สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administration

วารสารอาหารและยา THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
ปีที่ 27 ฉบับที่ 3 กันยายน - ธันวาคม 2563 Vol.27 No.3 September -December 2020
Journal homepage: https://www.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal

การทดสอบความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ โดยการประเมินประสิทธิภาพของการสร้างภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรด้วยเทคนิค ELISA

Potency Test of Diphtheria Vaccine by Using ELISA Technique to Evaluate in Mice Immune Response

สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์ Sakalin Trisiriwnich
สุรินทรา หลานวงศ์ Surintra Lhanwong
ฐิติพร สมพอง Thitiporn Sompong
ภูริต ทรงธนนิตย์ Phurit Songthananit
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ Institute of Biological Producrs, Department of Medical Sciences
E-mail: sakalin.t@dmsc.mail.go.th
รับต้นฉบับ 17 พฤษภาคม 2561 ปรับปรุง 18 มีนาคม 2563 รับตีพิมพ์ 14 กรกฎาคม 2563

บทคัดย่อ

การทดสอบความแรงของแอนติเจนหรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นกระบวนการที่สำคัญของการประเมินประสิทธิภาพวัคซีน ปัจจุบันประเทศไทยทดสอบความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบโดยวิธี neutralization test (US potency method) ในหนูตะเภา ซึ่งได้ผลการทดสอบเป็นค่าประมาณโดยไม่สามารถระบุเป็นค่าที่แน่นอนได้ การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ภูมิคุมกันในหนูถีบจักรด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งให้ผลการทดสอบมีค่าเชิงปริมาณในหน่วย International Unit (IU) สามารถนำผลมาวิเคราะห์แนวโน้มเทียบกับผลการทดสอบของผู้ผลิตได้ จึงเป็นวิธีทางเลือกเพื่อทดแทนวิธีดั้งเดิม จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่า ทุกผลการทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของทุกค่า ความแรงที่ได้มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 50 ถึง 200 ตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก ค่าระดับภูมิคุมกันของหนูถีบจักรต่อวัคซีนตัวอย่างจะแปรผันตามระดับความเจือจางของวัคซีนในลักษณะเป็นเส้นตรง ขนานกับค่าระดับภูมิคุ้มกันของหนูถีบจักรต่อวัคซีนมาตรฐาน ผลการทดสอบซ้ำในวันเดียวกัน 3 ครั้ง มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เท่ากับร้อยละ 1.15 และ 13.81 ตามลำดับ ผลการทดสอบระหว่างวัน พบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.89 และค่า %CV เท่ากับ 8.42 ส่วนผลการทดสอบโดยผู้วิเคราะห์ 2 คน มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.07 และค่า %CV เท่ากับ 7.03 และไม่พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการศึกษาดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นวิธีที่ให้ผลการทดสอบที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นอีกวิธีมาตรฐานทางเลือกในการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของวัคซีน ซึ่งจะสามารถลดระยะเวลาการทดสอบ และลดความเสี่ยงจากการสัมผัสพิษ (toxin) ที่จะเกิดขึ้นในขั้นตอน neutralization ได้

คำสำคัญ: วัคซีนป้องกันโรคคอตีบ การประเมินการสร้างภูมิคุ้มกัน เทคนิค ELISA

Abstract

Potency test of antigen or immunizing agent is an important process test of vaccine efficacy. In Thailand, the potency test of diphtheria vaccines is a using neutralization test in guinea pigs (US potency method) which the result is the estimation value, but it cannot demonstrate the exact value. Development of immunological test in mice by using ELISA technique will get quantitative results in international unit (IU) that can use to compare with the manufacturers' test results. ELISA technique is an alternative to replace the former neutralization test (US potency method). The method validation results show that every examination result at 95% confidence level met the strength by 50-200% as adhere to the specification of World Health Organization. The immunizing level of mice to vaccines varied with diluted linearity of vaccines and parallel to standard immunizing level. The replicate test results on the same day at third times got the standard deviation (SD) and coefficients of variance (%CV) at 1.15 and 13.81 respectively; the replicate test during day was SD and %CV at 1.89 and 8.42. For the test results by two analysists explored that it got SD and %CV at 1.07 and 7.03 respectively which it was not statistically significant difference ($p > 0.05$). In conclusion, the study demonstrates that the method Products results as efficiency. It can be one in standard alternative on potency test of diphtheria vaccine to assess the effectiveness of the vaccine which it can reduce examination time and decrease the risk of toxin exposure in the process neutralization.

