
การทดสอบวิธีตรวจปริมาณแอนติเจนของ Diphtheria ในวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ

สกาลิน ไตรศิริวัฒนชัย และอุบลวรรณ ชัยอารยะเลิศ

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ได้ทำการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อตรวจหาปริมาณแอนติเจน (adsorbed antigen) และการดูดซับแอนติเจน (degree of adsorption) ของสารเสริมฤทธิ์ในวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ พบว่าการทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ในวันเดียวกันมีค่าเบี่ยงเบน (SD) และเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของการทดสอบปริมาณ adsorbed antigen และ degree of adsorption เท่ากับ 1.01, 1.44 และ 1.00, 0.29 ตามลำดับ สำหรับการทดสอบต่างวันมีค่า SD และ %CV ของการทดสอบปริมาณ adsorbed antigen และ degree of adsorption เท่ากับ 1.01, 1.38 และ 1.01, 0.59 ตามลำดับ การทดสอบความทนของวิธีโดยเปรียบเทียบผลจากผู้ทำการทดสอบ 2 ราย มีค่า SD และ %CV ของการทดสอบปริมาณ adsorbed antigen และ degree of adsorption เท่ากับ 1.01, 1.19 และ 1.01, 0.83 ตามลำดับ สำหรับการทดสอบความจำเพาะพบว่าจะไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยักมาตรฐาน การทดสอบนี้แสดงว่าวิธี ELISA มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์เพื่อเฝ้าระวังคุณภาพการผลิตวัคซีนป้องกันโรคคอตีบในแต่ละรุ่นการผลิตได้

คำสำคัญ: แอนติเจนเชื้อคอตีบ, ปริมาณแอนติเจน, การทดสอบวิธี

Corresponding e mail: sakalin.t@dmsc.mail.go.th

Received: 18 May 2018

Revised: 3 April 2019

Accepted: 14 May 2020

บทนำ

โรคคอตีบ (Diphtheria) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium diphtheriae* เป็นโรคติดต่อทางเดินหายใจเฉียบพลัน ติดต่อทางการไอและจาม เชื้อจะอยู่ในโพรงจมูก ในลำคอของผู้ป่วย อาการป่วย คือ มีไข้ พิษของเชื้อจะทำลายกล้ามเนื้อหัวใจและเส้นประสาทส่วนปลาย ทำให้ลำคออักเสบและมีแผ่นเยื่อในลำคอ ในรายที่รุนแรงจะทำให้ทางเดินหายใจตีบตัน และอาจเสียชีวิตได้^(1, 2) ประเทศไทยมีการใช้วัคซีนป้องกันโรคคอตีบในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศเป็นเวลานานกว่า 20 ปีแล้ว เพื่อลดอัตราการเกิดโรคคอตีบในเด็ก ปัจจุบันได้มีการรณรงค์ให้มีการฉีดวัคซีนในผู้ใหญ่เนื่องจากพบภาวะระดับภูมิคุ้มกันของผู้ใหญ่ในกลุ่มอายุ 20-50 ปี ไม่เพียงพอ เสี่ยงต่อการเป็นโรคคอตีบได้สูง นอกจากนี้มีรายงานการระบาดของโรคคอตีบในประเทศเพื่อนบ้านอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งการเป็นสมาชิกของประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน ทำให้มีประชากรจากประเทศเพื่อนบ้านเดินทางเข้าออกประเทศไทยมากขึ้น จึงมีความเสี่ยงที่เชื้อก่อโรคคอตีบอาจแพร่กระจายและระบาดได้⁽²⁾

