วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 25 ฉบับที่ 5 กันยายน - ตุลาคม 2559

Journal of Health Science
Vol. 25 No. 5, September - October 2016

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

การทำแห้งไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเชื้อเป็น เพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ

ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์ วท.บ.
อัศจรรย์ อาเมน วท.บ.
สุภาพร ภูมิอมร วท.บ., วท.ม., วท.ด.
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ ในการผลิตวัคซีนทุกขั้นตอนมีความแปรปรวนสูงดังนั้นในการควบคุมคุณภาพวัคซีนทั้งหมดต้องอาศัยวัสดุอ้างอิงในการทดสอบ วัคซีนโรตาเป็นวัคซีนที่ประเทศไทยกำลังจะบรรจุเข้าในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค การรับรองรุ่นการผลิตจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อสนับสนุนด้านคุณภาพ ประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวัคซีน ปัญหาคือ ปัจจุบันวัคซีนมาตรฐานสากลยังไม่มีใช้ ดังนั้นเพื่อให้วัคซีนผ่านการรับรองรุ่นการผลิตในมาตรฐานเดียวกัน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำแห้งไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเชื้อเป็นสำหรับใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ ดำเนินการศึกษาโดยเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณไวรัสที่มากพอและนำมาผ่านกระบวนการทำแห้งให้ได้เป็นไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเชื้อเป็นแบบผงแห้ง จากนั้นตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ ความชื้น ความแรง และตัวแปรอื่น ๆ ร่วมกับการทดสอบ ความคงตัวในสภาวะเร่งเทียบกับการจัดเก็บในสภาวะปกติคือ -70°C จากผลการทดสอบพารามิเตอร์ที่จำเป็นใน เบื้องต้นพบว่าไวรัสโรตาเชื้อเป็นผงแห้ง มีลักษณะทางกายภาพที่ดี มีความชื้นเฉลี่ยร้อยละ 0.52 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของการบรรจุร้อยละ 0.23 โดยใช้ระยะเวลาในการละลายน้อยกว่า 1 นาที มีค่า pH เฉลี่ย 7.76 และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ เมื่อประเมินความแรงหลังทำแห้งพบว่า มีค่าความแรงเฉลี่ย 7.14 $\log CCID_{50}$/0.5ml สูงกว่า 6 $\log CCID_{50}$/ml ซึ่งเป็นเกณฑ์มาตรฐานที่ผู้ผลิตวัคซีนโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวกำหนด นอกจากนี้เมื่อประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันของวัคซีนในการแบ่งบรรจุตามมาตรฐานการผลิตวัสดุอ้างอิง (ISO Guide 34:2009) ค่าความแรงเฉลี่ยที่ได้เป็น 7.34 $\log CCID_{50}$/0.5ml คิดเป็น %CV 2.34 ($p=0.298$) จากการประเมินในเบื้องต้น แสดงให้เห็นว่าทุกพารามิเตอร์อยู่ใน เกณฑ์มาตรฐาน เมื่อทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ -20°C, 4°C, 20°C, 37°C และ 45°C ในระยะเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่ามีความคงตัวที่สภาวะอุณหภูมิสูงถึง 45°C ได้ถึง 2 สัปดาห์ และที่ 37°C ได้ถึง 6 สัปดาห์ ยิ่งไปกว่านั้น การเก็บ ที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 20°C ค่าความแรงที่ได้ไม่แตกต่างจากการเก็บที่ -70°C นานถึง 12 สัปดาห์ แสดงให้เห็นถึงไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเชื้อเป็นที่เตรียมได้มีความคงตัวในสภาวะเร่งสูงกว่าที่เคยศึกษามาก่อน ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเชื้อเป็นนี้ สามารถนำมาใช้เป็นวัคซีนมาตรฐานได้ แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการตรวจติดตามความคงตัวที่อุณหภูมิที่จัดเก็บเป็นระยะ ๆ เหมือนวัคซีนมาตรฐานทั่วไป

คำสำคัญ: **วัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเชื้อเป็นผงแห้ง, ความแรง, ความคงตัว**

บทนำ

วัสดุอ้างอิง (reference materials) มีความสำคัญสำหรับการผลิตและการควบคุมคุณภาพวัคซีนทั้งหมด เนื่องจากการผลิตวัคซีนมีความแปรปรวนสูงตลอดทุกขั้นตอนของการผลิตและการควบคุมคุณภาพ [1] ดังนั้น การจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง จึงมีความสำคัญและจำเป็นในการตัดสินว่ากระบวนการผลิตว่ามีความสม่ำเสมอหรือไม่ ถ้าการผลิตวัสดุอ้างอิงไม่ดีพอ อาจส่งผลต่อผลการทดสอบของวัคซีนที่ไม่ได้มาตรฐาน โดยเฉพาะค่าความแรง การผลิตวัสดุอ้างอิงสำหรับการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนทั่วไปนั้น สามารถจัดเตรียมได้เป็นวัคซีนมาตรฐานปฐมภูมิ (primary vaccine standards) หรือวัคซีนมาตรฐานทุติยภูมิ (secondary vaccine standards)[1] ซึ่งการผลิต primary vaccine standards มักจัดเตรียมโดยหน่วยงานที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล เช่น ห้องปฏิบัติการขององค์การอนามัยโลก ที่สำคัญและเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายคือหน่วยงาน National Institute of Biological Standards and Control (NIBSC) ประเทศสหราชอาณาจักร สำหรับ secondary vaccine standards นั้น หลายหน่วยงานทั้งผู้ผลิตวัคซีนและหน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐในหลายประเทศ ได้จัดเตรียมขึ้นเพื่อใช้เป็น working reference preparation สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งต้องคำนึงถึงคุณลักษณะของวัคซีนแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามการจัดเตรียม working reference preparation เพื่อใช้ในระดับประเทศหรือระดับภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จะต้องคำนึงถึงปริมาณที่มากพอสำหรับใช้ในระยะยาว มีความคงตัวสูง และต้องมีการตรวจติดตามคุณภาพเป็นระยะ ๆ[1] เพื่อให้แน่ใจว่า วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานนั้นสามารถนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนได้

