วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 23 ฉบับที่ 1 มกราคม - กุมภาพันธ์ 2557

Journal of Health Science
Vol. 23 No. 1 January - February 2014

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

การประเมินค่าความแรงของวัคซีนโรตาซีโรทัยป์เดียว: เปรียบเทียบระหว่างการย้อม crystal violet กับการย้อม immunoperoxidase

ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์ วท.บ.
ภูริต ทรงธนนิตย์ วท.บ.
สุภาพร ภูมิอมร วท.บ., วท.ม., วท.ด.
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ ในปี 2558 วัคซีนโรตาจะถูกนำมาใช้ในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของเด็กในประเทศ การควบคุมคุณภาพรุ่นการผลิตวัคซีนโรตาจึงมีความจำเป็น โดยเฉพาะการควบคุมค่าความแรงซึ่งเป็นตัวบ่งบอกทางอ้อมถึงประสิทธิภาพของวัคซีน การศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อทดลองหาวิธีที่เหมาะสมในการประเมินค่าความแรงสำหรับวัคซีนโรตาชนิดซีโรทัยป์เดียว โดยเปรียบเทียบการย้อมด้วย crystal violet กับการ ย้อมด้วย immunoperoxidase ภายหลังการติดเชื้อไวรัส โรตาในเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ผลการศึกษาพบว่าการประเมินความแรงจากการย้อมด้วยวิธี immunoperoxidaseให้ค่าความแรงที่สูงกว่าการย้อมด้วย crystal violet เนื่องจากมีความไวของวิธีมากกว่า ถึงแม้ว่าวิธีการย้อมด้วย crystal violet ไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบความแรงของ rotavirus vaccine แต่เป็นวิธีที่ใช้อย่างกว้างขวางสำหรับประเมินความแรงวัคซีนไวรัสเชื้อเป็นอื่น ๆ นอกจากนี้การย้อมด้วย immunoperoxidase แสดงความแม่นเมื่อเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนดของผู้ผลิต ซึ่งค่าความแรงต้องมากกว่า 6 $\log CCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร และแสดงค่าร้อยละของความแปรปรวนต่ำสำหรับค่าความเที่ยง โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดย independent Student's t-test ($p>0.05$) ชี้ให้เห็นว่าการย้อมด้วย immunoperoxidase มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการควบคุมรุ่นการผลิตของวัคซีนโรตา เพื่อรองรับการให้วัคซีนในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติ

คำสำคัญ: **วัคซีนโรตา, การประเมินค่าความแรงของวัคซีน**

บทนำ

ไวรัสโรตา (rotavirus) เป็นไวรัสที่พบในอุจจาระและลำไส้เล็ก ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในทารกอายุต่ำกว่า 3 เดือนและผู้ใหญ่ ในแต่ละปีมีเด็กตายเนื่องจากไวรัสโรตา ประมาณ 400,000 ถึง 500,000 คน โดยพบว่า ร้อยละ90 เป็นเด็กจากประเทศกำลังพัฒนา[1] ไวรัสโรตาแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม คือ A, B, C เป็นไวรัสก่อโรคในคน และ D, E, F และ G พบ เฉพาะในสัตว์ โดยพบมากคือ กลุ่ม A ก่อให้เกิดโรคในคนมากถึงร้อยละ 90 เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงเฉียบพลันในเด็ก[2,3]

ปัจจุบันวัคซีนโรตา (rotavirus vaccine) เป็นชนิดหยอดปากให้แก่เด็กก่อนอายุ 6 เดือน 2 ครั้ง ห่างกัน 2 เดือน จึงจะสามารถป้องกันโรคท้องร่วงจากไวรัสโรตาได้ วัคซีนโรตาเป็นวัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ของไวรัสโรตาที่ใช้ในประเทศมี 2 ชนิด คือวัคซีน Rotarix สายพันธุ์ที่