วัคซีนป้องกันโรคคอตีบอยู่ในรูปของวัคซีนผสมของคอตีบ และบาดทะยัก หรือวัคซีนผสมของคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน โดยวัคซีนป้องกันโรคคอตีบประกอบด้วย diphtheria toxoid ที่ถูกดูดซับ (adsorbed) ด้วยสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสถาบันชีววัตถุ ได้มีการประเมินคุณภาพวัคซีนทั้งประกอบการขึ้นทะเบียน และรับรองรุ่นการผลิตก่อนการจำหน่ายในท้องตลาด (Lot release) ประกอบด้วยการทดสอบค่าความแรง ความปลอดภัย และการทดสอบทางเคมี เพื่อให้มั่นใจว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพดีตามมาตรฐานสากล ขณะที่การรับรองรุ่นการผลิตเป็นการเฝ้าระวังความสม่ำเสมอของการผลิตจากการประเมินความสอดคล้องของผลการวิเคราะห์เทียบกับรุ่นการผลิตที่ได้ทดสอบเพื่อขึ้นทะเบียนไว้ และเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการควบคุมคุณภาพวัคซีน⁽³⁾ ปัจจุบันการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบใช้วิธี neutralization test (US Potency method)⁽⁴⁾ ในหนูตะเภา ซึ่งเป็นการทดสอบที่บอกเพียงความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันว่ามากกว่าหรือน้อยกว่าเมื่อเทียบกับวัคซีนมาตรฐาน แต่ระบุเป็น International Unit (IU) ที่ใช้เปรียบเทียบระหว่างวัคซีนแต่ละรุ่นไม่ได้ นอกจากนี้กระบวนการตรวจวิเคราะห์ในสัตว์ทดลองใช้เวลาอย่างน้อย 45 วัน และเมื่อรวมกับขั้นตอนดำเนินการอื่นๆ แล้วจะมีผลให้กระบวนการประเมินคุณภาพใช้เวลาไม่น้อยกว่า 60 วัน ส่งผลให้กระบวนการรับรองรุ่นการผลิตวัคซีนป้องกันโรคคอตีบที่ผลิตในประเทศใช้ระยะเวลานาน

วิธีการหาค่าแอนติเจนในวัคซีนโดยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีหนึ่งที่ยืดการอนามัยโลกได้แนะนำไว้⁽⁵⁾ แม้ว่าวิธีนี้ไม่สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการสร้างภูมิคุ้มกันได้ เช่นเดียวกับวิธีการตรวจสอบความแรงในสัตว์ทดลอง แต่ผลการทดสอบที่ได้สามารถนำมาวิเคราะห์แนวโน้ม และเฝ้าระวังคุณภาพการผลิตได้ ปัจจุบันได้มีการใช้การตรวจหาปริมาณแอนติเจนในวัคซีนสำหรับการเฝ้าระวังความสม่ำเสมอในการผลิตแทนการตรวจสอบค่าความแรงในสัตว์ทดลองเพื่อให้สอดคล้องกับหลักจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง 3Rs คือ การหลีกเลี่ยงการใช้สัตว์โดยวิธีอื่นทดแทน (replacement) ลดการใช้สัตว์ทดลองให้น้อยที่สุด โดยยังให้ความแม่นยำ (reduction) ให้สัตว์ทรมานน้อยที่สุด (refinement) เช่น การหาปริมาณไกลโคโปรตีนในวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า โดยเทคนิค ELISA หรือ SRD⁽⁶⁾ เป็นต้น

การศึกษานี้เพื่อหาวิธีทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบในกระบวนการรับรองรุ่นการผลิตของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ หรือนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างวัคซีน วัคซีนมาตรฐาน และสารมาตรฐาน

ตัวอย่างสำหรับการทดสอบ: วัคซีนรวมป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก ไอกรน (DTP vaccine) รุ่นการผลิต 0005812 บริษัท Bio Farma ประเทศอินโดนีเซีย

วัคซีนมาตรฐาน: Diphtheria toxoid (NIBSC code 02/176) ความเข้มข้นปริมาณแอนติเจน 1100 Limes flocculation (Lf) units ผลิตจาก National Institute for Biological Standards and Control, ประเทศสหราชอาณาจักร

สารมาตรฐาน: Tetanus Toxoid (NIBSC code 04/150) และ Diphtheria Polyclonal Antibody (NIBSC code 10/128) ทั้งหมดผลิตจาก National Institute for Biological Standards and Control, ประเทศสหราชอาณาจักร