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นหน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐด้านชีววัตถุของประเทศ มีการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสำหรับวัคซีนในรูปผงแห้งที่มีประสิทธิภาพที่ดี เช่น วัคซีนคางทูม[2] วัคซีนบีซีจี[3] และวัคซีนหัด[4] ซึ่งส่วนใหญ่เป็นวัคซีนที่ใช้ในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค

วัคซีนไวรัสโรตาที่ใช้ในการป้องกันโรคอุจาระร่วงในเด็กเล็ก เป็นเชื้อไวรัสอ่อน ฤทธิ์ของไวรัสโรตา ให้โดยการหยอดทางปาก[5] วัคซีนได้ขึ้นทะเบียนในประเทศตั้งแต่ปี 2548[6] เป็นวัคซีนซีโรทัยป์เดียวที่กรมควบคุมโรคกระทรวงสาธารณสุข มีแผนจะบรรจุเป็นวัคซีนพื้นฐานหรือวัคซีนภาคบังคับตามแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติในปี 2558[7] การรับรองรุ่นการผลิตจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อสนับสนุนด้านคุณภาพ ประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวัคซีน[8] ปัญหาคือ ปัจจุบันวัคซีนมาตรฐานสากลยังไม่มีใช้[9] การควบคุมกำกับในหน่วยงานภาครัฐต้องอาศัย working reference preparation จากหน่วยงานผู้ผลิตเท่านั้น ดังนั้น เพื่อให้วัคซีนผ่านการรับรองรุ่นการผลิตในมาตรฐานเดียวกัน หน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐด้านวัคซีน จึงได้จัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสำหรับวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว และทำการทดสอบพารามิเตอร์ที่จำเป็นในเบื้องต้น ได้แก่ การตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ ความชื้น ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการบรรจุ ระยะเวลาในการละลาย ค่า pH ตรวจสอบความปราศจากเชื้อ ประเมินประสิทธิภาพการทำแห้งเปรียบเทียบก่อนและหลังทำแห้ง ร้อยละการสูญเสียค่าความแรงหลังการทำแห้ง ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันของวัคซีนในการแบ่งบรรจุตามมาตรฐานการผลิตวัสดุอ้างอิง (ISO Guide 34: 2009) พร้อมทั้งประเมินความคงตัวในสภาวะเร่งเปรียบเทียบกับอุณหภูมิจัดเก็บปกติ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำแห้งไวรัสโรตา ซีโรทัยป์เดี่ยวเชื้อเป็นสำหรับใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ พร้อมทั้งยืนยันความเหมาะสมจากการทดสอบในพารามิเตอร์ที่จำเป็น ว่าสามารถนำไปใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน ในระดับประเทศและระดับภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์เพาะเลี้ยง MA104 (CCT WLB1998/12 cell bank) เป็น African green monkey foetal kidney ซึ่งมีความจำเพาะต่อไวรัสโรตา[5,9] ได้รับจากผู้ผลิต บริษัทแกล็กโซสมิทไคล์นจำกัด เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (growth medium) เตรียมโดย Dulbeco's Modified Eagle Minimum (DMEM) (Cat. No.31660-026, Gibco) ที่มี 5% ซีรั่มจากลูกวัว (fetal bovine serum, Cat. No. 26140-079, Gibco), 1%L-glutamine (Cat.No. G-3126, Sigma), 7.5% $NaHCO_3$ (Cat.No.S-5716, Sigma) 3% และ 1% 1M HEPES (Cat.No.H-6147, Sigma)

แอนติบอดี

โมโนโคนอลแอนติบอดี 2C9 ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวสำหรับใช้ในการย้อมเซลล์ติดเชื้อโดยใช้เทคนิค immunoperoxidase staining[9] ได้รับจากผู้ผลิต บริษัทแกล็กโซสมิทไคล์นจำกัด

อาหารที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนและตรวจวิเคราะห์ไวรัส

อาหารเลี้ยงเซลล์ (maintenance medium) เตรียมโดย Dulbeco's Modified Eagle Minimum (DMEM) (Cat. No.31660-026, Gibco) ที่มี 2% ซีรั่มจากลูกวัว (fetal bovine serum, Cat. No. 26140-079, Gibco), 1% L-glutamine (Cat.No.G-3126, Sigma), 7.5% $NaHCO_3$ (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) เตรียมโดยอาหารเลี้ยงเซลล์ (maintenance medium) ที่ไม่มีส่วนผสมของซีรั่มจากลูกวัว

อาหารเลี้ยงเชื้อไวรัสโรตา (titration medium) เตรียมโดยเติม 300 ไมโครลิตร ของ 0.25 % trypsin (Cat.No. 27250-018, Gibco) ลงไปใน washing medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อใช้กระตุ้นไวรัสในการเข้าสู่เซลล์

การเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวในเซลล์เพาะเลี้ยงและการเก็บไวรัส

นำวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวมาเจือจางใน titration medium อัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 50-60 นาที จากนั้นเติมลงในฟลาสค์ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask) ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ที่มีอายุ 1 วันปริมาตร 1 มล./tissue culture flask 175 cm^2 อัตราส่วนของไวรัสต่อเซลล์เป็น 0.01 โดยประมาณ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ เมื่อครบเวลาเติม maintenance medium ปริมาตร 10-15 มล. แล้วนำไปบ่มที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 นาน 4 วัน หลังการเพาะเลี้ยงไวรัสเซลล์จะเกิดการติดเชื้อไวรัสประมาณ 80-90% เก็บ (harvest)ไวรัสใน tissue culture flask ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C นาน 1 วัน และนำมาละลาย (freeze-thaw) 1 ครั้ง จากนั้นใช้ไปเปตดูดเป่าเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสให้หลุดจากฟลาสค์ และนำไปใส่ใน centrifuge tube เพื่อปั่นที่ 3,000 รอบ นาน 10 นาที แล้วเก็บส่วนใสที่มีไวรัสไว้ที่อุณหภูมิ -70°C

การเตรียมสูตรตำรับสำหรับการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

สูตรตำรับสำหรับการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ประกอบด้วย dextran 5.5% (w/v), lactose 10% (w/v), human albumin 0.5%(%v/v) ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อโดยองค์ประกอบทั้งหมดจะเตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า เพื่อผสมกับไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้นในอัตราส่วน 1:1

การบรรจุ

บรรจุวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในขวดแก้ว (Borosilicate glass type I) ขนาด 3 มิลลิลิตร ด้วย automatic dispenserโดยเลือก tip ขนาด 10 มิลลิลิตร ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อปิดขวดด้วยจุกยางในระดับครึ่งจุกยาง (half stoppering) ขนย้ายขวดเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งภายในห้องปลอดเชื้อ

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ทำการศึกษากระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยใช้เครื่องทำแห้งรุ่น Lyolab, LT ซึ่งได้ปรับสภาวะการทำแห้งมาจากการทำแห้งวัคซีนไวรัสหัด[4] เพื่อหาสภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมสำหรับไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยว โดยตั้งโปรแกรมกำหนดให้อุณหภูมิแช่แข็งเท่ากับ -60 องศาเซลเซียส นาน 7 ชั่วโมง จากนั้นในขั้นปฐมภูมิของกระบวนการทำแห้ง (primary drying process) เพิ่มอุณหภูมิเป็น -30 องศาเซลเซียสปรับความดันเท่ากับ 1000 mTorr นาน 15 ชั่วโมง และในขั้นทุติยภูมิของกระบวนการทำแห้ง (secondary drying process) ปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 35 องศาเซลเซียส ปรับความดันเท่ากับ 0 mTorr นาน 15 ชั่วโมง ดังตารางที่ 1

การประเมินประสิทธิภาพการทำแห้ง

ก่อนการทำแห้ง

สุ่มชั่งน้ำหนักขวดแก้วก่อนการบรรจุ จำนวน 10 ขวด แล้วนำมาบรรจุไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยว ทำการชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักของวัคซีนไวรัสหัดที่บรรจุ เพื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของการแบ่งบรรจุ และทำการสุ่มตัวอย่างที่บรรจุไวรัสแล้วเพื่อตรวจสอบความแรงก่อนการทำแห้งจำนวน 3 ขวด

หลังการทำแห้ง

ประเมินประสิทธิภาพไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวแบบผงแห้งโดยตรวจสอบลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่า[10] ตรวจสอบหาปริมาณความชื้นที่หลงเหลือโดยวิธี Karl Fischer[11] หากผ่านเกณฑ์กำหนด คือต้องมีลักษณะทางกายภาพที่ดีและค่าความชื้นที่เหลือต้องต่ำกว่าร้อยละ 3.0 จึงศึกษาตัวแปรอื่น ๆ ดังนี้

1. ตรวจสอบค่าความแรงโดยวิธี Cell Culture Infective Dose ที่ 50% ($CCID_{50}$)[5,9] และดูอัตราการลดลงของค่าความแรงภายหลังการทำแห้ง
2. ตรวจดูสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการแบ่งบรรจุโดยสุ่มชั่งน้ำหนัก
3. การตรวจสอบระยะเวลาการละลายตัวด้วยน้ำกลั่น (reconstitution time)[12]
4. ตรวจสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยเครื่อง pH meter ผลการตรวจสอบตัวแปรดังกล่าวนำมาหาค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
5. ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของการบรรจุ เพื่อแสดงความเที่ยงของการประเมินประสิทธิภาพหลังการทำแห้ง พร้อมกับตรวจสอบการปนปื้อนของเชื้อรา แบคทีเรียอื่น ๆ ตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก โดยใช้เชื้อมาตรฐานสากลเป็น positive control และตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อมัยโคพลาสมาโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction - PCR)[13,14]

การประเมินค่าความแรงของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยว[15]

เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 จำนวน 2.0 x10^5 เซลล์ในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในเพลทชนิด 96 หลุม นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นนำไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวแบบผงแห้งที่จัดเตรียมขึ้นมาละลายด้วยน้ำกลั่น 0.5 มล. จากนั้นเจือจางไวรัสใน titration medium เป็น 1:10

ตารางที่ 1 การกำหนดสถานะการทำแห้ง

ตัวแปร	Freezing step		Primary Drying Process		Secondary Drying Process			
อุณหภูมิของการทำแห้ง (องศาเซลเซียส)	-60 (slope)	-60	-30 (slope)	-30	-10 (slope)	10 (slope)	35 (slope)	35
ระยะเวลา(นาที)	10	480	60	3540	120	120	150	900
ควมดัน (mtorr)	-	-	200	200	0	0	0	0

