

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงไวรัสโรตา สายพันธุ์วัคซีนเพื่อใช้เป็นไวรัสอ้างอิงสำหรับ การประเมินค่าความแรงของวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์ สุกัลยาณี ไชยมี ภูริต ทรงธนินิตย์ และสุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วัคซีนป้องกันโรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรตา อาจถูกบรรจุเข้าในแผนการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติในอนาคต เพื่อลดอัตราการตายของทารกและเด็กเล็กที่เกิดจากโรคอุจจาระร่วง จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการควบคุมคุณภาพวัคซีน เพื่อให้แน่ใจในความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัคซีน ในการนี้จำเป็นต้องเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียว เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของวัคซีนในห้องปฏิบัติการ ในการศึกษานี้ได้หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวโดยให้ติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ trypsin ที่แตกต่างกัน และศึกษาการเก็บไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่ถูกติดเชื้อในสภาวะต่างๆ คือหลังถูกแช่แข็งและละลายจำนวน 1 ครั้ง 2 ครั้ง และ 3 ครั้ง ตามลำดับ เทียบกับการเก็บไวรัสโดยตรงจากน้ำเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่ถูกติดเชื้อเพื่อนำสภาวะที่เหมาะสมมาเตรียมและกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียว ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้น $7.5 \mu\text{g/ml}$ trypsin/washing medium ทั้งใน titration medium และ maintenance medium สามารถเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 และเก็บไวรัสแบบแช่แข็งและละลายเพียงครั้งเดียวเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวเนื่องจากให้ค่าความแรงของไวรัสโรตาสูงที่สุด เป็น $7.93 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร กับค่าพิสัยอยู่ในช่วง $7.46-8.40 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร และค่าที่ได้แต่ละค่าจากผู้วิเคราะห์ 3 ราย มีความแตกต่างไม่เกิน $0.5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร จึงสรุปได้ว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการนี้สามารถนำมาใช้เป็นไวรัสอ้างอิงในการควบคุมคุณภาพวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

บทนำ

วัคซีนป้องกันโรคอุจจาระร่วงโรตา หรือวัคซีนไวรัสโรตา (Rotavirus vaccine) ได้ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548⁽¹⁾ วัคซีนนี้เป็นไวรัสโรตาเชื้อเป็นชนิดรับประทาน สามารถให้โดยการหยอดกินทางปาก วัคซีนไวรัสโรตาที่ใช้ในประเทศและทั่วโลกอย่างแพร่หลายมี 2 ชนิด คือ Monovalent human rotavirus vaccine สายพันธุ์ P1A [8]G1 เป็นวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยว และ Multivalent human-bovine rotavirus reassortant vaccine ซึ่งเป็นวัคซีนไวรัสโรตาต่อหลายซีโรทัยป์เนื่องจากเป็นไวรัสลูกผสม (reassortant) ที่มีโปรตีนชั้นนอก G1, G2, G3 และ G4 ที่ได้จากไวรัสโรตาของคน และ P protein ชนิด P7 [5] ได้จากไวรัสโรตาของวัว⁽¹⁾ เมื่อปี พ.ศ. 2553 ประเทศไทยได้ทดลองให้วัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยว (monovalent vaccine) ในเด็กอายุต่ำกว่า 6 เดือน จำนวน 15,000 คน ในระยะเวลา 3 ปี โดยมีจังหวัดสุโขทัยเป็นจังหวัดนำร่อง ขณะนี้ยังไม่ทราบผลการทดลอง หากผลการให้วัคซีนเป็นที่น่าพอใจ คาดว่าในปี พ.ศ. 2558 จะบรรจุวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเข้าในแผนการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติ เพื่อลดอัตราการป่วยของเด็กไทยจากโรคอุจจาระร่วงซึ่งสูงถึงปีละกว่า 1 แสนราย⁽²⁾ และมีความเป็นไปได้ที่จะมีการนำวัคซีนไวรัสโรตามาใช้ในอนาคตอันใกล้นี้ ดังนั้นการควบคุมคุณภาพวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวทุก lot ที่นำเข้ามาใช้ในประเทศจึงมีความสำคัญ⁽³⁾ โดยเฉพาะค่าความแรงของวัคซีนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อประสิทธิภาพของวัคซีน และวัคซีนแต่ละชนิดมีการกำหนดค่าความแรงที่แตกต่างกัน ซึ่งการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนทุกชนิดต้องดำเนินการควบคุมไปกับวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานทุกครั้ง ซึ่งอาจใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสากลที่องค์การอนามัยโลกผลิต⁽⁴⁾ แต่เนื่องจากวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสากลสำหรับวัคซีนโรตานั้นยังไม่มีการผลิต จึงเป็นหน้าที่ของหน่วยควบคุมกำกับภาครัฐในแต่ละประเทศต้องจัดหาหรือจัดเตรียมขึ้น เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนดังกล่าวในห้องปฏิบัติการ การศึกษานี้ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไวรัสอ้างอิงสำหรับวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวโดยการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงจากการทบทุนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของไวรัสโรตาในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าต้องอาศัย trypsin ช่วยกระตุ้นในการติดเชื้อ⁽⁵⁻⁷⁾ จึงได้ทดลองให้ไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณความเข้มข้นของ trypsin ที่แตกต่างกัน รวมทั้งศึกษาการเก็บไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่ติดเชื้อในสภาวะต่างๆ หลังถูกแช่แข็งและละลายจำนวน 1 ครั้ง 2 ครั้ง และ 3 ครั้ง เทียบกับการเก็บไวรัสโดยตรงจากน้ำเลี้ยงเซลล์ แล้วจึงทำการจัดเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวและทำการกำหนดค่าความแรงขึ้น เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวในห้องปฏิบัติการต่อไป