การเตรียมตัวอย่างวัคซีน และวัคซีนมาตรฐาน

ตัวอย่างวัคซีน

ทำการเตรียมตัวอย่างวัคซีนโดยแบ่งเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่หนึ่ง ปั่นเก็บส่วนใส แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้เจือจาง ด้วย carbonate coating buffer (3.7 กรัม NaHCO_3 , 0.64 กรัม Na_2CO_3 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) pH 9.6 ในอัตราส่วน 1:10 เพื่อทำการทดสอบหาปริมาณแอนติเจนอิสระที่ไม่ถูกดูดซับโดยสารเสริมฤทธิ์ (non-adsorbed antigen) และชุดที่สอง ทำการผสมตัวอย่างวัคซีนกับ 20% w/v tri-sodium citrate ในน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:2 เพื่อ desorption จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเจือจาง ด้วย carbonate coating buffer ในอัตราส่วน 1:100 ก่อนนำมาใช้ทดสอบหาปริมาณ Adsorbed antigen

วัคซีนมาตรฐาน (NIBSC 02/176) เตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 Lf/ml โดยเจือจางด้วย carbonate coating buffer

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างวัคซีน และวัคซีนมาตรฐานที่เตรียม ปริมาตร 100 μl มาหยดลงใน ELISA plates (96-well; Nunc MaxiSorp™ round-bottom 449824, Thermo Fisher Scientific, USA) แล้วเจือจาง (2-fold dilution) ด้วย carbonate coating buffer pH 9.6 เป็นจำนวน 8 dilutions จากแถว A ถึง H โดยตัวควบคุมวิธีวิเคราะห์ (blank) คือ carbonate coating buffer จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างด้วย Phosphate buffer saline-Tween [PBS-T: PBS + 0.05% (V/V) Tween 20] 3 ครั้ง เติม blocking solution [PBS-T + 2.5% (V/V) Bovine serum albumin (BSA)] ปริมาตร 150 μl /well นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วเติม Guinea pig anti diphtheria IgG (NIBSC10/128) ที่ขนาดเจือจาง 1:200 ปริมาตร 100 μl /well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง จากนั้นเติม anti GP peroxides conjugate IgG (Chemicon® AP193P, Sigma-Aldrich, USA) ที่ขนาดเจือจาง 1:10000 ปริมาตร 100 μl /well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง แล้วเติม Tetramethylbenzidine (TMB Life technologies® 00-2019, Thermo Fisher Scientific, USA) ปริมาตร 100 μl /well บ่มที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้โดนแสงเป็นเวลา 15-20 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.5M H_2SO_4 ปริมาตร 50 μl /well แล้วอ่านค่าดูดกลืนแสง (Optical Density: OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Infinite® 200 PRO, TECAN, Switzerland)

คำนวณผลโดยใช้โปรแกรม parallel line (Bioassay assist; National Institute of Infectious Disease, Japan) ระหว่างความเข้มข้น และการดูดกลืนแสง

การทดสอบความเที่ยง (precision)

1. การทดสอบซ้ำในวันเดียว Intra-assay หรือ repeatability

ทำการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และร้อยละการดูดซับแอนติเจนของสารเสริมฤทธิ์ (degree of adsorption) ของวัคซีนตัวอย่างในวันและเวลาเดียวกันอย่างน้อย 3 การทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนซึ่งจะต้องมีค่า < 10%

2. การทดสอบซ้ำต่างวัน Inter-assay หรือ reproducibility

ทำการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และร้อยละ degree of adsorption ของวัคซีนตัวอย่าง ต่างวันและเวลากัน (separate experiment) อย่างน้อย 3 การทดสอบ นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนซึ่งจะต้องมีค่า < 10%

การทดสอบความทนของวิธี (Ruggedness/Robustness)

ทำการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และร้อยละ degree of adsorption ของวัคซีนตัวอย่าง จากผู้วิเคราะห์ 2 คนๆ ละ 3 การทดสอบ นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนซึ่งจะต้องมีค่า < 10%

