Research Articles

Optimized inactivation of avian influenza subtype H5N1 for polyclonal antibodies production in rabbit.

Kanaporn Poltep[1] Wongsakorn Wongwadhunyoo[1] Sirikron Pamonsupornvichit[1] Natthaphat Ketchim[1] Nattaran Chaisilp[1] Phirom Prompiram[1*]

[1]The Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Disease in Wildlife and Exotic Animals, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University

[*]Corresponding author, E-mail address: phirom.prm@mahidol.ac.th

Abstract

Polyclonal antibodies were produced by immunization of rabbit with inactivated avian influenza subtype H5N1, isolated in Thailand in 2004, combined with *Freund's* or Alum adjuvant. Polyclonal antibodies from rabbit inhibited hemagglutination activity of H5N1 virus. Rabbit immunized by using 10% formalin inactivated virus emulsify with *Freund's* adjuvant showed strong immune response to the virus and the highest antibody titer was 1:320.

Keywords: Adjuvant, Avian influenza, Inactivated, Polyclonal antibody

การทำให้เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 หมดฤทธิ์ก่อโรคอย่างเหมาะสมเพื่อสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย

คณาภรณ์ พลเทพ[1] วงศกร ว่องวทัญญู[1] สิริกร ภมรสุพรวิชิต[1] นัทธภัทร เกตุฉิม[1]
ณัฐรันทร์ ไชยศิลป์[1] ภิรมย์ พรมพิราม[1*]

[1]ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่นและสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยามหิดล

[*]ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: phirom.prm@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่แยกเชื้อได้ภายในประเทศ ในปี พ.ศ 2547 เมื่อทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคแล้ว ฉีดกระตุ้นร่วมกับตัวเสริมชนิด *Freund's* หรือ Alum ในกระต่ายเพื่อสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ได้ จากกระต่ายที่ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อไวรัสที่ทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยวิธีฟอร์มาลินร้อยละ 10 ร่วมกับตัวเสริมชนิด *Freund's* พบค่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมากที่สุดและมีระดับภูมิคุ้มกันสูงสุดที่ระดับ 1:320

คำสำคัญ : โพลีโคลนอลแอนติบอดี ไวรัสไข้หวัดนก ตัวเสริม หมดฤทธิ์การก่อโรค

บทนำ

โพลีโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของแอนติบอดีที่มีความหลากหลายในการจับกับส่วนต่างๆ ของแอนติเจน โมเลกุลของโพลีโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลมีโครงสร้างบริเวณที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ (variable region) แตกต่างกัน จึงทำให้ความเฉพาะเจาะจง (specificity) และความสามารถในการจับ (affinity) กับแอนติเจนด้วยความแรงที่แตกต่างกัน ความแรงในการจับสูงเนื่องจากสามารถจับกับโมเลกุลของแอนติเจนได้หลายส่วนจึงมีความไว (sensitivity) เพิ่มขึ้น โพลีโคลนอลแอนติบอดีมีความสำคัญในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพหลายด้านทั้งการวิจัยพื้นฐานและการวิจัยประยุกต์ด้านต่าง ๆ ได้แก่ การศึกษาการทำงานของยีน โปรตีน หรือศึกษากลไกการทำงานของเซลล์และงานตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ เช่น เทคนิค western blot analysis เทคนิค enzyme-linked immunoabsorbent assays (ELISA) เทคนิคโครมาโตกราฟแบบจำเพาะ (affinity chromatography) การตกตะกอนโปรตีน รวมทั้งใช้ในการรักษา โดยการยับยั้งการก่อโรคของเชื้อโรค หรือสารพิษ (neutralization activity) (Kendall, 2006) การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีนิยมใช้การฉีดกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลองจำพวกกระต่าย ม้า วัว หรือแพะ โดยส่วนใหญ่โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มักเป็นพวกอิมมูโนโกลบูลินจี (Immunoglobulin G; IgG) ซึ่งพบได้ส่วนใหญ่ในซีรั่มสัตว์ โดยฉีดแอนติเจนร่วมกับตัวเสริม (adjuvants) ช่วยเพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มต่อแอนติเจนนั้น ซึ่งตัวเสริมต้องไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง มีความคงตัว และสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้หลายกลไก เนื่องจากเมื่อแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายจะถูกตรวจจับบริเวณที่ฉีดกระตุ้น ซึ่งตัวเสริมจะทำให้แอนติเจนสามารถกระตุ้นการตอบสนองต่อเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันจึงเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า และยังทำให้แอนติเจนอยู่ในร่างกายได้นานขึ้น (Beck et al., 2003; Harold et al., 2005; Vogel and Hem et al., 2008)

