วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 28 ฉบับที่ 2 มีนาคม - เมษายน 2562

Journal of Health Science
Vol. 28 No. 2, March - April 2019

นิพนธ์ต้นฉบับ ***Original article***

การศึกษาความถูกต้องของวิธีการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีที่ผลิตในประเทศไทย

สุกัลยาณี ไชยมี วท.บ., วท.ม.
สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์ วท.บ., วท.ม., วท.ด.
ฐิติพร สมสอาด วท.บ.
สุภาพร ภูมิอมร วท.บ., วท.ม., วท.ด.
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วันรับ: 22 พ.ค. 2560
วันแก้ไข: 17 เม.ย. 2561
วันตอบรับ: 30 เม.ย. 2561

บทคัดย่อ การวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีในงานควบคุมคุณภาพ มีวิธีมาตรฐานที่กำหนดไว้โดยองค์การอนามัยโลก คือวิธีการเพาะเชื้อ แล้วคำนวณหาปริมาณเชื้อในหน่วย colony forming unit ต่อโด๊ส วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ใช้ระยะเวลาในการทดสอบนาน เนื่องจากเชื้อ mycobacteria มีการเจริญช้า ทำให้ต้องใช้เวลาในการทดสอบนานถึง 4 สัปดาห์ และผลการทดสอบยังมีความแปรปรวนสูง การศึกษานี้จึงมีแนวคิดจะนำวิธีทางเลือกคือการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์ ซึ่งใช้เวลาวิเคราะห์ผลเพียง 2 วันเท่านั้น เพื่อยืนยันว่าวิธีทางเลือกเหมาะสมที่จะนำมาใช้แทนวิธีเดิม จึงจำเป็นต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยทำการศึกษาในพารามิเตอร์ที่สำคัญได้แก่ ความแม่น ความเที่ยงทั้งการทดสอบซ้ำในวันเดียวกันและต่างวันกัน รวมถึง ความคงทนของวิธี ผลการศึกษาพบว่า วิธีทางเลือกนี้มีความแม่นที่ดี โดยมีค่าการคืนกลับที่ 91.73% มีความเที่ยงที่ดีจากการทำซ้ำในวันเดียวกันและในวันและเวลาที่ต่างกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยว่า 20.00% ส่วนความคงทนซึ่งทดสอบโดยผู้ปฏิบัติ 2 คน ไม่มีความแตกต่างของผลการทดสอบทางสถิติ ($p>0.05$) และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่า 10.00% นอกจากนี้พบว่ามีความสัมพันธ์สูงระหว่างวิธีการวัดปริมาณ ATP ภายในเซลล์กับวิธีการเพาะเชื้อ สรุปได้ว่าวิธีการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์ เป็นวิธีที่เร็ว ไว ประหยัดเวลา และเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือ เหมาะสำหรับนำมาใช้ในการวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนบีซีจี และสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมรุ่นการผลิตวัคซีนบีซีจีในประเทศไทย

***คำสำคัญ*: วัคซีนบีซีจี, วิธีทางเลือก, วิธีการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์**

บทนำ

วัคซีนป้องกันโรควัณโรค หรือวัคซีนบีซีจี ที่มีการใช้งานในประเทศไทย เป็นวัคซีนเชื้อเป็นที่ผลิตจาก *Mycobacterium bovis* สายพันธุ์ Tokyo-1 ซึ่งถูกทำให้อ่อนฤทธิ์ โดยเชื้อแบคทีเรียนี้สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ วัคซีนนี้ถูกบรรจุเข้าในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคในเด็กตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520[1] การรับรองรุ่นการผลิตนอกจากจะพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิตแล้ว จะต้องดำเนินการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการควบคู่ไปด้วย ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันการวิเคราะห์ค่าความแรง

ของวัคซีนบีซีจีที่กำหนดไว้โดยองค์การอนามัยโลกและที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม แล้วคำนวณหาปริมาณเชื้อมีชีวิตในวัคซีน[2-4] ซึ่งวิธีนี้ต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนมากและมีการเตรียมที่ยุ่งยากซับซ้อน ไม่เหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป และเนื่องจากเชื้อ mycobacteria เป็นแบคทีเรียที่มีการเจริญช้า การเกิดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลานานประมาณ 1 เดือน[5] การอ่านผลโดยการนับโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นในอาหารต้องอาศัยความชำนาญ ส่งผลให้การทดสอบมีความแปรปรวนสูง[6] มีหลายการศึกษาได้นำวิธีการหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์มาใช้ในการตรวจหาเชื้อที่มีชีวิตในวัคซีน[7-11] ซึ่งวิธีนี้มีขั้นตอนการดำเนินการที่รวดเร็ว สามารถลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ลงเหลือ 2 วัน โดยอาศัยหลักการที่ adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งพบในเซลล์ที่มีชีวิต ทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ Firefly luciferase โดยมี luciferin เป็น substrate ทำให้เกิดการเปล่งแสง bioluminescence ออกมา ซึ่งสามารถวัดค่าการเปล่งแสงได้ด้วยเครื่อง luminometer[7,8] ปัจจุบันยังไม่มีหน่วยงานควบคุมกำกับประเทศใดใช้วิธีนี้ในการตรวจหาค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีเพื่อรับรองรุ่นการผลิต และหากตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้วพบว่าวิธีนี้มีความเหมาะสมจริงประเทศไทยจะเป็นประเทศแรกที่ใช้วิธีนี้ในการรับรองรุ่นการผลิตวัคซีนบีซีจี