(10^{-1}) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 50-60 นาที เมื่อครบเวลาเจือจางไวรัสแต่ละขั้นเป็น $1:10^{0.5}$ 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 เพื่อเอาซีรั่มที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เนื่องจากซีรั่มจะหยุดการทำงานของ trypsin จากนั้นดูด washing medium ออกประมาณ 0.18 มิลลิลิตร ก่อนเติมวัคซีนตัวอย่างในแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/หลุม ความเจือจางละ 8 หลุม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 6 วัน จากนั้นล้างเพลทด้วย washing medium ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/หลุม จำนวน 1 ครั้งแล้ว fix เซลล์ด้วย 80% acetone ที่แช่เย็น ทิ้งให้เพลทแห้ง จากนั้นย้อมหาปริมาณแอนติเจนของ rotavius ด้วยวิธี immunoperoxidase staining[5,9] โดยเติม monoclonal antibody 2C9 ที่เจือจาง 250 เท่า ด้วย 5% skimmed milk (Cat.No.70166, Fluka) ใน PBS^- ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/หลุมลงในเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลท 4 ครั้งด้วย 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 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลท 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 ครั้งด้วยน้ำประปา อ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยนับจำนวนหลุมที่มีเซลล์ติดสีน้ำตาลซึ่งเกิดจากการที่เซลล์ติดเชื้อไวรัสโรตา นำจำนวนหลุมที่ให้ผลบวกมาคำนวณหาค่าความแรงหรือปริมาณไวรัสโรตาทั้งหมด มีหน่วยเป็น Cell culture infective dose 50% ($CCID_{50}$) 0.5 มิลลิลิตร

การคำนวณค่าความแรง

คำนวณค่าความแรงของไวรัส ใช้สูตรที่ดัดแปลงมาจาก Kaber[16] ดังนี้

$$\log_{10} CCID_{50} = - \text{ส่วนกลับของความเจือจางต่ำสุดที่ใช้} + \left[\left[\frac{\Sigma \text{ จำนวนหลุมทั้งหมดที่มี CPE}}{\text{จำนวนหลุมในแต่ละความเจือจาง}} - 0.5\right] \times 0.5\right]$$

คำนวณค่าความแรงที่ได้ในรูปของ $CCID_{50}$/50 ไมโครลิตร และรายงานผลเป็น $CCID_{50}$/โด๊ส/0.5 มิลลิลิตร ค่าความแรงที่ได้ในแต่ละครั้งที่ทดสอบต้องมีความแตกต่างไม่เกิน 0.5 $\log_{10} CCID_{50}$

การประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวแบบผงแห้งโดยวัดจากค่าความแรง

การประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวแบบผงแห้งที่เตรียมขึ้น ทำโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวนไม่น้อยกว่า = $\sqrt{X}$ (X หมายถึง จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่เตรียมได้) แต่ต้องไม่น้อยกว่า 10 ตัวอย่าง แล้วนำค่าความแรงที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one way ANOVA)

การประเมินความคงตัวในสภาวะเร่ง

การประเมินความคงตัวของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวแบบผงแห้งที่เตรียมขึ้นโดยดูการลดลงของค่าความแรงในสภาวะเร่ง หลังเก็บที่อุณหภูมิ -20, 4, 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ โดยเทียบกับการเก็บที่อุณหภูมิจัดเก็บปกติ -70 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษา

ลักษณะทางกายภาพหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ลักษณะทางกายภาพของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวแบบผงแห้ง (ภาพที่ 1) มีลักษณะเป็นก้อนสีชมพูอ่อนแห้ง อัดแน่น ไม่มีรูพรุน เมื่อเคาะไม่เกิดการยุบตัวและ

ไม่แตกเป็นชิ้น ๆ

ปริมาณความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้ง

การตรวจหาปริมาณความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้ง พบว่าจากการสุ่มตรวจจำนวน 6 หลอด พบมีปริมาณความชื้นสูงสุดร้อยละ 0.78 ต่ำสุดร้อยละ 0.12 เฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 0.52 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (น้อยกว่าร้อยละ 3.0)

การตรวจสอบค่าตัวแปรอื่น ๆ

ผลการทดสอบสัมประสิทธิความแปรปรวนของการแบ่งบรรจุโดยสุ่มตรวจจำนวน 10 หลอด พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 0.23 (เกณฑ์กำหนดน้อยกว่าร้อยละ 1.00) ส่วนตัวแปรอื่น ๆ ได้แก่ ความสามารถในการละลาย ได้สุ่มตรวจจำนวน 9 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 37.67 วินาที (%CV= 36.55) (เกณฑ์กำหนดน้อยกว่า 3 นาที) ค่า pH ก่อนทำแห้ง 7.46 และหลังทำแห้งเท่ากับ 7.76 (เกณฑ์กำหนด pH 6-8) และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา แบคทีเรียและมัยโคพลาสมา (ตารางที่ 2)

ค่าความแรงก่อนและหลังการทำแห้ง

ค่าความแรงของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวผงแห้ง เป็นตัวแปรที่สำคัญที่จะบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการทำแห้ง จากการตรวจสอบค่าความแรงของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยว ก่อนและหลังการทำแห้งจำนวน 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกันพบว่าก่อนทำแห้งมีค่าความแรงเฉลี่ย 7.41 $\log_{10}$CCID$_{50}$/0.5ml และหลังทำแห้งมีค่าความแรงเฉลี่ย 7.14 $\log_{10}$CCID$_{50}$/0.5ml ร้อยละของการสูญเสียค่าความแรงเท่ากับ 3.65 (เกณฑ์กำหนดน้อยกว่าร้อยละ 25.00)

การประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน

จากการประเมินค่าความแรงของวัคซีนตัวอย่างจำนวน 10 ขวด โดยทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง ได้ค่าความแรงทั้งหมด 20 ค่า เพื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าความแรงเฉลี่ย 7.34 $\log_{10}$CCID$_{50}$/0.5ml (%CV=2.34) และค่าความแรงที่ได้ทั้ง 20 ค่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (p=0.298) (Fcal= 1.41,

ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ตารางที่ 2 การทดสอบตัวแปรอื่น ๆ

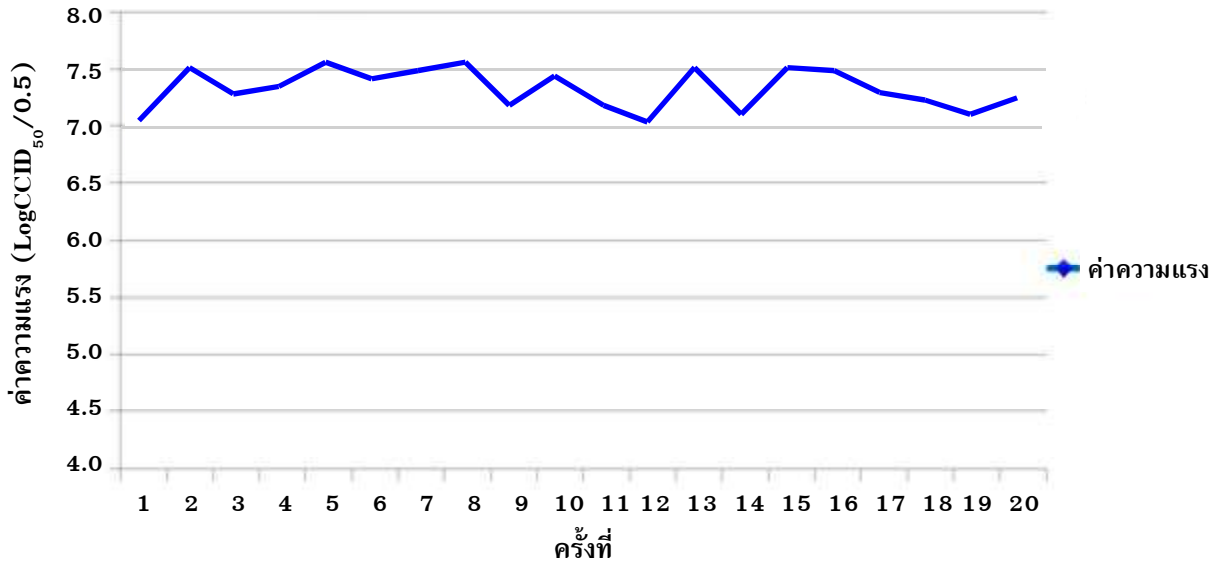
พารามิเตอร์ต่าง ๆ	สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของการแบ่งบรรจุ (n= 10)	ระยะเวลาในการละลายด้วยน้ำกลั่น (วินาที) (n= 9)	pH ก่อนทำแห้ง	pH หลังทำแห้ง (n= 3)	การทดสอบความปราศจากเชื้อ
ผลการทดสอบ	0.23	Mean 37.67 SD 13.77 % CV 36.55	7.46	Mean 7.76 SD 0.04 %CV 0.45	ไม่พบ
เกณฑ์กำหนด	ไม่เกิน 1%	< 180 วินาที	6 - 8	6 - 8	ไม่พบ

Fcrit=3.02) (ภาพที่ 2)