เชื้อไวรัสไข้หวัดนก (Avian Influenza) ชนิด H5N1 ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Orthomyxoviridae กลุ่มเชื้อไข้หวัดใหญ่ (Influenza) ชนิด A เนื่องจากคุณสมบัติของนิวคลีโอโปรตีน (Nucleoprotein, NP) โปรตีนเมตริกซ์ (Maxtric protein, M1) ซึ่งเป็นโปรตีนแอนติเจนภายใน (internal protein antigens) และไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ชนิดฮีแมกกูตินิน (Hemagglutinin, HA) ชนิด H5 และเอนไซม์นิวรามินิเดส (Neuraminidase, NA) ชนิด N1 (ภาวพันธ์ และประเสริฐ, 2549)

เชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1 ก่อพยาธิสภาพรุนแรง มีอัตราการป่วยและตายสูง ติดต่อได้ทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก ทั้งยังสามารถแพร่ระบาดโรคมายังมนุษย์ได้ ในปัจจุบันแม้ว่าจะมีทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีเพื่อจำหน่ายหลากหลายบริษัท ทั้งที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสหรือจำเพาะต่อโปรตีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนก อย่างไรก็ตามความจำเพาะและคุณสมบัติของแอนติบอดีเหล่านั้นอาจมีความแตกต่างจากแอนติบอดีที่ได้จากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกซึ่งแพร่กระจายตามสภาพภูมิศาสตร์ ดังนั้นการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1 ที่ระบาดในประเทศ ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดนกที่แพร่ระบาดประจำถิ่น การศึกษานี้เพื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำให้เชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1 หมดฤทธิ์การก่อโรค และศึกษาความแตกต่างของตัวเสริมในการกระตุ้นการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง แล้วทวนสอบคุณสมบัติและความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ เพื่อใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสและแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1

วิธีการทดลอง

การเตรียมเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิดก่อโรครุนแรง HPAI H5N1 clade 1 A/chicken/Thailand/vsmu-3-BKK/2004 ถูกนำมาทดสอบการทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยการเติมฟอร์มาลินร้อยละ 10 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลาแตกต่างกัน ได้แก่ 30,60,120 นาที, 6 ชั่วโมง หรือ 18 ชั่วโมง และการทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาแตกต่างกัน ได้แก่

30,45 หรือ 60 นาที จากนั้นทดสอบความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells (MDCK) จากนั้นสังเกตพยาธิสภาพกับเซลล์ หรือ Cytopathogenic effect (CPE) และคุณสมบัติของโปรตีนฮีแมกกูตินิน โดยการทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (OIE, 2012; WHO, 2011) ดังนี้ เจือจางเชื้อไวรัสที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคแบบ 2 เท่า (two-fold serial dilution) แล้วเติมเม็ดเลือดแดงห่านเข้มข้นร้อยละ 0.5 จากนั้นบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที อ่านค่าความเข้มข้นของเชื้อไวรัสจากหลุมสุดท้ายที่เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงห่าน อ่านค่าเป็น Hemagglutinating Units (HAU)

การฉีดกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันในกระต่าย โดยใช้กระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White) เพศเมีย จำนวน 3 ตัว อายุประมาณ 3 เดือน จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ นำมาเลี้ยงภายในห้องสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทย-ศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เจือจางเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้น 16 HAU จากนั้นนำเชื้อไวรัสที่ได้ผสมกับตัวเสริมชนิด *Freund's* (Pierce, USA, Cat. 77140 and 77145) หรือตัวเสริมชนิด Alum (Thermo Scientific, USA, Cat. 77161) ในอัตราส่วนตัวเสริมและเชื้อไวรัส 1:1 จึงฉีดกระตุ้นทางชั้นใต้ผิวหนัง จุดละ 0.1 มล. รวม 1.2 มล. จำนวน 3 ครั้ง ระยะเวลาห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ (Greenfield, 2014) โดยในกระต่ายตัวที่ 1 และ 2 ฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยฟอร์มาลินร่วมกับตัวเสริมต่างชนิดกัน คือ ตัวเสริมชนิด *Freund's* หรือตัวเสริมชนิด Alum ตามลำดับ ส่วนกระต่ายตัวที่ 3 ฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสถูกทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสร่วมกับตัวเสริมชนิด *Freund's* เจาะเลือดกระต่าย 0.3 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 1,500 รอบ นาน 10 นาที เก็บซีรั่มที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสทุก 2 อาทิตย์ด้วยปฏิกิริยายับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination Inhibition Test, HI) ต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนก เมื่อระดับแอนติบอดีสูงจึงเก็บซีรั่มครั้งสุดท้ายในปริมาณมากที่สุด และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อทำลายสารคอมพลีเมนต์ (complement) ต่างๆในซีรั่ม จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟแบบจำเพาะโดยใช้ HiTrap™ Protein A (Amersham phamacia biotech, Sweden)

การทดสอบระดับภูมิคุ้มกันด้วยปฏิกิริยายับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (OIE, 2012; WHO, 2011) มีขั้นตอน ดังนี้ เริ่มต้นด้วยกำจัดสารยับยั้งปฏิกริยาแบบไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific inhibitor) ด้วย Receptor Destroying Enzyme (RDE) จากนั้นทำให้หมดฤทธิ์ด้วยอุณหภูมิที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กำจัดสารเกาะกลุ่มแบบไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific agglutinator) ด้วยเม็ดเลือดแดงห่านเข้มข้นร้อยละ 50 จากนั้นเจือจางซีรั่มแบบ 2 เท่า (two-fold serial dilution) แล้วเติมเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1 ที่ความเข้มข้น 4 HAU แล้วนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เมื่อครบเวลาจึงเติมเม็ดเลือดแดงห่านเข้มข้นร้อยละ 0.5 จากนั้นบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที สุดท้ายอ่านค่าระดับแอนติบอดี (antibody titer) จากหลุมสุดท้ายของซีรั่มตัวอย่างทดสอบที่เกิดการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงห่าน

ผลการทดลอง

การเตรียมเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1 ที่ความเข้มข้น 256 HAU ถูกทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยการเติมฟอร์มาลินหรือความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส พบผลการทดสอบการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยสังเกตพยาธิสภาพกับเซลล์ และคุณสมบัติของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของไวรัสจากค่า HAU ดังตารางที่ 1

พบเชื้อไวรัสที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยการเติมฟอร์มาลินร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง มีค่า HAU สูงที่สุด และยังไม่พบพยาธิสภาพกับเซลล์เมื่อทดสอบด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง และเชื้อไวรัสที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีก็ไม่พบพยาธิสภาพกับเซลล์เช่นกัน แต่มีค่า HAU รองลงมา

