วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 มกราคม - กุมภาพันธ์ 2565

Journal of Health Science
Vol. 31 No. 1, January - February 2022

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original article*

การประเมินคุณภาพความแรงวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ของประเทศไทย

วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม วท.ม. (ชีวเคมี)*
อัจฉริยา ทรงธนนิตย์ วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์)*
ชลดา เพ็ชรไทย วท.บ. (จุลชีววิทยา)*
สิริฉัตร ชื่นใจ ภ.บ.**
สุภาพร ภูมิอมร วท.ด. (ไวรัสวิทยา)*
กรพงศ์ ภิญโญสุขี สพ.บ.*
ยุถิกา ขาวมีชื่อ วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์)*
สุภาภรณ์ ชุมพล ปร.ด. (จุลชีววิทยา)*
สมบัติ หิรัญศุภโชติ ภ.บ.**

** สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข*
*** กองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข*

วันรับ: 12 มิ.ย. 2563
วันแก้ไข: 1 ก.ค. 2564
วันตอบรับ: 11 ก.ค. 2564

บทคัดย่อ จากที่มีรายงานวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่ใช้กับสัตว์ในประเทศไทยไม่ผ่านเกณฑ์ความแรงในบางตำรับ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณภาพความแรงของวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่ใช้ในประเทศระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง 2562 ด้วยวิธีมาตรฐาน National Institutes of Health (NIH) Test ที่ใช้สัตว์ทดลอง และตรวจปริมาณแอนติเจนไกลโคโปรตีนในหลอดทดลอง โดยเก็บตัวอย่างภาคสมัครใจจากผู้นำเข้าวัคซีนตำรับที่ยังไม่เคยมีประวัติตรวจความแรงโดยห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพในประเทศ นำมาตรวจความแรงด้วยวิธี NIH โดยฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องหนูถีบจักรเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันแล้วจึงฉีดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าลงสมอง คำนวณค่าความแรงเทียบจากค่าวัคซีนมาตรฐานสากล และตรวจปริมาณไกลโคโปรตีนในวัคซีนด้วยวิธี sandwich ELISA ผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างที่ตรวจความแรงด้วยวิธี NIH จำนวน 11 รุ่นการผลิตจาก 6 ตำรับ มีค่าความแรงอยู่ระหว่าง 1.09 -17.12 IU ต่อโดส ผ่านเกณฑ์ขั้นต่ำ 1.0 IU ต่อโดส ขององค์การอนามัยโลก องค์การโรคระบาดสัตว์สากล และตำรายุโรป มีตัวอย่าง 2 รุ่นการผลิตจาก 2 ตำรับที่รายงานผลไม่ได้เนื่องจากไม่ผ่านเกณฑ์ควบคุมการทดสอบ การตรวจปริมาณไกลโคโปรตีน พบว่า วัคซีน 29 รุ่นการผลิต จาก 12 ตำรับ มีค่าอยู่ระหว่าง 1.14-10.33 IU ต่อโดส ซึ่งการตรวจนี้ยังไม่มีเกณฑ์ยอมรับที่เป็นสากล ผลตรวจความแรงจากสองวิธีมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน วัคซีนรุ่นการผลิตที่มาจากตำรับเดียวกันมีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่าแตกต่างกันระหว่างตำรับ สรุปได้ว่าวัคซีนทุกรุ่นการผลิตและทุกตำรับที่ตรวจมีค่าความแรงเมื่อตรวจด้วยวิธี NIH ผ่านเกณฑ์ยอมรับขั้นต่ำของสากล อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจความแรงเพิ่มเติมในตำรับที่ยังไม่มีผลวิเคราะห์ความแรงด้วยวิธี NIH และควรตรวจติดตามความแรงในวัคซีนตำรับที่ค่าความแรงอยู่ใกล้ค่าเกณฑ์ยอมรับขั้นต่ำ นอกจากนี้ ควรตรวจปริมาณไกลโคโปรตีนของแต่ละตำรับเพิ่มเติมเพื่อใช้กำหนดค่าเกณฑ์ยอมรับที่เหมาะสมของแต่ละตำรับต่อไป

คำสำคัญ: **วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า; ความแรง; ไกลโคโปรตีน; วิธี NIH**

บทนำ

โรคพิษสุนัขบ้าเกิดจากเชื้อไวรัสเรบีส์ (*Rabies lyssavirus*) ซึ่งจัดอยู่ในจีนัส Lyssavirus ทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบประสาท ที่มีอันตรายรุนแรงถึงเสียชีวิต เนื่องจากยังไม่มียาที่ใช้ในการรักษา โรคนี้สามารถติดต่อได้จากสัตว์สู่คน และสามารถป้องกันได้โดยการให้วัคซีนทั้งในคนและสัตว์ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิดสามารถติดเชื้อเป็นโรคได้ โดยพบว่าสุนัขและแมวเป็นสัตว์ที่นำโรคมาสู่คนได้บ่อยที่สุด[1] ปัจจุบันโรคนี้ยังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย แต่ละปีทั่วโลกมีผู้เสียชีวิตประมาณ 59,000 คน สาเหตุส่วนใหญ่ร้อยละ 99.0 ของการติดเชื้อในคนเกิดจากการถูกสุนัขบ้ากัด และร้อยละ 40.0 เป็นเด็กในประเทศแถบเอเชียและแอฟริกา[2,3] จากข้อมูลของประเทศไทยแต่ละปีคาดว่ามีผู้ถูกสุนัขกัดไม่ต่ำกว่า 1 ล้านคน[1] และมีรายงานผู้เสียชีวิตด้วยโรคพิษสุนัขบ้าระหว่างปี พ.ศ. 2558 ถึง 2562 จำนวน 5, 14, 11, 18 และ 3 คน ตามลำดับ ขณะที่รายงานสัตว์ติดเชื้อพิษสุนัขบ้าคิดเป็นร้อยละของตัวอย่างส่งตรวจแต่ละปีเท่ากับ 3.8, 6.9, 9.8, 15.3 และ 5.0 ตามลำดับและพบการติดเชื้อในสุนัข สูงสุด[4-8] องค์การอนามัยโลก (World Health Organization) องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties) องค์กรอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations) องค์กรรณรงค์ควบคุมโรคพิษสุนัขบ้า (Global Alliance for Rabies Control) ได้กำหนดเป้าหมายร่วมกันว่าภายในปี พ.ศ. 2573 ทั่วโลกต้องไม่มีผู้เสียชีวิตจากโรคพิษสุนัขบ้า “Zero human rabies deaths by 2030”[2,3]