วัสดุและวิธีการ

วัคซีน

นำวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวจากผู้ผลิตที่นำเข้ามาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งผู้ผลิตกำหนดค่าความแรงของวัคซีนโรตาต้องไม่น้อยกว่า $6 \log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{dose}/1.5$ มิลลิลิตร

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยง MA104 (CCT WLB1998/12cell bank) ซึ่งมีกำเนิดจาก African green monkey foetal kidney ซึ่งมีความจำเพาะต่อไวรัสโรตา⁽⁸⁾ ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ผลิต

แอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2C9 ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียวสำหรับใช้ในการย้อมเซลล์ติดเชื้อโดยใช้เทคนิค immunoperoxidasestaining⁽³⁾ ได้รับความเอื้อเฟื้อจากผู้ผลิต

อาหารเลี้ยงเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Minimum (DMEM) (Cat. No.31660-026, Gibco) ที่มี 2% ซีรัมจากลูกวัว (fetal bovine serum, Cat. No. 26140-079, Gibco), 1% L-glutamine (Cat.No. G-3126, Sigma), 7.5% NaHCO₃ (Cat.No.S-5716, Sigma) 3%, 1% Penicillin (10,000 units/มิลลิลิตร) (Cat.No.P-3032, Sigma) 1% Streptomycin (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (Cat.No.S-9137, Sigma) และ 1% 1M HEPES (Cat.No.H-6147, Sigma)

น้ำยาเพื่อใช้ล้างเซลล์ในการทดสอบ (washing medium) เตรียมโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกวัว

อาหารเลี้ยงเชื้อไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว (virus growth medium/titration medium)

อาหารเลี้ยงเชื้อไวรัสโรตา (titration medium) เตรียมโดยเติม trypsin (Cat.No.27250-018, Gibco) ความเข้มข้นต่างๆ กันลงไปใน washing medium ใช้ในช่วงการกระตุ้นไวรัสและให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์

อาหารเลี้ยงเชื้อไวรัสโรตา (maintenance medium) ใช้ในช่วงของการบ่มเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

ผลของ trypsin ต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียวในเซลล์เพาะเลี้ยง

นำวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียวมาเจือจางใน titration medium อัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 50-60 นาที เป็นการกระตุ้นไวรัสโรตา จากนั้นเติมลงในฟลาสค์ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 เจริญอยู่ 80-95% ปริมาตร 1 มล./ฟลาสค์ 175 cm² อัตราส่วนของไวรัสต่อเซลล์เป็น 0.01 โดยประมาณ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมงเพื่อให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ ในขั้นตอนนี้ titration medium ที่ใช้จะมีความเข้มข้นของ trypsin แตกต่างกันไปเป็น 3 สภาวะ ดังนี้ 7.5 µg/ml trypsin/washing medium, 0.75 µg/ml trypsin/washing medium และ 0.375 µg/ml trypsin/washing medium เมื่อครบเวลาเติม maintenance medium ปริมาตร 10-15 มล. แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% CO₂ นาน 4 วัน ขั้นตอนนี้ maintenance medium ที่ใช้มี 3 สภาวะ คือ titration medium, washing medium ที่เติม 1% ของซีรัมจากลูกวัว และ washing medium เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

