

การจำแนกคุณลักษณะเชื้อวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์

นพคุณ มูลสิน¹

คณิตา ภาสะฐิติ¹

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสืบค้นประวัติต้นตอวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ ทำการจำแนกและตรวจสอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ โดยศึกษาขนาดและรูปร่างจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics data) สร้างแบบจำลองโครงสร้างโปรตีนสามมิติโดยวิธี homology modeling และเสนอการเรียกชื่อสายพันธุ์ตามระบบสากล ผลการศึกษาพบว่าต้นตอและวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ที่กรมปศุสัตว์ผลิตเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นมีการวิจัยและพัฒนายาวนานกว่า 60 ปี มีขนาดอนุภาคไวรัส 60-80 nm. รูปร่างลักษณะกลม มีความบริสุทธิ์สูง พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่สายพันธุ์ LSD/051 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 87.76 % และมีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน 85.69 % โดยที่กรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งที่จดจำและถูกตัดด้วยเอนไซม์โฮสต์ประกอบด้วยอาร์จินีน-อาร์จินีน-เซอรีน-อาร์จินีน-อาร์จินีน จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างขึ้นด้วยวิธี neighbor joining และ maximum likelihood แสดงให้เห็นเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ของกรมปศุสัตว์จำแนกอยู่ใน จีโนไทป์ 1 ลำดับเชื้อสายที่ 25 อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษารายละเอียดทางพันธุกรรมจากยีนทั้งหมดเพื่อยืนยันอีกครั้ง จากโครงสร้างสามมิติของโปรตีน spike พบว่ากรดอะมิโนบริเวณ N-terminal domain ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการจับกับเนื้อเยื่อทางเดินหายใจมีความเหมือนกันระหว่างวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ของกรมปศุสัตว์กับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่สายพันธุ์ H120 และ M41

โดยสรุปจากประวัติต้นตอไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ที่ใช้ผลิตวัคซีนกรมปศุสัตว์พบว่าเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ท้องถิ่นและได้ทำการจำแนกตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆพบขนาด 60-80 nm. จากข้อมูลชีวสารสนเทศจัดจำแนกอยู่ใน จีโนไทป์ 1 ลำดับเชื้อสายที่ 25 ซึ่งมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่สายพันธุ์ LSD/051 และจากโครงสร้างโปรตีน S1 มีความคล้ายกับไวรัส สายพันธุ์ H120 และ M41 โดยระบบสากลควรใช้ชื่อ IBV DLD strain (TH/GI-25, DLD/S/54)

คำสำคัญ: ประวัติต้นตอวัคซีน วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
แบบจำลองโครงสร้างโปรตีนสามมิติ

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่เป็นโรคติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจส่วนต้น พบได้ในไก่ทุกอายุ เป็นโรคติดต่อที่สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ทั่วโลก มีสาเหตุจากเชื้อ Infectious bronchitis virus (IBV) ซึ่งรายงานครั้งแรกในรัฐนอร์ทดาโกตา สหรัฐอเมริกา ปี 1931 (Schalk and Hawn, 1931) ในไก่อายุ 2 วันถึง 3 สัปดาห์ พบการตาย 40-90% การติดต่อโรคนี้อาจเกิดจากการสัมผัสไก่ป่วย (Direct contact) หรือ พาหะที่มีเชื้อไวรัสปนมากับอาหาร น้ำ สิ่งรองนอน มูลไก่ หรือเกิดจากคนเป็นผู้นำโรคเข้าฟาร์ม (Indirect contact) ไวรัสสามารถแพร่กระจายติดต่อไปในอากาศ (Airborne transmission) (OIE, 2018) ไก่ทั่วไปที่ป่วยจะแสดงอาการน้ำมูกน้ำตาไหล อ้าปากหายใจ จาม ในไก่ไข่เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในท่อไข่ (oviduct) ส่งผลให้ผลผลิตไข่ลดลง เปลือกไข่มีสีซีด ฟองไข่มีลักษณะผิดปกติ และไข่ขาวเหลว นอกจากนี้เชื้อบางสายพันธุ์ (Nephropathogenic strain) เพิ่มจำนวนในไตทำให้เกิดโรคไตและไตอักเสบ (interstitial nephritis) มีการค้นพบยูเรตในท่อไต ในไก่ป่วยหากไก่ที่มีการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย อีโคไลและเชื้อมัยโคพลาสมา จะทำให้อัตราการป่วยตายสูงเพิ่มมากขึ้น (Jackwood, 2012)

ในประเทศไทยได้มีการรายงานการระบาดของเชื้อ IBV ครั้งแรกในปีค.ศ. 1954 (Chindavanig, 1962) ณ ปัจจุบันยังพบการแพร่ระบาดของโรคทุกพื้นที่ของประเทศซึ่ง IBV นี้มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากไวรัสเดิมจัดเป็น new variant (Pohuang *et al.*, 2011; Munyahongse *et al.*, 2020) IBV เป็น coronavirus ชนิดแรกที่มนุษย์ค้นพบก่อนที่จะมีการประดิษฐ์กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จัดอยู่ใน Family Coronaviridae, Genus Gamma coronavirus, Species Avian coronavirus เดิมตลอด 50 ปีที่มีการค้นพบ IBV เชื่อว่า gamma coronavirus มีสมาชิกเพียงชนิดเดียวคือ IBV ซึ่งพบไวรัสเฉพาะในไก่เท่านั้น แต่ปัจจุบันได้พบ gamma coronavirus ในสัตว์ปีกอื่นที่แยกเชื้อได้จาก นกยูง นกกระทา ไก่วง และนกป่า ที่เรียกว่า IBV-like virus (OIE, 2018) สมาชิกใน genus coronavirus จะมีรูปร่างลักษณะภายนอกที่เหมือนกันเมื่อส่องขยายโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบอนุภาคไวรัสขนาดประมาณ 60 ถึง 150 nm มีปุ่มหนามยื่นออกมาเหมือนรัศมีของดวงอาทิตย์ซึ่งภาษาลาตินเรียกว่า corona (Lalchhandama, 2020) เมื่อศึกษาสารพันธุกรรมภายในอนุภาคไวรัส(จีโนม) ซึ่งประกอบด้วยกรดไรโบนิวคลีอิกสายเดี่ยวชนิด positive-sense RNA ขนาดความยาวประมาณ 27.6 Kb ขนาด 2/3 จีโนมบริเวณ 5' ทำหน้าที่สร้างโปรตีน 15 ชนิดสำหรับถอดรหัสและจำลองตัวอนุภาค (nonstructural replicate proteins: nsp2-16) ที่เหลือ 1/3 บริเวณ 3' ของจีโนมไวรัสทำหน้าที่ผลิตโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิดคือ spike glycoprotein(S), envelope glycoprotein(E), membrane glycoprotein(M) และ nucleocapsid protein(N) สำหรับ S protein มีลักษณะเป็นปุ่มหนามอยู่บริเวณเปลือกหุ้มของอนุภาคไวรัสจัดเป็น membrane protein type I (Lontok *et al.*, 2004) ประกอบด้วยโปรตีนสองหน่วยย่อย คือ S1 และ S2 โปรตีนส่วน S1 ทำหน้าที่ในการจับกับตัวรับบนผนังเซลล์ของโฮสต์ (receptor-binding domain) ในส่วน amino-terminal ของ S1 ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่เหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์ให้สร้าง neutralizing antibodies ซึ่งเป็น protective immunity ที่ร่างกายสัตว์สร้างขึ้นใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ IBV และแอนติบอดีนี้อย่างแสดงถึงซีโรไทป์จำเพาะของเชื้อไวรัสอีกด้วย (Cavanagh, 2007)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์(สทช.) กรมปศุสัตว์ได้ผลิตวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ซึ่งเป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็นที่ถูกทำให้อ่อนกำลัง (live attenuated vaccine) โดยผ่านกระบวนการ lyophilization มาเป็นระยะเวลายาวนานกว่า 60 ปีโดยใช้เชื้อ IBV ที่แยกได้จากการระบาดในประเทศสายพันธุ์ท้องถิ่น (Local strain) แต่ไม่ทราบรายละเอียดข้อมูลสายพันธุ์ว่าเป็นวัคซีน strain อะไรในปัจจุบันและประวัติที่มาของเชื้อไวรัสดังกล่าวทำให้ขาดข้อมูลสำคัญในการขึ้นทะเบียนกับทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา(อย.) ในอดีตการจำแนก IBV จะอาศัยวิธีการทาง

ซีรัมวิทยาเช่น haemagglutination inhibition (HI) หรือ Virus neutralization (VN) แต่เนื่องจากการอุบัติขึ้นของเชื้อ IBV ชนิดใหม่อย่างต่อเนื่องจากอดีตจนถึงปัจจุบันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางด้านความเป็นแอนติเจนหรือพันธุกรรมที่เปลี่ยนไปจากไวรัสชนิดเดิมเป็นอย่างมากจากกระบวนการ mutation, insertion หรือ deletion นอกจากนี้ยังเกิดจากกระบวนการ recombination (Valastro *et al.*, 2016) เป็นผลให้เกิดไวรัสที่เรียกว่า new variant type ทำให้การจำแนกสายพันธุ์ IBV โดยวิธี serotyping แทบไม่มีการทำอีกต่อไป (OIE, 2018) ในทางตรงกันข้ามการจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลำดับรหัสพันธุกรรม ในส่วนยีนที่ทำหน้าที่สร้าง S1 protein มีการศึกษาแพร่หลายเนื่องจากทำได้รวดเร็ว ให้ความถูกต้องสามารถเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการต่างๆได้เป็นอย่างดี (Jackwood and De Wit, 2020) ส่วนวิธีเสริมอื่นเช่นการศึกษาไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะใช้จำแนกชนิดไวรัสจากรูปร่างที่แตกต่างกันและสามารถศึกษารายละเอียดโครงสร้างต่างๆที่มีขนาดเล็กบนอนุภาคไวรัส (OIE, 2018)

