

การศึกษาเปรียบเทียบส่วนประกอบสำคัญในน้ำยาสกัดไรฝุ่นของ ศิริราชกับของต่างประเทศที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคภูมิแพ้

วรรณะ มหาภักดีคุณ วท.ม., DAP&E*

ฉวีวรรณ บุนนาค พ.บ., FICS, FACA, FCOT**

ปภัต วิษยานนท์ พ.บ., FAAP, FACAI, Dip Amer Brd Allergy & Immunology***

จุฬาลักษณ์ โกมลตรี DrPH (Biostatistics)****

สิริจิต วงศ์กำชัย วท.ม., DAP&E*

ประยุทธ์ ดันสุริยวงศ์ พ.บ., FCOT**

พีรพันธ์ เจริญชาติศรี พ.บ., FCOT**

สุวัฒน์ วิมลวัฒนาภรณ์ พ.บ., Cert Clin Pharm*****

ชัยพร มโนชนนท์ DipMST*****

เรื่องย่อ : วิธีการทดสอบทางผิวหนังด้วยน้ำยาสกัดจากไรฝุ่นเป็นวิธีมาตรฐานที่ช่วยในการวินิจฉัยโรคภูมิแพ้จากไรฝุ่นได้ การทราบปริมาณของสารก่อภูมิแพ้จำเพาะต่อไรฝุ่นในน้ำยาสกัดจะทำให้สามารถเตรียมน้ำยาสกัดให้มีมาตรฐานได้ โดยมีส่วนประกอบของสารสำคัญเท่าเทียมกันทุกรุ่นของการผลิต ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยโรคภูมิแพ้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) เปรียบเทียบส่วนประกอบสำคัญ (major components) ของสารก่อภูมิแพ้ที่สกัดจากไรฝุ่น ในน้ำยาสกัดไรฝุ่น 3 ชนิดได้แก่ น้ำยาสกัดที่เตรียมมาจากไรฝุ่นสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) และ *Dermatophagoides farinae* (Der f) ที่เพาะเลี้ยงเองในห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล กับน้ำยาที่สกัดจากไรฝุ่นทั้งสองสายพันธุ์ที่สั่งซื้อจากประเทศอังกฤษ โดยศึกษาในน้ำยาสกัดที่ใส่และไม่ใส่สารกันเสียกลีเซอริน แล้วเปรียบเทียบกับน้ำยาสกัดไรฝุ่นสำเร็จรูปจากประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งตรวจหาความเข้มข้นของสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญชนิด Der p และ Der f กลุ่ม 1 และ 2 ในน้ำยาสกัดทั้งสามชนิดด้วยวิธี two-site monoclonal based ELISA, 2) ศึกษาด้านชีวภาพ (biological assay) เพื่อเปรียบเทียบ relative potency ของน้ำยาโดยการทดสอบทางผิวหนังในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้จำนวน 120 คน ผลการศึกษาพบว่าน้ำยาที่สกัดจากไรฝุ่นที่สั่งซื้อจากประเทศอังกฤษมีความเข้มข้นของส่วนประกอบสำคัญ Der p 1 ต่ำมาก (เท่ากับ 1 ไมโครกรัม/มล.) ส่วนน้ำยาสกัดที่ผลิตจากไรฝุ่นที่เพาะเลี้ยงเองมีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของส่วนประกอบสำคัญ ชนิด Der p 1, Der f 1 และสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น กลุ่ม 2 (Der p 2+Der f 2)

*ภาควิชาปรสิตวิทยา, **ภาควิชาโสต นาสิก ลาริงซ์วิทยา, ***ภาควิชาภูมิคุ้มกันเวชศาสตร์, ****สถานส่งเสริมการวิจัย,

*****ภาควิชาเภสัชวิทยา, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร 10700.

เท่ากับ 102, 195 และ 94 ไมโครกรัม/มล.ตามลำดับ ส่วนน้ำยาสกัดไรฝุ่นสำเร็จรูปจากประเทศสหรัฐอเมริกามีความเข้มข้นเท่ากับ 169, 238 และ 91 ไมโครกรัม/มล.ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารก่อภูมิแพ้จากน้ำยาที่ใช้และไม่ใช้สารกันเสียกลีเซอรินพบว่าส่วนใหญ่ไม่แตกต่างกัน การทำให้น้ำยาเจือจางลง 10 เท่า (จาก 10,000 เป็น 1,000 PNU/ml) ทำให้ความเข้มข้นของ mite allergen กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 ลดลงอย่างเป็นสัดส่วนกันด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำยาสกัดไรฝุ่นทั้งสามชนิดให้ผลลบวกในการทดสอบทางผิวหนังในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ตรงกัน และน้ำยาสกัดไรฝุ่นของศิริราชมีความคงตัว (stability) โดยมีอายุการใช้งานได้นานอย่างน้อย 1 ปีเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C สรุปว่าไรฝุ่นที่เพาะเลี้ยงเองในประเทศสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตวัคซีนไรฝุ่นได้

Abstract :

A Comparative Study of the Major Allergenic Components in House Dust Mite Extracts between Siriraj and Commercially Prepared Extracts
Vanna Mahakittikun, M.Sc., DAP&E*, Chaweewan Bunnag, M.D., FICS, FACA, FCOT**,
Pakit Vichyanond, M.D., FAAP, FACA, Dip Amer Brd Allergy&Immunology***,
Chulaluk Komoltri, DrPH (Biostatistics)****, Sirichit Wongkamchai, M.Sc., DAP&E*,
Prayuth Tunsuriyawong, M.D., FCOT**, Perapun Jareoncharsri, M.D., FCOT**, Suwat
Wimolwattanapun, M.D., Cert Clin Pharm*****, Chaiyaporn Manochnun, Dip.
MST*****

*Department of Parasitology, **Department of Oto-Rhino-Laryngology, ***Department
of Pediatrics, ****Epidemiology Unit, ***** Department of Pharmacology, Faculty of
Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.