การเก็บไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียวในสภาวะต่างๆ

หลังการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์นาน 4 วัน จะเกิดการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงประมาณ 80-90% เก็บ (harvest) ไวรัสใน 4 สภาวะ คือ 1) เก็บไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง โดยดูดทั้ง maintenance medium และเซลล์ที่ติดเชื้อจากฟลาสค์ไปปั่นที่ 3,000 รอบ นาน 10 นาที และเก็บส่วนใสที่มีไวรัสไว้ 2) เก็บไวรัสหลังการแช่แข็งและละลาย (freeze-thaw) 1 ครั้ง ทำโดยการนำฟลาสค์ที่ติดเชื้อไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นาน 1 วันแล้วนำมาละลาย 1 ครั้ง (1F-T) ดูดทั้ง maintenance medium และเซลล์ที่ติดเชื้อไปปั่นที่ 3,000 รอบ นาน 10 นาที และเก็บส่วนใสที่มีไวรัสไว้ 3) เก็บไวรัสหลังการแช่แข็งและละลาย 2 ครั้ง โดยทำเหมือนข้อ 2) แต่นำฟลาสค์ที่ติดเชื้อไวรัสไปแช่แข็งและนำมาละลายจำนวน 2 ครั้ง (2 F-T) 4) เก็บไวรัสหลังการเก็บแช่แข็งและละลาย 3 ครั้ง โดยทำเหมือน

ข้อ 2) แต่นำพลาสติกที่ติดเชื้อไวรัสไปแช่แข็งและนำมาละลายจำนวน 3 ครั้ง (3F-T) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

การประเมินค่าความแรงของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 จำนวน 2.0×10^5 เซลล์ในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรในเพลทชนิด 96 หลุม นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์จากนั้นนำวัคซีนตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสโรตาอ่อนฤทธิ์มากระตุ้นด้วย trypsin ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเจือจางไวรัสเป็น 1:10 ใน titration medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 50-60 นาที ในสภาวะที่มี trypsin จากนั้นเจือจางไวรัสแต่ละชั้นเป็น 1:10^{0.5} โดยเริ่มที่ระดับความเจือจาง 10^{-3.0} - 10^{-7.5} ด้วย titration medium โดยก่อนเติมวัคซีนตัวอย่างในแต่ละความเจือจาง ล้างเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ในเพลท 96 หลุม ด้วย washing medium ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/หลุม 2 ครั้ง เพื่อเอาซีรัมที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เนื่องจากซีรัมจะหยุดการทำงานของ trypsin จากนั้นดูด washing medium ออกประมาณ 0.18 มิลลิลิตร ก่อนเติมวัคซีนตัวอย่างในแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/หลุม ความเจือจางละ 8 หลุม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์นาน 6 วัน จากนั้นล้างเพลทด้วย washing medium ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/หลุม จำนวน 1 ครั้งแล้ว fix เซลล์ด้วย 80% acetone ที่แช่เย็นทิ้งให้เพลทแห้ง จากนั้นย้อมหาปริมาณแอนติเจนของ rotavirus ด้วยวิธีimmunoperoxidasestaining⁽⁹⁾ โดยเติม monoclonal antibody 2C9 ที่เจือจาง 250 เท่า ด้วย 5% skimmed milk (Cat.No.70166, Fluka) ใน PBS- ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/หลุมลงในเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมงจากนั้นล้างเพลท 4 ครั้ง ด้วย PBS- และเติม anti-mouse IgG-peroxidase (Cat. No. 12-349, Millipore) ที่เจือจาง 400 เท่า ซึ่งได้จากการหาค่าความเจือจางที่เหมาะสมโดยใช้ 5% skimmed milk (Cat. No.70166, Fluka) ใน PBS- ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงจากนั้นล้างเพลท 4 ครั้งด้วย PBS- ก่อนเติม 0.05 มิลลิลิตร/หลุมของสารละลายที่มี 3,3'-Diaminobenzidine tablet (DAB) และ urea hydrogen peroxide tablet อย่างละ 1 เม็ด (Cat. No. D4418, Sigma) ในน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที และล้าง 3 ครั้ง ด้วยน้ำประปา อ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยนับจำนวนหลุมที่มีเซลล์ติดสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากการที่เซลล์ติดเชื้อไวรัสโรตา นำจำนวนหลุมที่ให้ผลบวกมาคำนวณหาค่าความแรงหรือปริมาณไวรัสโรตาทั้งหมด มีหน่วยเป็น Cell culture infective dose 50% (CCID₅₀) 1.5 มิลลิลิตร

การกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวที่เตรียมขึ้น

ประเมินค่าความแรงของไวรัสอ้างอิงมาตรฐานไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียวที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็น in-house reference standard โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย

การคำนวณค่าความแรง

คำนวณค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ โดยใช้สูตรที่ดัดแปลงมาจาก Kaber⁽¹⁰⁾ ดังนี้

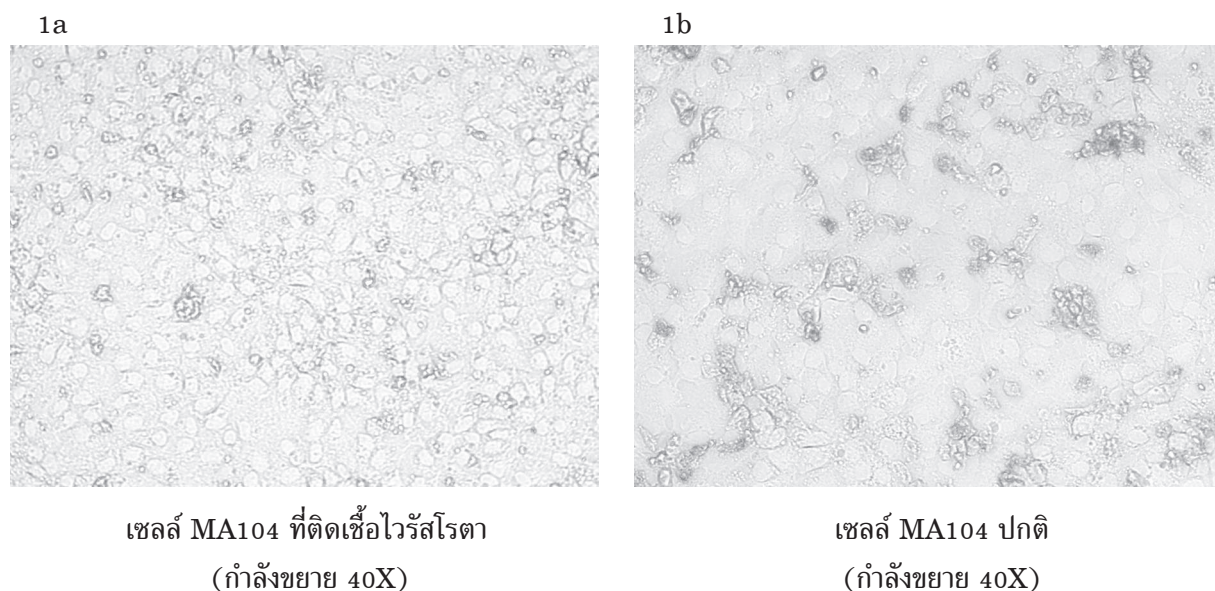
$$\text{Log}_{10}\text{CCID}_{50} = - \text{ส่วนกลับของความเจือจางต่ำสุดที่ใช้} + \left[\frac{\left[\sum \text{จำนวนหลุมทั้งหมดที่มี CPE} - 0.5 \right] \times 0.5}{\text{จำนวนหลุมในแต่ละความเจือจาง}} \right]$$

คำนวณค่าความแรงที่ได้ในรูปของ CCID₅₀/50 ไมโครลิตรและรายงานผลเป็น CCID₅₀/โดส/1.5 มิลลิตร ค่าความแรงที่ได้ในแต่ละครั้งที่ทดสอบต้องมีความแตกต่างกันไม่เกิน 0.5 log₁₀CCID₅₀

ผล

ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังการติดเชื้อด้วยไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียว

ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 หลังการติดเชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียว โดยสังเกตเห็นเซลล์เริ่มมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปที่เรียกว่า cytopathic effect (CPE) หลังการติดเชื้อนาน 4 วัน เมื่อย้อมสัด้วยวิธี immunoperoxidase จะเห็นสีน้ำตาลภายในเซลล์ (ภาพที่ 1 a) ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะไม่เห็นในเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 1 b) ที่ไม่ติดเชื้อที่กำลังขยาย 40x



ภาพที่ 1 ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ภายหลังการติดเชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียว (1a) เทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ปกติ (1b)

ผลของ **trypsin** ต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวในเซลล์เพาะเลี้ยง

จากผลการศึกษาพบว่าการใช้ trypsin ที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 7.5 µg/ml trypsin/ washing medium ในช่วงการให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์โดย titration medium และช่วงการเพิ่มจำนวนไวรัสโดย maintenancemedium ให้ปริมาณไวรัสสูงที่สุดคือ 6.86 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร ในขณะที่ปริมาณไวรัสลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้น trypsin ที่ 0.75 µg/ml trypsin/washing medium (4.05 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร) และ 0.375 µg/ml trypsin/washing medium (3.86 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร) ในสภาวะที่ 7.5 µg/ml trypsin/washing medium แต่ในอาหาร maintenancemedium เป็น washing medium ที่เติม 1% ของซีรัม และ washing medium จะให้ปริมาณไวรัสเท่ากับ 3.93 และ 4.30 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้ที่ 0.75 µg/ml trypsin/washing medium และ 0.375 µg/ml trypsin/washing medium ในอาหาร maintenancemedium เป็น washing medium ที่เติม 1% ของซีรัม และ washing medium คือ 4.05, 3.80, 4.55 และ 4.24 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของ trypsin ต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวในเซลล์เพาะเลี้ยง

Titration medium	สถานะของอาหาร Maintenance medium	ค่าเฉลี่ยของ virus titer (log ₁₀ CCID ₅₀ /1.5 ml)
7.5 µg/mltrypsin/ washing medium	7.5 µg/mltrypsin/washing medium	6.86
	washing medium+ 1% FBS	3.93
	washing medium	4.3
0.75 µg/mltrypsin/ washing medium	0.75 µg/mltrypsin/washing medium	4.05
	washing medium+ 1% FBS	4.05
	washing medium	3.8
0.375 µg/mltrypsin/ washing medium	0.375 µg/mltrypsin/ washing medium	3.86
	washing medium+ 1% FBS	4.55
	washing medium	4.24

การเปรียบเทียบปริมาณไวรัสจากการเก็บไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวในสถานะต่าง ๆ

จากการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวในเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ในสถานะที่ความเข้มข้น trypsin เป็น 0.75 µg/ml trypsin/washing medium และเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีไวรัสโดยวิธีที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ คือ 1) เก็บโดยตรง 2) 1F-T 3) 2F-T และ 4) 3F-T ผลการทดลองพบว่าในสถานะการทดลอง 3 ซ้ำที่เป็นอิสระแก่กันโดยผู้วิเคราะห์ 3 ราย การเก็บไวรัส โดยตรงให้ค่าปริมาณไวรัสเฉลี่ยเท่ากับ 6.68 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร ซึ่งต่ำกว่าปริมาณไวรัสที่ได้จากการเก็บโดยวิธี 1F-T และวิธี 3F-T ที่ให้ปริมาณไวรัสเฉลี่ยเท่ากัน คือ 6.97 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดย One-Way ANOVA (p < 0.05) เช่นเดียวกับปริมาณไวรัสที่เก็บโดยวิธี 2F-T คือ 106.47 CCID₅₀/1.5 ml (p < 0.05) และการเก็บโดยวิธี 2F-T ให้ค่าความแรงที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการจัดเก็บไวรัสโดยวิธี 1F-T และวิธี 3F-T (p < 0.05) การเก็บโดยวิธี 1F-T และวิธี 3F-T ให้ปริมาณไวรัสเฉลี่ยมากที่สุด ดังนั้นเพื่อลดเวลาการเก็บวัคซีนไวรัสลงจะใช้วิธี 1F-T มาเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวอ้างอิงเพื่อนำมาใช้เป็น in-house reference standard ในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบปริมาณไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวจากการเก็บไวรัสในสถานะต่าง ๆ