การศึกษารั้วนี้มีจุดประสงค์ต้องการสืบค้นประวัติต้นตอเชื้อ IBV ที่สห.นำมาใช้ผลิตวัคซีนและต้องการทราบคุณลักษณะต่างๆของเชื้อได้แก่ขนาดและรูปร่าง การนำความรู้ทางชีวสารสนเทศมาวิเคราะห์ลำดับรหัสพันธุกรรมเพื่อจำแนกสายพันธุ์ตลอดจนศึกษาโครงสร้างโปรตีนสามมิติบริเวณปุ่มหนาม (S1) นำเสนอการตั้งชื่อสายพันธุ์วัคซีน ผลที่ได้จากการศึกษารหัสพันธุกรรมบริเวณ S1 ซึ่งมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงทำให้ทราบรายละเอียดสามารถใช้จำแนกสายพันธุ์และสามารถบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อ IBV ที่ใช้ผลิตวัคซีนกับเชื้อที่มีการระบาด รวมถึงใช้เป็นเอกสารทางวิชาการเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนชีววัตถุต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สืบค้นประวัติแหล่งที่มาต้นตอและเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์โดยสืบค้นจากวารสารวิชาการที่เผยแพร่ข้อมูลไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ทั้งในประเทศและต่างประเทศรวมถึงการเข้าถึงข้อมูล Nucleotide และ Protein databases โดยระบุเป็นเลข Accession number สำหรับ Nucleotide (EU589323) และ Protein sequence (ACB87909.1) พร้อมสัมภาษณ์ผู้พัฒนา seed IBV

2. เตรียมตัวอย่างไวรัสต้นตอ (seed virus) เพื่อศึกษารูปร่างและโครงสร้างส่วนหนามหรือ S1 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิสชัน (TEM)¹ ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยใช้ตัวอย่างไวรัสปริมาณ $10^{4.75}$ EID₅₀/ml. ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ml. ต่อกวนนั้นดูด 20 μ l. สารละลายไวรัสหยดลงบน copper grid ซึ่งถักทอเป็นโครงตาข่ายสำหรับรองรับตัวอย่างปล่อยให้ดูดซับตัวอย่างประมาณห้า นาที จากนั้นย้อมตัวอย่างด้วย 2% uranyl acetate ทำการดูดความชื้นด้วยตู้ดูดความชื้นทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นนำตัวอย่างทำการยิงลำอิเล็กตรอนทะลุผ่านตัวอย่างด้วยความต่างศักย์ 120 kV จากนั้นโฟกัสและขยายด้วยเลนส์แม่เหล็กขนาดกำลังขยาย 100,000 – 200,000 เท่า

¹ ยี่ห้อ FEI รุ่น Tecnai G20, Czech Republic

3. การวิเคราะห์ข้อมูลเชื้อ IBV โดยใช้ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics Data)

3.1 จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมข้อมูลชีวสารสนเทศต่างๆ ประกอบด้วยฐานข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิก (DNA) และ mRNA ที่เก็บรักษาและบริหารจัดการโดย National center for biotechnology กระทรวงสาธารณสุข สหรัฐอเมริกา ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ข้อมูลรหัสพันธุกรรมบริเวณ Spike 1 gene ใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Aliment Search Tool) ซึ่งเป็นชุดโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ประกอบไปด้วยตรรกะขั้นตอนวิธีสำหรับเปรียบเทียบความคล้ายกันของ DNA หรือโปรตีนประกอบด้วย

- Blastn เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน S1 เชื้อ IBV ของกรมปศุสัตว์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ IBV สายพันธุ์ต่างๆทั่วโลกที่อยู่ในฐานข้อมูล
- Blastp เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบนโปรตีน S1 เชื้อ IBV ของกรมปศุสัตว์กับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ IBV สายพันธุ์ต่างๆทั่วโลกที่อยู่ในฐานข้อมูล

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนบริเวณ S1 ซึ่งทำหน้าที่สร้างและประกอบเป็นปุ่มหนามของ IBV กรมปศุสัตว์ก่อนการศึกษาในครั้งนี้สห. ได้ศึกษาจากตัวอย่าง seed IBV จำนวน 3 lots ที่เก็บรักษา เปรียบเทียบกับ vaccine IBV จำนวน 3 Batch ที่ผลิตต่อเนื่องกัน โดยเทคนิค RT-PCR, Restriction fragment length polymorphism และ Sanger nucleotide sequencing พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น complete S1 gene ความยาว 1,635 nucleotides มีความเหมือนกันระหว่าง seed และ vaccine 100% แสดงถึงลักษณะที่เรียกว่า genetic stability ซึ่งรายละเอียดไม่ได้นำมาเผยแพร่ในการศึกษานี้โดยที่ข้อมูลได้จากการศึกษาถูกเก็บไว้ที่ GenBank สามารถเข้าถึงได้โดยใช้รหัส Accession number: Nucleotide sequence (EU589323), Protein sequence (ACB87909.1)

3.2. เทียบเรียงข้อมูลรหัสพันธุกรรมข้อมูลนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนโดยเทียบเรียงคู่ลำดับข้อมูลสองเส้น (Pairwise alignment) หรือหลายตัวอย่างข้อมูลในเวลาเดียวกัน (Multiple sequence alignment) โดยทำการเปรียบเทียบความเหมือน (Identity) หรือความคล้าย (Similarity) บริเวณโปรตีน S1 วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่กรมปศุสัตว์กับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่สายพันธุ์วัคซีนที่นิยมใช้กัน ได้แก่ M41, H120, 4/91, QX, Ma5 (ตารางที่ 1) และเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนที่เป็นเชื้ออ้างอิงหรือสายพันธุ์ที่มีความคล้ายของกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม CustalW (Thompson *et al.*, 1994)

3.3. สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้ข้อมูลยีน S1 วัคซีน IBV กรมปศุสัตว์กับเชื้อ Reference IBV strains ซึ่งจำแนกเป็น 6 genotype 32 lineages (ตารางที่ 2) และเชื้อ IBV 7 Thai isolated โดยที่ 4 Isolated (GenBank accession number: Chonburi:MG191016, Phetchabun:MG191018, Prachinburi:MG191020, Saraburi: MG191023) รายงานโดย (Munyahongse *et al.*, 2020) และอีก 3 Isolated (GenBank accession number: THA90151Group1:GQ503617, THA80151Group2:GQ503616, THA241251/Mass:GQ885131) รายงานโดย (Pohuang *et al.*, 2011) นำมาสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA v.6.0 (Tamura *et al.*, 2013) เลือก Neighbor – joining และ Maximum-likelihood method และใช้ General time reversible model ร่วมกับการกระจายข้อมูลแบบ gamma distribution และ invariant site model กำหนดให้ทำการสร้างแผนภูมิโดยการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มด้วยค่า bootstrap value 1000 (nodal support value)

3.4. สร้างและทำนายหน้าที่จากโครงสร้างสามมิติ S1 โดยวิธี homology modeling เริ่มจากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน S1 เชื้อ IBV กรมปศุสัตว์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วใช้ Swiss-Model web server (<http://swissmodel.expasy.org>) ทำการ

3.4.1. ค้นหาและคัดเลือก Template S1 protein ที่มีโครงสร้างสามมิติที่มีรายละเอียดความถูกต้องที่ดีที่สุดซึ่งได้โครงสร้างโปรตีนนี้มาจากการทดลองโดยใช้เทคนิค X-ray crystallography หรือ Cryo-TEM

3.4.2. สร้างแบบจำลองขึ้นมาโดยการทำการ alignment ระหว่าง S1 protein IBV กรณปศุสัตว์ (Query Protein) กับโครงสร้าง Template protein ซึ่งการ alignment นี้จะเป็นการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ Backbone และ side chain และ loop เพื่อนำมาสร้างเป็นแบบจำลองโครงสร้างสามมิติ

3.4.3 ประเมินความถูกต้องโครงสร้างโปรตีนสามมิติที่สร้างขึ้น โดยใช้ค่า Qualitative Model Energy Analysis (QMEAN) Z-Scores และค่า QMEANDisCo (Studer *et al.*, 2020)

4. นำเสนอการตั้งชื่อสายพันธุ์ (strain) เชื้อ IBV กรณปศุสัตว์ที่ใช้ผลิตเป็นวัคซีนตามหลักเกณฑ์การเรียกชื่อสากล (Jackwood and De Wit, 2020)

ผล

1. ประวัติต้นตอวัคซีน IBV (Seed History)

ในช่วงปีค.ศ. 1954 -1955 ได้เกิดการระบาดของโรคในไก่ที่กรุงเทพฯ ในช่วงระบดดังกล่าวได้มีการแยกเชื้อไวรัสหลายครั้งพร้อมสืบหาสาเหตุของโรคพบว่าเกิดจากเชื้อ Infectious bronchitis virus ในการวินิจฉัยยืนยันโรคใช้วิธี Neutralization test ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ Immune serum จากห้องปฏิบัติการ Dr. Salisbury และกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา ขณะนั้นมีการค้นคว้าเอกสารทางวิชาการต่างประเทศ (Review literature) พบว่ามีเอกสารจำนวน 5 ฉบับ (Chindavanig, 1962) ระบุว่ามีความเป็นไปได้ที่จะควบคุมการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่โดยวิธีการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นที่ทำการดัดแปลงคุณสมบัติเชื้อไวรัสที่ก่อโรค จึงเป็นที่มาของการพัฒนาวัคซีนนี้ในประเทศไทยเป็นครั้งแรกโดยทีมวิจัยพัฒนาวัคซีนประกอบด้วยนายสัตวแพทย์ปิยะ ชัยสิทธิ์ยุทธพันธ์ นายสัตวแพทย์ พอ จินดาวณิก นายประเสริฐ วิมลสุข และนายเจริญ แก้วทับ โดยทำการคัดแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรค เตรียมเป็น seed virus ทำโดยใช้เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่แยกได้ (S-strain) ทำการผ่านไวรัสลงไปในไข่ไก่ฟักอายุ 9-10 วันบริเวณช่องว่าง allantoic sac ในไข่จำนวน 142 ครั้งได้ปริมาณไวรัสมีปริมาณคงที่และเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนในไก่อายุ 10 วันจำนวน 42 ตัว พบว่าไก่สร้างภูมิคุ้มกันได้ดียาวนานถึง 3 เดือนโดยเชื้อไวรัสนี้ได้อ่อนกำลังลงไม่ก่อให้เกิดโรคในไก่ (Chindavanig, 1962)

จากการสัมภาษณ์ในปีพ.ศ. 2550 นายสัตวแพทย์ พอ จินดาวณิก อดีตผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ให้ข้อมูลว่า ได้ใช้ไวรัส Passage ที่ 143 เป็นต้นกำเนิดของการผลิตวัคซีนป้องกันโรคไวรัสหลอดลมอักเสบ

ติดต่อกันในไก่ ในช่วงเวลาที่ นายสัตวแพทย์จักร พิชัยณรงค์สงคราม ดำรงตำแหน่งอธิบดีกรมปศุสัตว์และเคยดำรงตำแหน่ง เป็นผู้อำนวยการกองเชื้อมหโรคหรือสพ.ในปัจจุบัน (พอ จินดาวงศ์, สัมภาษณ์)