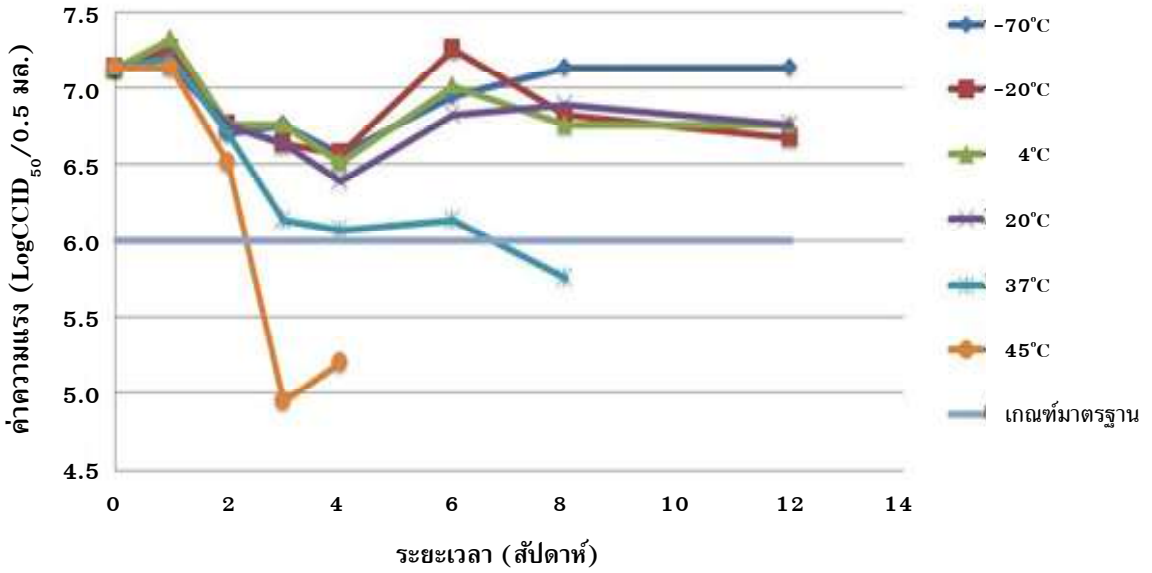
การประเมินความคงตัวในสภาวะเร่ง

เมื่อนำไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวแบบผงแห้งมาประเมินความคงตัวในสภาวะเร่งโดยนำไปเก็บในอุณหภูมิที่สูงกว่าสภาวะปกติตั้งแต่ -20, 4, 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 สัปดาห์ เทียบกับการเก็บในสภาวะปกติที่ -70°C พบว่า ค่าความแรงไวรัสโรตาผงแห้งที่เก็บที่อุณหภูมิ 45°C และที่ 37°C มีค่าความแรงลดลงต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานคือ 6 $\log_{10}$CCID$_{50}$/dose เมื่อเก็บไว้นาน 3 สัปดาห์และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ ในขณะที่สภาวะจัดเก็บที่ -20, 4 และ 20°C ไวรัสโรตายังมีค่าความแรงผ่านเกณฑ์มาตรฐานไม่แตกต่างจากการเก็บที่ -70°C ที่ระยะเวลา 12 สัปดาห์ (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 2 การประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน



ภาพที่ 3 ค่าความแรงของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวแบบผงแห้งที่อุณหภูมิต่าง ๆ



วิจารณ์

จากการศึกษาดูลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสมของสูตรตำรับที่ใช้พบว่า ลักษณะทางกายภาพหลังการทำแห้งเป็นก้อนอัดกันแน่น ไม่มีรูพรุน เมื่อเคาะจะไม่แตกเป็นชิ้น ๆ (ภาพที่ 1) ซึ่งเป็นลักษณะทางกายภาพที่ดี ที่เรียกว่า uniform distribution [10] และเมื่อสุ่มตรวจหาปริมาณความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้ง พบว่ามีปริมาณความชื้นเหลือเฉลี่ยร้อยละ 0.52 ซึ่งต่ำกว่าปริมาณความชื้นของวัคซีนไวรัสผงแห้งที่ใช้ฉีดในคนเพื่อป้องกันโรคทั่วไปที่กำหนดไม่เกินร้อยละ 3.00[17] และเมื่อเทียบกับวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสากลที่ผลิตโดยห้องปฏิบัติการขององค์การอนามัยโลกจะพบว่า ค่าปริมาณความชื้นหลงเหลือโดยประมาณร้อยละ 0.1- 2.9 ซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นกับคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์และสูตรตำรับที่ใช้ให้เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์หรือแอนติเจนนั้น ๆ อย่างไรก็ตามความคงตัวของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสากลสามารถใช้ได้นานกว่า 10 – 20 ปี[12] ซึ่งการจัดเตรียมวัคซีนไวรัสโรตานี้มีความชื้นหลงเหลืออยู่ในช่วงเดียวกับที่พบทั่วไปในวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสากล จึงเชื่อได้ว่า วัคซีนมาตรฐานที่เตรียมขึ้นนี้น่าจะมีความคงตัวที่ยาว เมื่อศึกษาตัวแปรอื่น ๆ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการแบ่งบรรจุ เท่ากับร้อยละ 0.23 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำนดไว้สำหรับของเหลวข้นไม่ควรเกินร้อยละ 1.00 ความสามารถในการละลายตัวด้วยน้ำกลั่นเฉลี่ยประมาณ 38 วินาที ตามเกณฑ์กำหนดควรน้อยกว่า 3 นาที[18] เมื่อตรวจสอบความเป็นกรด-ด่าง หลังการทำแห้งอยู่ที่ 7.76 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันกับค่าความเป็นกรด-ด่างก่อนการทำแห้ง นอกจากนี้ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา แบคทีเรียอื่น ๆ และเชื้อมัยโคพลาสมา[9-14] (ตารางที่ 2) อัตราการลดลงของค่าความแรงภายหลังการทำแห้งเท่ากับร้อยละ 3.65 ซึ่งเป็นอัตราค่อนข้างต่ำและไม่เกินร้อยละ 25.00 ตามที่กำหนดไว้ โดยทั่วไปถ้าค่าความแรงลดลงมาก แสดงถึงสูตรตำรับของการทำแห้งอาจไม่เหมาะสม[12] ในการทดลองนี้ได้สูตรตำรับที่น่าจะเหมาะสม เนื่องจากมีการลดลงของค่าความแรงอยู่ในระดับที่ต่ำและค่าความแรงหลังการทำแห้งพบเฉลี่ยสูงกว่า 6 $logCCID_{50}$/does ซึ่งสูงกว่าค่าความแรงที่ฉีดในเด็กที่ผู้ผลิตกำหนดคือไม่น้อยกว่า 6 $logCCID_{50}$/does เมื่อตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกันตามข้อกำหนดมาตรฐานการผลิตวัสดุอ้างอิง(ISO Guide 34:2009) พบว่า ค่าความแรงเฉลี่ยที่ได้เป็น 7.34 $logCCID_{50}$/0.5ml คิดเป็น %CV เท่ากับ 2.34 โดยแต่ละค่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 2) แสดงว่าการแบ่งบรรจุมีความแตกต่างของค่าความแรงในแต่ละขวดน้อยมาก เมื่อทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งโดยจัดเก็บที่อุณหภูมิสูงกว่าปกติที่ -20°C, 4°C, 20°C, 37°C และ 45°C ในระยะเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 20°C ค่าความแรงที่ได้ไม่แตกต่างจากการเก็บที่ -70°C นานถึง 12 สัปดาห์ สามารถเก็บที่ 37°Cได้นานถึง 6 สัปดาห์ และยิ่งไปกว่านั้นที่อุณหภูมิสูงถึง 45°C ได้นานถึง 2 สัปดาห์ ค่าความแรงที่ได้ไม่แตกต่างจากการเก็บที่ -70°C นาน 12 สัปดาห์ (ภาพที่ 3) ซึ่งการเก็บที่ 45°C นาน 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลายาวนานที่สุดของวัคซีนมาตรฐานที่เคยได้มีการจัดเตรียมมาถือเป็นสภาวะความคงตัวที่ดีมาก ซึ่งจากประสบการณ์การทำแห้งวัคซีนมาตรฐานมาเช่น วัคซีนคางทูม[2] วัคซีนบีซีจี[3] และวัคซีนหัด[4] ยังไม่เคยพบว่าวัคซีนมาตรฐานนั้นทนต่ออุณหภูมิ 45°C นาน 1 สัปดาห์ ขณะนี้มีความคงตัวยาวนานมากกว่า 3 ปี จึงทำให้เชื่อได้ว่าวัคซีนมาตรฐานโรตาที่เตรียมได้น่าจะมีความคงตัวยาวนานมากกว่า 3 ปีขึ้นไปแน่นอน