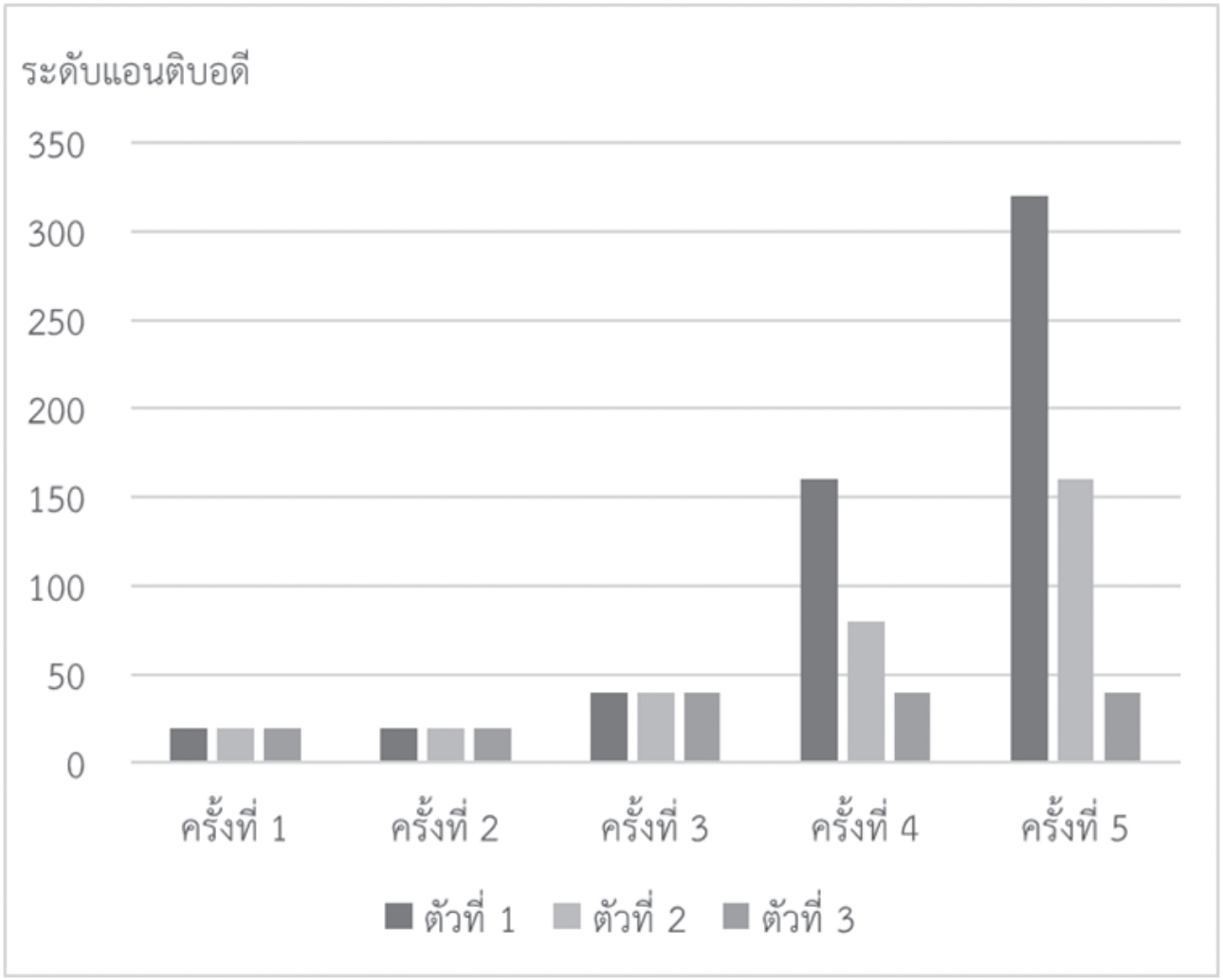
ผลการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย ภายหลังจากฉีดไป 3 ครั้ง หรือ 6 สัปดาห์ พบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1 เพียง 1:40 ทั้งในเชื้อไวรัสที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยการเติมฟอร์มาลินและความร้อน (ดังรูปที่ 1) ซึ่งผลการฉีดกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีในกระต่ายอยู่ในระดับต่ำ โดยค่าระดับแอนติบอดีในครั้ง 1 ถึงครั้งที่ 3 ไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 1 จึงเพิ่มจำนวนครั้งของการฉีดกระตุ้นรวมฉีดกระตุ้นทั้งสิ้น 5 ครั้ง เมื่อทดสอบระดับภูมิคุ้มกันด้วยปฏิกิริยายับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงต่อเชื้อไวรัส พบระดับแอนติบอดีในกระต่ายตัวที่ 1 มีค่ามากที่สุด คือ 1:320 ส่วนกระต่ายตัวที่ 2 มีค่าน้อยกว่าเพียง 1 ระดับการเจือจาง แต่พบรอยแผลเป็นตุ่มหนองน้อยกว่า ส่วนกระต่ายตัวที่ 3 พบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดี ซึ่งยังคงมีค่าน้อยที่สุด คือ 1:40 ดังรูปที่ 1