2. การจำแนกคุณลักษณะไวรัสโดยใช้รูปร่างลักษณะ (Morphological Characterization)

จากการศึกษาไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่โดยใช้ตัวอย่าง seed virus ที่เป็น local strain สำหรับผลิตเป็นวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ของกรมปศุสัตว์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด TEM ขนาดกำลังขยาย 150,000 เท่า พบไวรัสมีรูปร่างค่อนข้างทรงกลมโดยมีปุ่มหนามยื่นออกมาบนอนุภาค โดย อนุภาคไวรัสมีขนาดประมาณ 60-80 nm แต่ละอนุภาคมีขนาดใกล้เคียงกัน และจากภาพถ่ายแสดงให้เห็นรูปร่าง ลักษณะ coronavirus โดยที่ไม่พบไวรัสชนิดอื่น (รูปที่ 1, 2)

3. การวิเคราะห์คุณลักษณะ IBV โดยการใช้ข้อมูลชีวสารสนเทศ

3.1 เปรียบเทียบความเหมือนของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ S1 protein gene

ใช้โปรแกรม BLAST เปรียบเทียบ % Identity ระหว่าง IBV กรมปศุสัตว์และวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ จำหน่ายในประเทศไทยรวมถึง IBV สายพันธุ์อื่น จากตารางที่ 1พบว่าเชื้อ IBV กรมปศุสัตว์มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน ของกรดอะมิโนเทียบกับเชื้อสายพันธุ์วัคซีน IBV H120 และ Ma 5 มากที่สุด 81.26% และมีความเหมือนของนิวคลีโอ ไทด์ 81.47 % และ 81.58% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามถ้าเปรียบเทียบกับเชื้อ IBV สายพันธุ์อื่นจะพบว่ามีความเหมือน ของกรดอะมิโนเหมือนกับ IBV LSD/051 มากที่สุด 85.69% และมีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ 87.76%

3.2. แสดง Multiple sequence alignment

จากการเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่าง S1 ของเชื้อ IBV ซึ่งจัดอยู่ใน avian coronavirus สปีชีส์เดียวกัน แต่ต่างสายพันธุ์กันจำนวน 10 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ใช้เป็นวัคซีนและสายพันธุ์อ้างอิงหรือสายพันธุ์อื่นเมื่อ เทียบกับวัคซีนกรมปศุสัตว์ จะพบ% ความเหมือนของกรดอะมิโน (ตารางที่ 1) และลักษณะอื่นๆที่สำคัญ (รูปที่ 3)จากรูป พบว่าด้านปลาย amino terminal (N-terminal) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความผันแปรของกรดอะมิโนหรือนิวคลีโอไทด์สูง มากพบกรดอะมิโน Methionine (M) ทำหน้าที่เป็น Translation initiation codon เมื่อนับลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง ที่ 24และ 25 พบว่ามีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในเชื้อ IBV กรมปศุสัตว์และเชื้อ IBV (ลำดับ 4-6) สำหรับกรดอะมิ โนด้าน Carboxy terminal (C-terminal) ของเชื้อ IBV แต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวกรดอะมิโนค่อนข้างอนุรักษ์ (conserved region) โดยเฉพาะบริเวณเชื่อมต่อระหว่าง S1 และ S2 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 ตัว (five basic amino acid) คือ arginine-arginine-basic amino acid-arginine-arginine บริเวณนี้จะเป็นตำแหน่งที่เอนไซม์ serine proteases ของเซลล์โฮสต์จดจำและตัดพันธะเปปไทด์ (Spike glycoprotein cleavage recognition site) (Cavanagh *et al.*, 1986)

3.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการจำแนกสายพันธุ์ IBV กรมปศุสัตว์โดยการทำให้ phylogenetic strain classification โดยการนำ S1 gene ของเชื้อ IBV จำนวน 52 สายพันธุ์มาสร้าง tree โดยใช้วิธี character base approach ได้แก่ Maximum likelihood (Jones *et al.*, 1992) (รูปที่ 4) และ distance-base approach ได้แก่ Neighbor-joining approach (Saitou and Nei, 1987) (รูปที่ 5) พบว่า Phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นสามารถจำแนกเชื้อ IBV ออกเป็น 6 genotype 32 lineages โดยใช้เกณฑ์ rules of thumb ถ้านิวคลีโอไทด์ต่างกัน 13% จัดอยู่คนละ lineage ในกรณี ต่างกันมากกว่า 30% จัดแยกเป็นอีก genotype นอกจากนี้ lineage ยังถูกกำหนดจากการทำ monophyletic groups

จากเชื้อ IBV อย่างน้อยสามสายพันธุ์ซึ่งเกิดการระบาดอย่างน้อยสองครั้ง (Valastro *et al.*, 2016) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจาก phylogenetic tree จำนวน 32 lineages นั้นพบลักษณะสำคัญดังนี้ Genotype I ประกอบไปด้วยสมาชิก IBV จำนวนมากที่สุดถึง 27 lineages ส่วน Genotype (II-VI) ที่เหลือมีสมาชิก อย่างละ lineage สำหรับ IBV vaccine strains จัดจำแนกอยู่ที่ Genotype I lineage ที่ 1 (H120, Ma5) และ lineage ที่ 13 (4/91)

สำหรับ IBV กรมปศุสัตว์จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (รูปที่ 4 และ 5) สามารถจำแนกอยู่ใน Genotype I ซึ่งมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนไก่ LSD/051 มากที่สุด (87.76 % nucleotide identity และ 85.69 % amino acid identity) สำหรับ IBV LSD/051 เป็นไวรัสที่แยกได้ในมณฑลซานตง สาธารณรัฐประชาชนจีน ระหว่างปี 2005-2006 (Liu *et al.*, 2008) โดยก่อให้เกิดโรคทางเดินหายใจในไก่มากกว่า 37 ฟาร์มซึ่งต่อมาในระยะเวลาสองปีพบว่าไวรัสนี้เกิดกระบวนการ recombination กลายเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่คือ IBV LSD/07-4

นอกจากนี้ IBV กรมปศุสัตว์ยังมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Genetic relationships) ใกล้ชิดรองลงมากับ IBV CA/1737/04 Genotype I lineage ที่ 25 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากการระบาดในฟาร์มไก่เนื้อที่มลรัฐแคลิฟอร์เนียปี 2004 นอกจากนี้ใน lineage 25 จะประกอบด้วยเชื้อ IBV ที่แยกได้จากมลรัฐเดลาแวร์ซึ่งสมาชิกที่สำคัญคือ DMV/5642/06

3.4 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน S1

3.4.1 SWISS-MODEL server ซึ่งเป็น web-base service จะทำการค้นหาโครงสร้างสามมิติเพื่อใช้เป็น template จาก The SWISS-MODEL Template Library ซึ่งมีที่มาของโครงสร้างโปรตีนจาก protein data bank (PDB) สำหรับทำ homology modeling พบว่า PDB template ID: 6CV0 (Shang *et al.*, 2018) ถูกเลือกให้เป็นแม่แบบในการสร้างโครงสร้างสามมิติของ S1 IBV กรมปศุสัตว์

3.4.2 ทำการสร้างแบบจำลองสามมิติ (รูปที่ 6)

จากรูป 5ก แสดง S1 ประกอบขึ้นด้วย protein domain ต่างๆมีลักษณะและหน้าที่ดังนี้

1. บริเวณ N-terminal domain (NTD) มีลักษณะโครงสร้างที่เรียกว่า galectin fold โดยที่โครงสร้างหลักประกอบด้วย 12 β sandwich ซ้อนทับกันเกิด hydrophobic interactions เหนือถัดโครงสร้างหลักขึ้นไปคือโครงสร้าง loop ซึ่งมีลักษณะ partial ceiling ซึ่งใน coronavirus แต่ละ genus จะมีลักษณะเฉพาะสามารถใช้บ่งบอกถึงวิวัฒนาการไวรัสกลุ่มนี้ ส่วนโครงสร้างรองได้แก่ alpha helix และ beta sheet

2. บริเวณ C-terminal domain ประกอบด้วยโครงสร้าง 2 parallel และ 5 antiparallel beta sheet และ extended loop ทำหน้าที่เป็น receptor-binding motifs (RBM) กับเซลล์โฮสต์

3. บริเวณ SD2 เป็นบริเวณที่ต่อกับ S2 และเป็นบริเวณที่ถูก host cell protease cleave เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง Conformation ของโครงสร้างก่อนเกิดการ fusion ของ S2 subunit

จากการศึกษาโครงสร้าง S1 protein ของเชื้อ IBV โดยวิธี Cryo-TEM สายพันธุ์ M41 ซึ่งถูกเลือกให้เป็นแม่แบบในการสร้างโครงสร้างโปรตีนสามมิตินี้ ได้ทำการเปรียบเทียบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญ 4 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3) พบว่าวัคซีนกรมปศุสัตว์มีความคล้ายของกรดอะมิโน (Similarity) ตำแหน่งที่ 43 กับ IBV M41 strain และมีความเหมือนของกรดอะมิโน (Identity) ตำแหน่งที่ 63 และ 69 กับวัคซีน H120

3.4.3 ประเมินคุณภาพแบบจำลองโครงสร้างโปรตีนสามมิติที่สร้างขึ้น (รูปที่ 7)

ทำการประเมินความถูกต้องของแบบจำลองที่สร้างขึ้นด้วยค่า QMEAN Z scores ประกอบไปด้วย

3.4.3.1.1 QMENDisCo global หรือ QMEAN distance constraints Global เป็นการประเมิน

คุณภาพแบบจำลองโดยรวมโดยประเมินเป็นค่าตัวเลขระหว่าง 0 และ 1 ถ้าได้เกิน 0.5 ถือว่าดีโดยเฉพาะแบบจำลองที่มีการเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่าง template และ target ครอบคลุมได้เพียง 50 % ภาพรวม QMEANDisCo ซึ่งแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีค่า 0.78 ± 0.05 (รูป 7ก)

3.4.3.1.2 QMEANSDisCo Local หรือ QMEAN distance constraints Local เป็นการประเมินคุณภาพแบบจำลองโดย plot กรดอะมิโนในแบบจำลองแต่ละตัวเทียบความคล้ายกับโครงสร้าง native structure ของ template ประเมินเป็นค่าคะแนนออกมา ค่าคะแนนที่ได้จากการดะมิโนแต่ละตัว ค่า >0.6 ถือว่าดี (รูป 7ข)

3.4.3.1.3 QMEAN Z-score (รูป 7ก และ 7ง)

ประกอบด้วย QMEAN (รูป 7ก) เป็นค่าคะแนนรวม (composite score) ควรจะมีค่า >-4 ซึ่งประกอบด้วยค่า