Siriraj Hosp Gaz 2003; 55: 283-293.

The quantity and concentration of major allergens in mite allergenic extracts are crucial for skin testing, which is the recommended standard method for the diagnosis of house dust mite allergic disease. The purposes of this study were 1) To compare the constituents of major mite allergens in 3 types of mite extracts, i.e., extracts from mite reared in-house (*Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*), extracts from commercial mite products and commercial ready-made mite extracts. These in-house extracts were prepared either with or without the preservative, glycerine. The concentrations of the major constituents of group 1 and 2 allergens of the extracts were determined by a two-site monoclonal based ELISA. 2) Biological assays were also carried out to determine the relative potency of the extracts in 120 allergic patients by skin prick test. It was found that the mean concentrations of Der p 1, Der f 1 and group 2 mite allergens in extracts from mites reared in-house were 102, 195 and 94 µg/ml, respectively, compared to 169, 238 and 91 µg/ml, respectively in commercial mite extracts. The commercial mite products had the lowest concentrations of mite allergens (1 µg/ml). Comparison of mite extracts with and without glycerine preservative showed no significant difference in concentrations of major allergens. Reduction of allergen concentration from 10,000 to 1,000 PNU/ml also reduced the concentration of mite allergens proportionately. Siriraj mite extracts were stable for at least 1 year at 4°C without any significant change in composition or concentration.

In conclusion, mite reared in-house can be used as raw material for preparation of mite allergenic vaccine.

บทนำ

ไรฝุ่นเป็นสารก่อภูมิแพ้ภายในบ้าน (indoor allergens) ที่สำคัญที่สามารถก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ได้¹ สำหรับในประเทศไทยพบว่า ไรฝุ่นสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) และ *Dermatophagoides farinae* (Df) เป็นสาเหตุของโรคภูมิแพ้ในคนไทยมากที่สุด² การวินิจฉัยโรคภูมิแพ้จากไรฝุ่นในผู้ป่วยอาศัยประวัติของผู้ป่วย ลักษณะอาการทางคลินิก และการทดสอบทางผิวหนัง (allergy skin test)³ ซึ่งสามารถบอกชนิดของสารก่อภูมิแพ้และไรฝุ่นสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของการแพ้ได้ ทั้งยังช่วยบอกว่าผู้ป่วยแพ้มากหรือน้อยได้อีกด้วย โดยทั่วไปการทดสอบภูมิแพ้ทางผิวหนังที่นิยมใช้มี 2 วิธี คือ วิธีสะกิดผิวหนัง (skin prick test, SPT) และวิธีฉีดเข้าในผิวหนัง (intradermal test, ID) โดยนำน้ำยาสกัดจากไรฝุ่น (mite allergen extracts) มาสะกิดหรือฉีดเข้าในผิวหนัง แล้วอ่านผลโดยดูปฏิกิริยาการบวมแดงที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และอ่านผลได้ทันที ดังนั้นน้ำยาสกัดสารก่อภูมิแพ้ที่นำมาใช้ในการทดสอบจึงต้องมีคุณภาพและได้มาตรฐาน น้ำยาสกัดสารก่อภูมิแพ้ที่ดีควรมีส่วนประกอบของสารก่อภูมิแพ้ครบถ้วน มีปริมาณของส่วนประกอบสำคัญ (major components) ที่แน่นอน และต้องมีความแรง (allergenic potency) ที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาภูมิไวเกินได้⁴ ดังนั้นจึงต้องศึกษาถึงคุณสมบัติของน้ำยาสกัดว่ามีประสิทธิภาพมากน้อยเพียงใด และประสิทธิภาพนั้นคงที่เท่ากันในการผลิตแต่ละรุ่นหรือไม่ โดยกำหนดเป็นหน่วยวัดและมีการเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน

การกำหนดหน่วยวัดของน้ำยาสกัดสารก่อภูมิแพ้หลายระบบ และยังไม่มีการตกลงกันแน่นอนว่าควรใช้ระบบใด ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้แก่ International unit, Biological unit (BU), Allergy unit (AU), Weight/volume เป็นหน่วยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยจะบอกค่าน้ำหนักของสารที่นำมาสกัดต่อปริมาตรของน้ำยาที่ใช้

สกัด, หน่วยโปรตีนไนโตรเจน (protein nitrogen unit, PNU/ml) ซึ่งจะบอกถึงปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำยาสกัด โดย 1 PNU จะเท่ากับปริมาณโปรตีนในสารสกัด 0.01 ไมโครกรัม เป็นต้น⁵