สรุป

วัคซีนโรตาเป็นวัคซีนที่ประเทศไทยกำลังจะบรรจุเข้าในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค เนื่องจากขณะนี้ยังไม่มีวัคซีนมาตรฐานสากล หน่วยงานควบคุมกำกับด้านวัคซีนจึงจำเป็นต้องจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสำหรับวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวขึ้นเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนให้มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยก่อนนำเข้ามาใช้ในประเทศ โดยเพิ่มจำนวนไวรัสให้ได้

ปริมาณมากพอและนำมาผ่านกระบวนการทำแห้งให้ได้เป็นไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเชื้อเป็นแบบผงแห้ง จากนั้นตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ ความชื้น ความแรง และตัวแปรอื่น ๆ ร่วมกับการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งเทียบกับการจัดเก็บในสภาวะปกติ พบว่าไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเชื้อเป็นผงแห้ง มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นวัคซีนมาตรฐานของประเทศ เนื่องจากมีลักษณะทางกายภาพที่ดี ความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 1 มีอัตราการลดลงของค่าความแรงต่ำเพียงร้อยละ 3.65 และมีค่าความแรงสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดของผู้ผลิต มีความเป็นเนื้อเดียวกันตามมาตรฐาน ISO Guide 34:2009 การเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 20^{O}C ค่าความแรงที่ได้ไม่แตกต่างจากการเก็บที่ -70^{O}C ได้นานถึง 12 สัปดาห์ และเก็บที่ 37^{O}C ได้นานถึง 6 สัปดาห์ นอกจากนี้ที่อุณหภูมิสูง 45^{O}C เก็บได้นานถึง 2 สัปดาห์ ซึ่งนับว่ายาวนานที่สุดของวัคซีนมาตรฐานทั่วไปที่เคยได้ศึกษามาก่อน แสดงให้เห็นว่าวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่เตรียมได้นั้นมีคุณสมบัติทุกประการผ่านตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ มีความคงตัวดี และมีแนวโน้มสูงต่อการเก็บไว้ใช้ได้นาน อย่างไรก็ตาม จะมีการตรวจติดตามความคงตัวในระยะยาวที่อุณหภูมิที่จัดเก็บเพื่อวิเคราะห์แนวโน้มค่าความแรงเป็นระยะ ๆ เหมือนกับวัคซีนมาตรฐานสากลทั่วไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิ นางธีรนารถ จิวะไพศาลพงศ์ ที่ให้การสนับสนุนการทำงานวิจัยในครั้งนี้ และบริษัทแกล็กโซสมิทไคล์นจำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์แอนติบอดีในการทดสอบ ทำให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงลงไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. WHO expert committee on biological standardization. Fifty-eighth report. WHO technical report series 963. Geneva: World Health Organization; 2011.
2. อัศจรรย์ อาเมน, จิรเดช ปัจฉิม, พรหมฉัตร เจริญพัฒน์, ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์, สุภาพร ภูมิอมร. การศึกษาหาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการทำแห้งวัคซีนคางทูมอ้างอิงมาตรฐาน. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2553;53:97-111.
3. สุภาพร ภูมิอมร, อัศจรรย์ อาเมน, จิรเดช ปัจฉิม, สิรินัดดา ร่วมพร, สุกัลยาณี ไชยมี. การประเมินความคงตัวของวัคซีนบีซีจีชนิดผงแห้งสำหรับใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในประเทศ. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2557;23:369-80.
4. ธีรนารถ จิวะไพศาลพงศ์, จิรเดช ปัจฉิม, อัศจรรย์ อาเมน, ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์, สุภาพร ภูมิอมร. ประสิทธิภาพของการทำแห้งและความคงตัวที่สภาวะเร่งของวัคซีนหัดอ้างอิงมาตรฐาน.วารสารวิชาการสาธารณสุข 2558;24:161-73.
5. GlaxoSmithKline. Rotarix, human rotavirus, live, attenuated, oral vaccine, oral suspension active immunizing agent. Product monograph [Internet]. 2015 [cited 2016 Jan 25]. Available from: http://ca.gsk.com/media/591739/rotarix.pdf
6. วิชัย สันติมาลีวรกุล, ทศวรรณ จิตรวศินกุล. วัคซีนโรตาไวรัส: การพัฒนาและการนำมาใช้ทางคลินิก. วารสารไทย ไภษัชยนิพนธ์ 2550;4:1-9.
7. สำนักสารนิเทศ. หมอสุรวิทย์ เผย สธ.เตรียมบรรจุวัคซีนไวรัสโรต้าเข้าแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติปี 2558. สำนักสารนิเทศ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข [อินเทอร์เน็ต]. 2555 [สืบค้นเมื่อ 21 ก.ย. 2558]. แหล่งข้อมูล: http://www.moph.go.th/ops/iprg/include/admin_hotnew/show_hotnew.php?idHot_new=49880
8. World Health Organization. Rotavirus vaccines WHO position paper – January 2013. Weekly Epidemiological Record 2013;88:49-64.
9. World Health Organization. Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral). WHO Technical Report Series No 941. Geneva: World Health Organization; 2007.
10. Jennings TA. Lyophilization: Introduction and basic principles. New York: Informa Healthcare Publisher; 2008.
11. Zheng Y, Lai X, Bruun SW, Ipsen H, Larsen JN, Lϕwenstein H, et al. Determination of moisture content of lyophilized allergen vaccine by NIR spectroscopy. J Pharm Biomed Anal 2008;46:592-6.
12. Rey L, May JC, editors. Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. 2nd edition. NewYork: Marcel Dekker Publisher; 2004.