- $C\beta$ เป็นค่าที่ประเมินคู่ carbon atom ตำแหน่ง beta ในกรดอะมิโนที่เกิดแรงปฏิสัมพันธ์ในขณะ folding พบว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีค่า -2.34

- All atom เป็นค่า pairwise interaction ของอะตอมอื่นเช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ไฮโดรเจน และคาร์บอนที่ไม่ใช่ $C\beta$ พบว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีค่า -3.39

- Solvation ค่าที่บ่งถึงความสามารถในการเข้าถึงตัวทำละลายในที่นี้หมายถึงกรดอะมิโนที่ expose หรือ buried ที่จัดเรียงตัวกันในโครงสร้างสามมิติ พบว่าแบบจำลองสร้างขึ้นมีค่า -4.19

- Torsion หรือ dihedral angle เป็นค่าที่วัดมุม psi และ phi ที่เกิดจากการนำเอากรดอะมิโน 3 ตัวที่เรียงต่อกันในโครงสร้างสามมิติซึ่งต้องมีพิกัดที่เหมาะสมถูกต้อง พบว่าแบบจำลองมีค่า -2.86

- Ramachandran plot (รูป 7ค) ใช้ตรวจสอบความถูกต้องของพิกัดกรดอะมิโนของ IBV กรมปศุสัตว์แต่ละจุดคือกรดอะมิโนหนึ่งตัวซึ่งถูกจัดเรียงแต่ละ Quadrant ตามมุม Psi และ Phi บ่งบอกถึงโครงสร้าง alpha helix, Beta sheet พบว่าแบบจำลองมีตำแหน่งพิกัดและโครงสร้างของกรดอะมิโนถูกต้อง 88.54%

- QMEAN4 score (รูป 7ง) เป็นค่าที่บอกถึงความเบี่ยงเบนจากค่ามาตรฐานของแบบจำลองว่าน้อยเพียงใดเมื่อเทียบกับโครงสร้างโปรตีนทั้งหมดซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล protein data bank จำนวน 9,766 ชนิดที่ทราบโครงสร้างแท้จริงโดยแกน X แสดงความยาวของกรดอะมิโนที่สร้างขึ้นในแบบจำลองโปรตีนสามมิติ แกน Y แทนค่าคะแนน QMEAN แต่ละจุดเป็นตัวแทนของหนึ่งโปรตีนที่ทราบโครงสร้างที่ถูกต้องได้จากการทดลองแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยจุดสีดำ เทาเทาจาง เรียงลำดับเบี่ยงเบนจากน้อยไปมาก เครื่องหมายดาวสีแดงคือค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย (Mean) ของแบบจำลองที่สร้างขึ้น พบว่าแบบจำลองมีค่า $1 < Z\text{-score} < 2$

4. ระบบการตั้งชื่อสายพันธุ์เชื้อ IBV

ณ ปัจจุบันยังไม่มีข้อตกลงที่เป็นที่ยอมรับเป็นทางการในระบบการตั้งชื่อสายพันธุ์ IBV (Jackwood and De Wit, 2020) อย่างไรก็ตามนักวิชาการส่วนใหญ่ยอมรับและตั้งชื่อสายพันธุ์ IBV ตามข้อเสนอของศาสตราจารย์ Dave Cavanagh สหราชอาณาจักร ในปี 2001 (Cavanagh, 2001) ซึ่งการตั้งชื่อตามข้อกำหนดดังนี้

IBV/ชนิดสัตว์ปีกที่พบ/ประเทศกำเนิด/การจำแนกตามข้อมูลทางพันธุกรรมหรือทางซีรัมวิทยา/กำหนดชื่อสายพันธุ์/ปีที่ทำการแยก ตัวอย่างเช่น IBV/CH/US/GI-9, Ark/ArkDPI/81 อย่างไรก็ตามไวรัสที่พบในไก่จะไม่นิยมระบุค่าเรียก ดังนั้นชื่อเรียกจึงเป็น US GI-9 หรือ US ArkDPI/81

ดังนั้นการตั้งชื่อ IBV กรมปศุสัตว์ตามข้อตกลงควรจะเป็น IBV/CH/TH/GI-25, DLD/S/54 หรือย่อเหลือ TH/GI-25, DLD/S/54

วิจารณ์

การทราบประวัติที่มาและการจำแนกคุณลักษณะตลอดจนการทราบเชื้อสายพันธุ์ไวรัสมีความจำเป็นและสำคัญเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะไวรัสที่ใช้เป็นสายพันธุ์ในการผลิตวัคซีน เป็นที่น่าภูมิใจและควรยกย่องในความรู้ความสามารถของนักวิชาการไทยในรุ่นบุกเบิกที่วิจัยและทำ attenuation ลดความรุนแรงในการก่อโรคเชื้อ IBV จนสามารถใช้เป็นต้นตอไวรัสสำหรับผลิตวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ (seed vaccine) ช่วยลดการสูญเสียและประหยัดเงินตราในการนำเข้าวัคซีนจากต่างประเทศไม่น้อยกว่าพันล้านบาทต่อปี นับจากวันที่ 21 พฤษภาคม 2500 ที่มีพระราชกฤษฎีกาจัดระเบียบบริหารกรมปศุสัตว์มีการจัดตั้งแผนกไวรัสวัคซีนโดยมี นายประกอบ จินตกานนท์ เป็นหัวหน้าแผนก นับได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นการผลิตวัคซีน IBV ในระดับอุตสาหกรรมขึ้นใช้ในประเทศ นับเวลานานกว่า 60 ปีที่มีการใช้สายพันธุ์ไวรัสท้องถิ่นผลิตวัคซีนซึ่งเก่าและยาวนาน แต่อย่างไรก็ตามเป็นความเก่าที่ยังทรงคุณค่ามีวัคซีนที่มีคุณภาพมีความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการป้องกันโรค (คณิตาและนพคุณ, 2563) จากการศึกษาคุณลักษณะต่างๆของเชื้อ โดยการศึกษารูปลักษณะและขนาดไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยายภาพขนาดสูงทำให้ทราบว่า seed IBV กรมปศุสัตว์มีขนาด 60-80 nm โดยมีรูปร่างทรงกลมอยู่ในกลุ่ม Envelope virus ซึ่งมีปุ่มหนาม S protein ยื่นออกมาบนอนุภาคทำให้ระบุได้ว่าเป็น coronavirus และจากการที่ปรากฏลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมและขนาดสม่ำเสมอทำให้ทราบได้ว่าการแยกเชื้อและการพัฒนา seed ในช่วงเริ่มต้นนั้นสามารถแยกและเตรียมเชื้อได้บริสุทธิ์ (seed purity)

จากข้อมูลและความรู้ชีวสารสนเทศซึ่งเป็นวิทยาศาสตร์ที่ใช้เทคโนโลยีสารสนเทศและวิทยาศาสตร์คอมพิวเตอร์มาบูรณาการเข้ากับชีววิทยาโมเลกุล ถูกนำมาใช้ค้นคว้าข้อมูลใน GenBank โดยการทำ BLAST search พบว่าเชื้อ IBV กรมปศุสัตว์มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนเทียบกับเชื้อ IBV H120 และ Ma 5 มากที่สุด 81.26% ซึ่งค่าความเหมือนของกรดอะมิโนใน S1 โปรตีนนี้สามารถใช้ทำนาย Cross-protection เชื้อ IBV ในแต่ละ Genotype หรือ Serotype ได้ (Ladman *et al.*, 2006) โดยที่ระดับความเหมือนของกรดอะมิโน 80-89 % จะมีความสัมพันธ์กับการ Neutralizing virus ได้มากกว่า 41.7 % (Shimazaki *et al.*, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย คณิตาและนพคุณ (2563) ที่พบว่าวัคซีน IBV กรมปศุสัตว์มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไม่แตกต่างจากวัคซีน IBV สเตรน H120

ในการทำ Multiple sequence alignment พบว่า IBV กรมปศุสัตว์มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในตำแหน่งเดียวกับ IBV สายพันธุ์ LSD/051 และสายพันธุ์ DMV/5642/06, CA1737 จากเชื้อที่ระบาดทางทวีปอเมริกาทั้งนี้อาจเนื่องมาจากประเทศไทยได้มีการนำเข้า Rhode island red มาทดลองเลี้ยงในประเทศตั้งแต่ปีพ.ศ.2492 และได้มีการนำเข้าพันธุ์ไก่เนื้อมาผลิตเป็นการค้าในประเทศอย่างจริงจังในปีพ.ศ. 2510 (วัชรพงษ์, 2561) เมื่อพิจารณาตำแหน่ง Spike protein cleavage recognition site ของ IBV กรมปศุสัตว์คือ RRSRR จะเหมือนเชื้อ IBV ทางทวีปอเมริกา ซึ่งรูปแบบชนิดของกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่ง Cleavage site นี้จะอนุรักษ์และบ่งบอกถึงความเก่าแก่ของสายพันธุ์และมี correlation กับ geographic regions (Jackwood *et al.*, 2001)

จากการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโน (nucleotide or amino acid substitutions) ในแต่ละยีนหรือในจีโนมมีค่าค่อนข้างที่จะคงที่นำไปสู่การนำเอาข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (Phylogenetic relationships) ในระดับต่างๆได้แก่ ระดับสิ่งมีชีวิตต่างชนิด (คน ชะนี อูรังอุตัง ไพรเมท) หรือในระดับ

อนุกรมวิธาน (genus, species) ไปจนถึงระดับต่ำกว่า species (strain classification) โดยทั่วไปเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วพบว่าข้อมูลของสารมหโมเลกุล (Macro molecule) ให้รายละเอียดที่มีแบบแผนชัดเจนในด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเทียบเคียงได้กับข้อมูลที่มาจากสัณฐานวิทยา (ศราวุธ, 2544) เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและทำ Phylogenetic analysis ของ S1 gene พบว่าให้ข้อมูลที่สำคัญในด้านระบาดวิทยาโดยที่การระบาดของไวรัส IBV นั้นมีความเกี่ยวข้องใกล้ชิดกับ IBV vaccine strain ซึ่งสาเหตุเกิดการ breakthrough vaccine ยังต้องสอบสวนหาสาเหตุแท้จริงต่อไป อย่างไรก็ตามเมื่อเกิดการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ สิ่งที่เกิดขึ้นคือการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นอ่อนกำลังควบคุมการระบาด สิ่งที่น่าสังเกตตามาคือโรคสงบลงชั่วคราว ในเวลาต่อมาไม่นานก็จะพบการระบาดรอบใหม่ซึ่งพบว่าเชื้อที่ระบาดใหม่มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์วัคซีนที่ใช้ล่าสุด สถานการณ์ดังกล่าวสอดคล้องกับการแยกไวรัสที่ได้จากการระบาดในพื้นที่ประเทศไทยพบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการใช้วัคซีน (IBV Prachinburi, THA241251/Mass, Petchabun) ในกรณี QX IBV ซึ่งพบกระจายอยู่ทั่วทุกทวีป ซึ่งปัจจุบันนี้ประเทศไทยพบการระบาดในฝูงไก่สายพันธุ์ QX เป็นส่วนใหญ่ (Dominant strain) (Saraburi Isolated, THA80151 Group II) (Munyahongse *et al.*, 2020) (รูปที่ 4, 5)