สำหรับน้ำยาสกัดไรฝุ่นที่ใช้ในประเทศไทยในปัจจุบันนั้นมีทั้งที่สั่งซื้อเป็นน้ำยาลำเร็จรูปจากต่างประเทศ (commercial ready-made aqueous extract) และน้ำยาที่เตรียมขึ้นใช้เอง (in-house preparation) แต่นำเข้าวัตถุดิบ (ไรฝุ่น) จากต่างประเทศโดยบอกค่าความเข้มข้นของน้ำยาสกัดเป็นหน่วยโปรตีนไนโตรเจน ในปัจจุบันมีชุดตรวจสำเร็จรูปซึ่งใช้หลักการ two-site monoclonal antibody based ELISA สามารถหาความเข้มข้นของสารก่อภูมิแพ้ชนิด Der p, Der f ซึ่งเป็นสารสำคัญ (major allergens) ในน้ำยาสกัดได้ ดังนั้นการผลิตน้ำยาสกัดแต่ละรุ่นโดยบอกค่าความเข้มข้นของสารสำคัญจึงมีความแม่นยำกว่าการบอกค่าเป็นหน่วยโปรตีนไนโตรเจน การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อ (1) ผลิตน้ำยาสกัดสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ที่เพาะเลี้ยงเอง, (2) เปรียบเทียบ allergenicity ของน้ำยาสกัดจากไรฝุ่นที่เพาะเลี้ยงเองกับน้ำยาสกัดจากไรฝุ่นที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ และน้ำยาสกัดไรฝุ่นสำเร็จรูป (commercial mite extracts) โดยตรวจหาระดับของสารก่อภูมิแพ้ที่จำเพาะต่อไรฝุ่นชนิด Der p, Der f กลุ่ม 1 และ 2 ซึ่งเป็น major mite allergens ในน้ำยาสกัดด้วยวิธี two-site monoclonal based ELISA ในน้ำยาความเข้มข้นต่างๆ กัน, (3) เปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาสกัดทั้ง 3 ชนิดโดย biological assay โดยศึกษาในคน (*in vivo* study) ด้วยการทดสอบทางผิวหนัง (skin prick test) ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ และ (4) เปรียบเทียบ variation และ stability ของน้ำยาทั้ง 3 ชนิดในความเข้มข้นต่างๆ กัน ทั้งที่ใส่และไม่ใส่สารกันเสีย (กลีเซอริน) ในเวลา 1 ปี

วัตถุประสงค์และวิธีการ

น้ำยาสกัดไรฝุ่นที่ใช้ ได้แก่

1. น้ำยาสกัดที่ผลิตจากไรฝุ่นที่เพาะเลี้ยงเองในประเทศ (Dp-SI, Df-SI)
2. น้ำยาสกัดที่ผลิตเองแต่สั่งซื้อวัตถุดิบ (ไรฝุ่น) จากต่างประเทศ (บริษัท Central Science Laboratory, ประเทศอังกฤษ) (Dp-UK, Df-UK)
3. น้ำยาสกัดสำเร็จรูปจากบริษัท Greer ประเทศสหรัฐอเมริกา (Dp-US, Df-US)

การทดสอบใช้วิธีสะกิดผิวหนัง โดยใช้น้ำยาทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 10,000 PNU/ml โดยใช้ histamine ความเข้มข้น 1 มก./มล. (1:1,000) เป็น positive control และใช้ buffer saline ซึ่งเป็น diluent ที่ใช้ในการผลิตน้ำยาสกัดเป็น negative control

การเพาะเลี้ยงไรฝุ่น⁷

เพาะเลี้ยงไรฝุ่นชนิด *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ด้วยอาหารหนู (rat chow) และผงตับด (liver extract) ในตู้เพาะเลี้ยง (cabinet) ที่มีสารละลายอิ่มตัวของเกลือแกง (saturated NaCl solution) เพื่อปรับสภาพภายในตู้ให้มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 70-75 จากนั้นสังเกตการเจริญเติบโตของไรฝุ่น และปรับเพิ่มอาหาร หรือ subculture ทุก 2 สัปดาห์ และจัดทำระบบควบคุมคุณภาพการเพาะเลี้ยงไรฝุ่น (quality assurance of house dust mite cultivation) เพื่อให้ได้ไรฝุ่นสายพันธุ์ที่ถูกต้องและปราศจากการปนเปื้อนจากแมลงอื่น เชื้อรา หรือไรชนิดอื่นๆ (predators) ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ไรฝุ่นที่มีคุณภาพและใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นน้ำยาสกัด โดยแบ่งการปฏิบัติงานเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้ pre-analysis, analysis และ post-analysis (แผนภูมิที่ 1) โดยแต่ละขั้นตอนสามารถตรวจสอบและวัดผลได้เมื่อเพาะเลี้ยงจนได้ไรฝุ่นปริมาณมากพอแล้ว จึงนำมาแยกตัวไรฝุ่นออกจากอาหารเพาะเลี้ยงด้วยวิธี modified Berlese Tullgren โดยให้อุปกรณ์แยกไรฝุ่นและ

วิธีการทำไรฝุ่นให้บริสุทธิ์ซึ่งได้คิดค้นขึ้นเอง จากนั้นเก็บรักษาไรฝุ่นที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -40 °C จนกระทั่งนำไปสกัด (extraction)

การสกัดไรฝุ่น (Mite allergen extraction)⁸

การเตรียมน้ำยาสกัดไรฝุ่นประกอบด้วยขั้นตอน dehydration, defatting, extraction, separation, dialysis, sterilization, sterility test, standardization และ pyrogen test โดยนำไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus*, *D. farinae* ชนิดละ 10 กรัมมาทำการสกัดโดยวิธีแยกกัน แต่ขั้นตอนของการสกัดทำคู่กันไปเพื่อไว้กระบวนการสกัดอยู่ในสภาวะเดียวกัน

การตรวจหาระดับสารก่อภูมิแพ้จำเพาะต่อไรฝุ่น (Specific mite allergens)⁹

การตรวจหาระดับสารก่อภูมิแพ้จำเพาะต่อไรฝุ่นใช้วิธี two-site monoclonal based antibody method ซึ่งมีหลักการคือ monoclonal antibody ชนิดที่ 1 จะจับกับสารก่อภูมิแพ้ในน้ำยาสกัด และเมื่อเติม monoclonal antibody ชนิดที่ 2 ที่มี biotin ติดแน่นจะปฏิกิริยาจับกับ streptavidin-peroxidase และจะเกิดสีขึ้นเมื่อเติม substrate 2,2'-azino-di-(3 ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (Sigma A1888) จากนั้นวัดความเข้มของสีที่ความยาวคลื่น 405 nm ค่าความเข้มข้นของน้ำยาสกัดวัดเป็น ไมโครกรัม/มล. โดยอ่านค่าจากกราฟเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (standard Der p 1, Der f 1 และ allergen กลุ่ม 2)

