

การพัฒนาวิธี cell-based ELISA สำหรับทดสอบหาปริมาณ neutralization antibody ต่อ enterovirus 71

ณัฐนันท์ ภิญโญสุชี^{1*}, รัตนาวิ วิชาจารย์¹, นุชนาฏ ชัชวาลการพาณิชย์¹, ปนัดดา เทพอดิศ¹

¹สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

E-mail: nadthan.p@dmisc.mail.go.th

บทคัดย่อ

โรคมือเท้าปากที่เกิดจากเชื้อ enterovirus 71 เป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขในประเทศพบมากในเด็กเล็กติดต่อได้ง่ายโดยการสัมผัส ซึ่งบางรายอาจมีอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต ด้วยเหตุนี้จึงได้พัฒนาวัคซีนต้นแบบป้องกันโรคมือเท้าปากชนิด inactivated enterovirus 71 ขึ้น และศึกษาผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนในกระต่าย โดยการทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้ง enterovirus 71 ในตัวอย่างซีรัม กระต่ายกลุ่มที่ฉีดทดสอบด้วยวัคซีนทดสอบ ดังนั้นเพื่อทดสอบหาความยับยั้ง enterovirus 71 ในซีรัมกระต่ายที่สามารถให้ผลการทดสอบที่อ่านค่าได้จึงพัฒนาวิธี cell-based ELISA โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการติดเชื้อไวรัส ได้แก่ ปริมาณเซลล์ ปริมาณไวรัส ระยะเวลาในการบ่ม และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA โดยศึกษาชนิดและปริมาณแอนติบอดี เป็นต้น โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธี micro-neutralization assay จากการศึกษพบว่าวิธี cell-based ELISA ที่พัฒนาขึ้นสามารถอ่านผลโดยการวัดค่าดูดกลืนแสง โดยให้ผลของระดับการยับยั้งใกล้เคียงกับวิธี micro-neutralization เดิมที่อ่านผลด้วยตา ดังนั้นวิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบปริมาณ neutralizing antibody แทนวิธี micro-neutralization assay แบบเดิม

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบสำหรับหาปริมาณ neutralizing antibody ต่อ enterovirus 71 ในซีรัม โดยวิธี cell-based ELISA

วิธีการวิจัย

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี cell-based ELISA ในขั้นตอนการติดเชื้อไวรัส ได้แก่ ปริมาณเซลล์ ปริมาณไวรัส ระยะเวลาในการบ่ม และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA โดยศึกษาชนิดและปริมาณแอนติบอดี