ประเทศไทยได้ดำเนินโครงการสัตว์ปลอดโรค คนปลอดภัย จากโรคพิษสุนัขบ้า มีเป้าหมายกวาดล้างโรคพิษสุนัขบ้าให้หมดไปจากประเทศไทย และการควบคุมป้องกันการแพร่ระบาดของโรคในสัตว์โดยการให้วัคซีนเป็นกลยุทธ์หนึ่งภายใต้แผนยุทธศาสตร์การดำเนินโครงการที่มีความสำคัญ[9-11]

วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่ใช้สำหรับสัตว์ในประเทศไทยทั้งหมดเป็นวัคซีนนำเข้ามาจากต่างประเทศ การควบคุมกำกับคุณภาพวัคซีนให้มีมาตรฐานตามข้อกำหนดของแต่ละผลิตภัณฑ์เป็นเรื่องสำคัญ โดยเฉพาะการตรวจวิเคราะห์ด้านความแรง ซึ่งหมายถึงความสามารถในการป้องกันโรค วัคซีนที่มีค่าความแรงต่ำกว่าเกณฑ์ยอมรับจะไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ได้ และส่งผลให้เกิดการแพร่เชื้อโรคมาสู่คน วิธีมาตรฐานสากลที่ใช้วิเคราะห์ความแรงของวัคซีนคือวิธีทดสอบในสัตว์ทดลองที่เรียกว่า National Institutes of Health (NIH) test ซึ่งพัฒนาเริ่มต้นโดย National Institutes of Health สหรัฐอเมริกา และองค์การอนามัยโลกได้นำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสากลในการทดสอบความแรงของวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า[12] กำหนดเกณฑ์ยอมรับค่าความแรงต้องไม่ต่ำกว่า 1.0 IU ต่อโดส โดยองค์การอนามัยโลก[13] องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ[14] และตำรายายุโรป[15] ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีทางเลือกเพื่อนำมาใช้แทนวิธี NIH เช่น การตรวจหาปริมาณแอนติเจน-ไกลโคโปรตีนหรือการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกัน แต่การนำวิธีทางเลือกเหล่านี้มาใช้ยังมีข้อจำกัด จำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในแต่ละห้องปฏิบัติการเพื่อกำหนดเกณฑ์ยอมรับที่เหมาะสมของแต่ละผลิตภัณฑ์

จากข้อมูลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสถาบันชีววัตถุซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพวัคซีนภาครัฐของประเทศ ที่ทำการเก็บและตรวจตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ จากสถานบริการและคลินิกในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลปี พ.ศ. 2555 ถึง 2556 และในพื้นที่ภาคเหนือ 17 จังหวัด ปี พ.ศ. 2557 ถึง 2558 จำนวนรวมทั้งสิ้น 108 ตัวอย่าง พบว่า วัคซีนส่วนใหญ่ 107 ตัวอย่าง จาก 7 ทะเบียนตำรับยังคงมีความแรงผ่านเกณฑ์ขั้นต่ำ และพบตัวอย่าง 1 ตำรับที่มีค่าความแรงต่ำกว่าเกณฑ์[16,17] คือ DOG-VAC Rabia เลขทะเบียน 1F6/53(B)[18] ซึ่งได้ยกเลิกทะเบียนไปแล้วแสดงให้เห็นว่าวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่ใช้สำหรับสัตว์ในประเทศยังคงมีความเสี่ยงที่อาจมีความแรง

ต่ำกว่าเกณฑ์ป้องกันโรคได้ สำหรับการขนส่งและเก็บรักษาวัคซีนในห่วงโซ่ความเย็นตามสถานบริการต่าง ๆ ยังคงมีประสิทธิภาพ จึงไม่พบวัคซีนที่เก็บมาตรวจจากสถานที่เก็บต่างกันเสียสภาพความแรงไป จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ที่เน้นการตรวจความแรงเพิ่มเติมในตัวอย่างวัคซีนที่มีทะเบียนในประเทศระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง 2562 โดยตรวจวัคซีนตำรับที่ยังไม่เคยมีประวัติการตรวจวิเคราะห์ความแรงโดยห้องปฏิบัติการภาครัฐของประเทศมาก่อน และมีวัตถุประสงค์ 2 ข้อคือ 1) เพื่อตรวจประเมินความแรงของวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าสำหรับสัตว์ที่ใช้ในประเทศไทยด้วยวิธี NIH และ 2) เพื่อตรวจปริมาณไกลโคโปรตีนในวัคซีนซึ่งเป็นแอนติเจนสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งอาจใช้เป็นวิธีทางเลือกในการประเมินความแรงของวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า โดยไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง

วิธีการศึกษา

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: AR grade, NaCl, $Na_2HPO_4.10H_2O$, KH_2PO, NaOH, HCl, Normal horse serum (Gibco, Cat. No. 16050), Equine anti-rabies immunoglobulin (TRCS ERIG), Anti-rabies virus glycoprotein antibody (Lifespan Biosciences, Inc, Cat. No. LS-C75305), Donkey anti-mouse IgG secondary antibody (HRP) (Lifespan Biosciences, Inc, Cat. No. LS-C60841), Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, Cat. No. A2153), 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 34021), Tween-20, H_2SO_4, KCl, $NaHPO_4.12H_2O$, KH_2PO_4, Sucrose

สารมาตรฐาน: วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าอ้างอิงสำหรับใช้งาน (working reference preparation (WRP); IBP code RaV181215)) ที่สอบเทียบค่าความแรงกับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้ามาตรฐานสากล (WHO international standard the 6th international standard for rabies vaccine: NIBSC code 07/162) และเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้ามาตรฐาน สำหรับตรวจความแรง (Challenge virus standard (CVS) จากสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เครื่องมือและอุปกรณ์

ตู้ชีวนิรภัย เครื่องอ่านอิไลซ่าแบบไมโครเพลท เครื่องชั่งสารความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม กระบอกและเข็มฉีดยาสำหรับฉีดสัตว์ทดลอง ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -70 องศาเซลเซียส ปิเปตอัตโนมัติ เครื่องเขย่าผสมสารละลาย ตู้อบเพาะเชื้อ หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงปลอดเชื้อ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง และเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ

การเตรียมสาร

- Phosphate buffer saline, pH 7.20 (PBS): ละลาย NaCl 17.73 กรัม, $Na_2HPO_4.10H_2O$ 6.18 กรัม, KH_2PO 0.88 กรัม ด้วยน้ำบริสุทธิ์ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.20 ฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ
- Normal horse serum 2% (v/v) ในน้ำกลั่น
- Carbonate-bicarbonate buffer: ผสมสารละลาย 0.10 M sodium carbonate 80 มิลลิลิตร, 0.10 M sodium bicarbonate 170 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับ pH 9.60
- Blocking buffer: ละลาย sucrose 50.00 กรัม และ BSA 3.00 กรัม ใน carbonate-bicarbonate buffer 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 9.60 กรองด้วยแผ่นกรอง 0.22 ไมครอน
- Washing solution: ละลาย NaCl 0.80 กรัม, KCl 0.20 กรัม, $Na_2HPO_4.12H_2O$ 1.13 กรัม และ KH_2PO_4 0.2 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Tween-20 0.50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH 7.00
- Dilution buffer: ละลาย BSA 5.00 กรัม ใน washing solution 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.00

กรองด้วยแผ่นกรอง 0.22 ไมครอน

- Coating antibody: เจือจาง Equine anti-rabies immunoglobulin (TRCS ERIG) (ที่มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วย PBS ให้มีระดับความเจือจาง 1: 100
- Detection antibody: เจือจาง Mouse anti-rabies virus glycoprotein monoclonal antibody ด้วย dilution buffer ให้มีระดับความเจือจาง 1: 25,000
- Secondary antibody: เจือจาง Donkey anti-mouse antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase ด้วย dilution buffer ให้มีระดับความเจือจาง 1:75,000
- Substrate: TMB substrate kit

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าสำหรับสัตว์ ที่มีทะเบียนในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง 2562 ตัวอย่างที่ส่งตรวจความแรงในสัตว์ทดลองเป็นตัวอย่างของทะเบียนตำรับที่ยังไม่เคยมีประวัติการตรวจความแรงจากสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 8 ตำรับ 13 รุ่นการผลิต รุ่นการผลิตละ 30 ขวด จากผู้ผลิต 3 บริษัท และผู้รับอนุญาตนำเข้า 3 ราย และตัวอย่างที่ส่งตรวจปริมาณไกลโคโปรตีนเป็นตัวอย่างของวัคซีนที่มีทะเบียนและนำเข้ามาใช้ในประเทศในช่วงทำการศึกษา จำนวน 12 ตำรับ 29 รุ่นการผลิต รุ่นการผลิตละ 3-10 ขวด จากผู้ผลิต 5 บริษัท และผู้รับอนุญาตนำเข้า 6 ราย โดยเจ้าหน้าที่กลุ่มกำกับดูแลหลังออกสู่ตลาด สำนักยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ติดต่อประสานงานบริษัทนำเข้าวัคซีนให้จัดส่งตัวอย่างวัคซีนที่เก็บรักษาสภาวะอุณหภูมิภายใต้ห่วงโซ่ความเย็นให้กับสถาบันชีววัตถุโดยตรง ตัวอย่างที่ส่งตรวจครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจของบริษัทผู้รับอนุญาตนำเข้า

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักร สายพันธุ์ ICR (Imprinting Control Region) เพศเดียวกัน สุขภาพดี น้ำหนักระหว่าง 13-16 กรัม แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม

- กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนมาตรฐานที่เจือจางแล้ว 4 ระดับ ระดับความเจือจางละ 16 ตัว รวมจำนวนทั้งสิ้น 64 ตัว
- กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 4 ระดับ ระดับความเจือจางละ 16 ตัว จำนวนทั้งสิ้น 64 ตัว
- กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุมความแรงของ CVS จำนวน 40 ตัว

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัยโดยคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขโครงการ 61-031

การตรวจวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนโดยวิธี NIH[12,19]

เจือจางวัคซีนมาตรฐาน (WRP) และวัคซีนตัวอย่างด้วย PBS ให้มีความเจือจาง 4 ระดับ นำไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรโดยฉีดเข้าช่องท้องตัวละ 0.50 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 16 ตัว และฉีดกระตุ้นวัคซีนครั้งที่สองห่างจากครั้งแรก 7 วัน หลังจากนั้น 7 วันจึงฉีดเชื้อไวรัส CVS ที่เจือจางด้วย 2% (v/v) Normal horse serum ให้มีค่าเท่ากับ 25 เท่าของ LD_{50} (50% Lethal dose) ต่อปริมาตร 0.03 มิลลิลิตร เข้าสมอง (intra-cerebral) ตัวละ 0.03 มิลลิลิตร และฉีด CVS ที่เจือจาง 4 ระดับให้กับหนูกลุ่มควบคุมที่ระดับเจือจางละ 10 ตัวเพื่อนำไปไทเทรต CVS ที่ใช้ในกลุ่มควบคุม สังเกตอาการของหนูหลังจากฉีดเชื้อ CVS ต่ออีก 14 วัน และนับจำนวนหนูที่รอดชีวิต นำมาคำนวณความแรงโดยเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของวัคซีนที่ทำให้หนูไม่เป็นโรคร้อยละ 50.0 (50.0% Effective dose, ED_{50}) ของหนูกลุ่มที่ได้รับวัคซีนตัวอย่างกับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมาตรฐาน โดยเริ่มนับหนูจำนวนเริ่มต้นในวันที่ 5 หลังจากฉีดเชื้อ CVS และนับจำนวนหนูที่รอดชีวิตโดยไม่แสดงอาการป่วยและตายในวันที่ 14 หลังจากฉีดเชื้อ CVS คำนวณค่าความแรงโดยใช้โปรแกรมสถิติ Probit analysis[20]

การตรวจปริมาณไกลโคโปรตีนในวัคซีนโดยวิธี Sandwich ELISA[21]

เคลือบเพลท 96 หลุม ด้วย coating antibody หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วเก็บต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน เทสารละลายออกจากเพลท แล้วเติม blocking buffer หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย washing solution หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง เติมวัคซีนมาตรฐาน (WRP) และวัคซีนตัวอย่างที่เจือจางด้วย dilution buffer ความเจือจางต่าง ๆ หลุมละ 200 ไมโครลิตร และเติม dilution buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในหลุมควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 90 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วย washing solution 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 5 ครั้ง ใส่ detection antibody หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 90 นาที ล้างเพลทด้วย washing solution 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 5 ครั้ง แล้วจึงเติม secondary antibody หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที ล้างเพลทด้วย washing solution 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 6 ครั้ง แล้วจึงเติม substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องทึบแสง 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ หลุมละ 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณไกลโคโปรตีนด้วยโปรแกรม Parallel line[22]