หมายเหตุ : monoclonal antibody ชนิดที่ 1 สำหรับสารก่อภูมิแพ้ชนิด Der p 1 คือ 5H8 ส่วน Der f 1 และ mite allergens กลุ่ม 2 ใช้ 6A8 และ 7A1 ตามลำดับ ส่วน monoclonal antibody ชนิดที่ 2 ใช้ 4C1

การทดสอบทางผิวหนัง¹⁰

การทดสอบทางผิวหนังโดยวิธีสะกิดผิวหนัง (skin prick test) ทำโดยใช้น้ำยาสกัดจากสารก่อภูมิแพ้ (allergen extract) หยดลงบนผิวหนังที่ทำความสะอาด

ด้วยแอลกอฮอล์ และใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 26 สะกิดผิวหนังเบาๆ ตรงกลางหยดน้ำยา เพื่อเปิดผิวหนังชั้นบนสุดออกให้สารก่อภูมิแพ้ในน้ำยานั้นสามารถซึมผ่านลงไปทำปฏิกิริยากับ IgE ที่อยู่ภายใต้ผิวหนังได้ ถ้ามี IgE ที่จำเพาะต่อสารก่อภูมิแพ้ในหยดน้ำยานั้นก็จะเกิด

ปฏิกิริยาภูมิแพ้ขึ้น ทำให้ผิวหนังเกิดรอยบวม (wheal) และผื่นแดง (flare) ให้เห็นได้ วัดผลการทดสอบภายใน 15-20 นาที ทั้งนี้รอยบวมจะต้องมีผื่นแดงประกอบด้วยจึงจะถือว่าเป็นผลบวกและใช้เกณฑ์ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. เกณฑ์การวัดผลการทดสอบทางผิวหนังโดยวิธีสะกิด

เกณฑ์	ผลการทดสอบ
ผลไม่แตกต่างจาก control	ผลลบ
รอยบวมขนาดน้อยกว่า 3 มม.	1+
รอยบวมขนาด 3-5 มม.	2+
รอยบวมขนาด 5-7 มม.	3+
รอยบวมขนาดมากกว่า 7 มม. และ/หรือมี pseudopod	4+

*ดัดแปลงมาจาก Wormald PJ¹¹

ผู้ป่วยที่ทำการศึกษา มีลักษณะตามเกณฑ์ดังนี้

เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีโรคภูมิแพ้จากภูมิแพ้และหรือหอบหืด ที่มารับการทดสอบภูมิแพ้ทางผิวหนังที่คลินิกโรคภูมิแพ้ของภาควิชาโรค นาสสิก ลาริงซ์วิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และมีอายุเกิน 18 ปี
2. ผู้ป่วยที่สามารถงดยาต้านฮีสตามีน ยาพาราเซตามอล และยาที่อาจมีผลต่อการทดสอบภูมิแพ้ได้ตามระยะเวลาที่กำหนด

3. ผู้ป่วยที่สมัครใจเข้าร่วมการศึกษาวิจัย โดยลงนามในแบบสมัครใจเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

เกณฑ์การคัดออกผู้ป่วย (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่ไม่สามารถงดยาต้านฮีสตามีน ยาพาราเซตามอล และยาที่อาจมีผลต่อการทดสอบภูมิแพ้ได้ตามระยะเวลาที่กำหนด

2. ผู้ป่วยที่ไม่สมัครใจเข้าร่วมการศึกษาวิจัยนี้ งานวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติให้ทำการวิจัยจากคณะกรรมการสิทธิมนุษยชนเกี่ยวกับการวิจัยในคน (Ethical Clearance Committee on Human Rights Related to Research Involving Human Subjects) ของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารก่อภูมิแพ้ในน้ำยาที่ใส่และไม่ใส่กลีเซอริน ใช้การทดสอบ Mann-Whitney U ส่วนการเปรียบเทียบระหว่างน้ำยาสกัด 3 ชนิดใช้การทดสอบ Kruskal Wallis การเปรียบเทียบผลการทดสอบทางผิวหนัง (ผลบวก, ผลลบ) ใช้การทดสอบ chi-square การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรม SPSS Version 11.5

ผล

การผลิตไรฝุ่นบริสุทธิ์ (pure mite bodies) จากไรฝุ่นที่เพาะเลี้ยงเอง สามารถเตรียมจนได้วัตถุดิบไรฝุ่นที่มีความบริสุทธิ์สูง ปราศจากการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยง (รูปที่ 1)

จากการศึกษา allergenicity ของน้ำยาทั้ง 3 ชนิดในความเข้มข้น 10,000 พบว่าความเข้มข้นของ Der p 1, Der f 1 และ mite allergen กลุ่ม 2 จากน้ำยาผลิตจากไรฝุ่นเลี้ยงเองและน้ำยาสกัดสำเร็จรูปมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 2) ส่วนน้ำยาสกัดจากวัตถุดิบไรฝุ่นสั่งซื้อจากต่างประเทศมีค่าสารสำคัญต่ำมาก ประมาณเท่ากับ 1 ไมโครกรัม/มล. เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารก่อภูมิแพ้จากน้ำยาที่ใส่และไม่ใส่สารกันเสียกลีเซอรินพบว่าส่วนใหญ่ไม่แตกต่างกัน ความเข้มข้นของ mite allergen กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 ที่ความเข้มข้น 10,000 PNU/ml เป็นประมาณ 10 เท่าของความเข้มข้น 1,000 PNU/ml ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำให้เนื้อมีผลทำให้ความเข้มข้นของ mite allergen เจือจางลงอย่างเป็นสัดส่วนกันด้วย