สุดท้ายจึงเลือกเก็บซีรั่มครั้งสุดท้ายในกระต่ายตัวที่ 1 และ 2 และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiTrap™ Protein A จากนั้นนำไปประยุกต์ใช้เป็นชุดควบคุมบวกในการตรวจหาระดับของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ผลการทวนสอบระดับแอนติบอดีทั้ง 3 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 0.00 ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานเท่ากับ 0.00 ความผิดพลาดเท่ากับ 0.00 ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 เท่ากับ 0.00 พบค่าระดับแอนติบอดีเท่ากับ 1:320 และ 1:160 ในกระต่ายตัวที่ 1 และตัวที่ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 การทดสอบการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงและคุณสมบัติของโปรตีนฮีแมกกูตินินจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ซึ่งทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยการเติมฟอร์มาลินหรือความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

การทำให้หมดฤทธิ์	ระยะเวลาการบ่ม	พยาธิสภาพกับเซลล์	HAU*
ฟอร์มาลินร้อยละ 10 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	นาน 30 นาที	ไม่พบ	0
ฟอร์มาลินร้อยละ 10 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	นาน 30 นาที	พบ	-
	นาน 60 นาที	พบ	-
	นาน 120 นาที	พบ	-
	นาน 6 ชั่วโมง	พบ	-
	นาน 18 ชั่วโมง	ไม่พบ	32
อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส	นาน 30 นาที	ไม่พบ	16
	นาน 45 นาที	ไม่พบ	4
	นาน 60 นาที	ไม่พบ	0

*HAU คือ Hemagglutinating Units



รูปที่ 1 ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1 ในกระต่ายที่ถูกฉีดกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในแต่ละครั้ง

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทำให้เชื้อจุลินทรีย์หมดฤทธิ์การก่อโรคพบในกระบวนการผลิตวัตซีนหลายโรค เช่น วัคซีนพิษสุนัขบ้า วัคซีนไวรัสตับอักเสบเอ วัคซีนโรคไข้สมองอักเสบเจอี และวัคซีนไวรัสไข้หวัดใหญ่ การทำให้เชื้อจุลินทรีย์หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยความร้อนพบในการผลิตวัคซีนไวรัสตับอักเสบบี หรือวัคซีนจากเชื้อแบคทีเรีย โดยในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส และเลือกใช้ฟอร์มาลินซึ่งเป็นสารเคมีราคาถูกและพบในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป ในการศึกษาเชื้อไวรัสถูกทำให้หมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยการเติมฟอร์มาลินหรือความร้อน เมื่อทดสอบการติดเชื้อไม่พบพยาธิสภาพกับเซลล์และไม่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง แต่ยังคงคุณสมบัติของโปรตีนฮีแมกกูตินินและสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสได้ (Haredy et al., 2013; Fan et al., 2015) ถึงแม้การทำให้เชื้อไวรัสหมดฤทธิ์การก่อโรคด้วยการเติมฟอร์มาลินอาจจะทำให้ลักษณะโปรตีนฮีแมกกูตินินซึ่งมีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มเป็นร่างแหเสียสภาพไป แต่จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ฟอร์มาลินความเข้มข้นต่ำและบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสยังคงรักษาคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของโปรตีนฮีแมกกูตินินของเชื้อไวรัสได้ดีกว่าวิธีการใช้ระดับความร้อนที่สูงกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Shin และคณะ (2007)