Key words: diphtheria vaccine, immunological test, ELISA

บทนำ

โรคคอตีบ เป็นโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium diphtheriae* ซึ่งมีรูปทรงแท่งและย้อมติดสีแกรมบวก พิษที่เชื้อขับออกมาจะไปที่กล้ามเนื้อหัวใจและปลายประสาท ทำให้เกิดการอักเสบ ซึ่งถ้าเป็นรุนแรงจะมีการตีบตันของทางเดินหายใจ จึงได้ชื่อว่าโรคคอตีบ อาจทำให้ถึงเสียชีวิตได้ เชื้อจะพบในคนเท่านั้น โดยอาจพบอยู่ในจมูกหรือลำคอของผู้ป่วยหรือผู้ติดเชื้อโดยไม่มีอาการเรียกว่าเป็นพาหะ (carrier) ติดต่อกันได้ง่ายด้วยการได้รับเชื้อโดยตรงจากการไอ จาม รดกัน หรือพูดคุยกันในระยะใกล้ชิด เชื้อสามารถเข้าสู่ผู้สัมผัสทางปากหรือทางการหายใจ บางครั้งอาจติดต่อกันได้โดยการใช้ภาชนะร่วมกัน[1,2]

วัคซีนป้องกันโรคคอตีบถูกกำหนดให้อยู่ในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศในรูปของวัคซีนรวม คอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ซึ่งทุกคนจะได้รับวัคซีนนี้ในวัยเด็กโดยไม่มีค่าใช้จ่ายที่สถานบริการสาธารณสุขของรัฐ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีหน้าที่ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อการควบคุมคุณภาพวัคซีนก่อนออกจำหน่าย ปัจจุบันได้ทดสอบค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบในหนูตะเภาโดยวิธี neutralization (US potency method) ซึ่งเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ ผลการทดสอบที่ได้ไม่สามารถกำหนดค่าที่แน่นอนของวัคซีนออกมาได้ ผลที่ได้เป็นเพียงค่าประมาณเทียบกับค่าของ Antitoxin มาตรฐานทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์แนวโน้ม (trend analysis) ค่าความแรงของวัคซีนได้[3] วิธีการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบที่องค์การอนามัยโลกให้การยอมรับเป็นวิธีมาตรฐานคือวิธี lethal challenge test และการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันในหนูตะเภาซึ่งเป็นการทดสอบเชิงปริมาณ ผลการทดสอบที่ได้เมื่อเทียบกับวัคซีนมาตรฐานสากลจะมีหน่วยเป็น International Unit สามารถสื่อถึงประสิทธิภาพของการสร้างภูมิคุ้มกันในเด็กทารกได้ เนื่องจากสาเหตุการขาดแคลนหนูตะเภาที่ต้องใช้เวลานานในการขยายพันธุ์ องค์การอนามัยโลกจึงแนะนำทางเลือกให้ทำการทดสอบภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรได้[4,5] ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการทดสอบระดับภูมิคุ้มกันของหนู

ถีบจักรด้วยเทคนิค ELISA เนื่องจากมีความสะดวก ทำได้ง่าย ราคาถูก และลดระยะเวลาของการทดสอบด้วยวิธี lethal challenge test และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการทดสอบความแรงของวัคซีนโรคคอตีบโดยการวัดระดับภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค ELISA นี้ มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานอีกวิธีหนึ่งในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีประเมินคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคคอตีบที่ให้ผลเป็นหน่วยที่นับได้ สามารถวิเคราะห์แนวโน้มคุณภาพ (trend analysis) ของวัคซีนได้ และลดระยะเวลาในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ สำหรับเป็นทางเลือกในการควบคุมคุณภาพวัคซีนที่ใช้ในประเทศ

ระเบียบวิธีวิจัย

ขอบเขตการดำเนินงาน

ในการศึกษานี้เป็นการหาสภาวะของการทดสอบความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบจากการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรโดยเทคนิค ELISA จากวัคซีนรวม (DTP vaccine) ซึ่งผลิตโดยบริษัท BioFarma ประเทศอินโดนีเซีย ที่นำส่งตรวจในสถาบันชีววัตถุในปี 2558 และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีโดยใช้วัคซีนรวม DTP ชนิดเดียวกัน 1 รุ่นการผลิต

