ว กรมวิทย พ 2559; 58 (3) : 169-179

การทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยักด้วยชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป

กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล วิชชุดา จริยะพันธุ์ และสายวรุฬ จดูรกิตตินันท์

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ โรคบาดทะยักเป็นโรคติดเชื้อในกลุ่มโรคทางประสาทและกล้ามเนื้อ เกิดจากสารพิษของ *Clostridium tetani* ซึ่งป้องกันได้ด้วยการฉีดวัคซีน หากผู้ติดเชื้อไม่มีภูมิคุ้มกันจะรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะและเซรุ่มแก้โรคบาดทะยักหรืออิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยัก ดังนั้น คุณภาพของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการรักษา วิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยัก เป็นชีววิธีที่ใช้สัตว์ทดลองทำให้มีต้นทุนและความแปรปรวนสูง ตำรายายุโรปฉบับปัจจุบันได้กำหนดวิธี enzyme-linked immunosorbent assay เป็นวิธีมาตรฐานทางเลือกในการตรวจวิเคราะห์ การทดสอบความถูกต้องของวิธีดังกล่าวนี้ใช้น้ำยาทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อสารพิษซึ่งเป็นแอนติเจนของเชื้อบาดทะยักในเลือด ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีพบว่าวิธีที่ใช้ผ่านเกณฑ์การทดสอบในหัวข้อความเที่ยง ความแม่น ความเหมาะสมของระบบและความสัมพันธ์เชิงเส้น และมีขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.00208 IU/ml รวมทั้งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังการหยุดปฏิกิริยาได้นานถึง 2.30 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยักด้วยชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปโดยวิธี ELISA มีความถูกต้องและเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศ

Accepted for publication, 8 July 2016

บทนำ

โรคบาดทะยักเป็นโรคติดเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มของโรคทางประสาทและกล้ามเนื้อเกิดจากการได้รับสารพิษของเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium tetani* ซึ่งป้องกันได้ด้วยวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยัก หากไม่มีภูมิคุ้มกันสารพิษจะทำลายเส้นประสาทที่ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ ทำให้มีอาการปวดกล้ามเนื้อทั่วร่างกาย อาจทำให้กล้ามเนื้อช่วยหายใจไม่ทำงานเกิดภาวะหายใจลำบาก และอาจจะเสียชีวิตได้ ในการรักษาโรคบาดทะยัก นอกจากจะรักษาโดยให้ยาปฏิชีวนะเพื่อฆ่าเชื้อโรค แพทย์จะพิจารณาให้วัคซีนป้องกันโรคบาดทะยัก และให้เซรุ่มหรืออิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยัก ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อสารพิษหรือแอนติเจนของเชื้อบาดทะยัก โดยเซรุ่มหรืออิมมูโนโกลบูลินจะจับกับสารพิษที่อยู่ในกระแสเลือดทำให้ผู้ป่วยรอดชีวิตได้ ดังนั้น ประสิทธิภาพของเซรุ่มหรืออิมมูโนโกลบูลิน จึงเป็นปัจจัยสำคัญ[1, 2, 3] เนื่องจากความสามารถในการทำลายจะขึ้นอยู่กับความแรงของเซรุ่มหรืออิมมูโนโกลบูลินในการจับกับสารพิษที่เป็นแอนติเจน ดังนั้น จึงต้องมีการตรวจสอบความแรงหรือแอนติบอดีของเซรุ่มหรืออิมมูโนโกลบูลินว่าเป็นไปตามที่ระบุในฉลากยาที่ได้รับอนุมัติขึ้นทะเบียนเพื่อให้การบริหารยาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยได้

วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยักตามตำรายาของยุโรปเป็นการตรวจสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง (หนูถีบจักร) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความยุ่งยากต้องจัดหาสัตว์ทดลองที่เหมาะสมและใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นานถึง 4 วัน รวมทั้งต้นทุนจากการใช้สถานที่และการดูแลสัตว์ทดลองที่ต้องควบคุมสภาวะมีค่าใช้จ่ายสูง ซึ่งการตรวจวิเคราะห์โดยใช้สัตว์ทดลองจะมีความแปรปรวนเนื่องจากเป็นการทดสอบในสิ่งมีชีวิตจึงควบคุมได้ยากโอกาสที่จะมีความเบี่ยงเบนสูง และบางครั้งขาดแคลนสัตว์ทดลอง ผู้ผลิตอิมมูโนโกลบูลินและหน่วยงานภาครัฐทั่วโลกจึงมีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีทดแทนการใช้สัตว์ทดลองโดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดสอบในหลอดทดลอง *(in vitro assay)* เพื่อให้สอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองที่เป็นพื้นฐานสากลและมีการใช้กันทั่วโลกตามหลักการของ 3 Rs[4] คือ การหลีกเลี่ยงการใช้สัตว์ โดยใช้วิธีอื่นทดแทน (replacement) การใช้จำนวนสัตว์ทดลองให้น้อยที่สุด โดยยังคงความแม่นยำ (reduction) เมื่อจำเป็นต้องใช้ต้องมีวิธีปฏิบัติต่อสัตว์ให้ทรมานน้อยที่สุด (refinement)[4] ตำรายาสากลของยุโรปฉบับที่ 8 (European Pharmacopoeia edition 8.0) ได้ยอมรับ immunoassay เป็นวิธีมาตรฐานทั้งเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ Toxoid inhibitory assay (TIA)[2, 5] ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าเป็นเทคนิคที่มีความไว เหมาะสมในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งได้มีการศึกษาโดยการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA โดยเตรียมสารต่าง ๆ ขึ้นใช้เองในห้องปฏิบัติการและให้ผลน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตาม การเตรียมน้ำยาสำหรับ ELISA ให้มีคุณภาพสม่ำเสมอนั้นต้องการความรู้ความชำนาญ ซึ่งห้องปฏิบัติการนั้น ๆ ต้องมีประสบการณ์ด้านเทคนิคนี้อย่างเพียงพอเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องเชื่อถือได้

ปัจจุบันมีชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปด้วยวิธี ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อบาดทะยักเมื่อได้รับวัคซีนในเลือดคนหลายยี่ห้อจากหลายประเทศ เช่น ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท Genzyme Virotech GmbH บริษัท Euroimmun และบริษัท Serion-Verion ประเทศเยอรมนี ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท Scimedx ของประเทศอเมริกา ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท The Binding Site ประเทศสหราชอาณาจักร เป็นต้น[3, 6, 7] ซึ่งเกณฑ์ในการเลือกใช้นั้นมาจากการทบทวนวรรณกรรมโดยเลือกชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่มีหลักฐานเชื่อถือได้ที่มีความเหมาะสมทั้งคุณภาพ ราคา และมีตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย การศึกษานี้จึงดำเนินการโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบเปรียบเทียบเบื้องต้นเพื่อเลือกชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่มีความเหมาะสมกับตัวอย่างที่ใช้วัด จากนั้นจึงนำชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปนั้นมาทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยักเพื่อลดการใช้งานสัตว์ทดลองและเป็นไปตามหลักการ 3Rs

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader) รุ่น ELx 808 ของบริษัท BioTek สำหรับใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. เครื่องบ่มเพาะเชื้อ (incubator) แบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ± 1 องศาเซลเซียส

ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป สารมาตรฐาน และตัวอย่าง

ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป tetanus IgG ELISA (Genzyme Virotech GmbH, Germany) เป็นชุดน้ำยาทดสอบที่มีความไวเหมาะสมต่อตัวอย่างที่วิเคราะห์[6, 7] เมื่อเทียบกับชุดน้ำยาทดสอบจากแหล่งผลิตอื่น โดยชุดน้ำยาทดสอบนี้ประกอบด้วย 96-well plate ที่เคลือบด้วยแอนติเจน น้ำยาสำหรับเจือจาง (sample diluents) น้ำยาสำหรับล้างเพลท (washing solution) tetanus IgG low positive รวมทั้งแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (anti-immunoglobulin conjugate) สารตั้งต้น (substrate) เพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ (3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine; TMB) และน้ำยาหยุดปฏิกิริยา (stop solution)[8]

สารมาตรฐานสากลที่ใช้เป็น 1st International standard for human tetanus immunoglobulin (code: TE-3) ได้จากหน่วยงาน National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) ประเทศสหราชอาณาจักรที่มีค่าความแรงเท่ากับ 120 IU/มิลลิลิตร[9]

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบเป็น Human tetanus immunoglobulin จำนวน 2 ยี่ห้อ (A และ B) ที่นำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทย โดยทำการทดสอบ 3 รุ่นการผลิตในแต่ละยี่ห้อ ซึ่งระบุเป็น 1A, 2A, 3A และ 1B, 2B, 3B

การเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง

เตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่างโดยการเจือจางด้วย normal saline เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 IU/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:50 ด้วย sample diluent ของชุดน้ำยาทดสอบ

การคำนวณ

ในการคำนวณค่าความแรงใช้โปรแกรม parallel line assay โดยกำหนดเกณฑ์มาตรฐานดังนี้ ค่าความสัมพันธ์ของการเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง (preparation) ต้องไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างในลักษณะของ dose-response (regression) ต้องอยู่ในเกณฑ์ของความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ และกราฟที่ได้ต้องมีความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างในลักษณะคู่ขนาน (parallelism) และเชิงเส้นตรง (linearity) นำผลของค่าความแรงจากโปรแกรมมาหาค่าเฉลี่ยทางชีววิธีเพื่อมาคำนวณค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) ต่อไป[10, 11]

วิธีวิเคราะห์

นำสารมาตรฐานสากลและตัวอย่างที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้นใส่ลงในหลุมของ 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และใส่น้ำยาสำหรับเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม สำหรับใช้เป็น negative control (blank) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วยน้ำยาสำหรับล้างเพลทปริมาตร 350 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง โดยแต่ละครั้งล้างเพลทด้วยเครื่องล้างเพลทแบบอัตโนมัติ แล้วทำให้เพลทแห้ง

โดยการซับด้วยกระดาษรองซับน้ำ จากนั้นเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างเพลทจำนวน 4 ครั้ง และเติมสารตั้งต้น TMB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จะเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นเติมน้ำยาหยุดปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ในทุกหลุม สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอ้างอิง (reference wavelength) 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท[9] คำนวณผลโดยใช้โปรแกรม parallel line ระหว่างความเข้มข้นของ log anti-tetanus antibodies (log dose) และค่าการดูดกลืนแสง (response) เปรียบเทียบผลระหว่างค่าของสารมาตรฐานสากลและตัวอย่าง โดยกำหนดให้ค่ามาตรฐานมีค่าเท่ากับ 1 IU/มิลลิลิตร

การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method of Validation)

1. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

1.1 การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)

ทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 2 ยี่ห้อ ยี่ห้อละ 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ ในวันเดียวกัน และนำค่าที่ได้มาคำนวณ %CV ซึ่งจะต้องมีค่า ≤ 10[12]

1.2 การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediate precision: between-day variation)

ทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 2 ยี่ห้อ ยี่ห้อละ 3 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ ต่างวันกัน นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า %CV ซึ่งจะต้องมีค่า ≤ 10[12]

1.3 การทดสอบโดยนักวิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

ทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 1 ยี่ห้อ 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และเปรียบเทียบค่าความแรงที่วัดได้โดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2. การทดสอบความแม่น (Accuracy)

ทดสอบโดยนำตัวอย่างที่ได้จากการหาค่าเฉลี่ยของตัวอย่างในการทดสอบหัวข้อความเที่ยง จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เติมด้วยสารมาตรฐานสากล 1st International standard ที่ทราบค่าความเข้มข้น ลงในตัวอย่างจำนวน 0.5 มิลลิลิตร และทำการทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 2 ยี่ห้อ ยี่ห้อละ 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า % recovery ที่ต้องอยู่ในช่วง 80-120 และค่า %CV ต้องมีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่า 20

3. การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

ทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 2 ยี่ห้อ ยี่ห้อละ 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำวัดค่าการดูดกลืนแสง ณ เวลา 0, 20, 60, 105 และ 150 นาที หลังใส่น้ำยาหยุดปฏิกิริยา เพื่อตรวจสอบว่ามีความเบี่ยงเบนไปจากเกณฑ์กำหนดหรือไม่

4. การทดสอบความเหมาะสมของระบบและความสัมพันธ์เชิงเส้น (System suitability and linearity)

ตรวจสอบผลการทดสอบในแต่ละพารามิเตอร์ของการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีว่าค่าความสัมพันธ์ของการเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง (preparation) ต้องไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ค่าความสัมพันธ์

ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างในลักษณะของ dose-response (regression) ต้องอยู่ในเกณฑ์ของความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ และกราฟที่ได้ต้องมีความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างในลักษณะคู่ขนาน (parallelism) และเชิงเส้นตรง (linearity)

5. ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ)

ทดสอบโดยนำ tetanus IgG low positive ของชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปมาทำการทดสอบหาค่าความแรง จำนวน 11 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