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์ ในพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ ความแม่น (accuracy) ความเที่ยง (precision) ความจำเพาะ (specificity) และความคงทน (robustness) โดยใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่ใช้ในประเทศเป็นตัวควบคุมผลการทดสอบร่วมกับวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสากลที่ทราบค่าในหน่วยนาโนกรัมของ ATP พร้อมกับประเมินค่าความแรงของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน และตัวอย่างในประเทศจำนวน 15 รุ่นการผลิต ซึ่งเป็นตัวอย่างวัคซีนที่ส่งตรวจยังสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อขอรับรองรุ่นการผลิตใน พ.ศ. 2560 - 2561 โดยการวิเคราะห์ปริมาณ ATP ภายในเซลล์เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานเดิม เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทางเลือกนี้สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานได้

วิธีการศึกษา

วัคซีนมาตรฐาน

วัคซีนบีซีจีมาตรฐานสากล รุ่นการผลิต 07/272 (The 1st WHO reference reagent for BCG vaccine of Tokyo 172 sub-strain) ได้จากหน่วยงาน National Institute of Biological Standards and Control (NIBSC) ซึ่งมีค่าความแรงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเพาะเชื้อเท่ากับ 49.4 x 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 5.9 x 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และมีค่าความแรงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์เท่ากับ 217.6 นาโนกรัมต่อหลอด ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 27.5 นาโนกรัมต่อหลอด สำหรับวัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ ได้รับจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ซึ่งได้กำหนดรุ่นการผลิตเป็น BCG220316 ในห้องปฏิบัติการหลังจากการกำหนดค่าความแรงร่วมกับผู้ผลิตในประเทศแล้ว พบว่ามีค่าความแรงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเพาะเชื้อเท่ากับ 15.88 x 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร มีช่วงค่าที่ยอมรับได้สำหรับการใช้งานเท่ากับ 6.93 x 10^6 - 24.82 x 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร

วัคซีนตัวอย่าง

วัคซีนบีซีจีตัวอย่างที่นำมาทดสอบ เป็นตัวอย่างที่ส่งมาจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย จำนวน 15 รุ่นการผลิตที่ขอรับรองรุ่นการผลิตที่สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปี พ.ศ. 2560 - 2561

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทรุ่น Centro XS3 LB960 Microplate Luminometer (BERTHOLD technologies) สำหรับการวัดค่าการเปล่งแสง bioluminescence

อาหารเลี้ยงเชื้อและชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป

อาหารเลี้ยงเชื้อ Dubos oleic albumin complex

เตรียมโดยการชั่ง Dubos broth base (Cat No.238510, Difco) ปริมาณ 0.7 กรัม และ Bovine albumin (Cat No. A4503-10G, Sigma) ปริมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ Tween 80 (Cat No. P4780, Sigma) ปริมาตร 45 ไมโครลิตร กวนให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

น้ำยาสกัด ATP (Extractant B/S, Cat.No. 31-103, Biothema) ซึ่งประกอบด้วยชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป cell viability kit (Cat. No.188-441, Biothema) ที่มี ATP reagent SL, Diluent B, ATP Standard 10 ไมโครโมลต่อลิตร

วิธีทดสอบ

ทำการละลายตัวอย่างวัคซีนบีซีจี 1 ขวดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Dubos oleic albumin complex ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดวัคซีนที่ละลายแล้วใส่ลงในหลอดทดลองแบบฝาเกลียวขนาด 2 มิลลิลิตร หุ้มด้วยกระดาษฟลอยด์เพื่อป้องกันแสง แล้วนำไปบ่มที่ตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22-26 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Dubos oleic albumin complex โดยเริ่มจากหลอดที่ไม่เจือจาง และเจือจางเป็น 1:2 และ 1:4 ตามลำดับ จากนั้นนำไปสกัด ATP โดยนำน้ำยา Extractant B/S ที่แบ่งใส่หลอดทดลองไว้ปริมาตร 900 ไมโครลิตร มาต้มที่อุณหภูมิ 96 – 98 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วเติมตัวอย่างวัคซีนที่เจือจางไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลอดน้ำยา Extractant B/S ปั่นให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 96 – 98 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เมื่อครบเวลา ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที ในการทดสอบทุกครั้งให้ทำควบคู่กับหลอดควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) และวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน จากนั้นให้ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่ผ่านการสกัด ATP แล้วปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลทสีขาวทึบ (white microplate) โดยทำ 3 หลุมในแต่ละระดับความเจือจาง แล้วเติม ATP reagent SL ปริมาตร 80 ไมโครลิตรลงในทุกหลุมที่มีตัวอย่างพร้อม negative control แล้วนำไปอ่านผลการทดสอบ โดยเครื่อง Centro XS3 LB960 Microplate Luminometer ซึ่งเครื่องจะอ่านผลเป็นค่าการเปล่งแสง (luminescence; I_{smp}) ในการอ่านค่าการเปล่งแสงของเครื่องนั้น ต้องตั้งค่าเวลาการอ่านไว้ที่ 1 วินาทีต่อหลุม เนื่องจากค่าการเปล่งแสงจะลดลงตามเวลา เมื่อเครื่องอ่านผลการทดสอบในรอบแรกแล้ว ให้นำเพลทออกจากเครื่อง แล้วเติม ATP standard ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างทุกหลุม จากนั้นนำเพลทไปวัดค่าการเปล่งแสง (luminescence; $I_{smp+std}$) อีกครั้งหนึ่ง แล้วนำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่า ATP