ใช้ผลิตคือ RIX 4414 ซีโรทัยป์เดียว G1P ผลิตโดยบริษัท GlaxoSmithKline Biologicals s.a, Belgium และวัคซีน Rotateq ซึ่งประกอบด้วย 5 ซีโรทัยป์คือ G1, G2, G3, G4 และ P1 เป็นวัคซีนที่ผลิตจากสายพันธุ์ไวรัสในคนรวมกับสายพันธุ์ที่ได้จากวัว[4-6] ซึ่งวัคซีนทั้งสองได้รับการขึ้นทะเบียนในประเทศไทยในปี 2548 ต่อมาในปี 2554 กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้ทดลองให้วัคซีนโรตาซีโรทัยป์เดียวในเด็กไทยที่จังหวัดสุโขทัย โดยมีความคาดหวังว่าในปี 2558 จะนำ วัคซีนโรตาเข้าบรรจุไว้ในแผนการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติเพื่อลดอัตราการตายของเด็กไทย[7] สอดคล้องกับองค์การอนามัยโลกที่แนะนำให้แต่ละประเทศทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยนำวัคซีนโรตาบรรจุในโปรแกรมสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติ[1] ทำให้ในอนาคตประเทศไทยต้องนำเข้าวัคซีนโรตาเป็นจำนวนมากเพื่อรองรับแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศ ดังนั้นการประกันคุณภาพการผลิตวัคซีนโดยการควบคุมคุณภาพก่อนจำหน่ายในกระบวนการควบคุมรุ่นการผลิต (lot-by-lot release process) จึงเป็นสิ่งสำคัญ[8,9] นอกจากการควบคุมคุณภาพวัคซีนทางเคมีฟิสิกส์ การตรวจสอบความเป็นพิษ เพื่อดูความปลอดภัยตลอดจนการตรวจสอบความเป็นเอกลักษณ์ตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกแล้ว[10,11] สิ่งสำคัญที่เป็นตัวบ่งบอกวัคซีนนั้นมีประสิทธิภาพหรือไม่ คือการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีน ซึ่งการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนโรตาเชื้อเป็นซีโรทัยป์เดียว (monovalent rotavirus vaccine) สามารถตรวจหาปริมาณไวรัสได้โดยตรงโดยวิธี 50% cell culture infective dose ($CCID_{50}$) เหมือนวัคซีนไวรัสเชื้อเป็นทั่ว ๆไป[3,11-14] ซึ่งเป็นการนับจำนวนหลุมของเซลล์เพาะเลี้ยงที่พบว่าถูกทำลาย โดยไวรัสโรตาและทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เรียกว่า cytopathic effect (CPE) เปรียบเทียบกับจำนวนหลุมที่ไม่พบ CPE แล้วคำนวณความเจือจางของไวรัสสูงสุดที่มีจำนวนหลุมเซลล์เพาะเลี้ยงที่เกิด CPE คิดเป็นร้อยละ 50 ของจำนวนหลุมเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมด มีหน่วยเป็น 50% cell culture infective dose ($CCID_{50}$)[11] สามารถอ่านผลโดยการย้อมสี crystal violet หรือ immunoperoxidase ซึ่งวิธี immunoperoxidase นี้เป็นวิธีที่ใช้ในการประเมินค่าความแรงของวัคซีนโรตาของผู้ผลิตในต่างประเทศ

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาวิธีที่เหมาะสม สำหรับนำมาใช้ในการประเมินค่าความแรงของวัคซีนโรตา เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมรุ่นการผลิตของวัคซีนโรตาจากต่างประเทศในการรองรับแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศในอนาคต

วิธีการศึกษา

เป็นการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนโรตาเชื้อเป็นซีโรทัยป์เดียวโดยวิธี 50% $CCID_{50}$ ซึ่งนับจำนวนหลุมของเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ที่ถูกทำลายโดยไวรัสโรตาแล้วเกิด cytopathic effect เปรียบเทียบผลระหว่างการย้อมด้วย crystal violet กับการย้อมด้วย immunoperoxidase แล้วคำนวณหาค่าความแรงโดยใช้สูตรที่ดัดแปลงมาจาก Spearman & Kaber[15]

วัคซีนตัวอย่าง

การศึกษานี้ ใช้วัคซีนโรตาซีโรทัยป์เดียวจากบริษัทผู้ผลิตที่นำเข้าวัคซีนโรตาในประเทศไทย โดยบริษัทกำหนดค่าความแรงของวัคซีนโรตาต้องไม่น้อยกว่า 6 log $CCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยง MA104 (CCT WLB1998/12cell bank) เป็น African green monkey foetal kidney ซึ่งมีความจำเพาะต่อไวรัสโรตา ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทผู้ผลิต

แอนติบอดี

โมโนโคนอลแอนติบอดี 2C9 สำหรับใช้ในการย้อม immunoperoxidase ได้รับจากบริษัทผู้ผลิต

อาหารเลี้ยงเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbeco's modified eagle mini-

mum (DMEM) (Cat. No.31660-026, Gibco) ที่มีซีรั่มจากลูกวัว (fetal bovine serum, Cat. No. 26140-079, Gibco) 2%, L-glutamine (Cat. No. G-3126, Sigma) 1%, 7.5% $NaHCO_3$ (Cat.No.S-5716, Sigma) 3%, Penicillin (10,000 units/มิลลิลิตร) (Cat. No. P-3032, Sigma) ที่มี streptomycin (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (Cat. No. S-9137, Sigma) 1% และ 1M HEPES (Cat.No.H-6147, Sigma) 1% โดยเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์

อาหารเพื่อใช้ล้างเซลล์ในการทดสอบ (washing medium) เตรียมโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีส่วนผสมของซีรั่มจากลูกวัว

