดสอบลงบน 96-well plate จากนั้นใช้วิธี Biopanning ในการคัดเลือกโคลน ทำการคัดเลือกทั้งหมด 3 รอบ โดยเพิ่มความเข้มข้นของสารชะล้างทุกรอบ เพื่อเพิ่มโอกาสการชะเอาฟาจที่ไม่จำเพาะออกให้มากที่สุด และเพิ่มสัดส่วนจำนวนฟาจที่มีการจับได้แข็งแรง (High affinity) ให้มากที่สุด จากนั้นทำการอ่านลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ของฟาจที่คัดเลือกได้ แล้วแปลงเป็นลำดับอะมิโน **(ตารางที่ 2)** พบความหลากหลายของเปปไทด์ ทั้งหมด 6 แบบ จากการคัดเลือก 20 โคลน แต่ละแบบมีความสอดคล้องกันของกรดอะมิโนแต่ละตำแหน่ง โดยทั้ง 6 แบบ คิดเป็นสัดส่วน คือ 35, 25, 25, 5, 5 และ 5 เปอร์เซนต์ สามารถประเมินได้เบื้องต้นว่ารูปแบบเปปไทด์ที่มีสัดส่วนมากที่สุด สามารถจับกับ mAb ได้แข็งแรงที่สุด และแสดงความเป็นไปได้ในความสอดคล้องกับรูปแบบเอพิโทปมากที่สุดด้วยเช่นกัน โดยมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็น FEQ สอดคล้องกันมากที่สุด (65 เปอร์เซนต์) รองลงมาคือ Q_L (50 เปอร์เซนต์) และเมื่อนำเปปไทด์ที่มีสัดส่วนสูงที่สุด 3 โคลนมาทดสอบการจับกับ Rabies immunoglobulin (RIG) ด้วยวิธี ELISA พบว่าให้ผลบวกทั้งหมด จากผลการทดลองสรุปได้ว่า หากมี mAb ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการติดเชื้อพิษสุนัขบ้า เราสามารถใช้เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ในการประเมินตำแหน่งเอพิโทปที่จำเพาะต่อ mAb นั้น และสามารถนำ Mimotope peptide มาพัฒนาใช้ในการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าในผู้ได้รับวัคซีน หรือต่อยอดสู่การพัฒนาเป็นวัคซีนที่ระบุเอพิโทปได้ในอนาคต

การหาตำแหน่งเอพิโทปด้วยการคัดเลือกฟาจเปปไทด์ จาก Phage display random-peptide library มีข้อได้เปรียบวิธีการอื่นหลายประการคือ เป็นวิธีการที่สิ้นเปลืองเวลาน้อยกว่าในกระบวนการทำต่อครั้ง ประหยัดงบประมาณในการทำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นซึ่งต้องใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ ที่มีความสลับซับซ้อน นอกจากนี้ยังสิ้นเปลืองแรงงานน้อยกว่า (Molek and Bratkovic , 2016) จากผลการศึกษาหลายงานวิจัยทั้งที่กล่าวถึงในที่นี้หรืองานวิจัยอื่น ๆ สามารถสรุปได้ว่า เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์สามารถนำมาใช้ผลิต Mimotope peptide ที่มีศักยภาพทางการแพทย์ ทั้งในด้านการผลิตเป็นชีววัตถุสำหรับฉีดให้

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเปปไทด์ของโคลนที่จำเพาะต่อฟาจ และการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่สอดคล้องกัน โดยใช้ Anti-G mAb เป็นตัวคัดเลือก

Clone	Consensus sequence	% of sequences
1	I P W T M A **F E** E F I R	5
2	N A W A E Y **F E Q** W V K	35
3	N A W A E Y **F E Q** L V K	5
4	W T G R L L **F E Q** Y **L** T	25
5	Y D L S T W S Q W Q I **L**	25
6	H V E R W Y I R T Y T G	5

การบำบัดรักษาโรคมะเร็ง การนำมาใช้ในงานตรวจวินิจฉัย หรือนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนที่ระบุเอพิโทปตัวใหม่สำหรับป้องกันโรค ทั้งโรคติดเชื้อโปรโตซัว เชื้อรา และไวรัส

เอกสารอ้างอิง

Gazarian, K., Gazarian, T., Betancourt, J. I. S., Morales, R. A. A. 2011. Immunogenic peptides from phage display libraries with potential of protecting mice against the Pseudorabies virus. Vet. Microbiol. 154, 29–36.

Gershoni, J. M., Roitburd-Berman, A., Simon-Tov, D. D., Freund, N. T., Weiss, Y. 2007. Epitope mapping the first step in developing epitope-based vaccines. Biodrugs 21(3), 145-156.

He, Y., Wang, Y., Struble, E. B., Zhang, P., Chowdhury, S., Reed, J. L., Kennedy, M., Scott, D. E., Fisher, R. W. 2012. Epitope mapping by random peptide phage display reveals essential residues for vaccinia extracellular enveloped virion spread. Virol. J. 9 (217).

Hess, K. L., Jewell, C. M. 2020. Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. Bioeng. Transl. Med. 5, e10142.

Li, P. C., Liao, M. Y., Cheng, P. C., Liang, J. J., Liu, I. J., Chiu, C. Y., Lin, Y. L., Chang, G. J., Wu, H. C. 2012. Development of a humanized antibody with high therapeutic potential against dengue virus type 2. PLoS Negl. Trop. Dis. 6(5), e1636.

Ma, J., Wei, Y., Zhang, L., Wang, X., Yao, D., Liu, D., Liu, W., Yu, S., Yu, Y., Wu, Z., Yu, L., Zhu, Z., Cui, Y. 2018. Identification of a novel linear B-cell epitope as a vaccine candidate in the N2N3 subdomain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A. J. Med. Microbiol. 67, 423–431.

Molek, P., Bratkovic, T. 2016. Epitope mapping of mono- and polyclonal antibodies by screening phage-displayed random peptide libraries. Acta Chim. Slov. 63, 914-919.

Pande, J., Szewczyk, M. M., Grover, A. K. 2010. Phage display: Concept, innovations, applications and future. Biotech nol. Adv. 28, 849-858.

Shi, W., Zhao, L., Li, S., Xu, G., Zeng, Y. 2018. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection by using the mimic epitopes. World J. Microbiol. Biotechnol. 34 (82).

Shi, H., Dong, S., Zhang, X., Chen, X., Gao, X., Wang, L. 2018. Phage vaccines displaying YGKDVKDLFDYAQE epitope induce protection against systemic candidiasis in mouse model. Vaccine 36, 5717–5724.

Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 228(4705), 1315–1317.

The Editors of Encyclopaedia Britannica. 2023. Bacteriophage. สืบค้น 29 กันยายน 2566, https://www.britannica.com/science/bacteriophage.

Van Nieuwenhove, L. C., Roge, S., Balharbi, F, Dieltjens, T., Laurent, T., Guisez, Y., Buscher, P., Lejon, V. 2011. Identification of Peptide Mimotopes of *Trypanosoma brucei* gambiense Variant Surface Glycoproteins. PLoS Negl. Trop. Dis. 5(6), e1189.