ผลการศึกษา

ตัวอย่างวัคซีนที่ส่งตรวจจำแนกตามทะเบียนตำรับประกอบด้วยวัคซีนที่ตรวจความแรงโดยวิธี NIH จำนวน 8 ตำรับ รวม 13 รุ่นการผลิต ซึ่งเป็นตำรับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเดี่ยว 1 ตำรับ และเป็นตำรับวัคซีนรวมโรค 7 ตำรับ สำหรับวัคซีนที่ตรวจปริมาณไกลโคโปรตีนโดยวิธี Sandwich ELISA มีจำนวน 12 ตำรับ รวม 29 รุ่นการผลิต เป็นทะเบียนตำรับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเดี่ยว 5 ตำรับ และเป็นทะเบียนตำรับวัคซีนรวมโรค 7 ตำรับ โดยวัคซีนรวมโรคมีส่วนประกอบของแอนติเจนเชื้อรวมกันตั้งแต่ 3 ชนิดจนถึง 9 ชนิด

ผลวิเคราะห์ค่าความแรงโดยวิธี NIH พบวัคซีนมีค่าความแรงต่ำสุดคือ 1.09 IU ต่อโดส (1 มิลลิลิตร) และค่าสูงสุดคือ 17.12 IU ต่อโดส โดยมีวัคซีน 2 รุ่นการผลิตจาก 2 ทะเบียนตำรับ คือ A1 และ C1 ที่ผลไม่สามารถรายงานได้เนื่องจากผลการทดสอบไม่อยู่ในเกณฑ์ควบคุม ถือเป็น invalid test และพบวัคซีน 2 ตำรับคือ G และ H ที่มีค่าความแรงต่ำกว่า 2 IU ต่อโดส ทุกรุ่นการผลิตรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

ผลตรวจวิเคราะห์ปริมาณไกลโคโปรตีนโดยวิธี Sandwich ELISA ในวัคซีน 12 ตำรับ จำนวน 29 รุ่นการผลิต พบว่า มีปริมาณไกลโคโปรตีนแตกต่างกันระหว่างตำรับ โดยมีช่วงค่าอยู่ระหว่าง 1.14 ถึง 10.33 IU ต่อโดส โดยวัคซีนทะเบียนตำรับ F มีปริมาณไกลโคโปรตีนสูงทั้ง 2 รุ่นการผลิต ตัวอย่างวัคซีนที่มาจากทะเบียนตำรับเดียวกันมีปริมาณไกลโคโปรตีนที่ใกล้เคียงกัน รายละเอียดแสดงในตารางที่ 2

ผลการศึกษาความแรงของวัคซีนตัวอย่างรุ่นการผลิตเดียวกันที่ตรวจโดยวิธี NIH และปริมาณไกลโคโปรตีนที่ตรวจโดยวิธี Sandwich ELISA จำนวน 11 รุ่นการผลิต

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนป้องกันพิษสุนัขบ้าที่ใช้สำหรับสัตว์ด้วยวิธี NIH จำนวน 8 ทะเบียนตำรับ (13 รุ่นการผลิต)

ทะเบียนตำรับ	รุ่นการผลิต (ค่าความแรง IU ต่อโดส)
A	A1 (invalid)
B	B1(5.09)
C	C1 (invalid)
D	D1 (1.37), D2 (2.44)
E	E1(1.76), E2 (3.89)
F	F1(17.12), F2 (11.82)
G	G1(1.25), G2 (1.30)
H	H1(1.69), H2 (1.09)

ตารางที่ 2 ปริมาณไกลโคโปรตีนในวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่ใช้สำหรับสัตว์ ตรวจโดยวิธี Sandwich ELISA จำนวน 12 ทะเบียนตำรับ (29 รุ่นการผลิต)

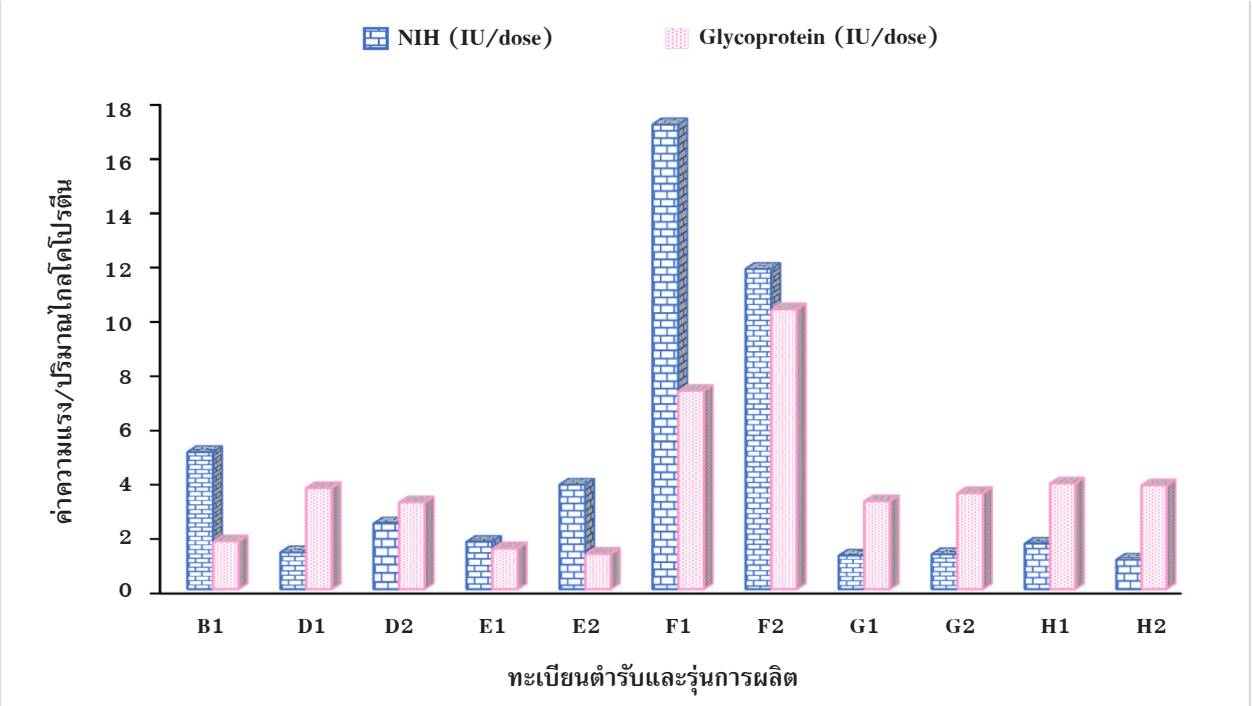
ทะเบียนตำรับ	รุ่นการผลิต (ปริมาณไกลโคโปรตีน IU ต่อโดส)
A	A1 (2.64), A2 (3.53)
B	B1 (1.78), B2 (1.14), B3 (1.56)
C	C1 (2.53)
D	D1 (3.76), D2 (3.23)
E	E1 (1.52), E2 (1.31)
F	F1 (7.34), F2 (10.33)
G	G1 (3.27), G2 (3.57)
H	H1 (3.93), H2 (3.86)
J	J1 (5.08), J2 (5.31), J3 (5.00), J4 (5.81)
K	K1 (4.34), K2 (4.74), K3 (5.88), K4 (5.61)
L	L1 (4.83), L2 (7.66), L3 (8.95)
N	N1 (3.69), N2 (2.41)