ผลการศึกษาโดยการทดสอบทางผิวหนังพบว่าน้ำยาทั้ง 3 ชนิดให้ผล skin prick test ตรงกัน (ตารางที่ 3) และมีความคงตัว (stability) ของสารสำคัญในน้ำยาทั้งที่ใส่และไม่ใส่กลีเซอริน โดยมีอายุการใช้งานอย่างน้อย 1 ปีเมื่อเก็บรักษาที่ความเข้มข้น 10,000 PNU/ml ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 °ซ

วิจารณ์

สารก่อภูมิแพ้ (allergens) เป็นสารที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีชนิด IgE ที่จำเพาะต่อสารก่อภูมิแพ้นั้นๆ ได้ (allergen-specific IgE antibody) การสร้างแอนติบอดีชนิดนี้จำนวนมากเกินไปจะก่อให้เกิดภาวะภูมิไวเกิน (hypersensitivity) ดังนั้นการวินิจฉัยโรคภูมิแพ้ นอกจากจะอาศัยประวัติอาการ

ประวัติการสัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ และการตรวจร่างกายแล้ว การทดสอบทางผิวหนังด้วยน้ำยาสกัดสารก่อภูมิแพ้ ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาระหว่างสารก่อภูมิแพ้กับแอนติบอดีชนิด IgE ที่ผิวหนัง ยังเป็นวิธีมาตรฐานที่คณะผู้เชี่ยวชาญขององค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ในการวินิจฉัยโรคภูมิแพ้ต่างๆ ได้¹² ดังนั้นการเตรียมน้ำยาสกัดสารก่อภูมิแพ้เพื่อนำมาใช้ทดสอบในผู้ป่วยจึงต้องพิถีพิถันในวิธีการเตรียมเพื่อให้ได้มาตรฐานและให้ได้น้ำยาสกัดที่มีประสิทธิภาพ มีความเข้มข้นของโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้สำคัญอยู่ครบถ้วนและปลอดภัยแก่ผู้ป่วย

สำหรับการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้เพาะเลี้ยงไรฝุ่นปริมาณมาก (large scale production) และได้คิดค้นอุปกรณ์สำหรับแยกไรฝุ่นออกจากอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้ได้ตัวไรฝุ่นที่มีการปนเปื้อนอาหารเพาะเลี้ยงน้อยที่สุด เพื่อกำจัดสารอื่นที่อาจทำให้ผู้ป่วยแพ้และเพื่อให้ได้ mite allergen ที่มีปริมาณ (yield) สูง โดยวิธีดังกล่าวนี้สามารถผลิตไรฝุ่นที่มีความบริสุทธิ์ประมาณร้อยละ 90 ทั้งนี้อยู่ระหว่างการจดสิทธิบัตร (เลขที่คำขอ 069755) นอกเหนือจากการใช้วัตถุดิบที่ดีในการนำมาสกัดแล้ว การเตรียมน้ำยาสกัดให้ได้มาตรฐานนั้นยังขึ้นต่อกันที่สำคัญอีกหลายขั้นตอน

การเตรียมน้ำยาสกัดจะต้องควบคุมให้มีสัดส่วนประกอบหลักของสารก่อภูมิแพ้ (major allergen compositions) ในแต่ละรุ่นของการผลิตในความเข้มข้นของสารก่อภูมิแพ้จำเพาะใกล้เคียงกัน ซึ่งการวัดค่าความเข้มข้นของสารจำเพาะ (specific allergen) ในน้ำยาสกัดจะทำให้ทราบค่าที่แน่นอนกว่าการบอกค่าความเข้มข้นของน้ำยาสกัดเป็นโปรตีนในโครงกระดูก (protein nitrogen content) หรือการบอกค่าเป็น weight volume ซึ่งไม่จำเพาะต่อไรฝุ่น เพราะการตรวจวัดดังกล่าวจะให้ค่าโดยอ้อมซึ่งอาจทำให้ส่วนประกอบของสารสำคัญในน้ำยาสกัดมีค่าไม่แน่นอน (lot-to-lot variation) ในแต่ละครั้งของการผลิตได้