ผล

1. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

1.1 การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)

การทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่าง 2 ยี่ห้อ (A และ B) ยี่ห้อละ 1 รุ่น การผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ ในวันเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียว ผลการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่าง A เท่ากับ 273.64, 264.13 และ 271.59 IU/มิลลิลิตร ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง B เท่ากับ 239.74, 226.46 และ 239.90 IU/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่ามีค่า %CV จากการทดสอบในตัวอย่าง 2 ยี่ห้อ เท่ากับ 1.50 และ 1.77 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งมีค่า %CV น้อยกว่า 10 เป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบ

ตารางที่ 1 การทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกัน (Repeatability)

ครั้งที่	ตัวอย่าง A (IU/มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง B (IU/มิลลิลิตร)
1	273.64	239.74
2	264.13	226.46
3	271.59	239.90
Weighted geometric mean (WGM)	271.28	236.93
Geometric standard deviation (GSD)	1.02	1.02
%CV	1.50	1.77

1.2 การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediate precision: between-day variation)

การทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่าง 2 ยี่ห้อ ยี่ห้อละ 3 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ ต่างวันกัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียว พบว่าตัวอย่าง A รุ่นการผลิตที่ 1A, 2A และ 3A มีค่า %CV ในแต่ละรุ่นการผลิตเท่ากับ 2.16, 1.18 และ 1.65 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่าง B รุ่นการผลิตที่ 1B, 2B และ 3B มีค่า %CV ในแต่ละรุ่นการผลิตเท่ากับ 2.06, 1.85 และ 1.46 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าผลการทดสอบดังกล่าวมีค่า %CV น้อยกว่า 10 เป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediate precision: between-day variation)

ครั้งที่	รุ่นการผลิตของตัวอย่าง A (IU/มิลลิลิตร)			รุ่นการผลิตของตัวอย่าง B (IU/มิลลิลิตร)		
	1A	2A	3A	1B	2B	3B
1	282.38	245.48	309.44	246.91	160.80	176.91
2	273.54	270.21	300.98	234.19	184.29	204.02
3	272.22	278.57	302.50	217.07	187.33	190.37
WGM	275.53	271.15	303.11	232.37	179.55	197.60
GSD	1.02	1.01	1.02	1.02	1.02	1.01
%CV	2.16	1.18	1.65	2.06	1.85	1.46

1.3 การทดสอบโดยนักวิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

การทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 1 ยี่ห้อ 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน พบว่านักวิเคราะห์คนที่ 1 เป็นผลวิเคราะห์ที่ได้จากการทำการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (ข้อ 1.1) และการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (ข้อ 1.2) ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 273.64, 264.13, 271.59, 282.38, 273.54 และ 272.22 IU/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 272.91 IU/มิลลิลิตร สำหรับนักวิเคราะห์คนที่ 2 ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกันได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 222.24, 253.19 และ 209.57 IU/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 228.33 IU/มิลลิลิตร และเมื่อนำมาเปรียบเทียบค่าความแรงที่วัดได้โดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.071) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การทดสอบความเที่ยงโดยนักวิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

	ผลการทดสอบ (IU/ml)	ค่าเฉลี่ย	Sig. (2-tailed)
นักวิเคราะห์ 1	271.59 264.13 273.64 282.38 273.54 272.22	272.91	0.071*
นักวิเคราะห์ 2	222.24 253.19 209.57	228.33	

*อักษรแสดงความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2. การทดสอบความแม่น (Accuracy)

ทดสอบโดยนำตัวอย่าง 2 ยี่ห้อ มาเติมสารมาตรฐาน 1st International standard ที่ความเข้มข้น 1 IU/มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างจำนวน 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และทำการทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน ผลการตรวจวิเคราะห์ ผลการทดสอบของตัวอย่าง A และ B มีค่า %recovery เท่ากับ 85.71 และ 85.57 และมีค่า %CV เท่ากับ 2.02 และ 2.28 ตามลำดับ