แสดงให้เห็นแนวโน้มค่าความแรงโดยรวมของวัคซีนเมื่อตรวจโดยวิธีทั้งสองมีทิศทางไปในทางเดียวกัน ตามภาพที่ 1

วิจารณ์

ผลการตรวจตัวอย่างด้วยวิธี NIH แสดงให้เห็นว่าวัคซีน 6 ทะเบียนตำรับที่ตรวจและอ่านผลได้มีค่าความแรงมากกว่า 1 IU ต่อโดส ซึ่งผ่านเกณฑ์ขั้นต่ำขององค์การอนามัยโลก องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ และตำรายาของยุโรป โดยวัคซีนตัวอย่างรุ่นการผลิตที่มาจากทะเบียนตำรับเดียวกันค่าความแรงที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน และทะเบียนตำรับที่มีค่าความแรงสูงแตกต่างอย่างชัดเจน คือทะเบียนตำรับ F ที่มีค่าความแรงทั้งสองรุ่นการผลิตมากกว่า 10 IU ต่อโดส ขณะที่วัคซีนส่วนใหญ่มีค่าต่ำกว่า 3 IU ต่อโดส โดยเฉพาะวัคซีน 2 ทะเบียนตำรับคือ G และ H มีค่าความแรงค่อนข้างต่ำน้อยกว่า 2 IU ต่อโดส ทุกรุ่นการผลิต แสดงถึงความแตกต่างของระดับความแรง

ภาพที่ 1 ค่าความแรง และปริมาณไกลโคโปรตีนของวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่ใช้สำหรับสัตว์ จำนวน 6 ทะเบียนตำรับ (11 รุ่นการผลิต)



ในวัคซีนแต่ละทะเบียนตำรับ จากข้อมูลในทะเบียนตำรับมีการระบุค่าความแรงของวัคซีนแต่ละตำรับไว้แตกต่างกันตั้งแต่ไม่ต่ำกว่า 1 IU ต่อโดส จนถึงไม่ต่ำกว่า 3 IU ต่อโดส ในการศึกษานี้มีตัวอย่าง 2 ทะเบียนตำรับ คือ A และ C ที่ไม่สามารถรายงานผลได้เนื่องจากค่าของการทดสอบไม่อยู่ในเกณฑ์ควบคุมจึงถือว่าเป็น invalid test เนื่องจากการตรวจความแรงโดยวิธี NIH มีค่าใช้จ่ายสูงประมาณ 1 แสนบาทต่อตัวอย่าง และใช้เวลานานประมาณ 1 เดือนจึงจะทราบผล จึงวางแผนตรวจเพียง 2 รุ่นการผลิตต่อทะเบียนตำรับ เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นและไม่มีการตรวจซ้ำ ทั้งนี้ธรรมชาติของการวิเคราะห์ที่ใช้สัตว์ทดลอง ผลที่ได้จะมีความเบี่ยงเบนค่อนข้างสูง

จากผลการศึกษาครั้งนี้ร่วมกับผลการศึกษาของสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เมื่อปี พ.ศ. 2555 - 2558[16,17] ทำให้วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าสำหรับสัตว์ที่ใช้ในประเทศ มีการตรวจวิเคราะห์ความแรงด้วยวิธี NIH ไปแล้วจำนวน 13 ทะเบียนตำรับ และมีวัคซีนอีกอย่างน้อย 2 ทะเบียนตำรับที่มีทะเบียนใช้ในประเทศยังไม่มีประวัติตรวจความแรงจากห้องปฏิบัติการภาครัฐ ผลการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าวัคซีนยังมีความเสี่ยงที่จะตกมาตรฐานความแรงได้ โดยเฉพาะวัคซีนตำรับที่มีค่าความแรงต่ำหากต้องเก็บไว้ใช้เป็นเวลานาน ขณะที่ข้อมูลการรายงานวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าตกมาตรฐานสู่สาธารณะนั้นมีค่อนข้างจำกัด แต่ก็มีข้อมูลบางประเทศที่รายงานวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่ใช้กับสัตว์[23,24] และวัคซีนที่ใช้กับคน[25-27] มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน จึงมีข้อแนะนำว่าควรพิจารณาตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเพิ่มเติมให้ครบทุกทะเบียนตำรับที่ใช้ในประเทศ รวมถึงการตรวจความแรงในวัคซีนที่จะนำมาขึ้นทะเบียนใหม่ และควรมีการตรวจติดตามต่อในวัคซีนตำรับที่มีค่าความแรงต่ำใกล้ค่าเกณฑ์ยอมรับ และควรพิจารณาใช้เกณฑ์ตัดสินความแรงตามข้อกำหนดจำเพาะของวัคซีนแต่ละตำรับที่ได้ขึ้นทะเบียนไว้ เชิงระบบอาจมีการกำหนดให้ตรวจวิเคราะห์คุณภาพความแรงของวัคซีนประกอบการขึ้นทะเบียน กำหนดความถี่ของการตรวจวิเคราะห์ความแรงของตัวอย่างประกอบการรับรองรุ่นการผลิต ร่วมกับการวางแผนการตรวจติดตามความแรงหลังการจำหน่าย เพื่อสร้างความมั่นใจในคุณภาพของวัคซีน และลดการส่งตรวจตัวอย่างซ้ำซ้อนจากผู้จัดซื้อ