ตารางที่ 2. ความเข้มข้นของสารก่อภูมิแพ้ในน้ำยาสกัดไรฝุ่นชนิดต่างๆ

ค่าความเข้มข้นเป็น PNU/ml	ชนิดของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น	ค่าความเข้มข้นของสารก่อภูมิแพ้เป็น มคก./มล. ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (min, max)			
		ผลิตภัณฑ์ ^a	ไฮกลีเซอริน	ไมไฮกลีเซอริน	p-value
10,000	Der p1	US	168.6 $\pm$ 2.4 (165.9, 170.9)	-	-
		UK	0.8 $\pm$ 0.6 (0.0, 1.4)	1.3 $\pm$ 0.7 (0.4, 2.0)	0.310
		SI	102.3 $\pm$ 15.3 (80.0, 120.5)	108.1 $\pm$ 11.8 (98.0, 126.6)	0.548
		p-value	0.002	0.008	
	Der f1	US	238.4 $\pm$ 25.6 (200.1, 251.6)	-	-
		UK	1.4 $\pm$ 0.6 (0.8, 2.0)	1.2 $\pm$ 0.3 (0.7, 1.6)	0.548
		SI	194.5 $\pm$ 17.1 (175.3, 209.5)	191.3 $\pm$ 15.6 (163.5, 199.3)	0.421
		p-value	0.006	0.008	
	กลุ่ม 2	US	91.2 $\pm$ 37.6 (60.1, 156.5)	-	-
		UK	0.0 $\pm$ 0.0 (0.0, 0.0)	1.6 $\pm$ 0.4 (0.9, 2.0)	0.008
		SI	94.0 $\pm$ 30.6 (78.5, 148.7)	135.4 $\pm$ 12.2 (120.2, 148.7)	0.095
		p-value	0.008	0.008	
1,000	Der p1	US	15.2 $\pm$ 0.6 (14.6, 16.1)	-	-
		UK	0.06 $\pm$ 0.04 (0.0, 0.10)	0.0 $\pm$ 0.0 (0.0, 0.0)	0.032
		SI	10.4 $\pm$ 0.6 (9.5, 10.9)	14.3 $\pm$ 1.7 (11.5, 15.7)	0.008
		p-value	0.002	0.008	
	Der f1	US	20.4 $\pm$ 1.1 (19.2, 21.8)	-	-
		UK	0.2 $\pm$ 0.05 (0.1, 0.2)	0.0 $\pm$ 0.0 (0.0, 0.0)	0.008
		SI	15.9 $\pm$ 2.0 (12.6, 17.3)	16.0 $\pm$ 3.0 (12.1, 19.9)	1.000
		p-value	0.002	0.008	
	กลุ่ม 2	US	18.0 $\pm$ 1.7 (15.5, 19.7)	-	-
		UK	0.0 $\pm$ 0.0 (0.0, 0.0)	0.0 $\pm$ 0.0 (0.0, 0.0)	1.000
		SI	6.9 $\pm$ 1.8 (4.9, 9.3)	8.8 $\pm$ 1.9 (5.8, 10.9)	0.151
		p-value	0.002	0.008	

^a n=5 (เดือนที่ 0, 3, 6, 9 และ 12)

ตารางที่ 3. ผลการทดสอบทางผิวหนังด้วยวิธี skin prick test ของน้ำยาสกัดไรฝุ่นชนิดต่างๆ ในผู้ป่วย 120 ราย

ชนิดของสาร ก่อภูมิแพ้ ไรฝุ่น	ผลิตภัณฑ์ ^๑	ค่าร้อยละของผลการทดสอบ					p-value ^๒
		ผลลบ	1+	2+	3+	4+	
Dp	US*	40.8	9.2	10.0	0	40.0	0.9233
	UK**	41.7	9.2	6.7	0	42.5	
	SI**	43.3	11.7	8.3	0	36.7	
Df	US*	37.5	8.3	11.7	0	42.5	0.1896
	UK**	49.2	8.3	11.7	0.8	30.0	
	SI**	43.3	8.3	14.1	0.8	33.3	
+ve control	Histamine	0	6.7	35.8	4.2	53.3	-
-ve control	Buffer saline	100	0	0	0	0	-

^๑ Dp-US, Df-US = น้ำยาสำเร็จรูปต่อไรฝุ่น *D. pteronyssinus*, *D. farinae* จากประเทศสหรัฐอเมริกา
Dp-UK, Df-UK = น้ำยาสกัดเองจากไรฝุ่น *D. pteronyssinus*, *D. farinae* จากประเทศอังกฤษ
Dp-SI, Df-SI = น้ำยาสกัดเองจาก ไรฝุ่น *D. pteronyssinus*, *D. farinae* ที่เพาะเลี้ยงในภาควิชาปรสิตวิทยา
รพ.ศิริราช