การคำนวณค่า ATP ให้มีหน่วยเป็น นาโนกรัมต่อโด๊ส โดยใช้สูตรดังนี้

$ATP_{smp} = [I_{smp}/(I_{smp+std} - I_{smp}) \times 100 \times 50 \times 10 \times 573.1 \times \text{dilution factor}]/1000$

- เมื่อ ATP smp คือค่า ATP ของตัวอย่าง
- I_{smp} คือค่าการเปล่งแสง luminescence ของตัวอย่าง
- $I_{smp+std}$ คือค่าการเปล่งแสง luminescence ของตัวอย่างหลังการเติม ATP standard
- Factor 100 คือความเข้มข้นของ ATP standard 100 พิโคโมล
- Factor 50 คือค่า dilution factor จากการใช้ตัวอย่าง BCG culture ในการทดสอบ 20 ไมโครลิตร จากทั้งหมด 1 มิลลิลิตร
- Factor 10 คือค่า dilution factor จากขั้นตอนการสกัด ATP ซึ่งใช้น้ำยาสกัด Extractant B/S ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่าง BCG culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- 573.1 คือมวลโมเลกุลของ ATP

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการหาปริมาณ ATP

การตรวจสอบความแม่นของวิธีการหาปริมาณ ATP: การตรวจสอบความแม่นทำการโดยดำเนินการทดสอบค่าความแรงด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณ ATP ในวัคซีนบีซีจีมาตรฐานสากล รุ่นการผลิต 07/272 ซึ่งมีค่าที่

กำหนดไว้เท่ากับ 217.6 นาโนกรัมต่อหลอด ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แล้วนำผลการทดสอบที่ได้มาคำนวณหาค่าการคืนกลับ (%recovery) ซึ่งควรอยู่ในช่วง 80.0-120.0% โดยคำนวณค่าการคืนกลับดังนี้

%recovery = (ปริมาณ ATP ภายในเซลล์ที่วัดได้ในตัวอย่างวัคซีน x 100)/ค่าความแรงที่กำหนดไว้

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธีการหาปริมาณ ATP: การตรวจสอบความเที่ยงใช้วัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานรุ่นการผลิต BCG220316 ในการศึกษา โดยนำมาทดสอบหาปริมาณ ATP ใน 2 พารามิเตอร์ ได้แก่

การทดสอบซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability): โดยทำการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณ ATP จำนวน 6 ครั้ง ในวันและเวลาเดียวกัน นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%Geometric coefficient of variation; %GCV) ของการทดสอบ ซึ่งกำหนดไม่เกิน 20.0%

การทดสอบซ้ำต่างวัน (Intermediate precision): โดยทำการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณ ATP จำนวน 6 ครั้ง ต่างวันและเวลากัน นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า %GCV ซึ่งกำหนดไม่เกิน 20.0%

การตรวจสอบความคงทนของวิธีการหาปริมาณ ATP: การตรวจสอบความคงทนดำเนินการโดยทำการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานรุ่นการผลิต BCG220316 ด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณ ATP โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ทำการทดสอบคนละ 3 ครั้ง ในวันและเวลาที่ต่างกัน ครั้งละ 1 ตัวอย่าง

การเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธีการเพาะเชื้อ

การเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ดำเนินการโดยทำการวิเคราะห์ปริมาณ ATP เปรียบเทียบกับผลการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein-Jensen โดยใช้วัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานรุ่นการผลิต BCG220316 จำนวน 6 ซ้ำ ต่อการทดสอบ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเปรียบเทียบในตัวอย่างวัคซีนที่ส่งตรวจเพื่อขอรับรองรุ่นการผลิต จำนวน 15 รุ่น โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณ ATP ของตัวอย่างวัคซีน รุ่นการผลิตละ 3 ซ้ำเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในที่ทำการทดสอบในช่วงเวลาเดียวกัน และมีการรายงานผลในการให้การรับรองรุ่นการผลิตจากสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ผลการศึกษา