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไกลโคโปรตีนในวัคซีนพิษสุนัขบ้ามีการศึกษาจำนวนมาก[28-34] เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือกในการทดสอบความแรงแทนวิธี NIH ตามหลักปฏิบัติสากลในการเลิก ลด และการบรรเทาความทรมานของสัตว์ทดลอง 3Rs (replacement, reduction and refinement)[35] การตรวจวิเคราะห์มีสารมาตรฐานสากลที่ประกาศค่าไกลโคโปรตีนสำหรับใช้เป็นค่าอ้างอิง[36] ปัจจุบันผู้ผลิตบางรายได้ตรวจปริมาณไกลโคโปรตีนในสารตัวกลางที่ได้จากกระบวนการผลิตเพื่อใช้เตรียมวัคซีนสำเร็จรูป ซึ่งปริมาณไกลโคโปรตีนมีความสัมพันธ์กับค่าความแรงของวัคซีนในแต่ละผู้ผลิต เป็นวิธีที่ทำได้เร็วไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง ประหยัดค่าใช้จ่าย และมีความเบี่ยงเบนของผลต่ำกว่าวิธีทดสอบที่ใช้สัตว์ทดลอง คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำมาเป็นวิธีทางเลือกในการตรวจความแรงของวัคซีนป้องกันพิษสุนัขบ้าเพื่อการควบคุมคุณภาพ แต่เนื่องจากไม่สามารถกำหนดค่าปริมาณไกลโคโปรตีนในวัคซีนที่เป็นค่ากลางมาตรฐานได้ เพราะแต่ละสูตรตำรับวัคซีนมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน จึงต้องทำการศึกษาและกำหนดค่าเกณฑ์ยอมรับเฉพาะของวัคซีนแต่ละยี่ห้อ โดยทดสอบกับตัวอย่างหลายรุ่นการผลิตในแต่ละตำรับ ผลวิเคราะห์ปริมาณไกลโคโปรตีนโดยวิธี ELISA ในวัคซีนจำนวนทั้งสิ้น 29 รุ่นการผลิตจากวัคซีน 12 ทะเบียนตำรับ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างวัคซีนที่มาจากทะเบียนตำรับเดียวกันมีปริมาณไกลโคโปรตีนใกล้เคียงกัน และค่ามีความแตกต่างกันระหว่างตำรับโดยมีช่วงค่าอยู่ระหว่าง 1.14 -10.33 IU ต่อโดส ทั้งนี้วัคซีนตำรับเดียวกันค่าความแรงและปริมาณไกลโคโปรตีนแสดงค่าใกล้เคียงกันระหว่างรุ่นการผลิต ค่าความแรงเมื่อตรวจด้วยวิธี NIH และปริมาณไกลโคโปรตีนในวัคซีนโดยรวมมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน โดยเฉพาะเมื่อค่าความแรงสูงขึ้นปริมาณไกลโคโปรตีนก็สูงขึ้นชัดเจน แนวโน้ม

ระหว่างรุ่นการผลิตที่มาจากทะเบียนตำรับเดียวกันยังไม่สามารถสรุปได้เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างน้อยเพียงสองรุ่นการผลิต ขณะที่ข้อมูลผลทดสอบไกลโคโปรตีนของแต่ละทะเบียนตำรับยังน้อยเกินไปที่จะกำหนดค่าเกณฑ์การยอมของปริมาณไกลโคโปรตีนในแต่ละทะเบียนตำรับ จึงยังต้องมีการตรวจตัวอย่างเพิ่มเติมให้ได้จำนวนที่เพียงพอก่อนนำมาใช้ทดสอบตัดสินผลและวางแผนการดำเนินการต่อไปได้ ในเบื้องต้นอาจใช้เป็นวิธีการตรวจสอบความแรงของวัคซีนที่ต้องทดสอบก่อนปล่อยผ่านวัคซีนกรณีมีความจำเป็นเร่งด่วนเพื่อช่วยลดระยะเวลา และหากมีข้อสงสัยจึงตรวจตัดสินด้วยวิธี NIH ต่อไป

สรุป

วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่ใช้สำหรับสัตว์ในประเทศไทย ได้ผ่านการตรวจยืนยันคุณภาพความแรงด้วยวิธีมาตรฐาน NIH จากห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพภาครัฐเพิ่มเติมในการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 6 ทะเบียนตำรับ มีผลค่าความแรงมากกว่า 1 IU ต่อโดส ถือว่าผ่านเกณฑ์ยอมรับขั้นต่ำของสากล อย่างไรก็ตามควรตรวจเพิ่มเติมในวัคซีนทะเบียนตำรับที่ยังไม่เคยมีการตรวจความแรงโดยห้องปฏิบัติการภาครัฐของประเทศ และควรตรวจติดตามวัคซีนทะเบียนตำรับที่ได้ค่าความแรงต่ำกว่า 2 IU ต่อโดส และควรพิจารณาเกณฑ์การตัดสินโดยใช้ข้อกำหนดเฉพาะของแต่ละตำรับแทนเกณฑ์ข้อกำหนดขั้นต่ำ สำหรับการตรวจปริมาณไกลโคโปรตีนในวัคซีนยังต้องมีการตรวจตัวอย่างเพิ่มในแต่ละทะเบียนตำรับเพื่อนำมากำหนดค่าเกณฑ์ยอมรับที่เหมาะสมของแต่ละทะเบียนตำรับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวัคซีนแห่งชาติที่สนับสนุนงบดำเนินงานในโครงการนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เจ้าหน้าที่ของกองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และเจ้าหน้าที่ของบริษัทนำเข้าวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่มีส่วนเกี่ยวข้องในโครงการนี้ทุกท่าน ที่มีส่วนทำให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วง