สัตว์ทดลองที่ใช้สำหรับการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีมีหลากหลายชนิด แต่ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้กระต่ายเนื่องจากมีขนาดเหมาะสมเพื่อได้ปริมาณเลือดเพียงพอต่อการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ตระกูลหนูที่สามารถเจาะเก็บเลือดได้ปริมาณน้อย และการใช้กระต่ายสามารถดูแลจัดการได้ง่ายเมื่อเทียบกับสัตว์ที่มีขนาดใหญ่จำพวกแกะหรือสุกร นอกจากนี้ยังได้ระดับแอนติบอดีและความจำเพาะในเกณฑ์สูง รวมทั้งชนิดของอิมมูโนโกลบูลินจีของกระต่ายมีเพียงชนิดเดียว ไม่มีกลุ่มย่อย (subclass) จึงสะดวกต่อการนำไปทำให้บริสุทธิ์ (Hanly et al., 1995)

ตัวเสริมในเริ่มแรกใช้ชนิด *Freund's* ต่อมามีการพัฒนาหลากหลายชนิด เช่น สารประกอบอะลูมิเนียม (Aluminum compound) กลุ่ม Monophosphoryl lipid A (MPL®) สารประกอบจำพวก lipopolysaccharide สารประกอบเชิงซ้อนซึ่งกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immune-stimulating Complexes; ISCOMs) และ ตัวเสริมชนิด TiterMax (Villarreal-Ramos et al., 2000; Rajput et al., 2007; อังคณา, 2008) ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ตัวเสริมชนิด *Freund's* และตัวเสริมชนิด Alum ซึ่งใช้โดยทั่วไปและมีราคาถูก โดยตัวเสริมชนิด *Freund's* เป็นสารละลายในรูปแบบอิมัลชัน (emulsion) ชนิดน้ำมันในน้ำ เกิดเป็นอนุภาคขนาดเล็ก (microparticle) ซึ่งเมื่อฉีดจึงเกิดเป็นแอ่ง (depot) ทำให้ปลดปล่อยแอนติเจนออกมาอย่างช้า ๆ และต่อเนื่อง มีส่วนช่วยให้แอนติเจนอยู่ในร่างกายได้นานขึ้น (persistence of antigen) โดยไม่ถูกทำลายโดยเซลล์ macrophage เพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการใช้แอนติเจนเพียงอย่างเดียว ช่วยพาแอนติเจนไปยังระบบน้ำเหลืองซึ่งมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และยังใช้ปริมาณแอนติเจนลดลง (MacLean et al., 2001) นอกจากนี้มีส่วนประกอบของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยการกระตุ้นให้สร้างอินเตอร์เฟียรอนชนิดแกรมม่า (Interferon-gamma) และการอักเสบผ่านทางเซลล์ (delayed-type hypersensitivity) โดยจะกระตุ้นการตอบสนองเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T helper 1 และ 2 (Th1 และ Th2) ซึ่งไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทำลายเซลล์ (cytotoxic-T lymphocyte) การสร้างแอนติบอดี การนำเสนอแอนติเจนต่อกลุ่มเซลล์รูปดาว (dendritic cell) และกลุ่มเซลล์ macrophage ส่วนตัวเสริมชนิด Alum คือ สารประกอบอะลูมิเนียม ประกอบด้วย Aluminum hydroxide; $Al(OH)_3$ และ Magnesium hydroxide; $Mg(OH)_2$ ซึ่งส่งเสริมการนำเสนอแอนติเจนและชะลอการปลดปล่อยแอนติเจน (depot mechanism) ทำให้เกิดการอักเสบเฉพาะที่และกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Th2 เท่านั้น จึงกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทำลายเซลล์ (Brewer et al., 1996; Ciarlet et al., 1998; Gottwein et al., 2001; Tovey and Lallemand, 2010; Behr and Divangahi, 2015) ซึ่งผลการศึกษากระต่ายตัวที่ 2 มีระดับแอนติบอดีน้อยกว่ากระต่ายตัวที่ 1 คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Hui และคณะ (1991) Jiao และคณะ (2010) และ Luo และคณะ (2012) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวเสริม พบการใช้ตัวเสริมชนิด *Freund's* มีการกระตุ้นของระดับแอนติบอดีได้ดีกว่าเมื่อเปรียบกับตัวเสริมชนิด Alum แต่อย่างไรก็ตามตัวเสริมชนิด *Freund's* ทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรัง (granuloma inflammation) เกิดการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ (necrosis) ทำให้เกิดความเจ็บปวดแก่สัตว์ (Broderson, 1989; Batista-Duharte et al., 2011) ซึ่งในกระต่ายที่ได้รับตัวเสริมชนิด Alum เกิดรอยแผลเป็นตุ่มหนองน้อยกว่าการฉีดกระตุ้นเมื่อใช้ตัวเสริมชนิด *Freund's*