การตรวจสอบความแม่นของวิธีการหาปริมาณ ATP

จากการตรวจสอบความแม่นของวิธีการหาปริมาณ ATP โดยการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีมาตรฐานสากล รุ่นการผลิต 07/272 ด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณ ATP ภายในเซลล์ จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าวิธีการหาปริมาณ ATP สามารถทดสอบค่าความแรงของวัคซีนมาตรฐานสากลได้โดยมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean, GM) เท่ากับ 199.02 นาโนกรัมต่อโด๊ส มีค่าเบี่ยงเบนเรขาคณิต (Geometric Standard deviation, GSD) เท่ากับ 1.10 และมีค่าการคืนกลับที่ 91.73% (ตารางที่ 1)

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธีการหาปริมาณ ATP

ในการตรวจสอบความเที่ยงของวิธีการหาปริมาณ ATP เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐาน รุ่นการผลิต BCG220316 จำนวน 6 ครั้ง ในวันและเวลาเดียวกัน พบว่า มีปริมาณของ ATP ที่ได้ใกล้เคียงกันมากในจำนวน 6 ครั้ง ที่ทำการทดสอบ โดยมี GM เท่ากับ 150.02 นาโนกรัมต่อโด๊ส มีค่า GSD เท่ากับ 1.08 และค่า %GCVเท่ากับ 7.74% และเมื่อทำการทดสอบในวัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานรุ่นการผลิตเดียวกัน จำนวน 6 ครั้งที่วันและเวลาต่างกัน พบว่ายังคงมีปริมาณ ATP ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า GM เท่ากับ 140.35 นาโนกรัมต่อโด๊ส มีค่า GSD เท่ากับ 1.01 และมีค่า %GCV เป็น 5.57% (ตารางที่ 2) ซึ่งยังคงเป็นไปตามเกณฑ์คือมี %GCV ไม่เกิน 20%

การตรวจสอบความคงทนของวิธีการหาปริมาณ ATP

ในการตรวจสอบความคงทนของวิธีการหาปริมาณ ATP เมื่อทำการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีอ้างอิง

มาตรฐาน รุ่นการผลิต BCG220316 ด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ ATP โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน คนละ 3 ครั้ง ในวันและเวลาต่างกัน ครั้งละ 1 ตัวอย่าง พบว่าผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คนมีผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกัน คือคนที่ 1 มีค่า GM เท่ากับ 150.02 นาโนกรัมต่อโด๊ส และค่า %GCVเท่ากับ 7.7% ส่วนคนที่ 2 มี GM เท่ากับ 142.98 นาโนกรัมต่อโด๊ส โดยมี %GCV เท่ากับ 12.6% เมื่อนำผลที่ได้มารวมกันได้ค่า GM เท่ากับ 146.46 นาโนกรัมต่อโด๊ส และค่า %GCV เท่ากับ 10.3% เพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาจึงได้นำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติเพิ่มเติม พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution) และเนื่องจากข้อมูลผลการทดสอบของผู้วิเคราะห์ทั้งสองเป็นอิสระต่อกัน จึงทำการวิเคราะห์ความแตกต่างต่อด้วยสถิติแบบ 2-independent sample (Mann-Whitney test) พบว่าผลการทดสอบของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญคือ p=0.394 (p>0.05) (ตารางที่ 3)

การเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธีการเพาะเชื้อ

เพื่อเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ ATP ที่วัดได้กับการหาปริมาณเชื้อด้วยวิธีการเพาะเชื้อบีซีจีในอาหารที่จำเพาะ วัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานรุ่นการผลิต BCG220316 จึงได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 1 จะเห็นได้ว่าค่าปริมาณ ATP ที่ตรวจพบในการทดสอบทั้ง 6 ตัวอย่างมีค่าอยู่

ตารางที่ 1 การตรวจสอบความแม่นของวิธีการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์ ในการวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีน-บีซีจีมาตรฐานสากล รุ่นการผลิต 07/272

การทดสอบครั้งที่	ปริมาณ ATP (นาโนกรัมต่อโด๊ส)*	GM	GSD	% recovery
1	196.73			
2	181.53	199.02	1.10	91.73
3	220.72			

* วัคซีนบีซีจีมาตรฐานสากล รุ่นการผลิต 07/272 มีการกำหนดค่าปริมาณ ATP เท่ากับ 217.6 นาโนกรัมต่อหลอด

ตารางที่ 2 การตรวจสอบความเที่ยงของวิธีการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์ ในการวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีน-บีซีจีอ้างอิงมาตรฐานรุ่นการผลิต BCG220316