ในส่วนของการชี้ชัดถึงแหล่งต้นกำเนิดและวิวัฒนาการเชื้อ IBV วัคซีนกรมปศุสัตว์ให้ถูกต้องแน่ชัดควรจะได้มีการหาและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมจากยีนอื่นเช่น N หรือ RNA polymerase gene หรืออาจวิเคราะห์ทุกยีน (Whole genome sequencing) จากการที่ IBV กรมปศุสัตว์มี genetic relationships กับเชื้อ IBV genotype I lineage 25 จำเป็นต้องทดสอบ serum neutralization หรือ challenge test เพื่อยืนยันว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพในการคุ้มโรคต่อเชื้อกลุ่มนี้ ในการสร้าง phylogenetic tree ครั้งนี้ใช้ maximum likelihood ซึ่งเป็น robust method ร่วมกับวิธี Neighbor-joining โดยมีค่า bootstrap เป็นตัวประเมินความเชื่อมั่น phylogenetic tree โดยถือว่ามีความน่าเชื่อถือที่ค่า 70 % (Hills and Bull, 1993) พบว่า IBV กรมปศุสัตว์มีค่า bootstrap value สูงถึง 98-100 % ซึ่งสนับสนุนรูปแบบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมหรือความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่สร้างขึ้น

การทราบโครงสร้างสามมิติทำให้ทราบรายละเอียดหน้าที่การทำงานของโปรตีนอย่างถูกต้องชัดเจน ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาโครงสร้างสามมิติ S1 IBV เพียงโครงสร้างเดียว (Shang *et al.*, 2018) งานวิจัยนี้จึงสร้างและทำนายโครงสร้างสามมิติโปรตีน S1 IBV กรมปศุสัตว์ ซึ่งการทำนายโครงสร้างสามมิติ (Prediction of 3D structure) สามารถกระทำได้สามวิธีได้แก่การทำนายโครงสร้างจากคุณสมบัติทางเคมี-ฟิสิกส์โดยตรงไม่ต้องอาศัยโครงสร้างโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกันในฐานะข้อมูลต่างๆ ที่เรียกว่า ab initio methods ซึ่งมีข้อจำกัดคือใช้เวลามาก และพบความผิดพลาดเกิดขึ้นบ่อย วิธีที่สองจะทำนายโครงสร้างจากการม้วนพับที่เรียกว่า threading methods วิธีนี้ใช้ทำนายโครงสร้างโปรตีนในกรณีที่มีหลายโครงสร้างแม่แบบที่คล้ายคลึงกับโครงสร้างที่ต้องการสร้าง วิธีนี้มีข้อจำกัดคือต้องทราบ folding topology และในกรณีเกิดช่องว่าง (Gaps) ในระหว่างการทำ alignment จะทำให้เกิดความยุ่งยากในการทำนายวิธีสุดท้าย homology modeling ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้เป็นวิธีที่ใช้กันมากที่สุดในปัจจุบันเนื่องจากผลการทำนายมีความถูกต้องสูง (Xu *et al.*, 2000; Studer *et al.*, 2021)

ในการประเมินคุณภาพโครงสร้างสามมิติของ Spike protein S1 ของ IBV กรมปศุสัตว์ที่สร้างขึ้นด้วยวิธี homology modeling โดยภาพรวมถือว่ามีความถูกต้อง (accuracy) ดีมีค่าคะแนน QMEANDisCo Global 0.78+/-0.05 มีค่า $1 < Z \text{ score} < 2$ อย่างไรก็ตามพบว่ามีความ QMEAN -4.78 ซึ่งน้อยกว่า -4.0 ทั้งนี้เนื่องจากธรรมชาติของ Spike protein เป็น membrane protein ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมี-ฟิสิกส์ที่แตกต่างจาก Soluble protein เช่น โลโซไซม์ทำให้การทำนายโครงสร้างได้คะแนนต่ำหรืออีกนัยหนึ่งคือมีความถูกต้องน้อยมีความเบี่ยงเบนมากกว่าค่ามาตรฐาน (Benkert *et al.*, 2011) จากโครงสร้างสามมิติในภาพ 6ข พบว่าวัคซีนกรมปศุสัตว์มีความคล้ายของกรดอะมิโน (Similarity) ตำแหน่งที่ 43 กับ IBV M41 strain และมีความเหมือนของกรดอะมิโน (Identity) ตำแหน่งที่ 63 และ 69 กับวัคซีน H120 ซึ่งความ

เหมือนและคล้ายนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดความรุนแรงจาก wild type strain ลงเป็น attenuated strain จากการศึกษาดูโดย (Promkuntod *et al.*, 2014) พบว่า S1-NTD บริเวณกรดอะมิโนที่ 19-69 ทำหน้าที่จับกับเนื้อเยื่อทางเดินระบบหายใจโดยอาศัย alpha 2,3 sialic acid เป็นตัวรับโดยมีกรดอะมิโน 4 ตำแหน่งที่สำคัญ (38, 43, 63 และ 69) ใช้สำหรับการยึดเกาะ(ตารางที่ 3) ซึ่งในตารางแสดงเฉพาะสายพันธุ์ M41 และ H120 เทียบกับ IBV กรมปศุสัตว์เนื่องจากเป็นเชื้อ serotype เดียวกันที่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจ

นอกจากนี้ผลการศึกษารายละเอียดของยีน S1 หรือ โครงสร้างสามมิติ S1 protein ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการสร้างเวกเตอร์วัคซีนหรือวัคซีนรูปแบบอื่นเช่น mRNA vaccine เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีนในการป้องกันโรค

ในการตั้งชื่อ IBV ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม gamma coronavirus ยังไม่มีหน่วยงานสากลรับเป็นผู้กำหนดหลักเกณฑ์ในการตั้งชื่อ หน่วยงาน International committee on Taxonomy of Virus ทำการตั้งชื่อไวรัสในระดับ species ขึ้นไป (ICTV code, 2018) ในกรณีการตั้งชื่อ SARS-CoV-2 ซึ่งเป็น beta coronavirus WHO เป็นผู้กำหนดในการเรียกชื่อแต่ในกรณีของ variant ระบบการตั้งชื่อสายพันธุ์ (genetic lineages) จะใช้ 3 ระบบคือ GISAID, Nexstrian, Pango (Konings *et al.*, 2021) เช่น สายพันธุ์ Delta ซึ่งจัดเป็น variant of concern ระบบการตั้งชื่อของ GISAID คือ G/452R.V3 ระบบ Nexstrian คือ 21A/S:478K ระบบ Pango คือ B.1.617.2

ดังนั้นจากเดิมการเรียกชื่อสายพันธุ์วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่กรมปศุสัตว์ซึ่งเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นว่า DLD หรือ S strain (ศักดิ์ชัยและคณะ, 2528) เพื่อความเข้าใจและยอมรับในระบบการตั้งชื่อสากลควรใช้ชื่อ IBV DLD strain (TH/GI-25, DLD/S/54) ควบคู่กันไป

สรุป

การศึกษานี้ได้ทำการสืบค้นประวัติต้นตอไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ใช้ผลิตวัคซีนกรมปศุสัตว์พบว่า เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ท้องถิ่นและได้ทำการจำแนกตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบรูปร่างกลมขนาด 60-80 nm จากข้อมูลชีวสารสนเทศจัดจำแนกอยู่ใน genotype I lineage 25 ซึ่งมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่สายพันธุ์ LSD/051 และจากโครงสร้างโปรตีน S1 มีความคล้ายกับไวรัสสายพันธุ์ H120 และ M41 ได้เสนอให้ใช้ชื่อสายพันธุ์ไวรัสชนิดนี้เป็น IBV DLD strain (TH/GI-25, DLD/S/54) เพื่อความเป็นสากล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Anun yuenyongolan Regional Manager IDEXX laboratories Co., Ltd ที่ได้ให้ข้อมูล วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ strain ต่างๆที่จำหน่ายในประเทศไทย ขอขอบคุณ รศ.สพ.ญ.ดร. กรรณภรณ์ สุริยผล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบเอกสารอ้างอิงประกอบการเขียนรายงานฉบับเต็ม นายสัตวแพทย์ ดร. แอบ คงทน ที่ประสานงานในการสัมภาษณ์ นายสัตวแพทย์ พอ จินดาวงศ์ ผู้พัฒนา Seed IBV ดร. จิตตพร วัฒนเสรี ผู้เชี่ยวชาญ GMP ที่บริษัท ฟาร์มาแพค แพลน เทคโนโลยี ให้คำแนะนำและแก้ไขบทความ และผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์พร้อมด้วยเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- คณิตา ภาสขุติ และ นพคุณ มูลสิน 2563 เปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ หลังการทำวัคซีน หลอดลมอักเสบติดต่อที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และบริษัทเอกชน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 29(1-2): 57-67
- วัชรพงษ์ วัฒนกุล 2561 การผลิตสัตว์ปีก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี
- ศิริวรุณ กลิ่นบุหงา 2544 Phylogenetics และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ในชีวสารสนเทศ ฝ่ายนิเทศ สัมพันธ์ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ หน้า149-171
- ศักดิ์ชัย หิมะทองคำ สุณีย์ หิมะทองคำ และสละ กองสมัคร 2528 การแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดไอบวม จาก รายงานการประชุมวิชาการสัตวแพทย์ครั้งที่ 12 ของสัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย (2-4 ธันวาคม 2528)
- ASEAN Secretariat. 2018. ASEAN standard requirements for infectious bronchitis vaccine, Live. In Manual of ASEAN standard for animal vaccine, Livestock publication series No. 2A, 3rd ed. Hanoi, Vietnam. pp. 3-5.
- Benkert, P., Biasini, M. and SchwedeT. 2011. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. bioinformatics. 27: 343-350.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Pappin, D.J., Boursnell, M.E. and Brown, T.D. 1986. Corona IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. Virus Res. 4: 133-143.
- Cavanagh, D. 2001. A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status. Avian Pathol. 30: 109-115.
- Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet. Res. 38: 281-297.