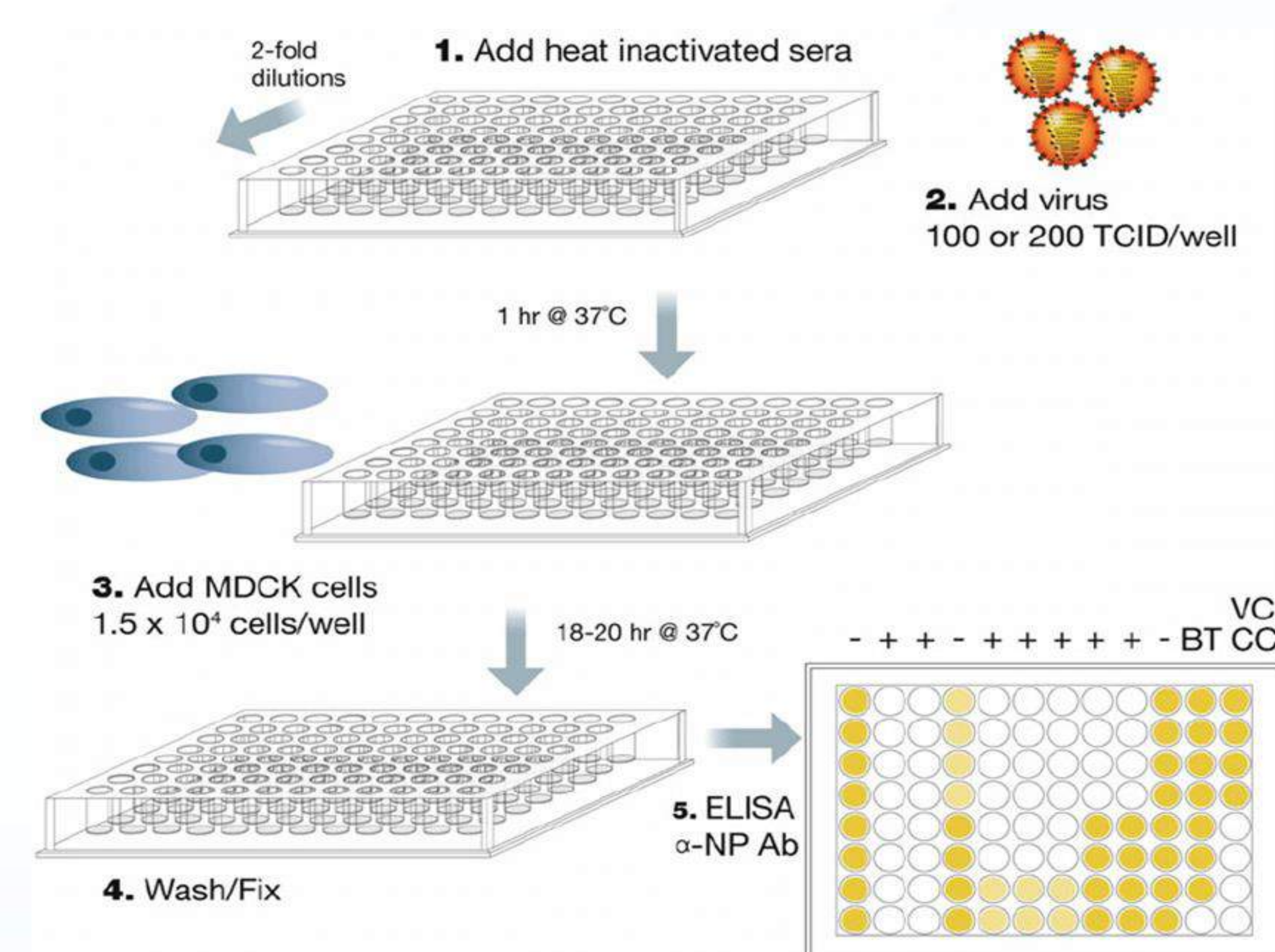


Table 1. Calculation of virus titre in mice using the Reed and Muench method

Log ₁₀ virus dilution	Mice	Died	Survived	Cumulative total	Total	Percent mortality
-1	10	0	10	0	10	0/10 = 0%
-2	10	0	10	0	10	0/10 = 0%
-3	10	0	10	0	10	0/10 = 0%
-4	10	0	10	0	10	0/10 = 0%
-5	10	0	10	0	10	0/10 = 0%
-6	10	4	6	4	10	4/10 = 40%
-7	10	9	1	9	10	9/10 = 90%

5. Reed and Muench calculation

ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย

วิธี cell-based ELISA ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจสอบหาปริมาณ neutralizing antibody แทนวิธี micro-neutralization assay แบบเดิม

บทสรุป

การพัฒนาวิธีทดสอบหาปริมาณ neutralizing antibody มีความจำเป็นต่อการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน จากการทดลองนี้พบว่าวิธี cell-based ELISA ที่พัฒนาขึ้นสามารถอ่านผลโดยการวัดค่าดูดกลืนแสง โดยให้ผลของระดับการยับยั้งใกล้เคียงกับวิธี micro-neutralization แบบเดิมที่อ่านผลด้วยตา ดังนั้นวิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบปริมาณ neutralizing antibody แทน วิธี micro-neutralization assay ได้