	ปริมาณ ATP (นาโนกรัมต่อโด๊ส)	
ครั้งที่	การทดสอบซ้ำในวันและเวลาเดียวกัน	การทดสอบซ้ำในต่างวันและเวลา
1	151.03	142.46
2	155.45	149.57
3	159.20	146.37
4	129.74	134.08
5	150.03	141.21
6	156.68	129.44
GM	150.02	140.35
GSD	1.08	1.01
%GCV	7.74%	5.57%

ระหว่าง 109.11 – 132.79 นาโนกรัมต่อโด๊ส และการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการเพาะเชื้อมีค่าอยู่ระหว่าง 15.52 – 22.49 x 10^6 CFU ต่อโด๊ส ซึ่งจะเห็นได้ว่าเส้นกราฟของทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างเห็นได้ชัด

เมื่อทดลองนำตัวอย่างวัคซีนบีซีจีที่ส่งตรวจเพื่อขอรับรองรุ่นการผลิตจำนวน 15 รุ่นการผลิต มาทดสอบค่าความแรง โดยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ ATP ซ้ำ 3 ครั้งต่อตัวอย่าง แล้วนำค่า GM ที่ได้จากแต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับค่าความแรงที่ได้จากวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งค่านี้ได้จากการออกผลรับรองรุ่นการผลิตเพื่ออนุญาตให้มีการจำหน่ายภายในประเทศ ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 2 โดยจะเห็นว่าค่าปริมาณ ATP ที่ได้จากตัวอย่างทั้งหมด 15 รุ่นการผลิตให้ผลที่ได้สอดคล้องไปในแนวทางเดียวกัน

วิจารณ์

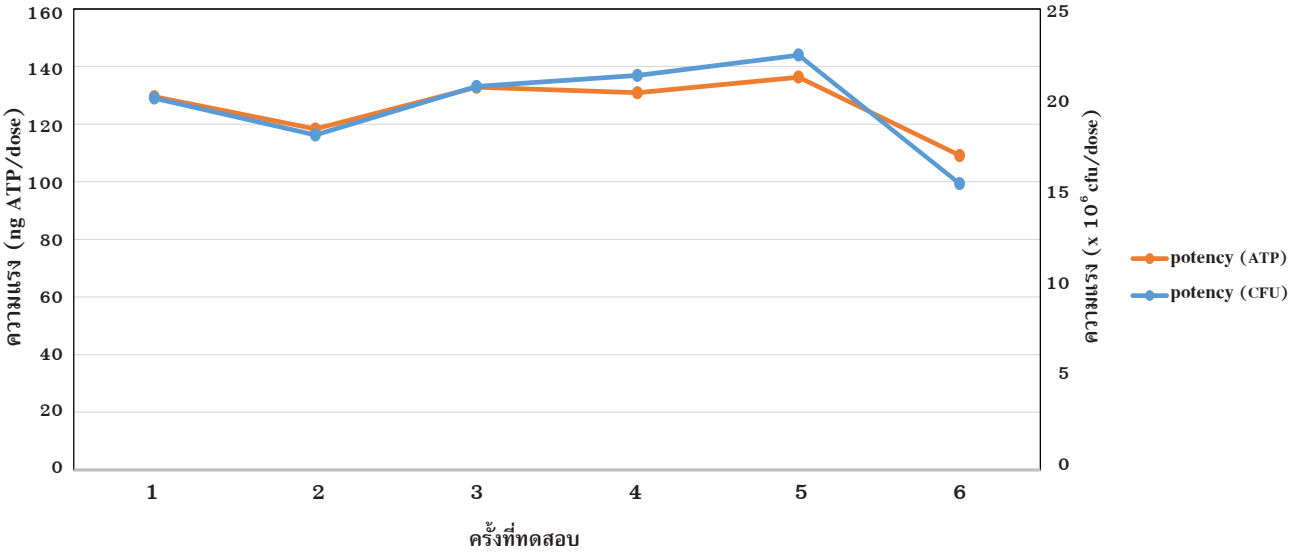
วัคซีนบีซีจีเป็นวัคซีนป้องกันโรควัณโรคเพียงชนิดเดียวในปัจจุบันที่มีการใช้งานมานานกว่า 80 ปี และเป็นวัคซีนที่มีการผลิตในประเทศ ดังนั้น วัคซีนนี้จึงจำเป็นต้องผ่านตรวจสอบคุณภาพเพื่อการรับรองรุ่นการผลิตก่อนจำหน่ายทุกครั้ง ปัจจุบันการตรวจสอบคุณภาพวัคซีน-บีซีจี โดยเฉพาะการทดสอบค่าความแรงของผลิตภัณฑ์วัคซีนสำเร็จรูปต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน และทุกประเทศยังคงใช้วิธีดั้งเดิมตามมาตรฐานสากลคือวิธีการนับจำนวนเชื้อที่ได้จากการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม[2-4] แต่วิธีนี้ก็มีข้อจำกัดหลายด้าน เช่น การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยุ่งยากซับซ้อน การทดสอบในห้องปฏิบัติการใช้เวลานานเนื่องจากใช้หลอดทดลองจำนวนมาก และการเพาะเลี้ยงเชื้อให้เพิ่มจำนวนจนเห็นเป็นโคโลนีของเชื้อใช้เวลานานประมาณ 1 เดือนจึงจะสามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีและออกผลรับรองรุ่นการผลิตวัคซีนได้ นอกจากนี้ยังมีความแปรปรวนของผลการทดสอบสูงที่เกิดจากการนับโคโลนีที่อาจมีการเกาะกลุ่มในหลอดทดลอง[11] วิธีการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์เป็นวิธีทางเลือกหนึ่งที่ให้ผลรวดเร็ว สามารถทำการ