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีแม้ว่าจะมีข้อจำกัดหลายด้าน เช่น การใช้สัตว์ทดลองในกระบวนการผลิตจึงอาจทำให้คุณภาพในการผลิตไม่แน่นอน (batch to batch variation) (Athmaram et al., 2014) แต่อย่างไรก็ตามโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้เป็นชุดควบคุมบวกสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและการตรวจระบุชนิด (typing) เชื้อไวรัสไข้หวัดนกด้วยปฏิกิริยายับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นเครื่องมือการตรวจจำแนกชนิดฮีแมกกลูตินินชนิด H5 เพื่อเพิ่มศักยภาพในการศึกษาวิจัยเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1 รวมทั้งงานบริการวิชาการในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ภาวพันธ์ ภัทรโกศล และ ประเสริฐ เอื้อวรากุล. 2549. ไวรัสไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนก, น. 13-25. ใน ภาวพันธ์ ภัทรโกศล และประเสริฐ เอื้อวรากุล, บรรณาธิการ. ไข้หวัดใหญ่/ไข้หวัดนก. สมาคมไวรัสวิทยา, กรุงเทพฯ.

อังคณา ตันติธุวานนท์. ระบบนำส่งวัคซีน. J Health Res. 2551; 22(3): 151-9.

Athmaram TN, Saraswat S, Sikarwar B, Verma SK, Singh AK, Boopathi M.. Characterization of pandemic influenza A (H1N1) virus hemagglutinin specific polyclonal antibodies for biosensor applications. J Med Virol 2014; 86: 363-71.

Batista-Duharte A, Lindblad EB, Oviedo-Orta E. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. Toxicol Lett 2011; 203: 97-105.

Beck I, Gerlach H, Burkhardt E. Kaleta EF. Investigation of several selected adjuvants regarding their efficacy and side effects for the production of a vaccine for parakeets to prevent a disease caused by a paramyxovirus type 3. Vaccine. 2003; 21: 1006-22.

Behr MA, Divangahi M. Freund's adjuvant, NOD2 and mycobacteria. Curr Opin Microbiol. 2015; 23: 126-32.

Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. Eur J Immunol. 1996; 26: 2062-6.

Broderson JR. A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. Lab Anim Sci. 1989; 39: 400-5.

Ciarlet M, Crawford SE, Barone C, Bertolotti-Ciarlet A, Ramig RF, Estes MK., Conner ME. Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity. J Virol. 1998; 72: 9233-46.