13. Phumiamorn S, Kullabutra K, Chaimee S, Jivapaisarnpong T. Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures: comparison between DNA fluorochrom staining and PCR amplification methods. Thai Pharm Sci 2006;30:82-92.
14. สุกัลยาณี เทพภูธร, สุภาพร ภูมิอมร. การประเมินความถูกต้องของวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อมัยโคพลาสมาในเซลล์เพาะเลี้ยง. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2551;50:87-102.
15. ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์, ภูริต ทรงธนนิตย์, สุภาพร ภูมิอมร. การประเมินค่าความแรงของวัคซีนโรตาซีโรทัยป์เดียว: เปรียบเทียบระหว่างการย้อม crystal violet กับการย้อม immunoperoxidase. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2557;23: 112-20.
16. World Health Organization. Polio laboratory manual. 4th edition. Geneva: World Health Organization; 2004.
17. World Health Organization. Expert committee on biological standardization; Annex 3: Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccines (Live). Forty-third report. WHO Technical Report Series 840. Geneva: World Health Organization; 1994.
18. Varshney D, Singh M. Lyophilized biologics and vaccines: modality-based approaches. London: Springer New York Heidelberg Dordrecht London; 2015.

Abstract: Freeze-Drying of Monovalent Rotavirus for Use as a National Vaccine Reference Standard

Natthakarn Mingngamsup, B.Sc.; Assajun Amen, B.Sc.; Supaporn Phumiamorn, B.Sc., M.Sc., Ph.D.
Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences
Journal of Health Science 2016;25:897-907.

A vaccine production process generally has a high degree of variability. So, the quality control of vaccines requires reference materials for vaccine quality testing. Thailand will include a rotavirus vaccine in its Expanded Programme on Immunization soon. The certification of lot release is necessary to support the quality, efficacy and safety control of a vaccine. The National Control Laboratory (NCL) requires a vaccine reference standard, but currently there is no international reference material for rotavirus vaccine. So, in order to certify the lot release for all lots of the vaccine using the same standards, this study aimed to freeze-dry monovalent rotavirus for use as a national vaccine reference. It was conducted by using viral propagation on cell culture to have enough viral load and a freeze-drying process. Then the prepared vaccine reference standard was checked for physical characteristics, moisture content, and potency as well as other related parameters, to test stability of vaccine in accelerated conditions compared with that in a normal condition at -70°C. The test results showed that the it had good physical characteristics, a low residual moisture content of 0.52%, the coefficient of variation (CV) of packing of 0.23%, reconstitution time less than 1 minute, and a pH value 7.76; and the vaccine was free of bacterial, fungal and mycoplasma contamination. The potency values of vaccine after drying were 7.14 log $CCID_{50}$/0.5 ml. The average potency of over 6 log$CCID_{50}$/0.5ml, which conform to the requirements of vaccine manufacturers. In addition, when evaluating the homogeneity of the vaccine in different vials according to the requirements for reference material producers (ISO Guide 34:2009), it was found that the mean value was 7.34 log$CCID_{50}$ /0.5ml with the CV of 2.34% (p=0.298). The preliminary assessment showed that all parameters were within the standards. The stability test of the vaccine in accelerated conditions at -20, 4, 20, 37 and 45°C after storage for 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 12 weeks showed that the vaccine stability was still high at 45°C for 2 weeks and at 37 °C for 6 weeks. Moreover, after being stored at -20, 4 and 20°C, the vaccine's potency values were not different from those at -70°C for up to 12 weeks. The stability of the monovalent rotavirus vaccine reference standard in accelerated conditions is greater than ever before. Thus, it is confirmed that the vaccine reference standard can be used for this quality control purpose. However, the vaccine potency has to be periodically monitored at the set storage temperature in a manner similar to that for other vaccine reference standards.

Key words: **lyophilized monovalent rotavirus vaccine, potency, stability**