ตารางที่ 3 การตรวจสอบความคงทนของวิธีการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์ ในการวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีน-บีซีจีอ้างอิงมาตรฐานรุ่นการผลิต BCG030313 ในการทดสอบจำนวน 3 ครั้งที่เป็นอิสระแก่กัน โดยนักวิเคราะห์ 2 คน

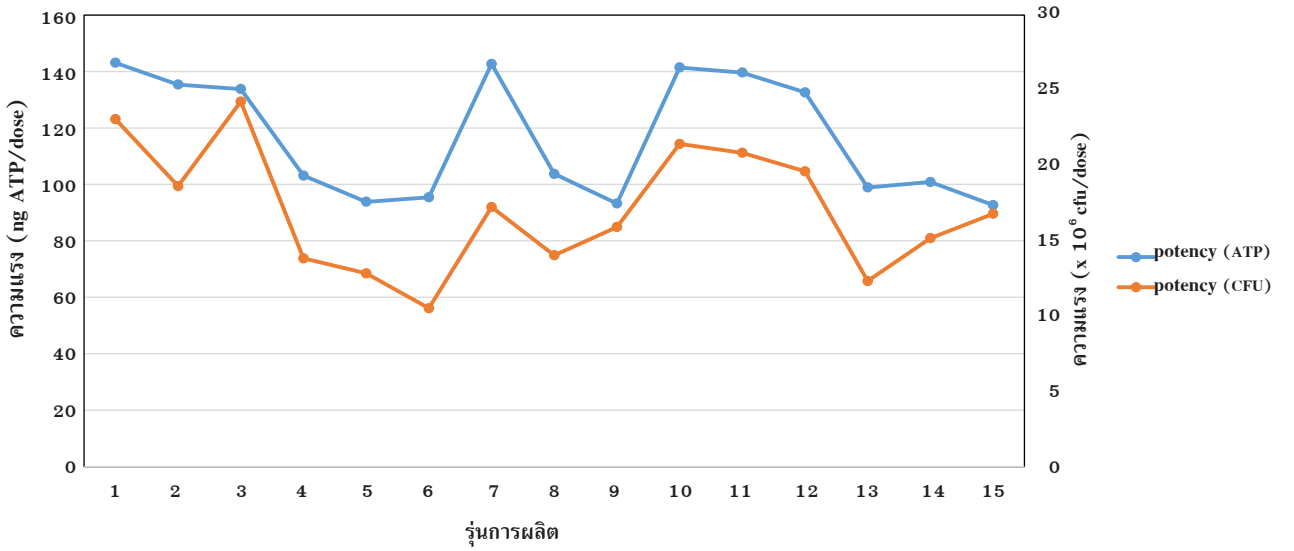
การทดสอบครั้งที่	ปริมาณ ATP (นาโนกรัมต่อโด๊ส)	
	ผู้วิเคราะห์คนที่ 1	ผู้วิเคราะห์คนที่ 2
1	151.03	142.04
2	155.45	152.43
3	159.20	156.27
4	129.74	113.29
5	150.03	146.74
6	156.68	151.90
GM	150.02	142.98
GSD	1.08	1.13
%GCV	7.74	12.61
GM (รวม)	146.46	
GSD (รวม)	1.10	
%GCV (รวม)	10.28	

วิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน มีวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก ทำให้วิธีนี้มีการศึกษากันมากเพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนบีซีจี[7-11] ก่อนหน้านี้เคยมีการศึกษาว่าวิธีการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์นี้สามารถตรวจวัคซีนบีซีจีได้ทุกสายพันธุ์[11] แต่ก็ยังไม่มีการนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจรับรองรุ่นการผลิตวัคซีนบีซีจี งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อยืนยันว่าวิธีทางเลือกโดยการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์นี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีได้จริง โดยทำการศึกษาความถูกต้องของวิธีเพื่อนำ

ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานรุ่นการผลิต BCG220316 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการทดสอบด้วยวิธีการตรวจหา ATP ภายในเซลล์กับการหาปริมาณเชื้อบีซีจีโดยการเพาะเชื้อ



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบค่าความแรงของตัวอย่างวัคซีนบีซีจีที่ส่งตรวจเพื่อขรับรองรุ่นการผลิตยังสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 15 รุ่นการผลิต เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการทดสอบด้วยวิธีการตรวจหา ATP ภายในเซลล์กับการหาปริมาณเชื้อบีซีจีโดยการเพาะเชื้อ