การทดสอบความเหมาะสมของระบบ และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (System suitability and linearity)

ตรวจสอบผลการทดสอบค่าความสัมพันธ์ของการเตรียมวัคซีนมาตรฐานและวัคซีนตัวอย่าง ต้องเป็นไปในลักษณะ dose response (regression) ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ เป็นเส้นตรง (linearity) คู่ขนาน (parallelism) ($r^2 > 98\%$) ซึ่งหากไม่เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดโปรแกรม parallel line จะไม่สามารถคำนวณผลได้

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ทำการทดสอบด้วยวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยักมาตรฐานเทียบกับวัคซีนรวมป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน ในสภาวะการทดสอบที่เหมือนกัน ค่า OD ของผลการทดสอบแอนติบอดีต่อวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยักมาตรฐานต้องไม่แตกต่างจาก blank

การคำนวณ

คำนวณหาปริมาณแอนติเจนด้วยโปรแกรม parallel line assay โดยค่าความสัมพันธ์ระหว่างวัคซีนมาตรฐานและวัคซีนตัวอย่างเป็นลักษณะ dose response (regression) ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ (95% Confidence Interval) เป็นเส้นตรง (linearity) และคู่ขนาน (parallelism) ผลที่ได้นำมาหาค่าเฉลี่ยแบบถ่วงน้ำหนัก (weighted geometric mean: WGO-Mean) ค่าช่วงการยอมรับบนและล่าง (upper-lower limit) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (weighted geometric standard deviation : WGO-SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (percent geometric coefficient of variation: % GCV) สำหรับค่าร้อยละการดูดซับแอนติเจน (Degree of adsorption) คำนวณโดยค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean: GO-Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิต (geometric standard deviation: GSD) และวิเคราะห์ผลความจำเพาะของวิธีการทดสอบโดยเปรียบเทียบค่า OD และผลการทดสอบแอนติบอดีต่อวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยักมาตรฐาน ด้วยสถิติ Paired t-test⁽⁷⁾

ผล

การทดสอบความเที่ยง (precision)

การทดสอบซ้ำในวันเดียว *Intra-assay* หรือ *repeatability*: ผลการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และ degree of adsorption ของวัคซีนตัวอย่างในวันและเวลาเดียวกัน อย่างน้อย 3 การทดสอบ ที่เป็นอิสระต่อกัน ผลวิเคราะห์ปริมาณ adsorbed antigen ทั้ง 3 ซ้ำ มีค่า WGO-SD เท่ากับ 1.01 และ %GCV เท่ากับ 1.44 สำหรับ degree of adsorption มีค่า GSD เท่ากับ 1.00 และ %GCV เท่ากับ 0.29 (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน

ครั้งที่	Adsorbed antigen (Lf/ml)	Lower limit	Upper limit	Non-adsorbed antigen (Lf/ml)	Degree of adsorption (%)
1	29.60	28.12	31.26	2.38	91.95
2	30.17	28.75	31.67	2.27	92.48
3	29.62	28.29	31.01	2.31	92.20
WGO-Mean	29.80	28.97	30.65	GO-Mean	92.21
WGSD	1.01			GSD	1.00
%GCV	1.44			%GCV	0.29

WGO-Mean: weighted geometric mean

WGO-SD: weighted geometric standard deviation

%GCV: percent geometric coefficient of variation

GO-Mean: geometric mean

GSD: geometric standard deviation

การทดสอบซ้ำต่างวัน *Inter-assay* หรือ *reproducibility*

ผลการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และ degree of adsorption ของวัคซีนตัวอย่างต่างวันและเวลากัน (separate experiment) อย่างน้อย 3 การทดสอบ ผลวิเคราะห์ปริมาณ adsorbed antigen ทั้ง 3 วัน มีค่า WGO-SD เท่ากับ 1.01 และ %GCV เท่ากับ 1.38 สำหรับ degree of adsorption มีค่า GSD เท่ากับ 1.01 และ %GCV เท่ากับ 0.59 (ตารางที่ 2)