หลักการและเหตุผล

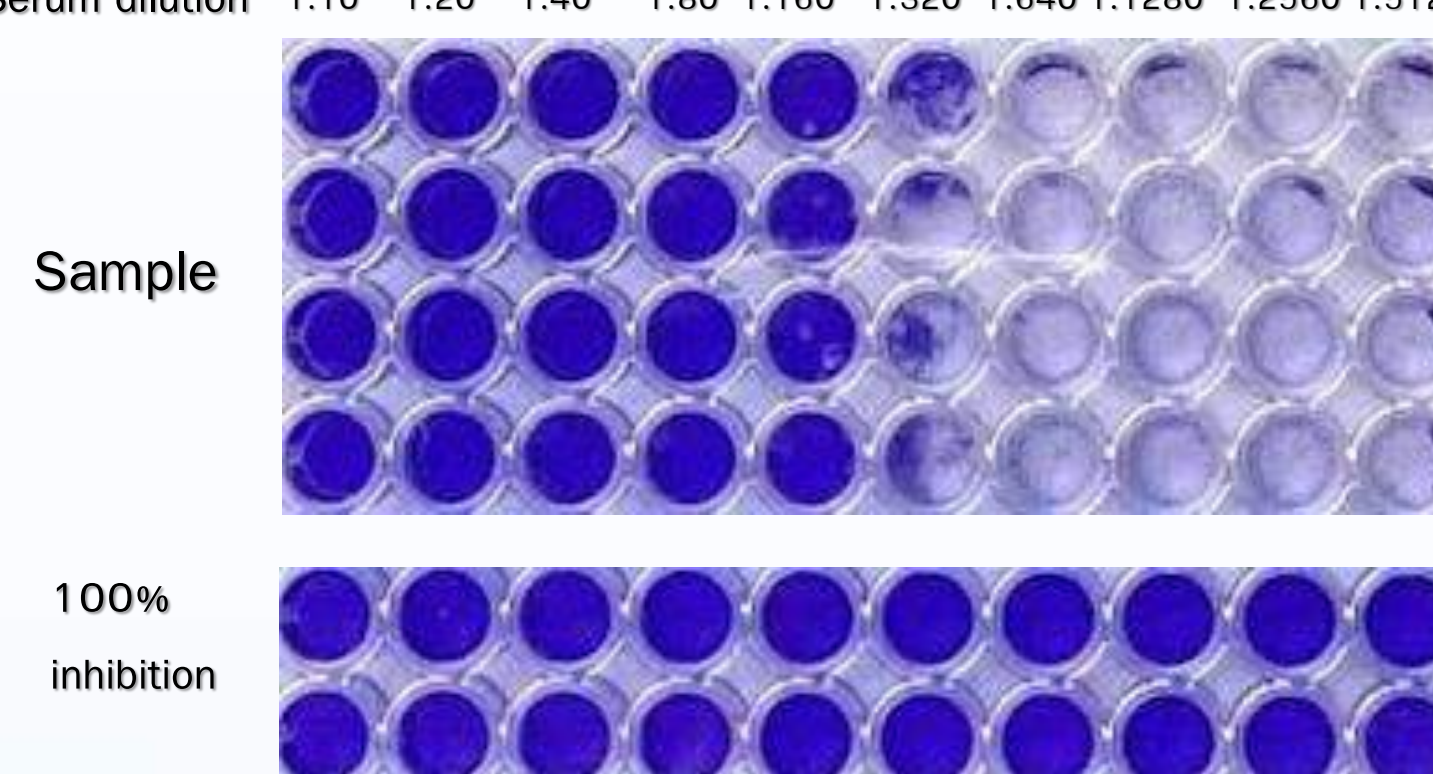
โรคมือเท้าปากเป็นโรคที่พบได้ในเด็กเล็ก เกิดจากการติดเชื้อกลุ่ม Enterovirus ได้หลายชนิด ได้แก่ Coxsackie A16 Coxsackie A6 Echovirus และ Enterovirus-71 โดยทั่วไปผู้ป่วยมีอาการไม่รุนแรงและหายได้เองใน 7-10 วัน มีอาการไข้ เจ็บปาก อาจมีผื่นเป็นตุ่มน้ำใสหรือเม็ดแดงบริเวณฝ่ามือ ฝ่าเท้า ลำตัว หรือมีแผลตุ่มในปาก แต่มีรายงานผู้ป่วยอาการรุนแรง มีภาวะสมองอักเสบหัวใจล้มเหลว ปอดล้มเหลวเฉียบพลัน และเสียชีวิต โดยมีสาเหตุเกิดจากเชื้อ Enterovirus-71 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ดำเนินโครงการวิจัยและพัฒนาวัคซีนต้นแบบสำหรับป้องกันโรคมือเท้าปากที่เกิดจากเชื้อเอนเทอโรไวรัส 71 ในรูปแบบวัคซีนเชื้อตาย (Inactivated Enterovirus-71) ที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง Vero และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในสัตว์ทดลอง จึงพัฒนาวิธีทดสอบเพื่อวิเคราะห์ผลการยับยั้งเชื้อไวรัสด้วย วิธี micro-neutralization assay โดยเปลี่ยนการอ่านผลโดยการนับจำนวน cytopathic effect (CPE) ที่เกิดขึ้นจากการใช้สายตาที่อาจทำให้การแปลผลมีความคลาดเคลื่อนได้ มาใช้วิธี cell-based ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ผิวของเอนเทอโรไวรัส 71 ชนิด VP2 แล้วอ่านผลจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งวิธีนี้สามารถให้ผลการทดลองที่มีความน่าเชื่อถือ