อาหารเลี้ยงเชื้อไวรัสโรตา

อาหารเลี้ยงเชื้อไวรัสโรตาสำหรับการทดสอบ (titration medium) เตรียมโดยเติม 0.25% trypsin (Cat. No. 27250-018, Gibco) ใน phosphate buffer saline (PBS^-) pH 7.2-7.4 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรลงใน washing medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การประเมินค่าความแรงของวัคซีนโรตา

เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 จำนวน 2.0 $x10^5$ เซลล์ในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในเพลทชนิด 96 หลุม (96-well plate) นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นนำวัคซีนตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสโรตาอ่อนฤทธิ์มากระตุ้นด้วย 0.25% trypsin (activate virus) ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อไวรัส titration medium โดยเจือจางไวรัสเป็น 1:10 บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 50-60 นาที จากนั้นเจือจางไวรัสแต่ละขั้นเป็น $1:10^{0.5}$ โดยเริ่มที่ระดับความเจือจาง $10^{-3.0}$- $10^{-7.5}$ โดยก่อนเติมวัคซีนตัวอย่างในแต่ละความเจือจาง เซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ในเพลท 96 หลุม จะถูกล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ washing medium ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/หลุม จำนวน 2 ครั้ง เพื่อเอา ซีรั่มที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เนื่องจากซีรั่ม จะหยุดการทำงานของ trypsin จากนั้นดูด washing medium ออกประมาณ 0.18 มิลลิลิตร ก่อนเติมวัคซีนตัวอย่างในแต่ละความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/หลุม ความเจือจางละ 8 หลุม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 7 วัน

การย้อม crystal violet

หลังจากบ่มครบ 7 วัน ตรวจนับจำนวนหลุมที่ไวรัสทำลายเซลล์เกิด CPE ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท แล้ว fix เซลล์ด้วย 5% formaldehyde นาน 30 นาที และย้อมเซลล์ด้วย 0.2% crystal violet ใน PBS^- pH 7.2-7.4 นาน 5 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกให้หมดด้วยน้ำประปา ปล่อยให้สีแห้งและนับจำนวน CPE ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ทเพื่อนำมาคำนวณหาความแรงหรือปริมาณไวรัสทั้งหมดในวัคซีนตัวอย่างมีหน่วยเป็น $logCCID_{50}$/dose/มล.

การย้อม immunoperoxidase

หลังจากบ่มครบ 7 วัน ตรวจนับจำนวนหลุมที่ไวรัสทำลายเซลล์เกิด CPE ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท แล้วจึงนำเพลทที่ถูกติดเชื้อมาล้างด้วย washing medium ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/หลุม จำนวน 1 ครั้งแล้ว fix เซลล์ด้วย 80% cool acetone แล้วนำมาเติม monoclonal antibody 2C9 ที่เจือจาง 250 เท่า ด้วย 5% skimmed milk (Cat.No.70166, Fluka) ใน PBS^- ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลท 4 ครั้งด้วย PBS^- และเติม anti-mouse IgG-peroxidase (Cat. No. 12-349, Millipore) ที่เจือจาง 400 เท่า ซึ่งได้จากการหาค่าความเจือจางที่เหมาะสมโดย 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 3,3'-Diaminobenzidine tablet (DAB) และ urea hydrogen peroxide tablet อย่างละ 1 เม็ด (Cat. No.

D4418, Sigma) ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมและเติมลงในเพลทปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที และล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำประปา อ่านผลและนับจำนวนหลุมที่มีเซลล์ติดสีน้ำตาลภายในเซลล์ซึ่งให้ผลบวกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสโรตาในเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำมาคำนวณหาค่าความแรงหรือปริมาณไวรัสโรตาทั้งหมด มีหน่วยเป็น log $CCID_{50}$/1.5 มิลลิลิตร

การคำนวณค่าความแรง

การคำนวณค่าความแรงของวัคซีนโรตา โดยใช้สูตรที่ดัดแปลงมาจาก Spearman & Kaber ดังนี้

$$\log CCID_{50} = - \text{ starting dilution(log)} + \left[\left[\frac{\sum \text{no. of CPE} - 0.5}{\text{no. of well in each dilution}} \right] \text{x dilution step(log)} \right]$$

ค่าความแรงที่ได้ในรูป log $CCID_{50}$/0.1 มิลลิลิตร จะถูกรายงานผลเป็น log $CCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร โดยถือว่าค่าความแรงที่ได้ในแต่ละครั้งที่ทดสอบต้องมีค่าความแตกต่างไม่เกิน 0.5 log $CCID_{50}$