การทดสอบความทนของวิธี

ผลการทดสอบหาปริมาณ adsorbed antigen, non-adsorbed antigen และ degree of adsorption ของวัคซีนตัวอย่าง จากผู้วิเคราะห์ 2 คน คนละ 3 การทดสอบ ผลวิเคราะห์ปริมาณ adsorbed antigen มีค่า WGO-SD เท่ากับ 1.01 และ %GCV เท่ากับ 1.19 สำหรับ degree of adsorption มีค่า GSD เท่ากับ 1.01 และ %GCV เท่ากับ 0.83 ซึ่งผลการทดสอบมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่า 10 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน

วันที่	ครั้งที่	Adsorbed antigen (Lf/ml)	Lower limit	Upper limit	Non-adsorbed antigen (Lf/ml)	Degree of adsorption (%)
1	1	29.60	28.12	31.26	2.38	91.95
	2	30.17	28.75	31.67	2.27	92.48
	3	29.62	28.29	31.01	2.31	92.20
2	1	28.01	25.07	31.27	1.87	93.32
3	1	27.36	22.93	32.6	1.94	92.91
WGO-Mean		29.63	28.84	30.44	GO-Mean	92.58
WGSD		1.014			GSD	1.01
%GCV		1.38			%GCV	0.59

WGO-Mean: weighted geometric mean

WGO-SD: weighted geometric standard deviation

%GCV: percent geometric coefficient of variation

GO-Mean: geometric mean

GSD: geometric standard deviation

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงทนของวิธี

ผู้ทดสอบ	ครั้งที่	Adsorbed antigen (Lf/ml)	Lower limit	Upper limit	Non-adsorbed antigen (Lf/ml)	Degree of adsorption (%)
รายชื่อ 1	1	27.36	22.93	32.6	1.94	92.91
	1	29.60	28.12	31.26	2.38	91.95
	2	30.17	28.75	31.67	2.27	92.48
	3	29.62	28.29	31.01	2.31	92.20
	4	28.01	25.07	31.27	1.93	93.32
รายชื่อ 2	5	27.36	22.93	32.6	2.02	92.91
	1	27.23	25.38	29.23	2.56	91.06
	2	30.5	28.57	32.55	1.94	92.91
	3	28.64	22.96	35.33	1.87	93.32
WGO-Mean		29.45	28.77	30.15	GO-Mean	92.53
WGSD		1.01			GSD	1.01
%GCV		1.19			%GCV	0.83