ผลการวิจัย

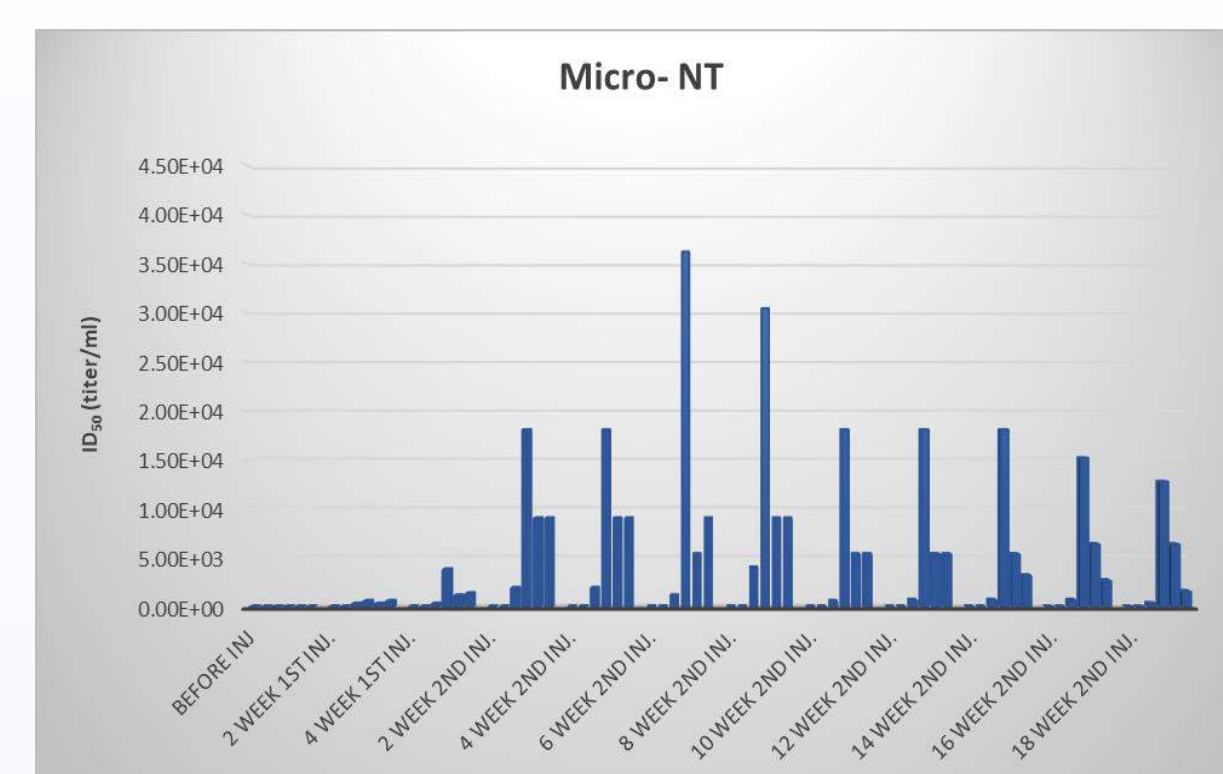
สภาวะที่เหมาะสมของวิธี cell-based ELISA เป็นดังนี้