- Chindavanig, P. 1962. Studies on the attenuation of infectious bronchitis virus. J.Thai Vet. Med. Assoc. 12: 1-7.
- Hills, D.M. and Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst. Biol. 42: 182-192.
- ICTV Code: The International Code of Virus Classification and Nomenclature. 2018. International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV).
- Jackwood, M. W. 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. Avian Dis. 56: 634-641.
- Jackwood, M.W. and De Wit, S. 2020. Infectious Bronchitis. In: David E. Swayne, chief editors. Diseases of Poultry. 14. UK: Wiley-Blackwell. pp. 167-188.
- Jackwood, M.W., Hilt, D.A., Callison, S.A., Lee, C.W., Plaza, H. and Wade, E. 2001. Spike Glycoprotein Cleavage Recognition Site Analysis of Infectious Bronchitis Virus. Avian Diseases. 45: 366-372.
- Jones, D.T., Taylor W.R., and Thornton. J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer Applications in the Biosciences. 8: 275-282.
- Konings, F., Perkins, M.D. Kuhn, J.H., Pallen, M.J., Alm, E.J., Archer, B.N., Barakat, A., Bedford, T., Bhiman, J.N., Caly, L., Carter, L.L., Cullinane, A., Oliveira, T.D., Druce J., Masry I.E., Evans, R., Gao, G.F., Gorbalenya, A.E., Hamblion, E., Herring, B.L., Hodcroft, E., Holmes, E.C., Kakkar, M., Khare, S., Koopmans, M.P.G., Korber, B., Leite, J., MacCannell, D., Marklewitz, M., Maurer-Stroh, S., Rico, J.A.M., Munster, V.J., Ziebuhr, J. and Kerkhove, M.D.V. 2021. SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern naming scheme conducive for global discourse. Nature Microbiology. 6: 821-823.
- Ladman, B.S., Loupos, A.B. and Gelb, J.Jr. 2006. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. Avian Pathol. 35: 127-133.
- Lalchhandama, k. 2020. The chronicles of coronaviruses: the electron microscope, the doughnut, and the spike. Science vision. 78-92.
- Liu, S., Wang, Y., Ma, Y., Han, Z., Zhang, Q., Shao, Y., Chen, J. and Kong, X. 2008. Identification of a Newly Isolated Avian Infectious Bronchitis Coronavirus Variant in China Exhibiting Affinity for the Respiratory Tract. Avian Disease. 52: 306-314.
- Lontok, E., Corse, E. and Machamer, C.E. 2004. Intracellular targeting signals contribute to localization of coronavirus spike proteins near the virus assembly site. Journal of virology. 78(11): 5913-5922.
- Munyahongse, S., Pohuang, T., Nonthabenjawan, N., Sasipreeyajan, J. and Thontiravong, A. Genetic characterization of infectious bronchitis viruses in Thailand, 2014-2016: identification of a novel recombinant variant. 2020. Poultry Science. 99: 1888-1895.
- Office International des Epizooties, OIE. 2018. Avian infectious bronchitis. In manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.3.2. pp. 1-14.

- Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A. and Sasipreeyajan, J. 2011. Sequence analysis of S1 genes of infectious bronchitis virus isolated in Thailand during 2008-2009: identification of natural recombination in the field isolates. *Virus Genes*. 43: 254-260.
- Promkuntod, N., Eijndhoven, R.E.W.V., Vrieze, G.D., Grone, A. and Verheije, M.H. 2014. Mapping of the receptor-binding domain and amino acids critical for attachment in the spike protein of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*. 448: 26-32.
- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C. and Sasisekharan, V. 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*. 7: 95-99.
- Saitou, N. and Nei, N. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
- Schalk, A.F. and Hawn, M.C. 1931. An apparent new respiratory disease of baby chicks. *J. AM. Vet Med. Assoc*. 78: 413-422.
- Shang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Liu C., Geng, Q., Luo, C., Zhang, W., and Li, F. 2018. Cryo-EM structure of the infectious bronchitis coronavirus spike protein reveals structural and functional evolution of coronavirus spike proteins. *PLOS Pathogens*. 1-19.
- Shimazaki, Y., Harada, M., Horiuchi, T., Yoshida, K., Tanimura, C., Nakamura, S., Mase, M. and Suzuki, S. 2009. Serological Studies of Infectious Bronchitis Vaccines against Japanese Field Isolates of Homologous and Heterologous Genotypes. *J. Vet. Met. Sci*. 71 (7): 891-896.
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A.M., Gumieny, R., Haas, J. and Schwede, T. 2020. QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*. 36(6): 1765-1771.
- Studer, G., Tauriello G., Bienert S., Biasini M., Johner N. and Schwede T. 2021. ProMod3-A versatile homology modelling toolbox *PLOS Computational Biology*: 1-18.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol*. 30: 2725-2729.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weighting matrix choice, *Nucl. Acids Res*. 22: 4673-4680.
- Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G. and Monne, I. 2016. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. *Infect. Genet. Evol*. 39: 349-364.
- Xu, D., Xu Y. and Uberbacher EC. 2000. Computational tool for protein modeling. *Current Protein and Peptide Science*. 1: 1-21.

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบ % ความเหมือนของกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ระหว่าง IBV กรมปศุสัตว์กับ IBV สายพันธุ์อื่น

สายพันธุ์วัคซีน (vaccine strain)	% กรดอะมิโน (545 aa)	% นิวคลีโอไทด์ (1,635 nt)
IBV DLD: Mass41	80.47	81.65
IBV DLD: H120	81.26	81.47
IBV DLD: Ma5	81.26	81.58
IBV DLD: 4/91	74.77	77.9
IBV DLD: QX	80.37	81.78
สายพันธุ์อื่น (other strain)		
IBV DLD: LSD/051	85.69	87.76
IBV DLD: LSD/07-4	84.94	86.67
IBV DLD: CA/1737/04	80.89	83.12
IBV DLD: DMV5642/06	80.34	83.28
IBV DLD: THA90151Group1	79.59	81.12
IBVDLD: IBV Chonburi	78.72	81.18
สกุลอื่น (other genus)		
IBV DLD: SARS-CoV-2	28.81	24.47

ตารางที่ 2 เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่สายพันธุ์อ้างอิงจำแนกเป็น 6 genotype และ 32 lineages (Valastro *et al.*, 2016)

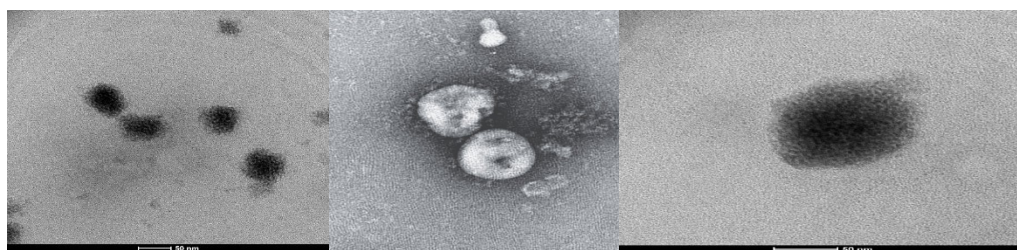
Lineage	Reference strains		
	Strain name	Country of origin	GenBank acc. Number
GI-1	Beaudette	USA	M95169
GI-2	Holte	USA	GU393336
GI-3	Gray	USA	L14069
GI-4	Holte	USA	L18988
GI-5	N1/62	Australia	U29522
GI-6	VicS	Australia	U29519
GI-7	TP/64	Taiwan	AY606320
GI-8	L165	USA	JQ964061
GI-9	ARK99	USA	M99482
GI-10	B	New Zealand	AF151954
GI-11	UFMG/G	Brazil	JX182775
GI-12	D3896	The Netherlands	X52084
GI-13	Moroccan-G/83	Morocco	EU914938
GI-14	B1648	Belgium	X87238
GI-15	B4	Korea	FJ807932
GI-16	IZO 28/86	Italy	KJ941019
GI-17	CA/Machado/88	USA	AF419315
GI-18	JP8127	Japan	AY296744
GI-19	58HeN-93II	China	KC577395
GI-20	Qu_mv	Canada	AF349621
GI-21	Spain/97/314	Spain	DQ064806
GI-22	40GDGZ-97I	China	KC577382
GI-23	Variant2	Israel	AF093796
GI-24	V13	India	KF757447
GI-25	CA/1737/04	USA	EU925393
GI-26	NGA/B401/2006	Nigeria	FN182243
GI-27	GA08	USA	GU301925
GII-1	D1466	The Netherlands	M21971
GIII-1	N1/88	Australia	U29450
GIV-1	DE/072/92	USA	U77298
GV-1	N4/02	Australia	DQ059618
GVI-1	TC07-2	China	GQ265948

เชื้ออ้างอิงในตารางจัดจำแนกเป็น genotype และ lineage ต่างๆตามข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ complete S1 gene ซึ่งมีรายละเอียดอยู่ใน GenBank acc. Number

G = genotype -(ตัวเลข) = lineage : GI-1 หมายถึง genotype ที่1 lineage ที่1

ตารางที่ 3 แสดงตำแหน่งและชนิดกรดอะมิโนที่จำเป็น (Critical amino acid) ในการจับกับเนื้อเยื่อทางเดินหายใจไก่
 N=Asparagine D=Aspartic acid H=Histidine R=Arginine P=Proline S=Serine T=Threonine
 I=Isoleucine

สายพันธุ์/ตำแหน่ง/ชนิด กรดอะมิโน	aa38	aa43	aa63	aa69
M41	N	H	P	T
H120	D	H	S	I
DLD	N	R	S	I



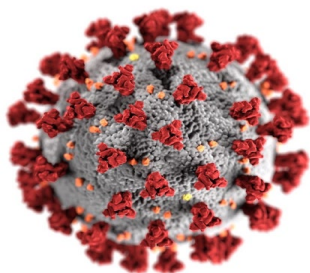
ก.

ข.

ค.