WGO-Mean: weighted geometric mean

WGO-SD: weighted geometric standard deviation

%GCV: percent geometric coefficient of variation

GO-Mean: geometric mean

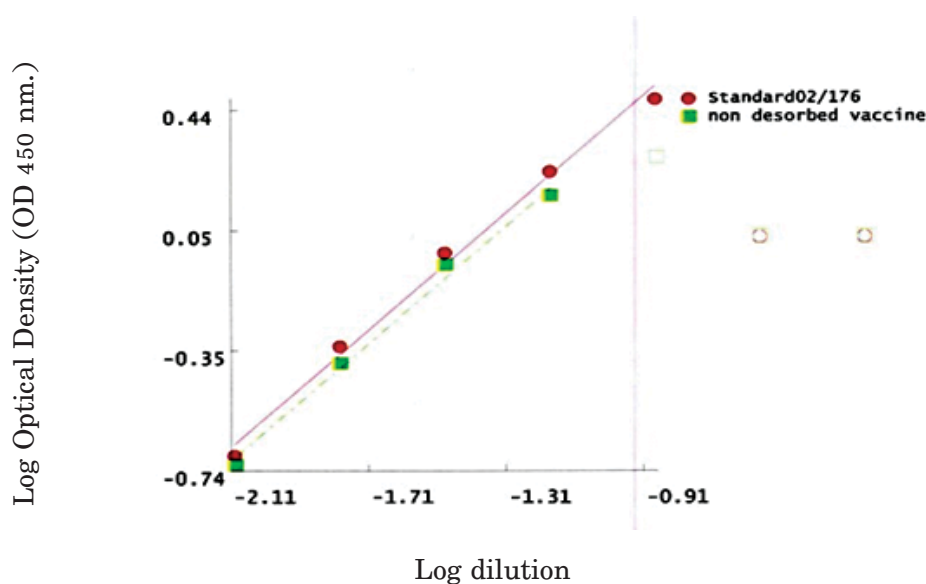
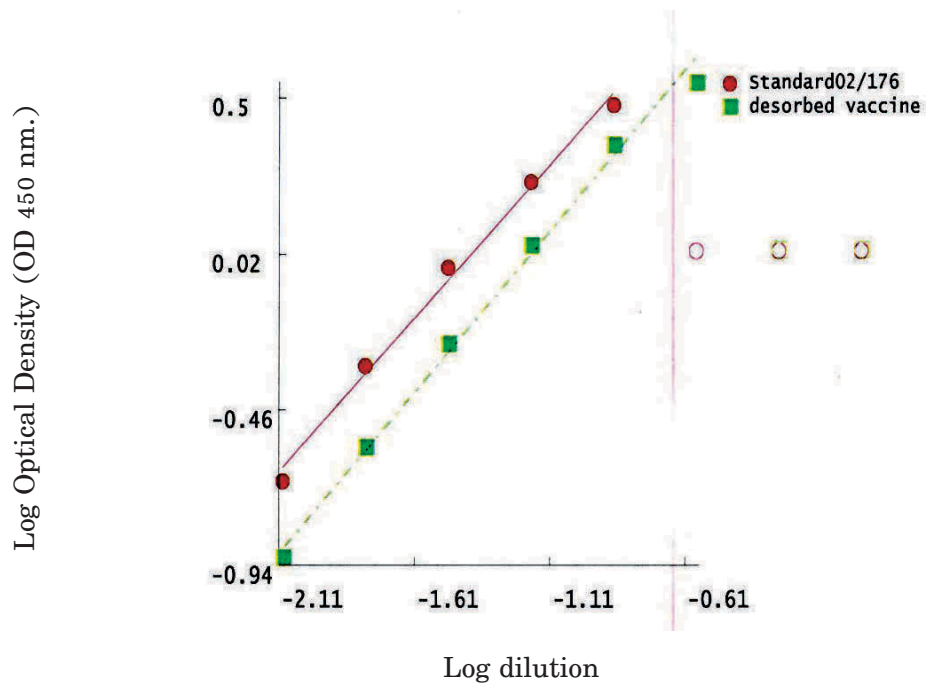
GSD: geometric standard deviation

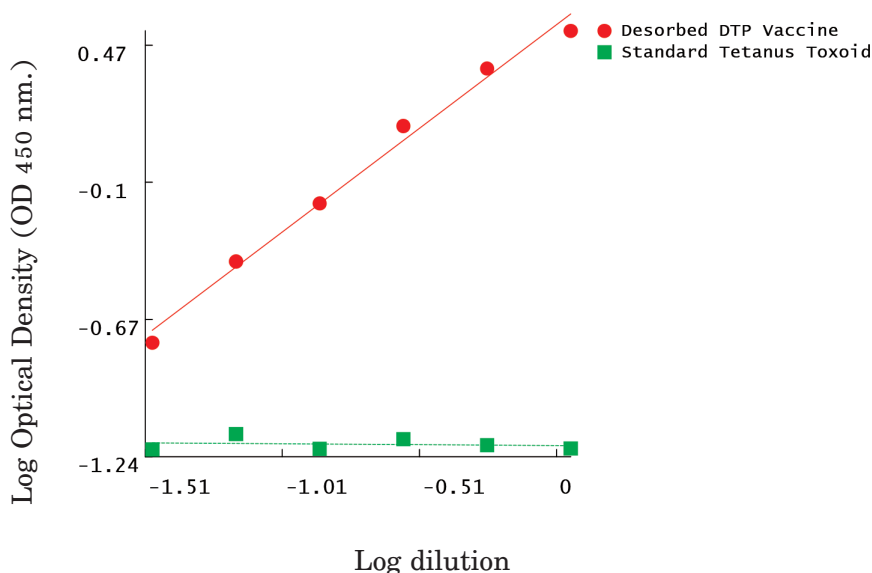
การทดสอบความเหมาะสมของระบบ และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