ระยะเวลาดำเนินการ

ตุลาคม 2558 ถึงเมษายน 2560

วิธีการวิจัย

เป็นการพัฒนาวิธีการทดสอบความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบโดยการวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักร ด้วยการหาสภาวะของการทดสอบที่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการ และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีนี้ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานได้ โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. วางแผนการทดสอบ จัดหาวัคซีนตัวอย่าง วัคซีนมาตรฐาน สัตว์ทดลอง และวัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์
2. ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการทดสอบ
   - กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักร: หาระดับความเข้มข้นของวัคซีนและวัคซีนมาตรฐานที่จะกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Antibodies) ให้มีระดับที่แปรผันตามระดับความเข้มข้น (Dose response)
   - ตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันโดยวิธี ELISA: หาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารต่างๆ ดังนี้
     i. Standard diphtheria toxoid
     ii. Serum หนูถีบจักร
     iii. Standard diphtheria antiserum
     iv. Peroxidase conjugate
   - สรุปวิธีทดสอบ
3. ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ประกอบด้วยการตรวจสอบความเที่ยง (precision) ในวันเดียวกัน (within-day variation หรือ intra-assay variation) ต่างวัน (between-day variation) การทดสอบเปรียบเทียบระหว่างผู้วิเคราะห์ 2 คน (intermediate precision) และความเป็นเส้นตรงของการทดสอบ (linearity)[6,7]
4. วิเคราะห์ และสรุปผล

ผลการวิจัย

ได้สภาวะการทดสอบที่เหมาะสมดังนี้

1. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักร ฉีดวัคซีนตัวอย่าง (DTP vaccine, BioFarma ประเทศอินโดนีเซีย) และวัคซีนมาตรฐาน (National Institute for Biological Standards and Control, ประเทศ สหราชอาณาจักร; NIBSC code 07/216) ที่เจือจางด้วย Normal saline solution (NSS) ระดับ 1:4 1:8 1:16 และ 1:32 บริเวณใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ขาหลังของหนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงเพื่อเพาะพันธุ์ (outbred mice) เพศผู้น้ำหนัก 10 ถึง 14 กรัม) โดยฉีดหนูตัวละ 0.5 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 10 ตัว สำหรับหนูในกลุ่มควบคุมฉีด NSS ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดหนูถีบจักรจากหัวใจแต่ละตัว แล้วนำมาปั่นแยกซีรั่มเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการนำไปวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกัน

2. การตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี ELISA เจือจางวัคซีนมาตรฐาน Diphtheria toxoid (NIBSC 02/176) ด้วยสารละลาย carbonate coating buffer pH 9.6 ในอัตราส่วน 1:2000 ใส่ลงในหลุม 96-well plate (Nunc Maxisorb) ทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลทด้วยสารละลาย phos phate buffer saline (PBS) -0.05% tween 20 (PBS-T) ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย PBS-T- 5% bovine serum albumin (BSA) หลุมละ 150 ไมโครลิตรเพื่อให้วัคซีนมาตรฐานที่เคลือบในหลุมติดแน่น แล้วนำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมซีรั่มหนูแต่ละตัวที่เจือจางด้วย PBS-T + 1% BSA ในอัตราส่วน 1:16 และ Standard Diphtheria antiserum (NIBSC 98/572) ที่เจือจางด้วย PBS-T + 1% BSA ในอัตราส่วน 1:1000 หลุมละ 200 ไมโครลิตรในแถว A ดังแสดงในภาพที่ 1 และหยอด PBS-T + 1% BSA ในแถว B-H ทุกหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจางลดลงเป็นลำดับ 2 เท่า (2 fold dilution) จากแถว B-H แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ครบกำหนดแล้วล้างเพลทเช่นเดิม เติม anti mouse peroxidase conjugate IgG (Chemicon® Cat no. 12-349) เจือจางด้วย PBS-T + 1% BSA ในอัตรส่วน 1:40000 ในแนวที่ 2 ถึง 11 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยากับซีรั่มหนูถีบจักร และ anti guinea pig**44** peroxidase conjugate IgG (Sigma-Aldrich® Cat no. A7289) เจือจางด้วย PBS-T + 1% BSA ในอัตรส่วน 1:10000 ในแนวที่ 1 และ 12 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยากับ Standard Diphtheria antiserum บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลท แล้วเติม Tetramethilbenzidine (TMB Life technologies®00-2019) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องป้องกันไม่ให้โดนแสง เป็นเวลา 15-20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.5M H_2SO_4 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำเพลทไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (optical density : OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm

3. ผลการทดสอบค่าความแรงของวัคซีน นำค่าระดับภูมิคุ้มกันของหนูถีบจักรต่อวัคซีนตัวอย่างแต่ละความเจือจางมาวิเคราะห์เทียบกับผลระดับภูมิคุ้มกันของหนูถีบจักรต่อวัคซีนมาตรฐานที่ทราบค่าด้วยสมการเส้นตรง ค่าความแรงของตัวอย่างวัคซีนเป็นค่าสัมพัทธ์ (Relative) กับวัคซีนมาตรฐานที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (95% confidence limits) ในหน่วยเป็น International Unit (IU)

การทดสอบจำนวน 9 ชุดการทดสอบ มีค่าความแรงของวัคซีนเฉลี่ย 1276.12 IU/ml ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน 1.07 และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน 7.03%

4. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

4.1 การทดสอบความเที่ยง (Precision): ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ของทุกผลการทดสอบจะต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 50 ถึง 200% ของค่าความแรงของวัคซีนนั้น

การทดสอบ within-day variation หรือ intra-assay variation แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 1 โดยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งในวันเดียวกันมีค่า 1.15 และ 13.81% ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบ within-day variation หรือ intra-assay variation

ครั้งที่	ค่าความแรง (IU/ml)	Lower limit	Upper limit
1	1,230.92	798.84	2,391.73
2	1,235.18	868.04	2,074.29
3	1,174.87	823.52	1,982.65
WGO-Mean	1,211.14	925.11	1,585.59
WGO-SD		1.15	
%GCV		13.81	

หมายเหตุ WGO-Mean = weighted geometric mean
WGO-SD = weighted geometric standard deviation
%GCV = percent geometric coefficient of variation

การทดสอบ between-day variation แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 2 โดยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการทดสอบ 3 ครั้งต่างวันกันมีค่า 1.89 และ 8.42% ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ between-day variation

ครั้งที่	ค่าความแรง (IU/ml)	Lower limit	Upper limit
1	1,230.92	798.84	2,391.73
	1,235.18	868.04	2,074.29
	1,174.87	823.52	1,982.65
2	1,394.09	1,027.49	2,034.81
3	1,221.19	913.51	1,764.89
4	1,235.19	868.04	2,074.29
WGO-Mean	1,257.54	1,066.52	1,482.77
WGO-SD		1.89	
%GCV		8.42	

การทดสอบ intermediate precision แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 3 โดยผลการทดสอบของผู้ทดสอบทั้ง 2 คนมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 1.07 และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 7.03% และเมื่อนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ Intermediate precision

ผู้ทดสอบ	ครั้งที่	ค่าความแรง (IU/ml)	Lower limit	Upper limit
ผู้ทดสอบ 1	1	1,230.92	798.84	2,391.73
		1,235.18	868.04	2,074.29
		1,174.87	823.52	1,982.65
	2	1,394.09	1,027.49	2,034.81
	3	1,221.19	913.51	1,764.89
	4	1,235.19	868.04	2,074.29
ผู้ทดสอบ 2	WGO-Mean	1,294.54	940.87	1,937.21
	WGO-SD	1,372.73	963.29	2,173.48
	%GCV	1,270.33	754.59	2,851.24
		1,276.12	1,112.07	1,464.38
			1.07	
			7.03	

ตารางที่ 4 ข้อมูลเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างผู้ทดสอบ 2 คนด้วย T-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Variable 1	Variable 2
F-Test: Two-Sample for Variances		
Mean	1,248.573333	1,312.53333
Variance	5,605.452747	2,864.26003
Observations	6	3
df	5	2
F	1.957033468	
P(F<=f) one-tail	0.371824117	
F Critical one-tail	19.29640965	

ตารางที่ 4 *(ต่อ)*

	Variable 1	Variable 2
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Mean	1,248.573333	1,312.533333
Variance	5,605.452747	2,864.260033
Observations	6	3
Pooled Variance	4,822.254829	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	7	
t Stat	-1.302561911	
P(T<=t) one-tail	0.116969286	
t Critical one-tail	1.894578604	
P(T<=t) two-tail	0.233938572	
t Critical two-tail	2.364624251	