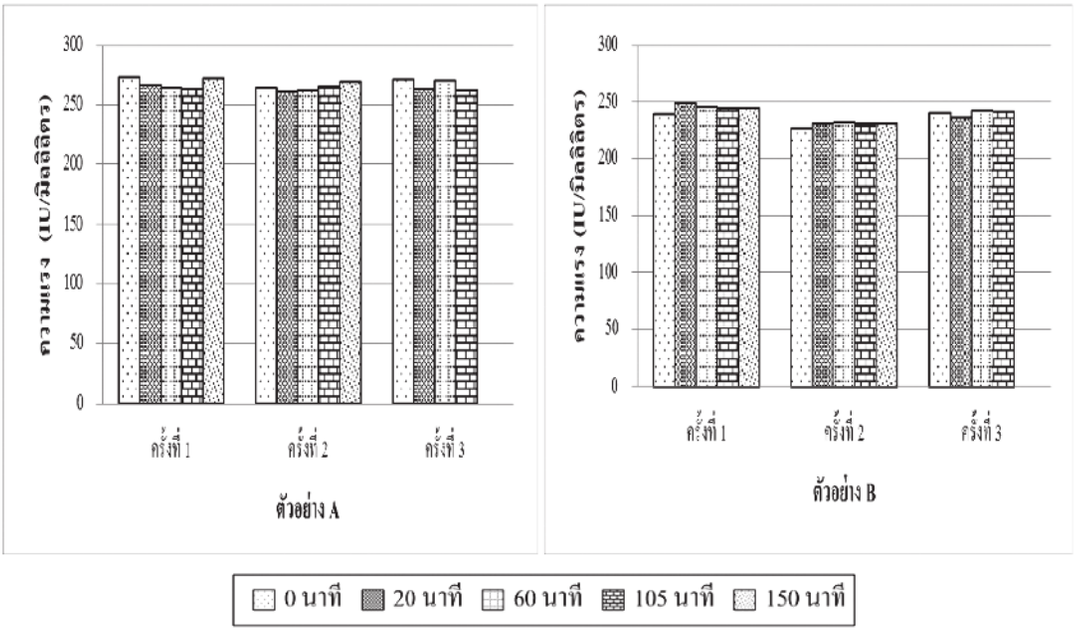
ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบดังกล่าวเป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบโดยมีค่า % recovery อยู่ในช่วง 80–120 และ %CV มีค่าน้อยกว่า 20 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การทดสอบความแม่น (Accuracy)

ครั้งที่	ค่าความแรงเฉลี่ยของตัวอย่าง (IU/มิลลิลิตร)	ค่าความแรงที่ทราบค่าของสารมาตรฐาน (IU/มิลลิลิตร)	ค่าความแรงของสารมาตรฐานและตัวอย่าง (IU/มิลลิลิตร)	ผลการวิเคราะห์ (IU/มิลลิลิตร)	WGM	GSD	%CV	% recovery
ตัวอย่าง A								
1	0.55	0.50	1.05	0.93	0.90	1.02	2.02	85.71
2	0.55	0.50	1.05	0.94				
3	0.55	0.50	1.05	0.86				
ตัวอย่าง B								
1	0.47	0.50	0.97	0.84	0.83	1.02	2.28	85.57
2	0.47	0.50	0.97	0.90				
3	0.47	0.50	0.97	0.79				

3. การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

จากการวิเคราะห์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังใส่น้ำยาหยุดปฏิกิริยาเพื่อหยุดปฏิกิริยา ณ เวลา 0, 20, 60, 105 และ 150 นาที โดยทดสอบในตัวอย่าง 2 ยี่ห้อ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 1 พบว่าตัวอย่าง A ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่า %CV เท่ากับ 0.73, 1.78 และ 1.08 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่าง B ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่า %CV เท่ากับ 1.04, 1.84 และ 1.37 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าผลการทดสอบดังกล่าวมีค่า %CV น้อยกว่า 10 ตามเกณฑ์การทดสอบ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แนวโน้มของค่าความแรงของ Human tetanus immunoglobulin 2 ยี่ห้อ (A และ B) เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังใส่น้ำยาหยุดปฏิกิริยาที่เวลา 0, 20, 60, 105 และ 150 นาที

4. การทดสอบความเหมาะสมของระบบและความสัมพันธ์เชิงเส้น (System suitability and linearity)

จากการทดสอบทุกหัวข้อของการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่ามีค่าที่ยอมรับได้อยู่ในเกณฑ์ทั้งหมด

5. ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ)

เป็นการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบและสามารถรายงานค่าได้ โดยเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 10 เท่าของ SD ซึ่งจากการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ low positive ของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานจำนวน 11 ครั้ง และนำผลที่ได้มาหาค่า SD และนำมาหาค่า LOQ ได้เท่ากับ 0.00208 IU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การทดสอบขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation)

