

จุฑารัตน์ ลิขจันทร 2551: การพัฒนาเชื้อไวรัสวัคซีนไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยเทคนิค reverse genetics (rg H5N1) ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม) สาขาพันธุ์วิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิงพรทิพา เล็กเจริญสุข, Ph.D.

77 หน้า

การผลิตวัคซีนป้องกันโรคไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากไวรัสธรรมชาติ ประสบปัญหาเนื่องจากไวรัสทำให้ไข่ไก่ฟักตายก่อน 24 ชั่วโมงทำให้ได้ผลผลิตต่ำ ส่วนวัคซีนที่ผลิตจากไวรัสชนิด H5 แต่เป็นสายพันธุ์อื่น (heterologous) มักจะให้ภูมิคุ้มกันไม่เต็มที่ การศึกษาครั้งนี้เป็นการใช้เทคนิค reverse genetics ในการสร้าง seed virus vaccine โดยการโคลนยีน HA และ ยีน NA จาก HPAI H5N1 และยีนอีกหกท่อนจาก swine influenza A virus (H1N1) จะถูกใช้เป็นยีนแกนหลักทำการดัดแปลงยีน HA โดยทำการกำจัดส่วนของ polybasic amino acids บริเวณ cleavage site เพื่อลดความรุนแรงในการก่อโรค หลังจากนั้นทำการโคลนแต่ละยีนเข้าไปยังพลาสมิดที่แสดงออกได้สองทิศทาง (pDZ) และทำการสร้าง reassortant โดยใช้ พลาสมิด pDZ ที่มียีน HA ที่ผ่านการดัดแปลงแล้วและพลาสมิด pDZ ที่มียีน NA ของ HPAI H5N1 และ ยีน PB2, PB1, PA, NP, M และ NS ของ SIV H1N1 นำพลาสมิดทั้งสองอันเข้าเซลล์ผสมระหว่างเซลล์ 293T และ Madin-Darby Kidney (MDCK) อนุภาคไวรัส (rg H5N1) ที่เก็บจากสารละลายเหนือเซลล์ (supernatant) สามารถทำให้ไข่ไก่ฟักอายุ 10 วันติดเชื้อ ผลของการเพิ่มปริมาณสายพันธุ์กรรมทั้งแปดท่อนด้วย RT-PCR พบว่าไวรัสมีครบทั้ง 8 ท่อน และประกอบด้วยยีน HA ที่ผ่านการดัดแปลงแล้วซึ่งไม่มี polybasic amino acid และยีน NA ของ HPAI H5N1 และ ยีน PB2, PB1, PA, NP, M และ NS ของ swine influenza virus (SIV) H1N1 ตามที่ต้องการ ไวรัสที่ได้จาก allantoic fluid มีไตเตอร์ 2×10^9 TCID₅₀/ml นอกจากนี้ไวรัสที่ได้สามารถทำให้เซลล์ MDCK ติดเชื้อและสามารถยืนยันการติดเชื้อได้ด้วยวิธี immunofluorescent test และการที่ไวรัสสามารถทำให้เกิด plaque ได้นั้นต้องอาศัย trypsin ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถพัฒนา seed virus สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ได้เป็นผลสำเร็จ