รูปที่ 1 ภาพถ่ายด้วยกล้อง TEM แสดงอนุภาค Coronavirus ขนาดกำลังขยาย 150,000 เท่า

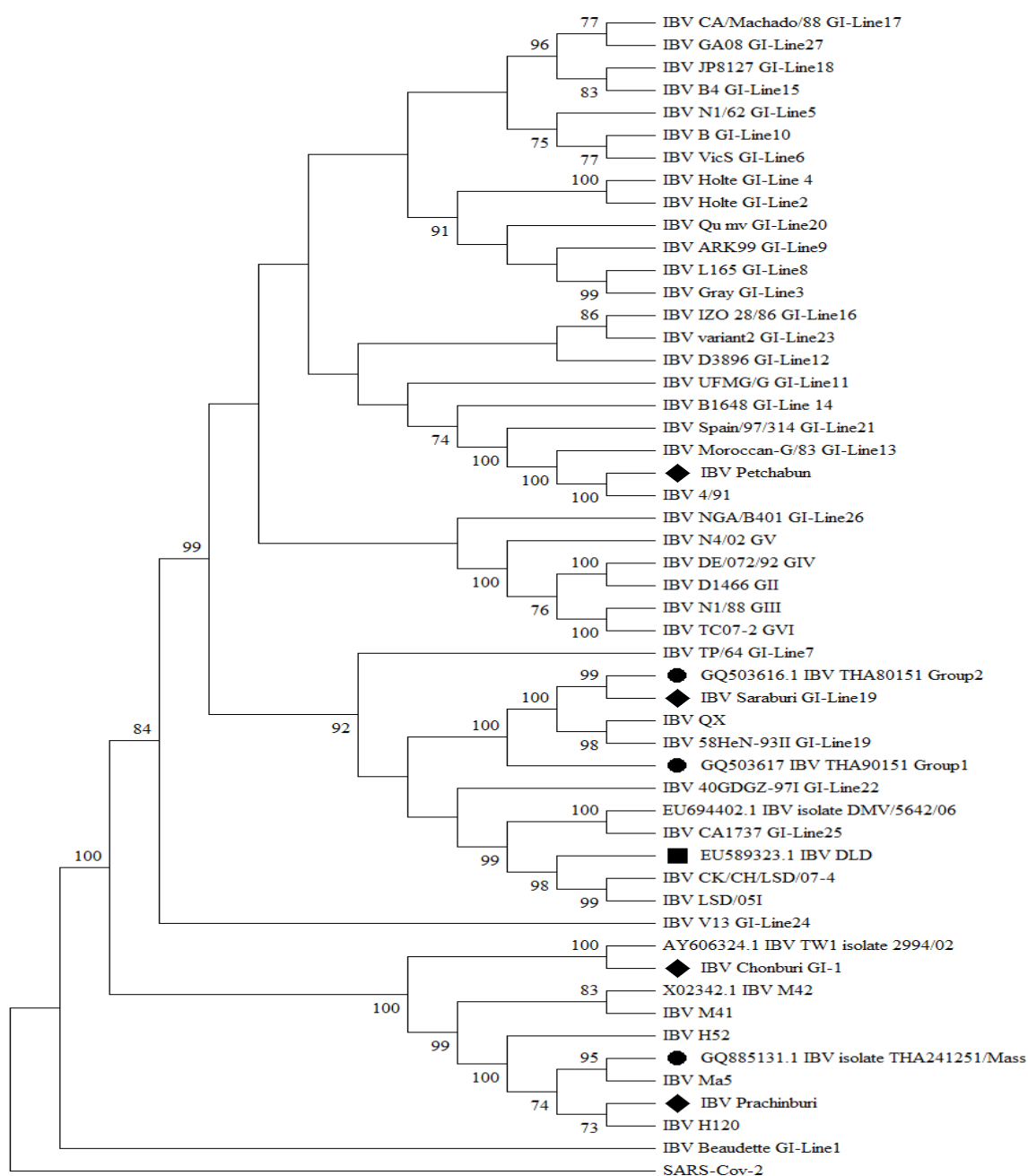
- ก. Seed IBV กรมปศุสัตว์รูปร่างทรงกลมไวรัสแต่ละอนุภาคมีขนาดใกล้เคียงกัน
- ข. Coronavirus แสดงลักษณะรูปร่าง pleomorphic appearance
- ค. Seed IBV กรมปศุสัตว์ แสดงให้เห็นปุ่มหนามยื่นออกมาภายนอก lipid bilayer membrane



รูปที่ 2 แบบจำลองอธิบายโครงสร้างภายนอก Coronavirus แสดงปุ่มหนามที่ยื่น S protein
 พื้นที่ทรงกลมเทา คือ lipid bilayer membrane (ที่มา: Alissa Eckert and Dan Higgins, 2020)



รูปที่ 3 แสดงลำดับกรดอะมิโน S protein ของวัคซีนหลอดลมอักเสบสายพันธุ์ต่างๆ (1-10) ทางด้าน N-terminal จะเป็นบริเวณที่มีความแปรผันของกรดอะมิโนสูงมาก (เครื่องหมาย+) C-terminal จะเป็นบริเวณที่กรดอะมิโนที่อนุรักษ์ไม่เปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะบริเวณ Cleavage site (RRXRR: X = F, S) S₂ คือบริเวณตั้งต้นของ S protein subunit 2 ตัวอักษรในแถบสีคือตัวย่อของกรดอะมิโนเช่น R = arginine, F = Phenylalanine, S = Serine - คือกรดอะมิโนที่ขาดหายไปเนื่องจากกระบวนการ gene deletion

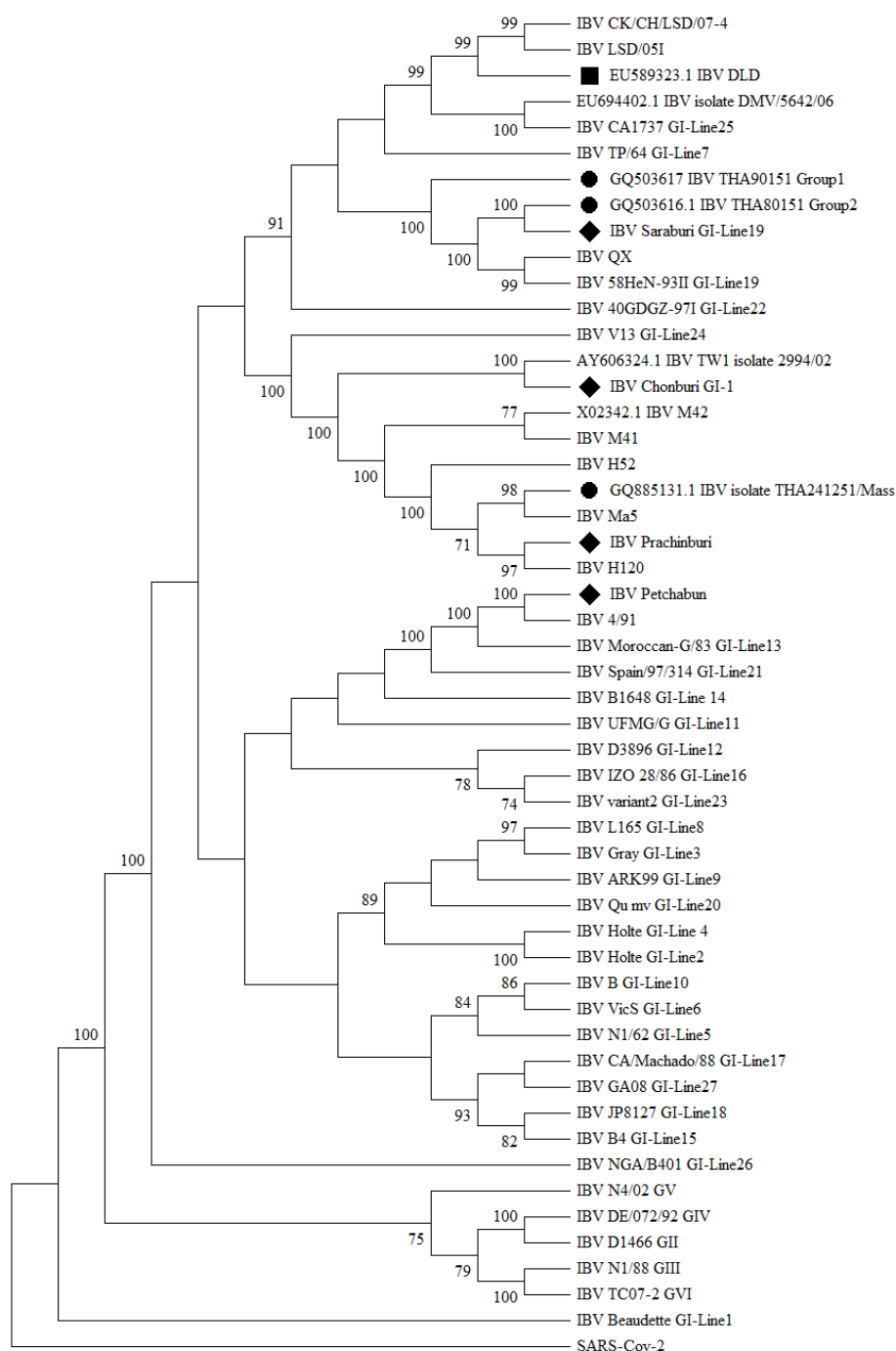


รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ complete S1 gene ระหว่างไวรัสค็อกซ์โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ของกรมปศุสัตว์และ IBV reference strains, 7 Thai IBVs isolated. สร้างโดยโปรแกรม MEGA v.6.0 โดยใช้ the maximum likelihood method; GTR+G+I model, 1,000 bootstrap replicates โดยแสดงผลค่าbootstrap ด้วยตัวเลขตั้งแต่ 70

■ วัคซีนกรมปศุสัตว์ (EU589323.1 DLD)

● IBV 3 Thai isolated: GQ503616.1 IBV THA80151 Group 2, GQ503617 IBV THA 90151 Group 1 และ GQ885131.1 IBV isolate THA 241251/Mass

◆ IBV 4 Thai isolated: IBV Petchabun, IBV Saraburi - GI Line 19, IBV Chonburi GI – 1 และ IBV Prachinburi