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค. คู่มือโรคพิษสุนัขบ้าและลดความเสี่ยงจากการถูกสุนัขกัด [อินเทอร์เน็ต]. 2554 [สืบค้นเมื่อ 22 เม.ย. 2563]. แหล่งข้อมูล: http://r36.ddc.moph.go.th/r36/uploads/document/51fffc9e410c4.pdf
2. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization. Zero by 30: the global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030 [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 17]. Available from: https://www.who.int/rabies/resources/9789241513838/en/
3. World Health Organization. Rabies [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 17]. Available from: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/rabies
4. ทีม SAT สคร.7 ขอนแก่น. Situation awareness team weekly report: situation of rabies in region 7 ประจำสัปดาห์ที่ 5 (วันที่ 4-10 กุมภาพันธ์2561) [อินเทอร์เน็ต]. 2561 [สืบค้นเมื่อ 22 เม.ย. 2563]. แหล่งข้อมูล: http://odpc7.ddc.moph.go.th/upload_files/20180703140707.pdf
5. มติชนออนไลน์. ชีวิตคุณภาพ. ยอดป่วย-ตายจาก 'พิษสุนัขบ้า' ลด สธ.- กรมปศุสัตว์จับมือเครือข่ายรณรงค์ป้องกันต่อเนื่อง [อินเทอร์เน็ต]. 2562 [สืบค้นเมื่อ 22 เม.ย. 2563]. แหล่งข้อมูล: https://www.matichon.co.th/local/quality-life/news_1677552
6. กรมควบคุมโรค. กองโรคติดต่อทั่วไป, สำนักสื่อสารความเสี่ยง กรมควบคุมโรค สธ. ร่วมกับเครือข่าย แถลงข่าวการรณรงค์เนื่องในวันป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าโลก ประจำปี 2562 [อินเทอร์เน็ต]. 2562 [สืบค้นเมื่อ 22 เม.ย. 2563]. แหล่งข้อมูล: https://gnews.apps.go.th/news?news=47481
7. มติชนออนไลน์. ชีวิตคุณภาพ. พิษสุนัขบ้า คร่าอีก 1 ราย ที่ จ.บุรีรัมย์ กรมควบคุมโรคแนะ ปชช. ยึด "คาถา 5 ย." ลดความเสี่ยง [อินเทอร์เน็ต]. 2562 [สืบค้นเมื่อ 22 เม.ย.

2563]. แหล่งข้อมูล: https://www.matichon.co.th/local/quality-life/news_1715985

8. สำนักข่าวไทย. เศรษฐกิจ. เกษตรฯ Kick off รณรงค์ฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า [อินเทอร์เน็ต]. 2563 [สืบค้นเมื่อ 26 พ.ค. 2563]. แหล่งข้อมูล: https://tna.mcot.net/tna-399129
9. สำนักนายกรัฐมนตรี. คำสั่งสำนักนายกรัฐมนตรี ที่ 214/2559 เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการขับเคลื่อนการดำเนินโครงการสัตว์ปลอดโรค คนปลอดภัยจากโรคพิษสุนัขบ้า ตามพระปณิธานศาสตราจารย์ ดร.สมเด็จพระเจ้าลูกเธอ เจ้าฟ้าจุฬาภรณวลัยลักษณ์ อัครราชกุมารี [อินเทอร์เน็ต]. 2559 [สืบค้นเมื่อ 26 พ.ค. 2563]. แหล่งข้อมูล: http://r36.ddc.moph.go.th/r36/uploads/document/590f50eb8b7f7.pdf
10. สำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์. แผนยุทธศาสตร์การดำเนิน โครงการสัตว์ปลอดโรค คนปลอดภัย จากโรคพิษสุนัขบ้า ตามพระปณิธานศาสตราจารย์ ดร.สมเด็จพระเจ้าลูกเธอ เจ้าฟ้าจุฬาภรณวลัยลักษณ์ อัครราชกุมารี ปี 2560-2563 [อินเทอร์เน็ต]. 2560 [สืบค้นเมื่อ 26 พ.ค. 2563]. แหล่งข้อมูล: http://dcontrol.dld.go.th/dcontrol/index.php/rabies/973-2017-03-10-07-14-47
11. อรพิรุฬห์ สการะเศรณี. สถานการณ์โรคพิษสุนัขบ้าในคนและสัตว์ประเทศไทย ปีพ.ศ. 2558. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ [อินเทอร์เน็ต]. 2559 [สืบค้นเมื่อ 22 เม.ย. 2563]. แหล่งข้อมูล: https://wesr.boe.moph.go.th/wesr_new/file/y59/F59161_1516.pdf
12. Wilbur LA, Aubert MFA. The NIH test for potency. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H., editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 360-8.
13. World Health Organization. WHO expert committee on rabies, eight report. WHO Technical Report Series 1992; 824:14.
14. World Organisation for Animal Health. Chapter 3.1.17. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses: OIE terrestrial manual 2018 [Internet]. 2019 [cited 2020 May 8]. Available from: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf
15. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare of the Council of Europe. Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. In: European pharmacopoeia, Vol. 1. 10th ed. NÖrdlingen: Druckerei CH Beck; 2019.
16. กรพงศ์ ภิญโญสุขี, อัฉริยา ทรงธนนิตย์, ชัญญภรณ์ ประสาทพรชัย, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, ธีรนารถ จิวะไพศาลพงศ์. การศึกษาเบื้องต้นด้านประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าสำหรับสัตว์ที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล. ใน: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 22 ประจำปีงบประมาณ 2557; 30 มิ.ย.-2 ก.ค. 2557; โรงแรมมิราเคิล แกรนด์คอนเวนชั่น, กรุงเทพมหานคร. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2557. p. 184.
17. กรพงศ์ ภิญโญสุขี, อัฉริยา ทรงธนนิตย์, อัศจรรย์ อาเมน, อภิชัย ศุภสาสาทร, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, ธีรนารถ จิวะไพศาลพงศ์. ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าสำหรับสัตว์ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย ระหว่างปี 2557-2558. ใน: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 24 ประจำปีงบประมาณ 2559; วันที่ 21-23 มี.ค. 2559; อิมแพคฟอรั่ม เมืองทองธานี, นนทบุรี; กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2559. p. 123.
18. ไทยโพสต์. อย. ยันตรวจซ้ำวัคซีนพิษสุนัขบ้านำเข้าทุกล็อตที่ตกมาตรฐานเจอปี 59 ทำลายทิ้งไปแล้ว [อินเทอร์เน็ต]. 2561 [สืบค้นเมื่อ 26 พ.ค. 2563]. แหล่งข้อมูล: https://www.thaipost.net/main/detail/8560
19. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การตรวจสอบเอกลักษณ์ ความแรงและความคงตัวของวัคซีนพิษสุนัขบ้า. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาลิน ไตรศิริ-

วาณิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จตุรกิตตินันท์, และคณะ, บรรณาธิการ. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: Full Forse; 2558. หน้า 20-6.