Greenfield EA. "Chapter 6 Immunizing Animals" In: Antibodies: A Laboratory Manual. Greenfield EA. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2014. 159-160

Fan YC, Chiu HC, Chen LK, Chang GJ, Chiou SS. Formalin Inactivation of Japanese Encephalitis Virus Vaccine Alters the Antigenicity and Immunogenicity of a Neutralization Epitope in Envelope Protein Domain III. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9: e0004167.

Gottwein JM, Blanchard TG, Targoni OS, Eisenberg JC, Zagorski BM, Redline RW, Nedrud JG, Tary-Lehmann M, Lehmann PV, Czinn SJ. Protective anti-Helicobacter immunity is induced with aluminum hydroxide or complete Freund's adjuvant by systemic immunization. J Infect Dis. 2001; 184: 308-14.

Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. ILAR J. 1995; 37: 93-118.

Haredy AM, Takenaka N, Yamada H, Sakoda Y, Okamatsu M, Yamamoto N, Omasa T, Ohtake H, Mori Y, Kida H, Yamanishi K, Okamoto S. An MDCK cell culture-derived formalin-inactivated influenza virus whole-virion vaccine from an influenza virus library confers cross-protective immunity by intranasal administration in mice. Clin Vaccine Immunol. 2013; 20: 998-1007.

Harold F, Stils J. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. ILAR J. 2005; 46: 280-93.

Hui GS, Tam LQ, Chang SP, Case SE, Hashiro C, Siddiqui WA, Shiba T, Kusumoto S, Kotani S. Synthetic low-toxicity muramyl dipeptide and monophosphoryl lipid A replace Freund complete adjuvant in inducing growth-inhibitory antibodies to the Plasmodium falciparum major merozoite surface protein, gp195. Infect Immun. 1991; 59: 1585-91.

Jiao XD, Cheng S, Hu YH, Sun L. Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen. Vaccine. 2010; 28: 1832-7.

Kendall LV. "Chapter 4. Production of Polyclonal Antibodies" In: Making and Using Antibodies A Practical Handbook. Howard GC and Kaser MR., CRC Press, New York 2006. 41

Luo Z, Shi H, Zhang H, Li M, Zhao Y, Zhang J, Guo F, Luo S, Sun P, Zhang D, Qian Z, Yang L. Plasmid DNA containing multiple CpG motifs triggers a strong immune response to hepatitis B surface antigen when combined with incomplete Freund's adjuvant but not aluminum hydroxide. Mol Med Rep. 2012; 6: 1309-14.

MacLean DS, Robertson JD, Jay M. Monitoring the retention of a protein antigen in complete Freund's adjuvant, alum, and pluronic F-127 gel formulations by X-ray fluorescence. Pharm Dev Technol. 2001; 6: 241-6.

OIE. Chapter 2.3.4. "Avian Influenza." In: OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2012 [Online]. Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf, Paris: OIE. Accessed November 25, 2012.

Rajput ZI, Hu SH, Xiao CW, Arijo AG. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. J Zhejiang Univ Sci B. 2007; 8: 153-61.

Shin JH, Sakoda Y, Kim JH, Ochiai K, Umemura T Comparison of antibody titers in rabbits following immunization with inactivated influenza virus via subarachnoidal or subcutaneous route. J Vet Med Sci. 2007; 69: 1167-9.

Tovey MG, Lallemand C. Adjuvant activity of cytokines. Methods Mol Biol. 2010; 626: 287-309.

Villarreal-Ramos B, Manser JM, Collins RA, Dougan G, Howard CJ. Cattle immune responses to tetanus toxoid elicited by recombinant S. typhimurium vaccines or tetanus toxoid in alum or Freund's adjuvant. Vaccine. 2000; 18: 1515-21.

Vogel FR, Hem SL. Immunologic adjuvants. In; Plotkin, S.A., Orenstein, W.A., Offit, P.A., editors. Vaccines. 5th ed. New York: Elsevier; 2008. 59-71.

WHO. Manual for the Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza. [Online]. Available: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/index.html. Accessed March 25, 2011.