* ความเข้มข้น 10,000 AU/ml

** ความเข้มข้น 10,000 PNU/ml

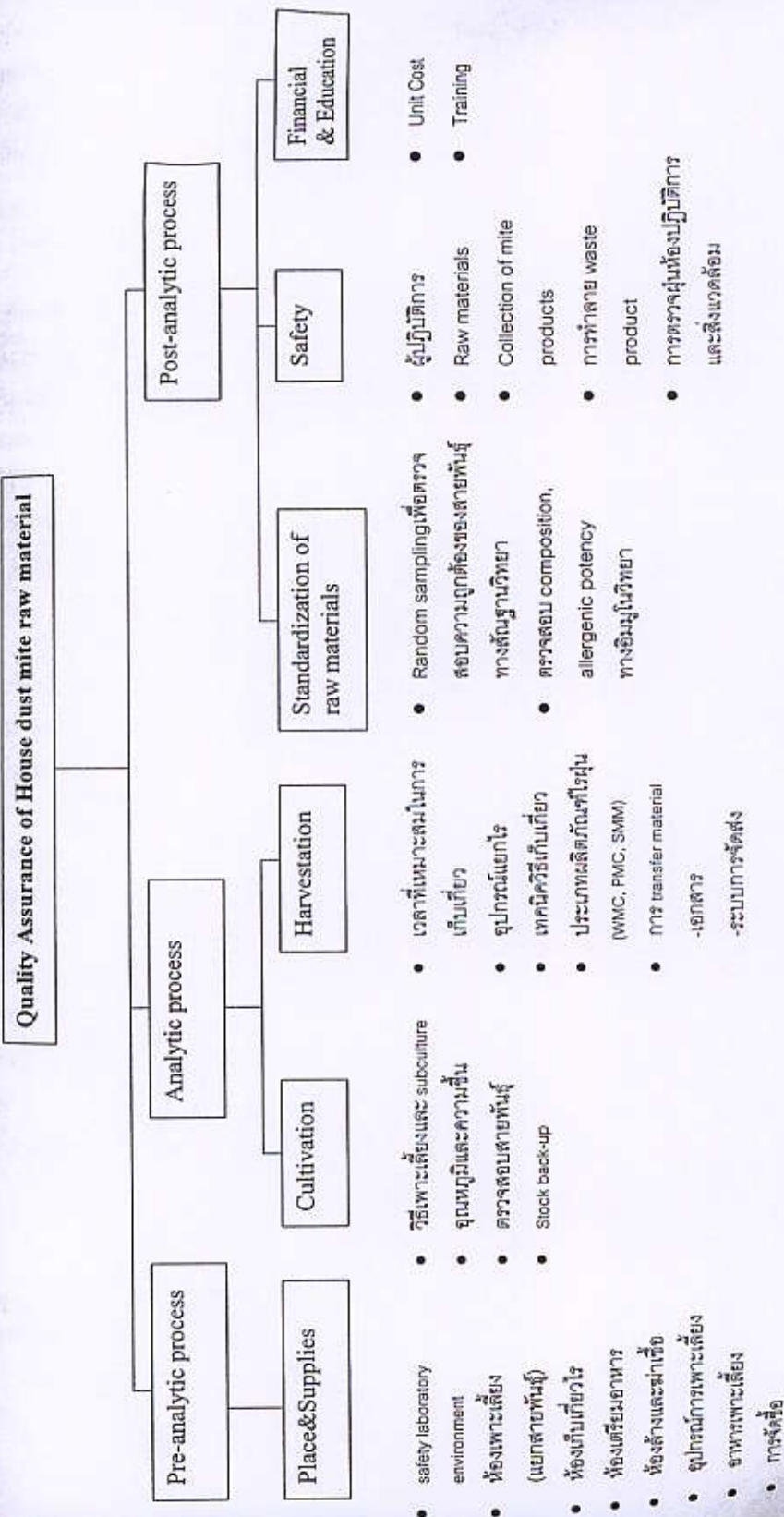
Histamine ความเข้มข้น 1 มก./มล. (1:1,000)

AU (Allergy Unit) = หน่วยวัดความแรงของสารสกัดด้วยวิธี *in vivo* assay

^๒ เปรียบเทียบผลการทดสอบทางผิวหนัง (ผลบวกและผลลบ) ระหว่างน้ำยา 3 ชนิด

จากการศึกษานี้ พบว่าน้ำยาสกัดที่ใช้ไรฝุ่น
ของต่างประเทศเป็นวัตถุดิบมีความเข้มข้นของ mite
allergens ทั้งกลุ่ม 1 และ 2 ต่ำ อาจเนื่องจากใช้วัตถุดิบที่
ต่างกัน เช่น ไรฝุ่นที่ส่งชื่อมามีปริมาณอาหารเพาะเลี้ยง
อยู่มากแต่ปริมาณตัวไรฝุ่นน้อย (ดังรูปที่ 1) จึงได้ปริมาณ
ของ mite allergens ต่ำ เมื่อนำมาทำเป็นน้ำยาสกัดจึง
เจือจางได้น้อย และจะสูญเสียความแรง (loss potency)
เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน อย่างไรก็ตามพบว่าให้ผลการ
ทดสอบทางผิวหนังเช่นเดียวกับน้ำยาสกัดอื่น ทั้งนี้อาจ

เนื่องมาจากมีส่วนประกอบของ mite allergens กลุ่มอื่น
ที่ไม่ใช่กลุ่ม 1,2 หรืออาจเป็นผลจากอาหารเพาะเลี้ยง
สำหรับน้ำยาสกัดจากไรฝุ่นที่เพาะเลี้ยงเอง ผู้วิจัยได้
แยกตัวไรฝุ่นออกจากอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งได้ไรฝุ่น
บริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 90 จึงทำให้มีความเข้มข้นของ
ส่วนประกอบสำคัญชนิด Der p, Der f ทั้งกลุ่ม 1 และ 2
ในระดับที่ใกล้เคียงกับน้ำยาสกัดสำเร็จรูปจากประเทศ
สหรัฐอเมริกา ในด้านผลการทดสอบทางผิวหนังพบว่า
ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างน้ำยาสกัดที่ผลิตเองและ



แผนภูมิที่ 1. House dust mite raw material control scheme

น้ำยาล้างรูป จึงกล่าวได้ว่าน้ำยาสกัดที่ผลิตขึ้นเองนี้มีความแรงใกล้เคียงกับน้ำยาสกัดสำเร็จรูปจากต่างประเทศ

อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการวิเคราะห์หาปริมาณของ specific mite allergen ชนิด Der p และ Der f กลุ่ม 1 และ 2 ด้วยวิธี two-site monoclonal based ELISA ก็ยังไม่ครอบคลุมสารก่อภูมิแพ้ในน้ำยาสกัดไรฝุ่นได้ครบทุกกลุ่ม เพราะตรวจหาเฉพาะความเข้มข้นของ major allergens Der p, Der f กลุ่ม 1 และ 2 ในน้ำยาสกัดเท่านั้นที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับโรคภูมิแพ้เท่านั้น¹³ ซึ่งปัจจุบันสามารถตรวจหาได้ด้วยน้ำยาล้างรูปสำหรับการตรวจ ในขณะที่มีรายงานว่ามีการก่อภูมิแพ้มากถึง 19 กลุ่ม¹⁴ ซึ่งเป็น minor allergens ซึ่งยังไม่มีชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูป อย่างไรก็ตามการทราบระดับความเข้มข้นของ Der p, Der f กลุ่ม 1 และ 2 ทำให้ทราบปริมาณของสารก่อภูมิแพ้ในน้ำยาสกัดที่แน่นอนกว่าการวัดความเข้มข้นของโปรตีนในโตรเจน แม้ว่าปริมาณสารก่อภูมิแพ้ในน้ำยาสกัดจะไม่ได้บอกถึงความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ในทางคลินิกโดยตรง แต่มีรายงานว่าน่าจะสัมพันธ์กัน¹⁵

