

รายงานการวิจัย

การทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอวัคซีนในภาคสนามเพื่อควบคุมโรคพรีอาร์อาร์เอส

A field trial evaluating the efficacy of DNA vaccine in PRRSV control

โดย
คณะผู้วิจัย

เดชฤทธิ์	นิลอุบล	(หัวหน้าโครงการ)
อังคณา	ตันติธวัช	(นักวิจัย)
ธิติมา	ไตรพิพัฒน์	(นักวิจัย)
นายอรรถพล	มาดาป๋อง	(นักวิจัย)

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557
(ผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของคณะผู้วิจัยแต่ผู้เดียว)

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2557

ทีมผู้วิจัยขอขอบพระคุณฟาร์มสุกรในเครือบริษัทมิตรภาพโภคภัณฑ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากฟาร์มสุกรเพื่อดำเนินการวิจัย ตลอดจน ญ.ดร. จิตติมา พิริยะพงศา และนางสาวปาวิตา ทิพย์สมบัติบุญ จากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนานิวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ช่วยอนุเคราะห์ในด้านวิเคราะห์ข้อมูล และบุคลากรภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรอื่นๆ ในหน่วยฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

บทคัดย่อ

การดำเนินงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส โดยดีเอ็นเอต้นแบบที่ผลิตขึ้นมีส่วนประกอบของยีน ORF5 ของไวรัสพาร์อาร์เอสที่มีการแทรกยีน PADRE ระหว่าง decoy epitope และ neutralizing epitope และศึกษาประสิทธิภาพของดีเอ็นเอวัคซีนต้นแบบนั้นในการกระตุ้นสร้าง neutralizing antibody แบ่งการวิจัยออกเป็น 3 ส่วนประกอบด้วย การผลิตดีเอ็นเอวัคซีน การทดสอบขนาดที่ใช้และการทดสอบประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งโดยวัดจาก serum neutralization และ lymphocyte proliferative assays ในภาคสนาม ผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอวัคซีนที่พัฒนาขึ้นสามารถกระตุ้นสร้างแอนติบอดีและกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์เมื่อวัดโดยวิธี serum neutralization และ lymphocyte proliferative assays แต่ผลการตอบสนองช้าและไม่สูง ดังนั้นจึงอาจต้องดำเนินการวิจัยต่อเพื่อพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีนให้มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น

ABSTRACT

The objectives of the study were to develop a DNA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome. The DNA vaccine was developed using ORF5 gene. PADRE was inserted into positions between decoy and neutralizing epitopes. The study was divided into 3 parts including the development and production of the plasmid DNA, dosage determination and a field trial. The results of the study demonstrated that the plasmid DNA was successfully developed and produced. However, the immune responses induced as measured by serum neutralization and lymphocyte proliferation assay were low and delayed. In conclusion, although the DNA vaccine was successfully developed, the further development including the aspects of increased robust and higher magnitude of immune response is needed.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป	7
ฟาร์มทดลอง	7
การเก็บตัวอย่างซีรัม	7
การตรวจสอบไวรัสและการถอดรหัสพันธุกรรมยีนโออาร์เอฟห้า และ Nsp2	8
วิเคราะห์ข้อมูล	9
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	9
ขอบเขตของโครงการวิจัย	9
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	10
วิธีดำเนินงานวิจัย	18
การดำเนินงานวิจัย	18
ฟาร์มดำเนินการวิจัย	18
การเก็บตัวอย่างซีรัม	20
การตรวจสอบไวรัส	21
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เลสReverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)	21
การถอดรหัสพันธุกรรมยีน ORF5 และ Nsp2	23
การวิเคราะห์ข้อมูล	24
ผลการทดลอง	25
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมส่วนยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสภายในฟาร์ม	25
จำนวนตัวอย่าง	25
วิเคราะห์ยีนส่วนโออาร์เอฟห้า โดยแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ	27
การจัดกลุ่มของไวรัสและการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม	34
การเปลี่ยนแปลงไวรัสภายในฝูง (Dynamic of PRRSV in a herd)	35
การผสมสารพันธุกรรมระหว่างไวรัส(Recombination)	37
วิเคราะห์ยีนส่วน Nsp2 บางส่วน	39

เรื่อง	หน้า
เอกสารอ้างอิง	41
วิจารณ์และสรุปผล	44
ผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย	49
ภาคผนวก	50
1. ลำดับกรดอะมิโนของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป	50

2. ลำดับกรดอะมิโนของยีนโนอาร์เอฟห้ำของเชื้อไวรัสฟิอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ	51
3. ลำดับกรดอะมิโนของยีน Nsp2 บางส่วนของเชื้อไวรัสฟิอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ	54

สารบัญตาราง (List of Contents)

ตารางที่	หน้า
1. แสดงจำนวนไวรัสที่แยกในแต่ละครั้งในแต่ละคลัสเตอร์ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป	26
2. แสดงจำนวนไวรัสที่แยกในแต่ละครั้งในแต่ละคลัสเตอร์ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ	26
3. แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์ (ตัวอักษรธรรมดา) และกรดอะมิโน (ตัวอักษรเอียงเข้ม) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป	32
4. แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์ (ตัวอักษรธรรมดา) และกรดอะมิโน (ตัวอักษรเอียงเข้ม) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ	33
5. แสดงตำแหน่งการเกิด N-linked glycosylation ของไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือในคลัสเตอร์ต่างๆ	35

สารบัญภาพ (List of Illustration)

รูปที่	หน้า
1. แผนภูมิต้นไม้แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของยีนส่วน ORF5 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ ยุโรปที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือทั่วโลก และคลัสเตอร์จำเพาะของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสที่แยกได้ในประเทศไทยแบ่งออกได้เป็นคลัสเตอร์ I (สีแดง) และคลัสเตอร์ II (สีน้ำเงิน)	5
2. แผนภูมิต้นไม้แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของยีนส่วน ORF5 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือทั่วโลก และคลัสเตอร์จำเพาะของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสที่แยกได้ในประเทศไทยแบ่งออกได้เป็นคลัสเตอร์ I-IV และคลัสเตอร์ II เป็นกลุ่มของเชื้อไวรัสที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง	6
3. แสดงแผนผังฟาร์มที่ดำเนินการวิจัย	19
4. แสดงแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพาร์ อาร์เอสสายพันธุ์สายพันธุ์ยุโรป ที่แบ่งไวรัสออกเป็น 2 คลัสเตอร์ประกอบด้วยคลัสเตอร์ 1 และ 2	29
5. แสดงแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์สายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แบ่งไวรัสออกเป็น 4 คลัสเตอร์ประกอบด้วยคลัสเตอร์ 1 2 3 และ 4	31
6. การเกิดขนาดของแต่ละกลุ่มไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (EU, genotype 1) และอเมริกาเหนือ (US, genotype 2) ในแต่ละเดือน	36
7. การผสมข้ามสายของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในคลัสเตอร์ที่ 2 ที่เป็นไวรัสพาร์ อาร์ เอสสายพันธุ์รุนแรงและไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 1	38
8. แสดงการผสมข้ามสายของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในคลัสเตอร์ที่ 1 และ 4	38
9. แสดงแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีนNsp2 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์	40