- เตรียมตัวอย่างซีรัมและไวรัส (100TCID₅₀/well) บ่มที่ 37°C, 1 ชั่วโมง
- เติม Fixing solution (4% formaldehyde ใน 1xPBS pH 7.2) ปริมาตร 200 µl/well บ่มที่อุณหภูมิห้อง, 20 นาที
- ล้างเพลทด้วย 1x Wash buffer 3 ครั้ง แล้วเติม Quenching buffer (0.6% H₂O₂ ใน wash buffer) ปริมาตร 200 µl/well บ่มที่อุณหภูมิห้อง, 20 นาที
- ล้างเพลทด้วย 1x Wash buffer 3 ครั้ง แล้วเติม Blocking buffer ปริมาตร 200 µl/well บ่มที่ 4°C นานข้ามคืน
- เติม primary antibody ที่ความเข้มข้น 1:20,000 ปริมาตร 100 µl/well บ่มที่ 37°C, 1 ชั่วโมง
- เติม secondary antibody ที่ความเข้มข้น 1:10,000 ปริมาตร 100 µl/well บ่มที่ 37°C, 1 ชั่วโมง
- เติม TMB substrate ปริมาตร 100 µl/well บ่มที่อุณหภูมิห้อง, 30 นาที
- เติม STOP solution 100 µl/well
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450/620 นาโนเมตร
- หาค่า cut-off โดยใช้ค่าเฉลี่ยของหลุมที่ยับยั้ง 100%
- คำนวณค่ายับยั้งไวรัส (ID₅₀) โดยใช้วิธีของ Reed and Muench (1938)

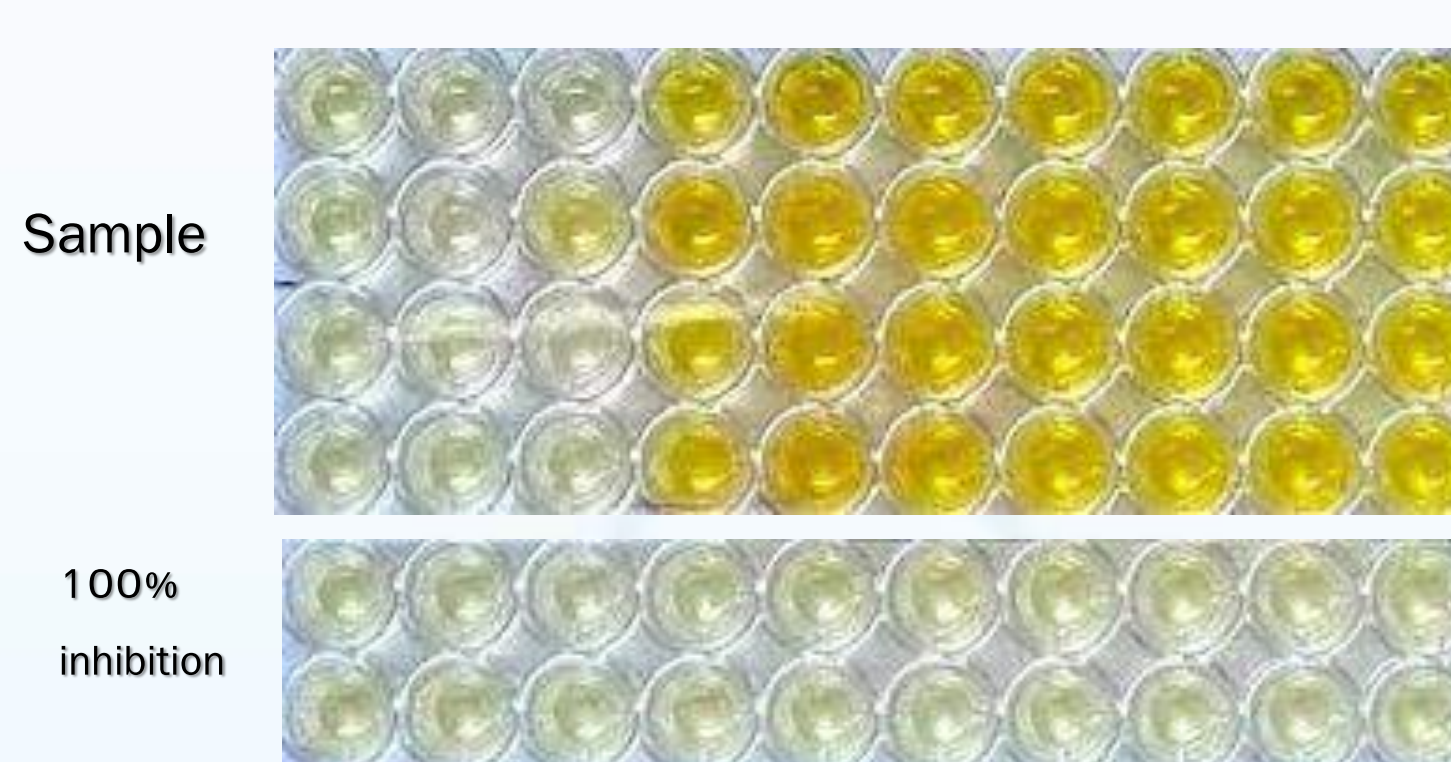
Serum dilution 1:10 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 1:1280 1:2560 1:5120