เมื่อพิจารณาค่า OD ของตัวอย่างวัคซีนและวัคซีนมาตรฐาน พบว่าแปรผันตามระดับการเจือจาง และเป็นคู่ขนานกับผลการทดสอบวัคซีนมาตรฐาน ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด ดังแสดงในภาพที่ 1

การทดสอบความจำเพาะของวิธี

การทดสอบด้วยวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยักมาตรฐานเทียบกับวัคซีนรวมป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน ไม่พบว่าเทคนิค ELISA นี้ตรวจจับแอนติเจนวัคซีนป้องกันบาดทะยักที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของวัคซีนรวมได้ ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยค่า OD ที่อ่านได้ไม่แตกต่างจาก blank ($p = 0.082$)





ภาพที่ 2 การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

วิจารณ์

ผลจากการทดสอบความเที่ยงของการทดสอบพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการทดสอบทั้งหมดไม่ว่าจะเป็นการทดสอบในวันเดียวกัน ต่างวัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียว หรือ 2 คน ให้ค่าต่ำกว่าร้อยละ 2 จากการทดสอบความจำเพาะของวิธีไม่พบการตรวจจับแอนติเจนวัคซีนป้องกันบาดทะยัก และค่า OD ของผลการทดสอบไม่มีความแตกต่างจากตัวควบคุม (blank) แสดงให้เห็นว่าการทดสอบนี้มีความจำเพาะ แม้ว่า antibody ที่ใช้จะเป็น polyclonal antibody เท่านั้น สำหรับความเป็นเส้นตรง หรือ linearity เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของการวิเคราะห์ด้วยสมการเส้นตรง หรือ parallel line⁽³⁾ ดังนั้นทุกผลการทดสอบที่สามารถคำนวณค่าได้จึงต้องผ่านคุณสมบัตินี้ ซึ่งผลการทดสอบทุกครั้งและทุกค่าแสดงถึงความเป็นเส้นตรง ค่าดูตกเส้นแสงลดลงตามระดับการเจือจางของตัวอย่าง และผลการทดสอบเป็นไปในลักษณะคู่ขนานกับวัคซีนมาตรฐาน ผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับข้อกำหนดสากลที่ระบุให้วัคซีนรวมมีปริมาณ Diphtheria antigen 6.7–25 Lf/ dose (0.5 ml)⁽⁸⁾ จากการศึกษาวิธีการหาปริมาณ Diphtheria antigen ในวัคซีนรวมป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน โดยเทคนิค ELISA สามารถชี้ให้เห็นว่าวิธีนี้มีความเที่ยง ความคงทน ความจำเพาะ และความเป็นเส้นตรงของวิธี สอดคล้องกับที่ระบุในแนวทางขององค์การอนามัยโลก^(5, 8, 9) เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการเพื่อการเฝ้าระวังคุณภาพการผลิตของวัคซีนในแต่ละรุ่นได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Laura C. และคณะ⁽¹⁰⁾ วิธีนี้สามารถลดระยะเวลาการวิเคราะห์ ลดความถี่ในการตรวจสอบความแรงในสัตว์ทดลองสอดคล้องตามหลักจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง นอกจากนี้จะสามารถลดค่าใช้จ่ายได้