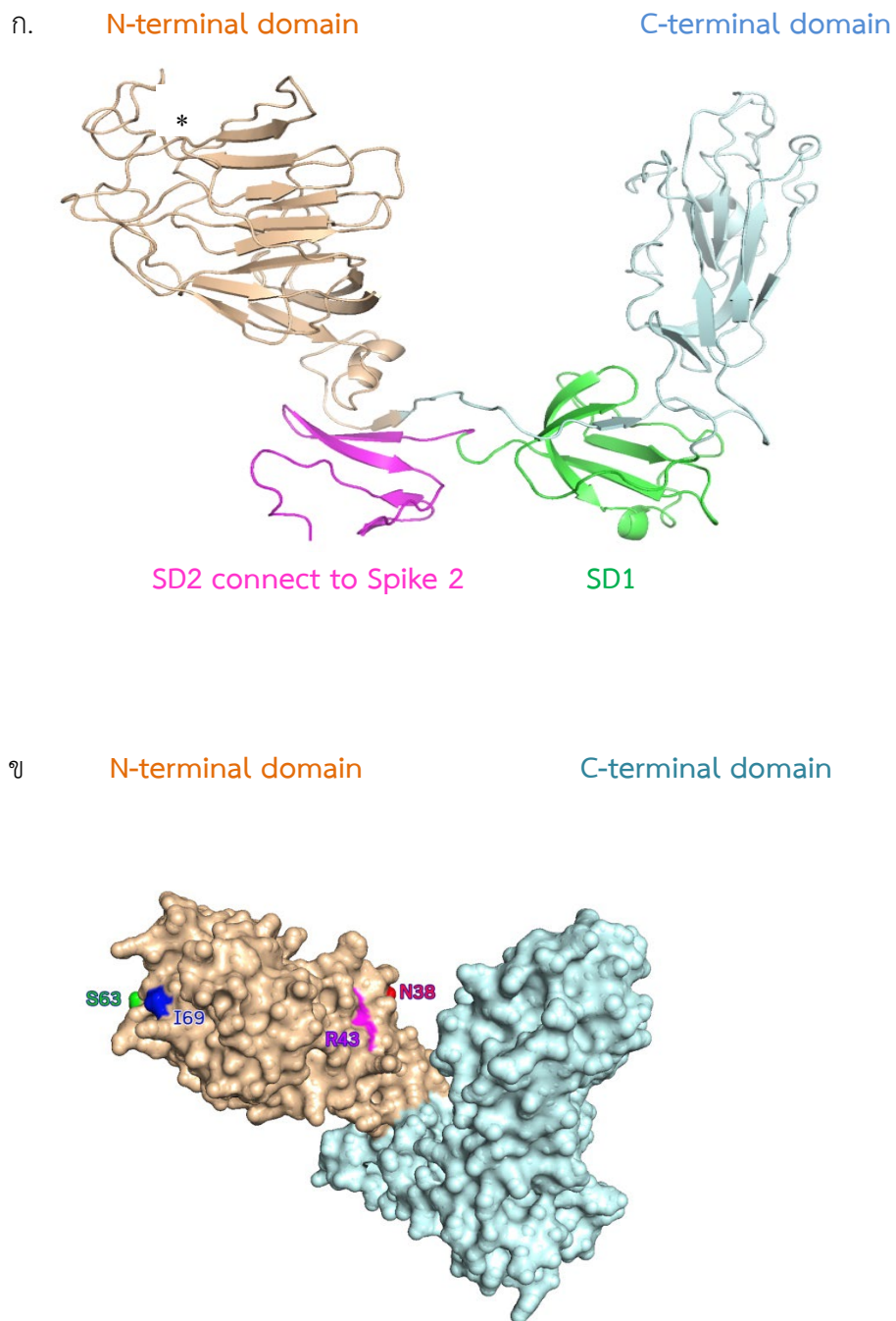


รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ complete S1 gene ระหว่างไวรัสโคโรนาโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันของกรมปศุสัตว์และ IBV reference strains, 7 Thai IBVs isolated. สร้างโดยโปรแกรม MEGA v.6.0 โดยใช้ Neighbor-joining method; p-distance model, 1,000 bootstrap replicates โดยแสดงผลค่าbootstrap ด้วยตัวเลขตั้งแต่ 70

■ วัคซีนกรมปศุสัตว์ (EU589323.1 DLD)

● IBV 3 Thai isolated: GQ503617 IBV THA 90151 Group 1, GQ503616.1 IBV THA80151 Group 2 และ GQ885131.1 IBV isolate THA 241251/Mass

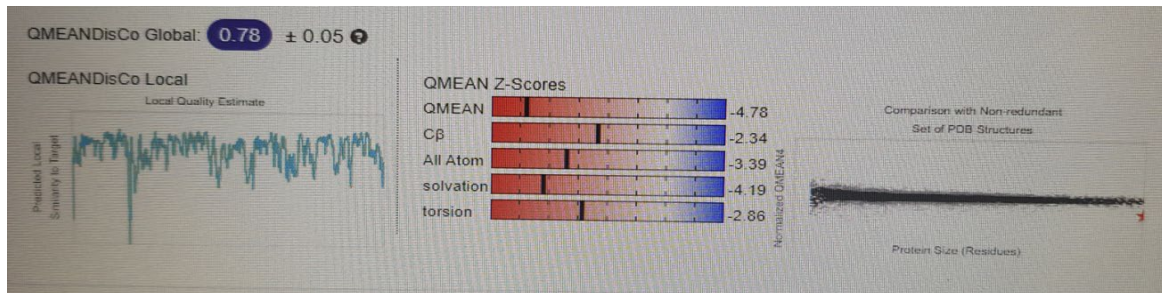
◆ IBV 4 Thai isolated: IBV Saraburi - GI Line 19, IBV Chonburi GI – 1, IBV Prachinburi และ IBV Petchabun



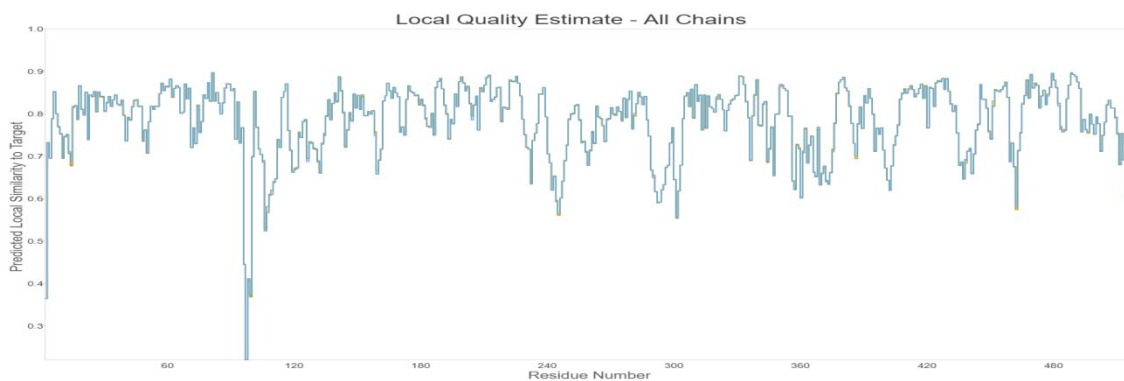
รูปที่ 6 แสดงโครงสร้าง S1protein IBV วัคซีนกรมปศุสัตว์สร้างโดยวิธี homology modeling

- ก. แสดง 3-D structure monomeric S1protein ประกอบด้วย N-terminal และ C-terminal และ subdomain SD1,SD2 * partial ceiling
- ข. แสดง critical amino acid residues ตำแหน่งที่ 38, 43, 63 และ 69 (แดง ม่วง เขียว น้ำเงิน) ทำหน้าที่สำคัญในการจับกับเนื้อเยื่อทางเดินหายใจ

ก. คะแนนโดยรวมจากการประเมินแบบจำลอง

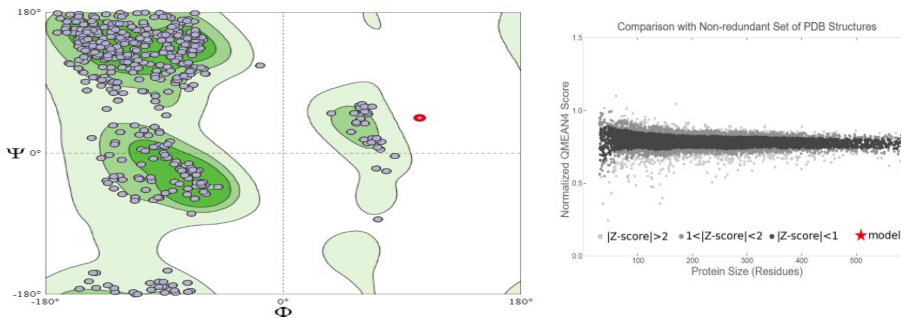


ข. ค่า QMEANSDisCo Local



ค. Ramachandran plot (Ramachandran *et al.*, 1963)

ง. QMEAN4 Score



รูปที่ 7 ประเมินโครงสร้างสามมิติของโปรตีน S1 เชื้อ IBV กรมปศุสัตว์

ก. ภาพรวม QMEANDisCo Global มีค่า 0.78 ± 0.05

ข. เส้นกราฟจำนวนกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นโปรตีน S1 ค่าคะแนนที่ได้ของกรดอะมิโนแต่ละตัวควร > 0.6

ค. Ramachandran plot จุดสีม่วงคือกรดอะมิโนของ IBV กรมปศุสัตว์แต่ละจุดคือกรดอะมิโนหนึ่งตัวซึ่งถูกจัดเรียงลงตามแต่ละ Quadrant ตามมุม Psi และ Phi บ่งบอกถึงโครงสร้าง alpha helix, Beta sheet

ง. QMAEN4 Score ★ คือตำแหน่งของแบบจำลองที่สร้างขึ้นมามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน $1 < Z\text{-score} < 2$ เทียบกับจุดต่างๆคือโปรตีนทั้งหมดในฐานข้อมูล

Characterization of Department of Livestock Development infectious bronchitis vaccine

Noppakun Moolsin¹

Kanita Bhasathiti¹

Abstract

This study aims to explore and characterize the seed virus history, which has been used for an infectious bronchitis vaccine produced by the Department of Livestock Development so far. The shape and size of the virus were visualized by transmission electron microscopy, and bioinformatics data was analyzed. The three-dimensional structure of spike1 protein was predicted by homology modeling. Lastly, a uniform, informative system was proposed for naming the infectious bronchitis vaccine strain. The result showed that the Infectious bronchitis virus particle was spherical with 60-80 nanometers in size, and BLAST search revealed 87.76 % nucleotide identity and 85.69 % amino acid identity to LSD/501 virus with RRSRR cleavage recognition site. Phylogenetic tree constructed by neighbor-joining and maximum likelihood methods disclosed genetically closed relation to infectious bronchitis virus which belonged to Genotype I lineage 25; however, whole-genome sequencings should be further studied. The 3-D spike1 protein homology modeling showed that the N-terminal domain contained four critical amino acid residues required to bind tracheal tissue, similar to infectious bronchitis H120 vaccine and M41 strain.

In summary, seed characterization and bioinformatics data analysis revealed that the infectious bronchitis vaccine produced by the Department of Livestock Development is a local strain, sizing 60-80 nanometers, classified to genotype I lineage 25, genetic close to LSD/501, S1 protein structure like IBV H120 and M41. Finally, it should be named IBV DLD strain (TH/GI-25, DLD/S/54)

Keywords: Seed history, Infectious bronchitis vaccine, Phylogenetic tree, 3-D homology modeling

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhon Ratchasima 30130