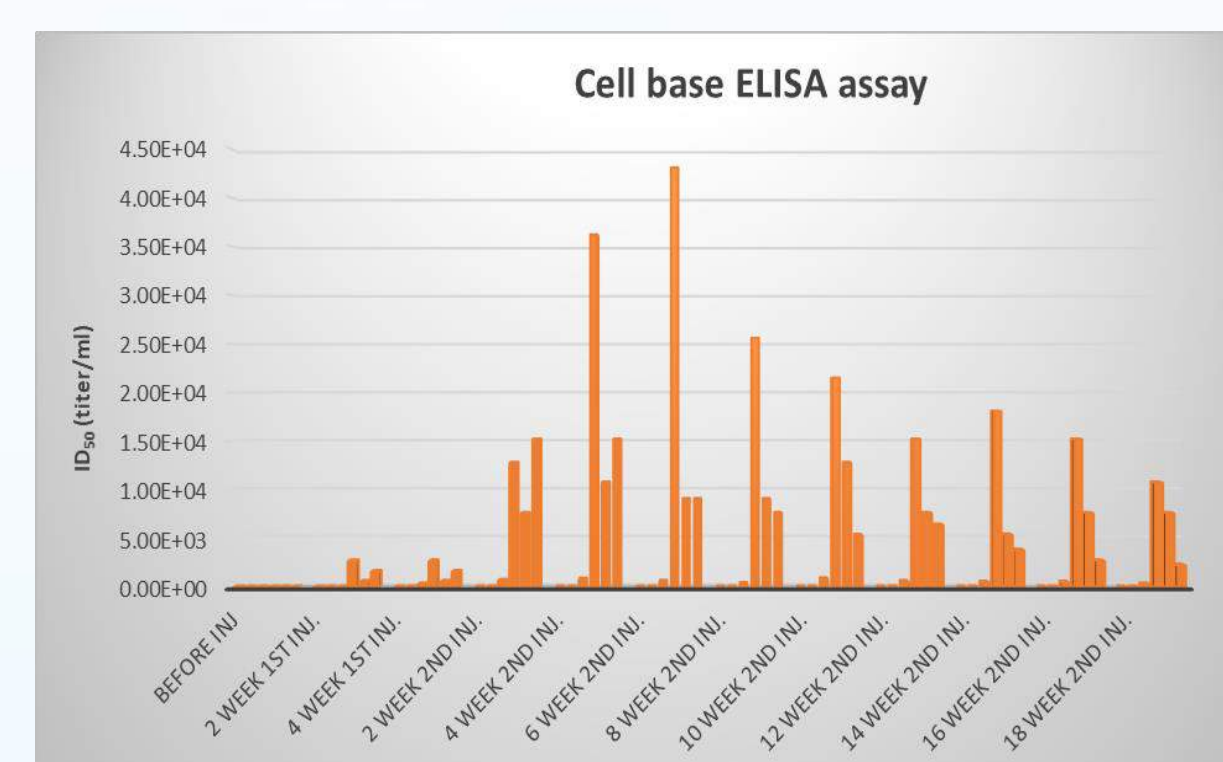
A



Serum dilution 1:10 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 1:1280 1:2560 1:5120



B



แสดงผล micro-neutralization assay (A) และผล cell-based assay (B)

กราฟแสดงผล micro-neutralization assay และ cell-based ELISA ของซีรัมกระต่ายที่ฉีดด้วย inactivated EV71ต่อการยับยั้งไวรัส EV-71 ที่ระยะเวลาต่างๆ หลังการฉีดวัคซีน

เอกสารอ้างอิง

- Chou AH, Liu CC, Chang JY, et al. Immunological evaluation and comparison of different EV71 vaccine candidates. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012:831282. doi:10.1155/2012/831282
- Liu CC, Chang HW, Yang G, et al. Development of a quantitative enzyme linked immunosorbent assay for monitoring the Enterovirus 71 vaccine manufacturing process. *J Virol Methods.* 2011; 176(1-2):60-68. doi:10.1016/j.jviromet.2011.06.001
- R&D systems. Cell-based ELISA [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 11] Available from: <https://resources.mdsystems.com/pdfs/datasheets/kcb002.pdf>