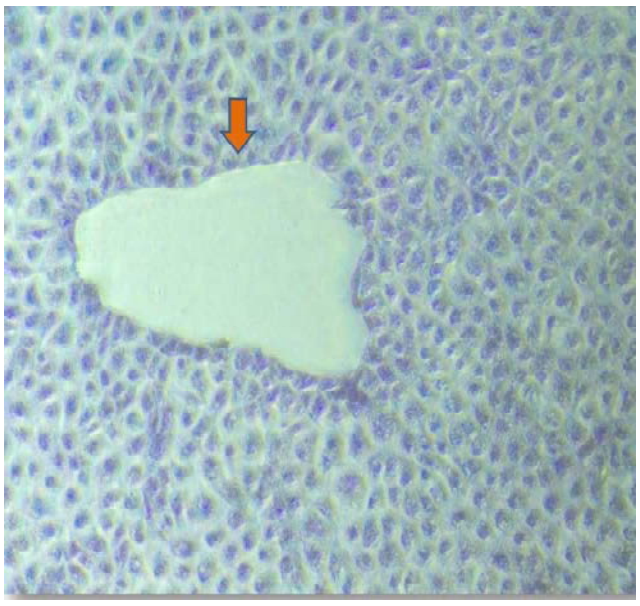
ผลการศึกษา

ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังถูกติดเชื้อด้วยไวรัสโรตาเมื่อย้อมด้วย crystal violet

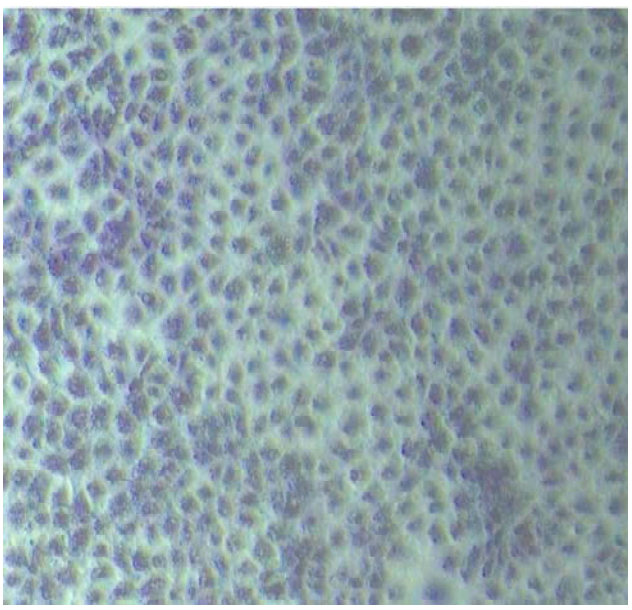
ภาพที่ 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 หลังถูกติดเชื้อด้วยไวรัสโรตา นาน 5-7 วัน เมื่อย้อมสีด้วย crystal violet จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์ทกำลังขยาย 50x โดยเซลล์มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปและถูกทำลายหลุดเป็นช่องว่าง ในขณะที่เซลล์ปกติมีการติดสีน้ำเงินของ crystal violet บริเวณไซโทพลาซึมและนิวเคลียสของเซลล์ (a) เหมือนกับเซลล์ควบคุม (b) ที่ไม่ได้ใส่วัคซีนโรตาลงในเซลล์เพาะเลี้ยง

ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังถูกติดเชื้อด้วย

ภาพที่ 1 ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังถูกติดเชื้อด้วยไวรัสโรตาเมื่อย้อมด้วย crystal violet



(a) เซลล์เพาะเลี้ยงMA104 ที่ถูกติดเชื้อ



(b) เซลล์เพาะเลี้ยงMA104 ที่ไม่ถูกติดเชื้อ จากภาพกำลังขยาย 50X

ไวรัสโรตาเมื่อย้อมด้วย immunoperoxidase

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 หลังถูกติดเชื้อด้วยไวรัสโรตาเมื่อย้อมด้วย immunoperoxidase จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์ท กำลังขยาย 100x หลังถูกติดเชื้อไวรัสโรตานาน 5-7 วัน เซลล์มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัดมีการติดสีน้ำตาลบริเวณไซโทพลาซึมและนิวเคลียสของเซลล์ (a) เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (b) ที่ไม่ได้ใส่วัคซีนโรตาลงในเซลล์เพาะเลี้ยง กำลังขยาย 100x