4.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ทุกการทดสอบค่าดูดกลืนแสงจากการทดสอบวิธี ELISA และ relative antibody titre ของซีรั่มหนูถีบจักรแปรผันตามระดับความเข้มข้นเป็นเส้นตรง และในแต่ละการทดสอบค่า relative antibody titre ของซีรั่มหนูถีบจักรในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนตัวอย่างมีความเป็นเส้นตรงขนานกับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมาตรฐาน

วิจารณ์และอภิปรายผล

ค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบที่ได้จากการศึกษานี้ให้ค่าของการทดสอบสูงกว่าที่ผู้ผลิตทำการทดสอบโดยหาปริมาณภูมิคุ้มกันของหนูถีบจักรในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero (228 IU/ml) ประมาณ 5 เท่า ซึ่งต่ำกว่าการศึกษาของ R. Winsnes และคณะ ที่พบว่ามีค่าสูงกว่าประมาณ 10 เท่า[8] แต่ทั้งนี้อาจมีปัจจัยด้านสภาวะอื่นๆ แตกต่างกัน การตรวจสอบความถูกต้องของการหาค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณแอนติบอดีของหนูถีบจักรต่อวัคซีนโดยวิธี ELISA พบว่าผลการทดสอบทุกค่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีค่าอยู่ระหว่าง 50 ถึง 200% ของค่าความแรงตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก[4,5] เมื่อทำการทดสอบตัวอย่างวัคซีนในวันและเวลาเดียวกันจำนวน 3 การทดสอบ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.15 และค่า %CV เท่ากับ 13.81 การทดสอบค่าความแรงของวัคซีนตัวอย่างต่างวันและเวลากัน (Separate experiment) พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.89 และค่า %CV เท่ากับ 8.42 ส่วนผลการทดสอบโดยผู้วิเคราะห์ 2 คน มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.07 และค่า %CV เท่ากับ 7.03 และไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งเห็นได้ว่า วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณภูมิคุ้มกันของหนูถีบจักรต่อวัคซีน โดยวิธี ELISA แม้มีขั้นตอนการทดสอบในสัตว์ทดลองซึ่งมีความเบี่ยงเบนสูง แต่ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของผลการทดสอบทั้งความเที่ยง และความคงทนของวิธีมีค่าต่ำกว่า 15% ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดี[9]

การหาค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบโดยวิเคราะห์หาปริมาณภูมิคุ้มกันของหนูถีบจักรต่อวัคซีน โดยวิธี ELISA แม้จะยังไม่สามารถหลีกเลี่ยงการใช้สัตว์ทดลองได้ อีกทั้งยังคงมีความยุ่งยากในขั้นตอนของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันวัคซีนในหนูถีบจักรที่ต้องมีการสุ่มเพื่อจัดกลุ่มของหนู และต้องมีช่วงเวลาพักให้หนูถีบจักรคุ้นชินกับสภาวะแวดล้อมก่อนทำการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีดั้งเดิม คือ neutralization test แต่วิธีนี้จะได้ผลการทดสอบเชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์แนวโน้มเชิงคุณภาพได้ นอกจากนี้ในขั้นตอนการทดสอบด้วยเทคนิค ELISA มีความสะดวก สามารถทดสอบและทราบผลได้ภายใน 1 วัน ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาการทดสอบลงได้อย่างน้อย 1 สัปดาห์ อีกทั้งยังช่วยลดความเสี่ยงของผู้วิเคราะห์ที่จะต้องสัมผัสกับพิษของ

เชื้อคอตีบในกระบวนการ neutralization ด้วย และข้อดีที่สำคัญของเทคนิค ELISA คือ สามารถประยุกต์ใช้สำหรับการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยักและวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Acellular) ได้ โดยวัคซีนที่อยู่ในรูปวัคซีนรวมคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน สามารถนำซีรั่มของหนูถีบจักรชุดเดียวกันมาทำการทดสอบหาค่าความแรงของทั้ง 3 วัคซีนได้ในคราวเดียว[10] ทั้งนี้แม้ขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ ELISA อาจต้องใช้เวลามาก เช่นระดับการเจือจางของวัคซีนที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การหาระดับความเจือจางของซีรั่มหนู และ antitoxin มาตรฐาน ที่ใช้ทดสอบ ELISA แต่เมื่อผ่านกระบวนการนี้แล้ว จะสามารถลดระยะเวลาของการทดสอบลงได้ การศึกษานี้เลือกใช้ standard Diphtheria antiserum ซึ่งเตรียมขึ้นจากหนูตะเภาตามที่องค์การอนามัยโลกได้กำหนดมาตรฐานไว้แล้ว เนื่องจากไม่สามารถหา antiserum มาตรฐานที่เตรียมจากหนูถีบจักรได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้วิเคราะห์แล้วว่า ไม่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ค่าความแรงสัมพัทธ์ (Relative potency)[4,5]