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน diphtheria โดยเทคนิค ELISA เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง มีความเที่ยง แม่นยำ มีความคงทน เชื่อถือได้ ให้ผลรวดเร็ว เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นงานประจำเพื่อการเฝ้าระวังการผลิตของวัคซีนป้องกันโรคคอตีบในแต่ละรุ่นการผลิต และเพื่อลดความถี่การตรวจสอบความแรง เป็นการลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลอง และสามารถควบคุมคุณภาพวัคซีนให้มีมาตรฐานตามที่ได้ขึ้นทะเบียนไว้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ และ นางวิชุดา จริยะพันธุ์ ผู้ทรงคุณวุฒิ ด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ชีววิทยา) ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำและสนับสนุน จนทำให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Diphtheria. In: Centers for Disease Control and Prevention Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. 13th ed. [online]. 2015; [cited 2015 Sep 15]; [12 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/dip.pdf>.
2. สำนักงานสารนิเทศและประชาสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข. สธ. ชี้ผู้ใหญ่วัย 20-50 ปี เสี่ยงป่วย “โรคคอตีบ” ธรรมชาติป้องกันฟรี เจลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพฯ. ข่าวเพื่อสื่อมวลชน. [ออนไลน์]. 15 ม.ค. 2558; [สืบค้น 3 พ.ค. 2561]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://dcd.ddc.moph.go.th/uploads/pdf/ข่าวสารนิเทศ%20dT%2015-01-58.pdf>.
3. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การควบคุมกำกับคุณภาพวัคซีนโดยการรับรองรุ่นการผลิต (lot release) ของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: บริษัท Full Force จำกัด; 2557.
4. Gupta RK, Siber GR. Use of in vitro Vero cell assay and ELISA in the United States potency test of vaccines containing adsorbed diphtheria and tetanus toxoids. Dev Biol Stand 1996; 86: 207-15.
5. Chapter II: testing for diphtheria vaccines. In: World Health Organization. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines, WHO/IVB/11.11. Geneva, Switzerland: Department of Immunization, Vaccines and Biologicals; 2013. p. 30-51.
6. World Health Organization. International collaborative study to assess the suitability of the candidate 7th WHO International Standard for rabies vaccine, WHO/BS/2018.2335. [online]. 2018; [cited 20 Jun 19]; [40 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/biologicals/BS.2018.2335_7th_IS_Rabies_Vaccine.pdf.
7. Niroumand H, Zain MFM, Jamil MA. Statistical methods for comparison of data sets of construction methods and building evaluation. Procedia Soc Behav Sci 2013; 89: 218-21.
8. World Health Organization. Observed rate of vaccine reactions diphtheria, pertussis, tetanus vaccines. [online] 2014; [cited 4 Sep 15]; [10 screens]. Available from: URL: http://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tools/DTP_vaccine_rates_information_sheet.pdf.
9. World Health Organization. Immunological basis for immunization/Module 2: diphtheria, WHO/EPI/GEN/93.12. Geneva, Switzerland: Department of Vaccines and Biologicals; 2001.
10. Coombes L, Stickings P, Tierney R, Rigsby P, Sesardic D. Development and use of a novel in vitro assay for testing of diphtheria toxoid in combination vaccine. J Immunol Methods 2009; 350(1-2): 142-9.

Method Verification for Determination of Diphtheria Antigen in Diphtheria Vaccine

Sakalin Trisiriwanich and Ubonwan Chairayalert

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi, 11000, Thailand.

ABSTRACT This study was aimed to verify an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) used to determine an amount of diphtheria antigen (adsorbed antigen) and degree of adsorption in diphtheria vaccine. The results revealed that standard deviations (SD) and percentages of coefficient of variation (% CV) for adsorbed antigen and degree of adsorption in intra-assay precision were 1.01, 1.44 and 1.00, 0.29, respectively, while those of inter-assay precision were 1.01, 1.38 and 1.01, 0.59, respectively. For robustness analysis, values of SD and %CV for adsorbed antigen and degree of adsorption were 1.01, 1.19 and 1.01, 0.83, respectively, as determined by each analyst. In addition, no cross reaction to standard tetanus vaccine was shown, indicating that the method is specific to combined DTP vaccine. Our study could suggest that ELISA is appropriate to use as an alternative method to monitor consistency of diphtheria vaccine production.

Keywords: Diphtheria antigen, Antigen content, Method verification