การเปรียบเทียบการประเมินค่าความแรงของวัคซีนโรตาจากทั้ง 2 วิธี

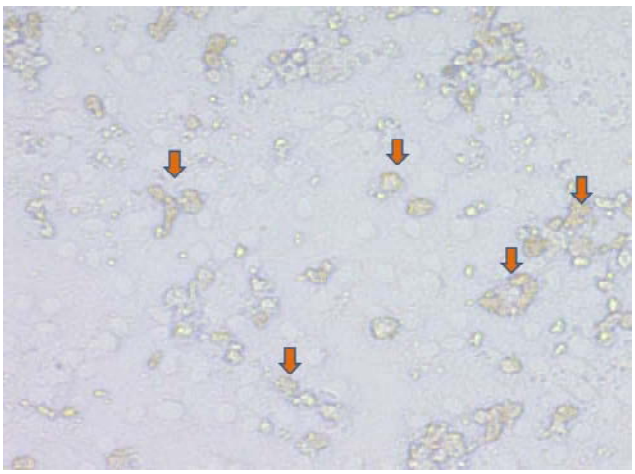
การตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนโรตา ได้ศึกษาเปรียบเทียบโดยการย้อมเซลล์ด้วย crystal violet กับการย้อมเซลล์ด้วย immunoperoxidase จากการทดสอบโดยทั้ง 2 วิธีพร้อมกันในสภาวะที่ใช้วัคซีนตัวอย่างและเซลล์เพาะเลี้ยงเดียวกัน จำนวน 6 การทดสอบ ที่เป็นอิสระแก่กัน (ตารางที่ 1)

ค่าความแรงของวัคซีนโรตา ที่ได้จากการย้อมด้วย crystal violet จากการทดสอบ 6 ค่า พบว่าให้ค่าความแรงต่ำกว่าการย้อมด้วย immunoperoxidase ในทุกค่าโดยมีค่าความแรงเฉลี่ย (geometric mean, G.M.) เท่ากับ 5.98 $logCCID_{50}$/1.5 มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ที่ 3.45% ในขณะที่การย้อมด้วย immunoperoxidase ให้ค่าความแรงเฉลี่ยมากกว่าเท่ากับ 6.20 $logCCID_{50}$/1.5 มิลลิลิตร ค่า %CV เท่ากับ 2.46 ซึ่งค่า %CV ต่ำกว่าการย้อมด้วย crystal violet เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง 2 วิธี พบว่าทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดย independent Student's t-test

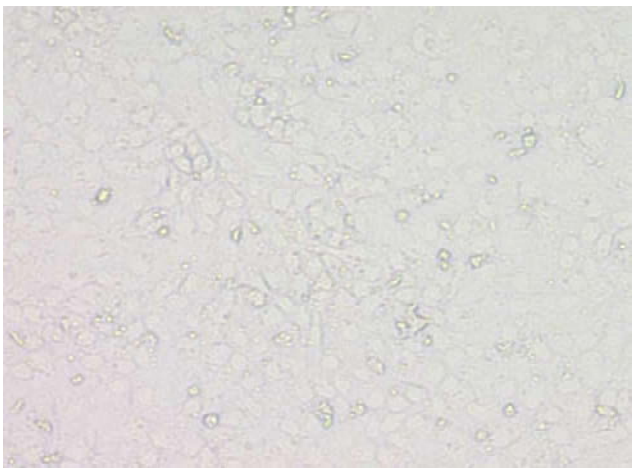
การตรวจสอบความแม่นของวิธี immunoperoxidase

เมื่อพบว่าวิธีการย้อม immunoperoxidase มีความเหมาะสมมากกว่าการย้อมด้วย crystal violet จึงได้นำวิธีการย้อมสีด้วย immunoperoxidase มาทดสอบความแม่นของวิธีเทียบกับข้อกำหนดของบริษัทที่ระบุว่า ค่าความแรง ของวัคซีนตัวอย่างต้องมีค่ามากกว่า 6 $logCCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร ทำการทดสอบ 6 ครั้งที่เป็นอิสระแก่กัน ค่าความแรงที่ได้ในแต่ละครั้งมากกว่า 6 $logCCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตรโดยมีค่าความแรงเฉลี่ยที่ได้เท่ากับ 6.11 $logCCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร ค่า %CV เท่ากับ 0.95% (ตารางที่ 2)

ภาพที่ 2 ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังถูกติดเชื้อด้วยไวรัสโรตาเมื่อย้อมด้วย immunoperoxidase



(a) เซลล์เพาะเลี้ยงMA104 ที่ถูกติดเชื้อ



(b) เซลล์เพาะเลี้ยงMA104 ที่ไม่ถูกติดเชื้อ จากภาพกำลังขยาย 100X

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธี immunoperoxidase

เมื่อนำวิธี immunoperoxidase มาทดสอบความเที่ยง โดยทำการทดสอบ 3 ค่า โดยผู้ปฏิบัติงาน 2 คนที่เป็นอิสระแก่กัน พบว่าค่าความแรงเฉลี่ยที่ได้จากผู้ปฏิบัติงานคนที่ 1 เท่ากับ 6.30 logCCID$_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร (%CV รวม 1.98) และผู้ปฏิบัติงานคนที่ 2 ได้ค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 6.36 logCCID$_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร (%CV รวม 1.02) อย่างไรก็ตามค่าความแรงของผู้ปฏิบัติคนที่ 1 และคนที่ 2 พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) โดย independent Student's t-test (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการประเมินค่าความแรงของวัคซีนโรตาจากทั้ง 2 วิธี*