ผู้วิจัยมีความเห็นว่าเพื่อให้การวิเคราะห์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ควรศึกษาต่อไปในแง่มุมต่อไปนี้ 1) ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารก่อภูมิแพ้โดยรวมของน้ำยาสกัดด้วยวิธี ELISA-inhibition โดยเปรียบเทียบกับน้ำยาสกัดมาตรฐานขององค์การอาหารและยา ของประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นการตรวจแบบ biological assays, 2) ศึกษาความคงตัว (stability) ของน้ำยาสกัดเมื่อนำออกใช้ในงานประจำวัน (day-time clinic use), 3) กำหนดมาตรฐานการผลิตน้ำยาสกัดโดยคำนึงถึง good labo-

ratory management ในห้องปฏิบัติการให้มากยิ่งขึ้น เพื่อพัฒนาการผลิตน้ำยาสกัดไรฝุ่นที่ทำอยู่ในปัจจุบันให้มีคุณภาพและได้มาตรฐานสากล และสามารถใช้เป็นบรรทัดฐานในการผลิตน้ำยาสกัดสารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่นๆต่อไปในอนาคต

สรุป

น้ำยาสกัดที่ผลิตจากไรฝุ่นที่เพาะเลี้ยงขึ้นเองมีความเข้มข้นของส่วนประกอบของสารสำคัญใกล้เคียงกับน้ำยาล้างรูปจากประเทศสหรัฐอเมริกา (CSL Greer) และให้ผลไม่ต่างกันในการทดสอบภูมิแพ้ทางผิวหนังในผู้ป่วย ส่วนการใส่หรือไม่ใส่สารกันเสีย (กลีเซอริน) ในน้ำยา ไม่มีผลทำให้น้ำยามีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 1 ปี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนพัฒนาการวิจัยและแพทยศาสตร์ศึกษา ปี พ.ศ. 2543 และทุนโครงการวิจัยมุ่งเป้าหมายมหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ. 2543

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณชลธิชา พงษ์ไต้ และคุณชจรศักดิ์ นรสีห์ ในการเพาะเลี้ยงไรฝุ่น, คุณศิริลักษณ์ แสงจันทร์ ในการทดสอบงาน ELISA, คุณกานดา เกษตรสินสมบัติ คุณศิริพร วรประยูร และคุณเผด็จ เดชพันท์ ในการทดสอบทางผิวหนังในผู้ป่วย และขอขอบคุณพระคุณ Dr. Ho Tze Ming ณ Institute for Medical Research ประเทศมาเลเซีย ที่ได้กรุณาให้ทุนเพื่อเพาะเลี้ยงในภาควิชาปรสิตวิทยา และให้คำปรึกษาที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Platts-Mills TAE, Thomas WR, Aalberse RC, Vervloet D, Chapman MD. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:1046-60.
2. Malainual N, Vichyanond P, Phan-Urai P. House dust mite fauna in Thailand. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 554-60.

3. อภิวัฒน์ นวนาค. จมูกอักเสบจากไรฝุ่น. ใน : อภิวัฒน์ นวนาค. บรรณาธิการ. หวัดเรื้อรัง. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์, 2539: 123-27.
4. ขวัญใจทองพานิชกุล, ปกิต วิษยานนท์. สารสกัดก่อภูมิแพ้. ใน: ปกิต วิษยานนท์, สุกัญญา โพธิ์คำจร, เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม, บรรณาธิการ. Allergy 2000 ตำราโรคภูมิแพ้. กรุงเทพมหานคร : สมาคมโรคภูมิแพ้แห่งประเทศไทย, 2543: 131-35.
5. Ipsen H, Klysner S, Larsen J, et al. Allergenic extracts. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, et al, eds. Allergy: principle and practice, 4th ed. St.Louis: CV Mosby, 1993: 529-53.
6. Cooke RA, Stull A. The preparation and standardization of pollen extracts for the treatment of hay fever. J Allergy 1933; 4: 87-91.
7. Voorhorst R, Spiekma FT, Varekamp R. House dust mite atopy and the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trousserst, 1897). Leiden : Stafleu's Company, 1969: 126-31.
8. บุญเจือ ธรณินทร์. การเตรียมน้ำยาสกัดสารภูมิแพ้. ใน : มนต์วิศิฐินดา. บรรณาธิการ. โรคภูมิแพ้. กรุงเทพมหานคร: อัมรินทร์การพิมพ์, 2521: 479-86.
9. Indoor Biotechnologies. Available at <http://www.indoorbio.com> access at 2/02/2003.
10. Board of directors, American Academy of Allergy and Immunology. Allergen skin testing. J Allergy Clin Immunol 1993; 92: 636-37.
11. Wormald PJ. Cross reactions in skin tests between house dust mite extract and feather extract. Clin Allergy 1971; 1: 491-93.
12. Bousquet J, vanCauwenberge P, Khaltaw N. ARIA Workshop Group; World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). J Allergy Clin Immunol 2001; 108: 147-334.
13. Thomas WR, Smith W. Update on allergens: house dust mite allergens. Allergy 1998; 53: 821-22.
14. Available at <http://www.allergen.org> access at 2/02/2003.
15. Shalit M, Schwartz LB, Von Allmen C, et al. Release of histamine and tryptase during continuous and interrupted cutaneous challenge with allergen in humans. J Allergy Clin Immunol 1990; 86: 117-25.