วิธีนี้มาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมรุ่นการผลิตวัคซีนบีซีจีเป็นแห่งแรกของประเทศไทย การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบในหลายพารามิเตอร์โดยใช้วัคซีนบีซีจีมาตรฐานสากล รุ่นการผลิต 07/272 ที่ทราบค่ามาตรฐานทั้งวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธีตรวจหาปริมาณ ATP เพื่อยืนยันว่าการตรวจหาปริมาณ ATP ในการวิจัยนี้ได้ค่าที่ใกล้เคียงกับห้องปฏิบัติการขององค์การอนามัยโลกคือ NIBSC ที่ผลิตวัคซีนมาตรฐานสากล ในขณะเดียวกันได้ใช้วัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ รุ่นการผลิต BCG-220316 ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการร่วมกับผู้ผลิตในประเทศในการทดสอบค่าความแรงคู่ขนานไปกับตัวอย่างวัคซีนบีซีจีทุกครั้ง ซึ่งวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานนี้ได้ผ่านการกำหนดค่าความแรงโดยวิธีการเพาะเชื้อร่วมกับผู้ผลิตมาแล้ว ผลการศึกษาพบว่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบความถูกต้องของวิธี มีผลอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ วิธีมีความแม่น โดยมีค่าการคืนกลับอยู่ที่ 91.7% มีความเที่ยงเมื่อทำการศึกษาในวันและเวลาเดียวกัน และต่างเวลากัน มีค่า %GCV ที่ 7.7% และ 5.6% ตามลำดับ นอกจากนี้วิธียังมีความคงทนที่ดี เมื่อทำการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานโดยผู้ปฏิบัติ 2 คน พบค่า %GCV เท่ากับ 10.3% ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ที่ไม่น้อยกว่า 20.0% ซึ่งผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับที่เคยมีการศึกษาไว้ในตัวอย่างวัคซีนบีซีจีสายพันธุ์ Danish 1331[9] จากการทดสอบความถูกต้องของวิธี ผู้วิจัยยังได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของวิธีการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์ กับวิธีการวิเคราะห์ค่าความแรงด้วยวิธีการเพาะเชื้อ ผลการเปรียบเทียบค่าความแรงทั้ง 2 วิธี จำนวน 6 ค่าการทดสอบ พบว่า ทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกัน และเมื่อทดสอบกับตัวอย่างวัคซีนบีซีจีที่ส่งตรวจรับรองรุ่นการผลิตจำนวน 15 รุ่น (ภาพที่ 2) จะเห็นว่าค่าปริมาณ ATP ที่ทดสอบได้มีความสอดคล้องกันกับการทดสอบด้วยวิธีเพาะเชื้อ และจะเห็นได้ชัดว่าวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ ATP ภายในเซลล์ในตัวอย่างวัคซีนมีความแปรปรวนของผลการทดสอบน้อยกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้[10,11] หากจะนำวิธีการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนเพื่อทดแทนวิธีมาตรฐานเดิมแต่ละห้องปฏิบัติการควรตรวจสอบความถูกต้อง และศึกษาความสัมพันธ์ของวิธีการตรวจหาปริมาณ ATP กับวิธีมาตรฐานเดิม โดยศึกษาแยกเป็นรายผลิตภัณฑ์[12] สำหรับการศึกษานี้จะเห็นว่าผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีอยู่ในเกณฑ์กำหนดในทุกพารามิเตอร์ มีความแปรปรวนของวิธีต่ำ ใช้ระยะเวลาในการทดสอบน้อย และค่าการทดสอบที่ได้จากวิธีนี้มีความสอดคล้องกับปริมาณเชื้อต่อโด๊สในวัคซีน แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ ATP น่าจะสามารถนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือกสำหรับวัคซีนบีซีจีในประเทศไทยได้