No.	1	2	3	4	5	6
Result	0.00249	0.00233	0.00245	0.00280	0.00237	0.00238
No.	7	8	9	10	11	
Result	0.00233	0.00261	0.00299	0.00262	0.00254	
Mean	0.00254					
SD	0.000208					
10SD	0.00208					

วิจารณ์

จากการตรวจวิเคราะห์หาค่าความแรงของ Human tetanus immunoglobulin โดยใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปด้วยวิธี ELISA พบว่าผลการทดสอบความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวและต่างวัน มีค่า %CV น้อยกว่า 3 จากเกณฑ์กำหนด 10 แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบมีความเที่ยงในการตรวจวัดแม้จะตรวจวิเคราะห์คนละครั้งหรือต่างวันกันค่าที่ได้มีความแปรปรวนน้อยมาก และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์เทียบระหว่างนักวิเคราะห์ 2 คน ด้วยสถิติ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 % พบว่า P-value มีค่าเท่ากับ 0.071 แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างนักวิเคราะห์ รวมทั้งวิธีดังกล่าวมีความแม่นยำเหมาะสมต่อการทดสอบ เนื่องจากค่า % recovery จากการใส่สารมาตรฐานลงในตัวอย่าง และ %CV มีค่าอยู่ในเกณฑ์กำหนด สามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังใส่น้ำยาหยุดปฏิกิริยาได้นานถึง 150 นาที หรือ 2.30 ชั่วโมง และสามารถวัดปริมาณความแรงได้น้อยที่สุดถึง 0.00208 IU/มิลลิลิตร ในขณะที่ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานของชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่น้อยที่สุดที่สามารถวัดได้ตามเอกสารกำกับชุดน้ำยาทดสอบคือ 0.001 IU/มิลลิลิตร[8] ซึ่งพบว่ามีความใกล้เคียงกัน ถึงแม้จะใช้ชนิดของตัวอย่างและสารมาตรฐานต่างกัน โดยชุดน้ำยาทดสอบนี้ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแอนติบอดีในซีรั่มผู้ป่วยที่มีปริมาณน้อยมาก ซึ่งผู้วิเคราะห์ได้นำมาประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีในตัวอย่างที่มีปริมาณแอนติบอดีสูง และใช้สารมาตรฐานสากลของ NIBSC แทนการใช้สารมาตรฐานที่มากับชุดน้ำยาทดสอบ

นอกจากนี้ วิธีดังกล่าวยังแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์และความเชื่อถือได้ตามหลักวิชาการ เนื่องจากค่าที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม parallel line จะต้องมีค่าที่ยอมรับได้ทางสถิติจึงจะสามารถ

นำไปรายงานผลวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากลักษณะความสัมพันธ์ของเส้นกราฟระหว่าง log dose และค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานและตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์ในลักษณะที่เป็นเส้นตรงและคู่ขนาน และตรวจสอบผลการคำนวณทางสถิติของแต่ละแฟคเตอร์ ได้แก่ preparation, regression, parallelism, linearity และ homogeneity of variance พบว่าค่า F-value ของแฟคเตอร์ในการคำนวณจากโปรแกรมในทุกหัวข้อของการทดสอบความถูกต้องของวิธีมีค่าที่ยอมรับได้อยู่ในเกณฑ์ทั้งหมด

การใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปด้วยวิธี ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อบาดทะยักเมื่อได้รับวัคซีนในเลือดคนมาตรวจวิเคราะห์ความแรงของ Human tetanus immunoglobulin ให้ผลที่น่าเชื่อถือ เป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำกว่าการใช้สัตว์ทดลอง ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 1 วัน เมื่อเทียบกับการใช้สัตว์ทดลองที่ต้องใช้เวลานานถึง 4 วัน และมีความแปรปรวนของการทดสอบน้อยกว่าเนื่องจากไม่ต้องใช้สิ่งมีชีวิตที่ควบคุมการทดสอบได้ยากกว่า ที่สำคัญทำให้ไม่ต้องฆ่าสัตว์ และวิธีนี้ยังคงให้ผลการตรวจประสิทธิภาพที่เชื่อถือได้ จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือก และหากห้องปฏิบัติการต่าง ๆ เลือกใช้วิธีนี้จะทำให้ลดการใช้สัตว์ทดลองเป็นจำนวนมาก ดังนั้นชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีนี้ จะสามารถลดความแปรปรวนของผลการตรวจสอบได้โดยไม่ต้องเตรียมน้ำยาสำหรับ ELISA เอง