ครั้งที่	วิธี	
	Immunoperoxidase (log CCID$_{50}$/1.5 มล.)[a]	Crystal violet (log CCID$_{50}$/1.5 มล.)[b]
1	6.18	6.05
2	5.99	5.68
3	6.18	5.99
4	6.30	5.99
5	6.11	5.86
6	6.43	6.30
G.M.	6.20	5.98
SD	0.15	0.21
%CV	2.46	3.45

* ค่าความแรงของตัวอย่างวัคซีนโรตาจากผู้ผลิตจากการทดสอบ 6 ครั้ง, a หมายถึงการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนโรตาด้วยวิธีย้อม immunoperoxidase, b หมายถึงการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนโรตาด้วยวิธีการย้อมด้วยสี crystal violet โดยระบุค่าความแรงเฉลี่ยเรขาคณิตเป็น G.M. มีหน่วยเป็น log CCID$_{50}$/1.5 มล. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% coefficient of variation, %CV) เมื่อเปรียบเทียบค่าความแรงของ 2 วิธีทางสถิติโดยใช้ Independent Samples t-test พบว่าค่าความแรงที่ได้จากวิธี immunoperoxidase ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเทียบกับวิธีการ ย้อมด้วยสี crystal violet

ตารางที่ 2 การตรวจสอบความแม่นของวิธี immunoperoxidase

ครั้งที่	วิธี Immunoperoxidase (log CCID$_{50}$/1.5 มล.)[a]
1	6.11
2	6.05
3	6.18
4	6.05
5	6.11
6	6.18
G.M. รวม	6.11
SD รวม	0.06
%CV รวม	0.95

*ค่าความแรงของตัวอย่างวัคซีนโรตาจากผู้ผลิตจากการทดสอบ 6 ครั้ง, a หมายถึงการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนโรตาด้วยวิธี immunoperoxidase โดยระบุค่าความแรงเฉลี่ยเรขาคณิตเป็น G.M. มีหน่วยเป็น log CCID$_{50}$/dose/1.5 มล. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% coefficient of variation, %CV)

ตารางที่ 3 การตรวจสอบความเที่ยงของวิธี immunoperoxidase*

ครั้งที่	ค่าความแรง (log CCID$_{50}$/1.5 มล.) (a)	
	ผู้ปฏิบัติคนที่ 1	ผู้ปฏิบัติคนที่ 2
1	6.43	6.30
2	6.30	6.43
3	6.18	6.36
G.M. รวม	6.30	6.36
SD รวม	0.13	0.07
%CV รวม	1.98	1.02

* ผู้ผลิตวัคซีนโรตาไวรัสกำหนดไว้ว่า ค่าความแรงของวัคซีนต้องไม่น้อยกว่า 6 log CCID$_{50}$/dose/1.5 มล. (a) หมายถึงการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนโรตาไวรัสโดยวิธี immunoperoxidase โดยระบุค่าความแรงเฉลี่ยเรขาคณิตเป็น G.M. ในรูป log CCID$_{50}$/dose/1.5 มล. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ตลอดจนค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% coefficient of variation, %CV) เมื่อเปรียบเทียบค่าความแรงของ 2 ผู้ปฏิบัติการทางสถิติโดยใช้ Independent Samples t-test พบว่าค่าความแรงที่ได้จากผู้ปฏิบัติการคนที่ 1 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเทียบกับผู้ปฏิบัติการคนที่ 2

วิจารณ์

เซลล์เพาะเลี้ยง MA104 เป็นเซลล์ที่มีความไวต่อไวรัสโรตาที่ทำให้เกิดอุจจาระร่วงในเด็กทารกแรกเกิด[3] เซลล์ดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการศึกษาหาปริมาณไวรัสโรตา ในขณะเดียวกันวัคซีนไวรัสเชื้อเป็นโดยทั่วไปการตรวจสอบความแรงจะตรวจหาปริมาณไวรัสที่มีอยู่ทั้งหมดในวัคซีนตัวอย่าง ซึ่งสามารถตรวจได้โดยวิธี plaque formation หรือวิธี $CCID_{50}$ หรือวิธี egg infective dose 50% (EID_{50})ขึ้นกับความเหมาะสมของไวรัสแต่ละชนิด[5,12-14] ซึ่งวัคซีนโรตาเป็นวัคซีนไวรัสเชื้อเป็น องค์การอนามัยโลกได้ออกข้อกำหนดระบุค่าความแรงเป็นหน่วย $CCID_{50}$ โดยการนับจำนวนหลุมที่เกิดการติดเชื้อเหมือนวัคซีนไวรัสเชื้อเป็นอื่นๆ เช่น วัคซีนโปลิโอ และวัคซีนรวมหัดหัดเยอรมันและคางทูม การศึกษานี้จึงเปรียบเทียบการย้อมด้วย crystal violet ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายเทียบกับการย้อมด้วย immunoperoxidase ซึ่งเป็นวิธีที่บริษัทผู้ผลิตนำมาใช้ จากนั้นคำนวณปริมาณไวรัสในรูปแบบ $CCID_{50}$