สรุป

การตรวจสอบค่าความแรง เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนบีซีจีนั้น ใช้ระยะเวลานาน เนื่องจากในการทดสอบทุกประเทศใช้วิธีดั้งเดิมคือการเพาะเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ยอมรับกันทั่วไปในการทดสอบ แม้จะมีความพยายามในการนำวิธีทางเลือกอื่นมาใช้ ซึ่งวิธีที่ศึกษากันมากคือวิธีการตรวจหาปริมาณ ATP ภายในเซลล์ แต่ปัจจุบันยังไม่มีประเทศใดใช้วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศในการควบคุมรุ่นการผลิต หากวิธีทางเลือกนี้ได้รับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว ก็น่าจะนำมาทดแทนวิธีเดิมได้ จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ATP เพื่อใช้ในการทดสอบหาค่าความแรงของวัคซีนบีซีจี ในพารามิเตอร์ต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบนี้มีความแม่น ความเที่ยง และความคงทนของวิธีที่ดี และเมื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างวิธีนี้กับวิธีการเพาะเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้อยู่ในปัจจุบันพบว่ามีความสัมพันธ์กัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการลดเวลาการทดสอบ และสามารถทดสอบได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน โดยประเทศไทยจะเป็นประเทศแรกที่นำวิธีทางเลือกนี้มาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจรับรองรุ่นการผลิตวัคซีนบีซีจี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวัคซีนแห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่สนับสนุนงบประมาณ และขอบคุณสถานเสาวภา สภากาชาดไทยที่ให้ความอนุเคราะห์วัคซีนบีซีจีเพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน และอนุเคราะห์ตัวอย่างวัคซีนเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยพัฒนานี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กุลกัญญา โชคไพบูลย์กิจ, เกษวดี ลาภพระ, จุฑารัตน์ เมฆมัลลิกา, ฐิติอร นาคบุญนำ, อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์, บรรณาธิการ. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค ปี 2556. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา; 2556.
2. World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations to assure quality, Safety and efficacy of BCG vaccines. WHO Technical Report Series; No.979: Annex 3. Geneva: World Health Organization; 2011.
3. European Pharmacopoeia. Strasbourg, Codex, BCG vaccine, freeze-dried. 01/2012: 0163. Strasbourg, France: Directorate for the quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM); 2012.
4. Ho MM, Markey K, Rigsby P, Hockley J, Corbel MJ. Report of an international collaborative study to establish the first WHO reference reagents for BCG vaccines of three different sub-strains. Vaccine 2011;29:512-8.
5. Oli AN, Agu RU, Nnadozie OJ, Onah CE, Okeke IJ, et al. Potency and immunogenicity of bacillus calmette Guerin (BCG) vaccines used in routine immunization programme in South-East, Nigeria. Afr J Pharm Pharmacol 2014;8:1186-91.
6. Singh Jadaun GP, Kasana Harit, M Neera. Quality control testing of BCG vaccine: current practices and technological advancements. Int J Vaccine Res 2016;1:1-4.
7. Askgaard DS, Gottschau A, Knudsen K, Bennedsen J. Firefly luciferase assay of adenosine triphosphate as a tool of quantitation of the viability of BCG vaccines. Biologicals 1995;23:55-60.
8. Janaszek W, Aleksandrowicz J, Sitkiewicz D. The use of the firefly bioluminescent reaction for the rapid detection and counting of mycobacterium BCG. J Biol stand 1987; 15:11-6.
9. Jensen SE, Hubrechts P, Klein BM, Haslov KR. Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilised BCG Danish 1331 vaccine. Biologicals 2008;36:308-14.
10. Ho MM, Markey K, Rigsby P, Jensen SE, Gairola S, Seki S, et al. Report of an international collaborative study to establish the suitability of using modified ATP assay for viable count of BCG vaccine. Vaccine 2008;26: 4754-7.
11. Kristopher K, Steven CD, William RJ, Sheldon LM. Characterization of an intracellular ATP assay for evaluating the viability of live attenuated mycobacterial vaccine preparations. J Microbiological Methods 2012; 90:245-9.
12. Stefanova T, Quality control and safety assessment of BCG vaccines in the post-genomic era. Biotechnology & Biotechnological Equipment 2014;28:387-91.

Abstract: Method Validation of Intracellular ATP assay for Potency Test of BCG Vaccine Produced in Thailand

Sukanlayanee Chaimee, B.Sc., M.Sc.; Sompong Sapsutthipas, B.Sc., M.Sc., Ph.D.; Thitiporn Somsaard, B.Sc.; Supaporn Phumiamorn, B.Sc., M.Sc., Ph.D.

Institute of Biological Product, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand

Journal of Health Science 2019;28:369-78.

An analysis of BCG potency values with the standard method defined by the World Health Organisation is culturable viable count. The potency of vaccine is calculated from the number of live attenuated bacteria in a colony forming unit per dose. The limitations of this method include a lengthy test period (due to slow growth of mycobacteria and 4-week incubation period) and the high variability of CFU assay results. In this study, we used an alternative method, intracellular ATP assay that could be performed more rapidly, in only 2 days to quantify the BCG potency. To ensure that the ATP assay was appropriate to estimate the potency of BCG vaccines, it is essential to conduct the bioassay validation by studying main parameters such as accuracy, precision (both repeatability and intermediate precision) as well as the robustness of test. The study showed good accuracy (91.73% recovery), precision tests (geometric coefficient of variation (GCV) less than 20%) for both repeatability and intermediate precision. For robustness test, there was no significant difference of the test results by two analysts ($p>0.05$); and the GCV was less than 10%, indicating that this assay showed good robustness as well. In addition, a high correlation was observed between intracellular ATP concentrations and the number of viable bacilli in vaccine samples. Overall, these data indicate that the intracellular ATP assay can be done rapidly; it is sensitive, less time-consuming, and reliable. It is should be a suitable alternative method for potency test of BCG vaccines; and could be routinely used as a standard method for the lot release of BCG vaccines in Thailand.

Keywords: BCG vaccine, alternative method, intracellular ATP assay