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์ความแรงของเซรุ่มแก้โรคบาดทะยักด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป มีความเที่ยง ความแม่น ความทนทาน และมีความเหมาะสมให้ผลการตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง เชื่อถือได้ สามารถลดขั้นตอน ระยะเวลา ต้นทุน และยกเลิกการใช้สัตว์ทดลองได้ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจหาประสิทธิภาพ Human tetanus immunoglobulin ที่ใช้ในประเทศในการควบคุมกำกับประสิทธิภาพของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยัก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และขอขอบคุณนายธีระพล คชาชีวะ นางนวพร อนันตสินกุล และนายอัศจรรย์ อาเมน ที่ให้ความรู้และคำแนะนำสถิติที่ใช้ในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. โรคบาดทะยัก. [ออนไลน์]. 2548. [เข้าถึงเมื่อ 4 พฤษภาคม 2559]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: http://www.boe.moph.go.th/fact/Tetanus.htm
2. Gross S, Janssen SWJ, de Vries B, Terao E, Daas A, Buchheit KH. Collaborative study for the validation of alternative in vitro potency assays for human tetanus immunoglobulins. Biologicals 2010; 38(4): 501–10.
3. Aybay C, Karakus R, GÜndoğdu AG. Development of a diagnostic and screening Elisa system for measuring tetanus antitoxoid levels. Turk J Med Sci 2003; 33(5): 289–94.
4. Animal Ethics Infolink. Three Rs. [online]. 2015. [cited 2016 May 4]. Available from: http://www.animalethics.org.au/three-rs
5. European Pharmacopoeia. Human tetanus immunoglobulin. 8th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2014. p. 2432-4.

6. Perry AL, Hayes AJ, Cox HA, Alcock F, Parker AR. Comparison of five commercial anti-tetanus toxoid immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assays. Clin Vaccine Immunol 2009; 16(12): 1837-9.
7. van Hoeven KH, Dale C, Foster P, Body B. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of immunoglobulin G antibodies to tetanus toxoid with reference standards and the impact on clinical practice. Clin Vaccine Immunol 2008; 15(12): 1751-4.
8. Tetanus ELISA IgG Testkit: EC 124.00 REV 18. Rüsselsheim: Sekisul Virotech GmbH [online]. 2014. [cited 2016 May 4]; [10 screens]. Available from: http://www.sekisuidiagnostics.com/writable/product_documents/files/tetanus_elisa_igg_ec124.00_gb.pdf
9. National Institute for Biological Standards and Control. WHO international standard 1st international standard for tetanus immunoglobulin, human.: TE-3 Version 8.0. Hertfordshire: NIBSC; 2013.
10. National Institute of Infectious Diseases. Biostatistics program 2006: how to use the statistical quality control program [CD-ROM]. Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare; 2006.
11. Tierney R, Stickings P, Hockley J, Rigsby P, Iwaki M, Sesardic D. Collaborative study for the calibration of a replacement International Standard for Tetanus Toxoid Adsorbed. Biologicals 2011; 39(6): 404-16.
12. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. [online]. 2015. [cited 2016 May 4]; [23 screens]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf

Method Validation for Potency Test of Human Tetanus Immunoglobulin by Commercial Test Kit

Kanitta Phuwanartnaranubarn Wichuda Jariyapan and Saywarul Jadoonkittinan
Institute of Biological Products, Department of Medical Science, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Tetanus is an infectious disease in neuromuscular diseases group caused by Clostridium tetani. Tetanus can be prevented by vaccination. If any patient has no immunity against tetanus, antibiotics and tetanus antiserum or human tetanus immunoglobulin are required for treatment. Therefore, the quality of the product is an important factor for effective treatment. The standard method for potency testing of human tetanus immunoglobulin is in vivo method which is high variation and costly. For this reason, the current European Pharmacopoeia has adopted Enzyme-linked Immunosorbent Assay as an alternative standard method. In this study, the commercial ELISA test kit for tetanus immunoglobulin in specimen was used. The results showed that the precision, accuracy, linearity and system suitability meet the validation criteria. The LOQ was 0.00208 IU/ml; and the absorbance after the reaction stopped could be measured up to 2.30 hours. In conclusion, the potency testing of human tetanus immunoglobulin by the commercial ELISA test kit is suitable to adopt as a national standard method.

Key words: tetanus immunoglobulin, ELISA test kit, potency