ผลการทดลองพบว่าการตรวจหาค่าความแรงของวัคซีนโรตาโดยการย้อม crystal violet กับวิธีย้อม immunoperoxidase สามารถตรวจพบเซลล์ MA104 มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสโรตาได้เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่การย้อมด้วย immunoperoxidase จะเห็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หลังการติดเชื้อ (cytopathic effect, CPE) ชัดเจนขึ้นหลังการย้อม ในขณะที่การย้อมด้วย crystal violet นั้นบางครั้งยากต่อการเห็นเซลล์มีการติดเชื้อ โดยเฉพาะในกรณีที่ปริมาณไวรัสถูกเจือจางให้น้อยลง นอกจากนี้การย้อมด้วย immunoperoxidase ให้ค่าความแรงที่สูงกว่าการย้อมด้วย crystal violet แสดงให้เห็นว่าการย้อมด้วยทั้งสองวิธีมีความไวที่แตกต่างกันทำให้ค่าความแรงที่ได้แตกต่างกันในทุกครั้งที่ทำการทดสอบ นั้นคือการย้อมด้วย immunoperoxidase สามารถตรวจหาจำนวนหลุมที่เกิดการ ติดเชื้อไวรัสโรตาได้มากกว่าการย้อมด้วย crystal violet ถึงแม้ว่าทั้ง 2 วิธีจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์ที่กำหนดของบริษัทผู้ผลิต จะพบว่าค่าความแรงที่ได้จากการย้อมด้วย crystal violet มีค่าความแรงเฉลี่ย 5.98 $logCCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร (ต่ำกว่า 6 $logCCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร ที่ระบุโดยบริษัท) ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์ของบริษัทผู้ผลิต ในขณะที่การย้อมด้วย immunoperoxidase จะให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์เนื่องจากค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 6.20 $logCCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร (สูงกว่า 6 $logCCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร ที่ระบุโดยบริษัท) ดังนั้นการย้อมด้วย crystal violet อาจจะไม่เหมาะสมสำหรับการประเมินค่าความแรงสำหรับ rotavirus vaccine ซึ่งมีโอกาสให้ผลการวิเคราะห์แตกต่างจากผู้ผลิต และอาจสร้างความขัดแย้งของผลการทดสอบได้เนื่องจากใช้วิธีที่แตกต่างจากบริษัทผู้ผลิต ดังนั้นเพื่อยืนยันว่าวิธี immunoperoxidase มีความแม่นของวิธี จึงนำวิธีการย้อม immunoperoxidase มาทดสอบความแม่น (ดังตารางที่ 2) แต่เนื่องจากไม่มีวัคซีนมาตรฐานสากลให้เทียบค่าความแรง จึงเปรียบเทียบค่าความแรงกับวัคซีนตัวอย่างของบริษัท นั่นคือวัคซีนตัวอย่างต้องให้ค่าความแรงเฉลี่ยมากกว่า 6 $logCCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร ผลการทดสอบความแม่นพบว่า ในทุกการทดสอบให้ค่าความแรงมากกว่า 6 $logCCID_{50}$/dose/1.5 มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์มาตรฐานของผู้ผลิต และเมื่อนำวิธีดังกล่าวมาศึกษาความเที่ยงของวิธี (ตารางที่ 3) เพื่อยืนยันว่าวิธีการย้อม immunoperoxidase มีความเหมาะสมจริง จึงทำการทดสอบโดยผู้ปฏิบัติ 2 คน พบว่าค่าความแรงที่ได้ไม่มีแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และมีค่าร้อยละความแปรปรวนต่ำ ผลการทดสอบสามารถยืนยันได้ว่าวิธีการตรวจหาค่าความแรงของวัคซีนโรตาซีโรทัยป์เดียวโดยการย้อมด้วยวิธี immuno-peroxidase มีความแม่นและความเที่ยงของการทดสอบ ซึ่งสามารถนำวิธีการย้อม immunoproxidase มาใช้ในการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนโรตาซีโรทัยป์เดียวสำหรับการควบคุมคุณภาพวัคซีนเพื่อรองรับการรับรองรุ่นการผลิตของวัคซีนให้ได้มาตรฐานเพื่อให้เด็กไทยได้รับวัคซีนโรตาซีโรทัยป์เดียวที่มี

ประสิทธิภาพและความปลอดภัยในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศในอนาคต

สรุป

การศึกษาในครั้งนี้ได้หาวิธีที่เหมาะสมในการตรวจหาค่าความแรงของวัคซีนโรตาซีโรทัยป์เดียวโดยเปรียบเทียบการย้อมเซลล์ภายหลังการติดเชื้อไวรัสโรตาด้วยวิธีการย้อม immunoperoxidase เทียบกับการย้อมด้วย crystal violet ซึ่งพบว่าวิธี immunoperoxidase มีค่าความแรงที่สูงกว่าการย้อมด้วย crystal violet และผ่านเกณฑ์มาตรฐานค่าความแรงที่กำหนด นอกจากนี้ ยังมีความแม่นและความเที่ยงของการทดสอบ ดังนั้นการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนโรตาโดยวิธี immunoperoxidase มีความเหมาะสม สามารถนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพค่าความแรงของวัคซีนโรตาซีโรทัยป์เดียวเพื่อรองรับการให้วัคซีนในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติในอนาคต

กิติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ นางธีรนารถ จิวะไพศาลพงศ์ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้ ทำให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Rotavirus vaccines. WHO position paper – January 2013. Wkly Epidemiol Rec 2013; 88:49–64.
2. วิชัย สันติมาลีวรกุล, ทศวรรณ จิตรวศินกุล.วัคซีนโรตาไวรัส: การพัฒนาและการนำมาใช้ทางคลินิก.ไทยไภษัชยนิพนธ์ 2550;4:1–12.
3. World Health Organization. Meeting Report. WHO Workshop in Training Performance of Rotavirus Vaccine Potency Testing; 2007 Mar 19–23; National Institute for Biological Standards & Control, Potters Bar, United Kingdom. Geneva: World Health Organization; 2007.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 2009;58(RR02):1–25.
5. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. European pharmacopoeia. 7th edition (7.0). Nordlingen (Germany): Druckerei C.H. Beck; 2011.
6. วันดี วราวิทย์, อัจฉรีย์ อินทุโสมา. Rotavirus vaccine. ม.ป.ท.; น. 28–33.
7. สำนักสารนิเทศ สำนักงานปลัดกระทรวง. หมอสุรวิทย์เผยสธ. เตรียมบรรจุวัคซีน"ไวรัสโรต้า"เข้าแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติปี 2558 [Internet]. [cited 2014 Feb 4]. Available from: http://www.moph.go.th/ops/iprg/include/admin_hotnew/show_hotnew.php?idHot_new=49880
8. World Health Organization. Training manual: licensing, lot release, laboratory access. Geneva: World Health Organization; 2001.
9. Hendriksen C, Spieser JM, Akkermans A, Balls M, Bruckner L, Cussler K, et al. Validation of alternative methods for the potency testing of vaccines. ATLA 1998;26:747–61.
10. Metz B, van den Dobbelsteen G, van Els C, van der Gun J, Levels L, van der Pol L, et al. Quality-control issues and approaches in vaccine development. Expert Rev Vaccines 2009;8:227–38.
11. Forcic D, Kosutic-Gulija T, Santak M, Jug R, Ivancic-Jelecki J, Markusic M, et al. Comparisons of mumps virus potency estimates obtained by 50% cell culture infective dose assay and plaque assay. Vaccine 2010;28:1887–92.
12. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-sixth report. WHO Technical Report Series 941. Geneva: World Health Organization; 2007.
13. Fukuda A, Sengun F, Sarpay HE, Konobe T, Saito S, Umino Y, et al. Parameters for plaque formation in the potency assay of Japanese measles vaccines. J Virol Methods 1996;61:1–6.

14. Schalk JA, Vries CG, Jongen PM. Potency estimation of measles, mumps and rubella trivalent vaccines with quantitative PCR infectivity assay. Biologicals 2005;33:71-9.

15. Adedeji AO, Okonko OI, Adu FD. Sabin and wild type polioviruses from children who presented with acute flaccid paralysis in Nigeria. Afr Health Sci 2012;12:345-54.

Abstract: Evaluating Potency Values of Monovalent Rotavirus Vaccine: Comparison between Crystal Violet Staining and Immunoperoxidase Staining

Natthakarn Mingngamsup, B.Sc.; Phurit Songthananit, B.Sc.; Supaporn Phumiamorn B.Sc., M.Sc., D.Sc.

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

Journal of Health Science 2014;23:112-20.

A human rotavirus vaccine will be included in the National Expanded Programme on Immunization in 2015. Thus, quality control of the vaccine is required, particularly in the control of potency values to verify vaccine efficacy in the market. The objective of this study was to compare two staining methods for assessing vaccine potency, the crystal violet and the immunoperoxidase, in the detection of rotaviral infection of MA104 cells. It was found that immunoperoxidase method yielded higher sensitivity than that of crystal violet. In addition, it showed compatible accuracy with the specification of the vaccine manufacturer which specified that the potency values should be higher than 6 $\log CCID_{50}$/dose/1.5 ml. The immunoperoxidase staining method also had high precision as observed by the non-significant variations of the outcomes of two analyses. Thus, immunoperoxidase staining was a more suitable method for lot-release control of rotavirus vaccines to support the National Expanded Programme on Immunization.

Key words: **rotavirus vaccine, determination of vaccine potency, immunoperoxidase, crystal violet**