บทสรุป

การวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ โดยการหาระดับภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค ELISA นี้ เป็นวิธีที่ให้ผลการทดสอบที่มีประสิทธิภาพ จึงอาจเป็นอีกหนึ่งวิธีมาตรฐานที่เป็นทางเลือกในการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของวัคซีน ซึ่งได้ผลการทดสอบเชิงปริมาณออกมาในหน่วย International Unit สามารถนำมาวิเคราะห์ค่าแนวโน้มคุณภาพของวัคซีนได้ ลดระยะเวลาการทดสอบ และลดความเสี่ยงจากการสัมผัสออกซินในกระบวนการ neutralization ได้

ข้อจำกัด

เนื่องจากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีไม่ได้ทำการทดสอบเทียบกับวิธี challenge method ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเพราะขาดแคลนหนูตะเภา ดังนั้นการนำวิธีนี้มาใช้ในห้องปฏิบัติการจึงต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมในหลายรุ่นการผลิตเพื่อเก็บข้อมูลและกำหนดค่าเฉลี่ย และช่วงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ยอมรับได้ของผลการวิเคราะห์ในแต่ละครั้งที่ผลิตวัคซีน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ และนายธีระพล คชาชีวะ ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำแก้ไข และให้การสนับสนุน จนทำให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กุลกัญญา โชคไพบูลย์กิจ, เกษวดี ลาภพระ, จุฑารัตน์ เมฆมัลลิกา, ฐิติอร นาคบุญนำ, อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค ปี 2556. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา;2556
2. สำนักงานสารนิเทศและประชาสัมพันธ์. กระทรวงสาธารณสุข. สธ ชี้ผู้ใหญ่วัย 20-50 ปี เสี่ยงป่วย “โรคคอตีบ” รณรงค์ฉีดวัคซีนป้องกันฟรี เฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพฯ [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 3 กันยายน 2558]. เข้าถึงได้จาก: http://dcd.ddc.moph.go.th/uploads/pdf/ข่าวสารนิเทศ%20dT%2015-01-58.pdf
3. Gupta R.K., Siber G.R. Use of in vitro Vero cell assay and ELISA in the United States potency test of vaccines containing adsorbed diphtheria and tetanus toxoids [Internet]. [cited 2017 Sep 21]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8785950/
4. World Health Organization. Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines-Chapter II Testing for Diphtheria Vaccines. WHO/IVB/11.11. p30-51. Geneva: WHO Document Production Services.

5. World Health Organization. Manual of Laboratory Methods for potency testing of Vaccines Used in the WHO Expanded Programme of Immunization. WHO/VSQ/97.04, p116 – 127. Geneva: WHO Document Production Services.
6. ASEAN Guidelines for Validation of Analytical Procedures for Vaccines [Internet]. [cited 2019 Dec 13]. Available from: https://asean.org/wp-content/uploads/2018/01/25PPWG-ANNEX-7-iii-Final-revision-of-analytical-method-validation-for-vaccinesdocx.pdf
7. European Medicines Agency. International Council for Harmonization; ICH Topic Q2 (R1), Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. CPMP/ICH/381/95.
8. R. Winsnes, D. Sesardic, A. Daas, and Behr-Gross M-E. Collaborative Study for the Validation of Serological Methods for Potency Testing of Diphtheria Toxoid Vaccines Part 1. Journal of Pharmeuropa Bio 2003(2), 35-68.
9. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry [Internet]. [cited 2018 May 25] Available from: https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf
10. Paul S, Peter R, Laura C, Jason H, Rob T, Dorothea S (2011). Animal refinement and reduction: alternative approaches for potency testing of diphtheria and tetanus vaccine. Journal of Procedia in Vaccinology 5(2011), 200-12.