20. Statsdirect.com. Probit analysis [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 8]. Available from: https://www.statsdirect.com/help/regression_and_correlation/probit_analysis.htm
21. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การตรวจสอบเอกลักษณ์และปริมาณไกลโคโปรตีนของวัคซีนพิษสุนัขบ้าโดยวิธีอิไลซา. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, อภิชัย ศุภสารสาทร, และคณะ, บรรณาธิการ. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 2. กรุงเทพมหานคร: Full Forse; 2558. หน้า 18-21.
22. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare of the Council of Europe. The parallel-line model. European Pharmacopoeia Vol. 1. 10th ed. Nördlingen: Druckerei CH Beck; 2020. p. 687-90.
23. Hu RL, Fooks AR, Zhang SF, Liu Y, Zhang F. Inferior rabies vaccine quality and low immunization coverage in dogs (*Canis familiaris*) in China. Epidemiol Infect 2008; 136:1556-63.
24. Rooijakkers EJM, Nieuwenhuijs JHM, Vermeulen AA, Steenis GV, Osterhaus ADME. Potency of veterinary rabies vaccines in the Netherlands: a case for continued vigilance. Vet Q 1996;18:146-50.
25. Editorial. Vaccine scandal and confidence crisis in China. Lancet 2018;392(10145):360.
26. Asianews. Substandard anti-rabies vaccines sold by a Changchun-based company [Internet]. 2018 [cited 2021 Jun 8]. Available from: http://www.asianews.it/news-en/Substandard-anti-rabies-vaccines-sold-by-a-Changchun-based-company-44450.html
27. Emma T, Ashley CB, Hervé B, Florence C, Hildegund E, Christine Fehlner-Gardiner F. Avoiding preventable deaths: the scourge of counterfeit rabies vaccines. Vaccine 2019;37:2285-7.
28. Jungback C, editor. Potency testing of veterinary vaccines for animals: The way from in vivo to in vitro. Proceeding of International Scientific Workshop; 2010 Dec 1-3; Langen, Germany. Basel: Karger; 2012.
29. Chabaud-Riou M, Moreno N, Guinchard F, Nicolai MC, Niogret-Siohan E, Seve N, et al. G-protien based ELISA as a potency test for rabies vaccines. Biologicals 2017;46:124-9.
30. Jallet C, Tordo N. *In vitro* ELISA test to evaluate rabies vaccine potency. J Vis Exp [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 15];2020:159. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32449742/
31. Gibert R, Alberti M, Poirier B, Jallet C, Tordo N, Morgeaux S. A relevant in vitro ELISA test in alternative to the in vivo NIH test for human rabies vaccine batch release. Vaccine 2013;31:6022-9.
32. Morgeaux S, Poirier B, Ragan CI, Wilkinson D, Arabin U, Guinet-Morlot F, et al. Replacement of in vivo human rabies vaccine potency testing by in vitro glycoprotein quantification using ELISA-results of an international collaborative study. Vaccine 2017;35:966-71.
33. Piza AT, Pieri KMS, Lusa GM, Caporale GMM, Terreran MT, Machado LA, et al. Effect of the contents and form of rabies glycoprotein on the potency of rabies vaccination in cattle. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:265-8.
34. Rooijakkers EJM, Uittenbogaard JP, Groen J, Osterhaus ADME. Rabies vaccine potency control: comparison of ELISA systems for antigenicity testing. J Virol Methods 1996;58:111-9.
35. National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of animals in research. The 3Rs [Internet]. [cited

2021 Jun 8]. Available from: https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs

36. National Institute for Biological Standards and Control. WHO International standard 7th international standard for rabies vaccine NIBSC code: 16/204 [internet]. 2018 [cited 2021 Jun 8]. Available from: https://www.nibsc.org/documents/ifu/16-204.pdf

Abstract: Quality Assessment of Veterinary Rabies Vaccines' Potency Used in Thailand

Wereyarmarst Jaroenkunathum, M.Sc. (Biochemistry)*; Koraphong Pinyosukee, D.V.M.*; Atchariya Songthananit, B.Sc. (Applied Biology)*; Yuthika Khaomeechue, B.Sc. (Applied Biology)*; Chonlada Petthai, B.Sc. (Microbiology)*; Supaporn Chumpol, Ph.D. (Microbiology)*; Sirichat Chuenjai, B.Pharm.; Sombat Hirunsupachote, B.Pharm.**; Supaporn Phumiamorn, Ph.D (Virology)***

**Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand*

***Medicines Regulation Division, Food and Drug Administration, Ministry of Public Health, Thailand*

Journal of Health Science 2022;31(1):172-82.

Some veterinary rabies vaccines used in Thailand had been found substandard potency. The objective of this study was to assess the potency of veterinary rabies vaccines used in country during 2017-2019 by the standard method National Institutes of Health (NIH) test which is the *in-vivo* assay, and also to determine the antigen content by *in-vitro* assay. The potency of samples, which were collected from voluntary companies, had never been determined by the local national control laboratory. NIH assay, mice were immunized with rabies vaccine and subsequently challenged with rabies virus into the brain. The results were calculated and compared with international reference vaccine. Glycoprotein content was determined by Sandwich ELISA. The results showed that the potency from NIH assay of 11 vaccine lots from 6 registration dossiers had a range of 1.09-17.12 IU/dose. All sample lots met the minimum acceptance criteria recommended by the World Health Organization, Office International des Epizooties and European pharmacopeia which must be not less than 1.0 IU/dose. There were 2 lots which had invalid results. The glycoprotein content was determined in 29 vaccine lots from 12 registration dossiers, the results revealed that glycoprotein content had a range of 1.14-10.33 IU/dose for which there was no international specification. The result of both NIH and glycoprotein assays showed the same trend; and the vaccines from the same dossiers had similar potency values whereas the difference dossiers had different but similar values. In summary, all rabies vaccine lots met the minimum acceptance criteria. However, the potency assay should be performed on vaccines which have never been tested and should continue to monitor the potency of vaccines which are close to the minimum acceptance criteria. In addition, the determination of glycoprotein content of each vaccine should be continued to obtain enough results for criterion establishment of vaccine quality monitoring.

Keywords: rabies vaccine; potency; glycoprotein; NIH test