สถานะการจัดเก็บไวรัส	virus titer (log ₁₀ CCID ₅₀ /1.5 ml)			
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	G.M.
เก็บโดยตรง	6.74	6.68	6.61	6.68
1F-T *	6.99	6.8	7.11	6.97
2F-T	6.49	6.49	6.43	6.47
3F-T *	7.05	6.99	6.86	6.97

การเก็บไวรัสหลังการแช่แข็งและละลาย (freeze-thaw) 1 ครั้ง 1F-T* และเก็บไวรัสหลังการแช่แข็งและละลาย (freeze-thaw) 3 ครั้ง 3F-T* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดย One-Way ANOVA (p>0.05)

การกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ

เมื่อนำไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้เป็นไวรัสอ้างอิงในห้องปฏิบัติการ (in-house reference) มาหาค่าความแรงโดยผู้ปฏิบัติ 3 ราย ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จำนวน 2 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน ค่าความแรงเฉลี่ยของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่เตรียมในห้องปฏิบัติการจากผู้ปฏิบัติ 3 ราย เท่ากับ 8.03, 7.86 และ 7.88 $\log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5 \text{ ml}$ ($n = 3$) โดยมีค่าความแรงรวมเฉลี่ย ($n = 18$) เท่ากับ 7.93 $\log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิตร เมื่อนำมาหาค่าพิสัย (G.M. $\pm$ 3SD) มีค่าเท่ากับ 7.46- 8.40 $\log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้น

ค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้น ในห้องปฏิบัติการ โดยผู้สอบเทียบ 3 ราย ($\log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5 \text{ ml}$)		
รายชื่อ 1 ($n = 6$)	รายชื่อ 2 ($n = 6$)	รายชื่อ 3 ($n = 6$)
8.05, 7.99, 8.11	7.74, 8.05, 7.80	7.74, 7.93, 7.68
8.11, 7.99, 7.93	8.05, 7.86, 7.68	7.99, 8.18, 7.80
G.M. = 8.03	G.M. = 7.86	G.M. = 7.88
SD = 0.07	SD = 0.16	SD = 0.18
G.M. รวม = 7.93		
SD รวม = 0.16		
G.M. $\pm$ 3SD = 7.46- 8.40		

วิจารณ์

ไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวจะทำให้เซลล์ MA104 เกิด CPE ในระยะเวลา 4-6 วัน ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้เมื่อย้อมหาแอนติเจนของไวรัสที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี immunoperoxidase จากการทบทวนวรรณกรรมไวรัสโรตาจะติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ดีต้องอาศัย trypsin ในการช่วยให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น⁽⁵⁻⁷⁾ จึงทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้น trypsin พบว่าการใช้ 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin/washing medium ทั้งใน titration medium และ maintenance medium ได้ค่าปริมาณไวรัสสูงสุด 6.86 $\log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิตร ส่วนที่สภาวะอื่นๆ ที่ลดความเข้มข้น trypsin ลง 10 และ 20 เท่า (0.75 μg , 0.375 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin) ทั้งใน titration medium และ maintenance medium ปริมาณไวรัสที่ได้จะลดลงและมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าความเข้มข้น trypsin มีส่วนสำคัญมากในการส่งเสริมการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาในการทดลองนี้จึงใช้ 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin/washing medium เป็นสภาวะเหมาะสมของอาหารที่ใช้เพิ่มจำนวนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวในเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 สอดคล้องกับที่มีการศึกษามาก่อนคือใช้ความเข้มข้น trypsin ระหว่าง 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ⁽⁵⁻⁷⁾

วิธีการจัดเก็บไวรัสก็เป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่มปริมาณไวรัสให้มากขึ้นการศึกษานี้ได้ทดลองหาสภาวะการเก็บไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวที่เหมาะสมใน 4 สภาวะ ผลการทดสอบพบว่าวิธีการเก็บโดยการแช่แข็งและละลายเพียง 1 ครั้ง ก็เพียงพอต่อการเก็บไวรัสโรตาอีกทั้งยังประหยัดเวลา โดยให้ปริมาณไวรัสสูงสุดเท่ากับการแช่แข็งและละลาย 3 ครั้ง ซึ่งโดยทั่วไปการเก็บไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงมักเก็บโดยการแช่แข็งและละลายอย่างน้อย 3 ครั้ง เนื่องจากเป็นวิธีเก็บที่ให้ปริมาณไวรัสเพิ่มขึ้นจากเดิมที่เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์โดยตรง⁽⁵⁾

การกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่จัดเตรียมขึ้น พบว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่จัดเตรียมขึ้นในสภาวะที่เหมาะสมในการติดเชื้อไวรัสโรตาในเซลล์โดยใช้ความเข้มข้น 7.5 $\mu\text{g/ml}$ trypsin/washing medium และจัดเก็บไวรัสโดยวิธีแช่แข็งและละลาย 1 ครั้ง พบว่าไวรัสที่ได้มีค่าความแรงเฉลี่ยสูงถึง 7.93 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร โดยมีค่าพิสัยอยู่ระหว่าง 7.46– 8.40 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร นอกจากนี้ค่าที่ได้แต่ละค่ามีความแตกต่างของผลการทดสอบในแต่ละคนไม่เกิน 0.5 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานสากลที่ยอมรับผลการทดสอบว่าไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบ⁽¹¹⁾ จึงสรุปว่าช่วงค่าความแรงที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่จัดเตรียมขึ้นโดยกำหนดว่า เมื่อใดที่ทำการทดสอบวัคซีนตัวอย่างแต่ละครั้ง ค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวอ้างอิงจะต้องอยู่ในช่วงค่าที่กำหนดทุกครั้ง หากไม่อยู่ในช่วงค่าที่กำหนดจะถือว่าผลการทดสอบในครั้งนั้นไม่ผ่านการทดสอบค่าความแรงจะต้องมีการทดสอบซ้ำ นอกจากนี้ค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้นเองสูงกว่าค่ามาตรฐานที่ WHO กำหนดคือวัคซีนตัวอย่างต้องมีค่าความแรงไม่น้อยกว่า 6 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร โดยไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้นจะนำมาใช้ทดสอบควบคุมไปกับวัคซีนตัวอย่างทุกครั้ง จึงควรมีองค์ประกอบของสารสำคัญที่ใกล้เคียงกัน เพื่อยืนยันผลการทดสอบในแต่ละครั้งว่าให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง และน่าเชื่อถือ การศึกษานี้ไม่สามารถระบุได้ว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการมีความคงตัว (stability) มากน้อยเพียงใด ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป รวมทั้งการหาวิธีจัดเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวในรูปผงแห้งเพื่อให้มีความคงตัวมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเก็บไว้ใช้เป็นระยะเวลานานๆ อย่างไรก็ตาม การจัดเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวในรูปของเหลวนี้ จัดเก็บเป็นหลอดบรรจุไว้ใช้เพียงพอในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบ เพื่อป้องกันการลดลงของไวรัสในขณะเดียวกันจะมีการประเมินค่าความแรงของวัคซีนตัวอย่างเป็นระยะๆ และศึกษาแนวโน้มการใช้ไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่จัดเตรียมขึ้นตามคำแนะนำของ WHO

สรุป

วัคซีนไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยว กำลังจะถูกนำมาใช้ในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคในเด็กของประเทศไทย ทำให้การควบคุมคุณภาพวัคซีนไวรัสโรตาของประเทศจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น การจัดเตรียมและกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวจึงมีความสำคัญในห้องปฏิบัติการ การศึกษานี้ได้เตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวขึ้นโดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงพร้อมวิธีการเก็บไวรัสเพื่อให้ได้ปริมาณไวรัสที่มากและเพียงพอต่อการนำไปใช้ในระยะเวลา 3–5 ปี จากการศึกษาพบว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวเพิ่มจำนวนได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ในสภาวะที่มีความเข้มข้น 7.5 $\mu\text{g/ml}$ trypsin/washing medium ซึ่งให้ค่าความแรงสูงสุดเมื่อเทียบกับสภาวะอื่นๆ ที่มีความเข้มข้น trypsin น้อยกว่า นอกจากนี้การเก็บไวรัสโดยการแช่แข็งและละลาย 1 ครั้ง เพียงพอและเหมาะสมสำหรับการเก็บไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวเมื่อตรวจสอบค่าความแรงที่ได้ พบว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมได้ค่าความแรงเฉลี่ยสูงเท่ากับ 7.93 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร โดยมีค่าพิสัยในช่วง 7.46– 8.40 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร ซึ่งค่าที่ได้แต่ละค่ามีความแตกต่างไม่เกิน 0.5 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร จึงสรุปได้ว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการสามารถนำมาใช้เป็นไวรัสอ้างอิงในการควบคุมคุณภาพค่าความแรงของวัคซีนไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์ ที่ให้การสนับสนุน คำปรึกษา และแนะนำ ทำให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้

เอกสารอ้างอิง

1. วิชัย สันติมาสิวรกุล และทศวรรณ จิตรวคินกุล. วัคซีนโรตาไวรัส : การพัฒนาและการนำมาใช้ทางคลินิก. ไทยโกซซันนิพนธ์ 2550; 4(1): 1-12.
2. สำนักสารนิเทศ สำนักงานปลัดกระทรวง. หมอสุรวิทย์ เผย สธ. เตรียมบรรจุวัคซีน “ไวรัสโรตา” เข้าแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติปี 2558 [cited 2014 Feb 4]; Available from: URL: http://www.moph.go.th/ops/iprg/include/admin_hotnew/show_hotnew.php?idHot_new=49880.
3. World Health Organization. Rotavirus vaccines WHO position paper – January 2013. Weekly Epidemiological Record (WER) 2013; 88(5): 49-64.
4. World Health Organization. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. WHO Technical Report Series No. 932, 2006.
5. Twist EM, Kolonich K, Rubin DH. Propagation of rotaviruses in the presence of chicken serum. J Gen Virol 1984; 65(Pt 7): 1207-10.
6. Almeida JD, Hall T, Banatvala JE, Totterdell BM, Chrystie IL. The effect of trypsin on the growth of rotavirus. J Gen Virol 1978; 40(1): 213-8.
7. Clark SM, Roth JR, Clark ML, Barnett BB, Spendlove RS. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. J Virol 1981; 39(3): 816-22.
8. วันดี วราวิทย์ และอัจฉริย์ อินทุโสมา. Rotavirus vaccine. กรุงเทพฯ: หน้า 28-33.
9. Martin J. Evaluating cell-line sensitivity. In: World Health Organization. Polio laboratory manual. 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO; 2004. p. 73-80.
10. World Health Organization. Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization (EPI). Geneva: WHO; 2001.

Optimal Conditions for Propagation of Rotavirus Monovalent Vaccine Strain to use as a Reference rotavirus for Evaluation of Potency Values of Monovalent Rotavirus Vaccine

**Natthakarn Mingngamsup Sukanlayanee Chaimee Bhurit Songthanant
and Supaporn Phumiamorn**

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000. Thailand.

ABSTRACT Rotavirus vaccine will be introduced to National Immunization Program in the future to reduce child mortality in Thailand caused a severe diarrhea in infants and children. Quality control of the vaccine to ensure the safety and effectiveness of rotavirus vaccine will be increased as well. Therefore, it is necessary to prepare rotavirus monovalent vaccine strain for using in quality control laboratory. This study was to determine optimal conditions for preparation of rotavirus monovalent vaccine strain infected cell culture in the presence of various concentrations of trypsin and to study harvesting virus in culture fluid in various conditions after freeze-thaw cycle 1 time, 2 times and 3 times, respectively comparing with harvesting viral vaccine directly from culture supernatant. Optimal conditions were used for the preparation of rotavirus monovalent vaccine strain that would be assigned with the potency values. The result showed that use of trypsin could enhance rotavirus quantity in MA104 cells. Trypsin at 7.5 µg/ml trypsin/washing medium both in the titration medium and the maintenance medium and harvesting virus with 1F-T method were optimal conditions for preparation of rotavirus vaccine due to a highest potency values. When optimal conditions used for preparation of rotavirus monovalent vaccine strain, it was found that the geometric mean was $7.93 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5 \text{ ml}$ with the range between $7.46-8.40 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5 \text{ ml}$. Each individual value from three analysts was not more than $0.5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5 \text{ ml}$. It can be concluded that rotavirus monovalent vaccine strain prepared in the laboratory can be used as a reference rotavirus for quality control of monovalent rotavirus vaccine potency.

Key words: Rotavirus vaccine, potency