การหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย โดยวิธี Limulus Amebocyte Lysate (LAL)

อารีรัตน์ สุดโต[1] ภูวนาถ เปาปราโมทย์[1]

บทคัดย่อ

วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ เป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมันผลิตจากเชื้อ *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถปล่อยเอนโดทอกซินออกมาจากเซลล์ที่ถูกทำลายได้ มีผลทำให้สัตว์ที่รับวัคซีนเกิดอาการแพ้วัคซีน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน โดยวิธี LAL test ด้วยเทคนิค Kinetic Chromogenic method และหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการนำไปปรับปรุงกระบวนการผลิตเพื่อลดปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีน

จากการศึกษาพบว่า ความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินของบรอทแบคเทอรินและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันคือ ความเจือจางที่ 10^{-5} และ 10^{-4} ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่างบรอทแบคเทอรินก่อนและหลังการผ่านกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration มาตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน มีค่าเท่ากับ $4.31\pm0.59 \times 10^5$ และ $7.92\pm0.88 \times 10^4$ EU/ml ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่างวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน จำนวน 20 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินจากการเติมและไม่เติมสารช่วยการกระจายตัว (dispersing agent) พบว่าตัวอย่างวัคซีนที่เติม dispersing agent และไม่เติม dispersing agent มีค่าเฉลี่ยปริมาณเอนโดทอกซินเท่ากับ $7.98\pm1.79 \times 10^3$ และ$7.29\pm1.63 \times 10^3$ EU/ml ตามลำดับ เมื่อนำมาหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานพบว่าแต่ละชุดที่มีการทดสอบซ้ำตัวอย่างวัคซีนที่เติม dispersing agent จะมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีความแตกต่างกันน้อยมาก และเมื่อนำมาคำนวณค่าทางสถิติพบว่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ดังนั้นการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินโดยวิธี LAL test เทคนิค Kinetic Chromogenic LAL ในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันควรมีการเติม dispersing agent เพื่อทำให้ปริมาณเอนโดทอกซินที่อ่านค่าได้มีความถูกต้อง สามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้เพื่อศึกษาวิธีการลดปริมาณเอนโดทอกซินในกระบวนการผลิต ทำให้สัตว์ที่ได้รับวัคซีนไม่เกิดอาการแพ้วัคซีนต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย เอนโดทอกซิน สารช่วยการกระจายตัว Limulus Amebocyte Lysate

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียหรือโรคคอบวมเป็นโรคระบาดสัตว์ตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 เป็นโรคระบาดชนิดรุนแรงทั้งในระยะเฉียบพลัน และระยะเรื้อรัง ของโคและกระบือ ลักษณะเฉพาะของโรค คือ สัตว์มีไข้สูง เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด หายใจหอบ คอบวมและตายภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากแสดงอาการ สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2 และ E:2 ซึ่งในทวีปเอเชียเชื้อก่อโรคเป็นซีโรไทป์ B:2 เท่านั้น ส่วนทวีปแอฟริกาพบทั้งซีโรไทป์ B:2 และ E:2 (De Alwis, 1999) เมื่อเกิดโรคในสัตว์ที่ไม่เคยมีภูมิคุ้มกันโรคมาก่อนสัตว์จะแสดงอาการป่วยรุนแรง การแพร่โรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว และการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาในสัตว์ที่แสดงอาการแล้วมักจะไม่ได้ผล ทำให้จำนวนสัตว์ป่วยและตายสูง

วัคซีนเป็นเครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการป้องกันโรค วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียมีทั้งวัคซีนเชื้อเป็นและวัคซีนเชื้อตาย และยังแบ่งเป็นชนิดต่างๆ ตามรูปแบบของวัคซีน สารแอดจูแวนท์ และเทคโนโลยีการผลิต (Verma and Jaiswal, 1998) ในประเทศไทยวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์เป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมันผลิตจากเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 โดยการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลินแล้วผ่านกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration จากนั้นนำไปผสมสารแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันจะได้วัคซีนที่อยู่ในรูปของอิมัลชันให้ความคุ้มโรคสูง (รัชนี, 2553)

เชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobe ติดสีแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ แต่จะมีการสร้างสารพิษบริเวณด้านนอกของผนังเซลล์ เมื่อเซลล์ถูกทำลายจะปล่อยสารพิษออกมาเป็นสารพวก Lipopolysaccharide (LPS) สารพิษที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ถูกทำลายเรียกว่าเอนโดทอกซิน (endotoxin)(Marina *et al.*, 2006) ซึ่งทนความร้อนสูง ไม่สามารถทำลายด้วยความร้อนชื้น (steam sterilization) แต่จะถูกทำลายด้วยความร้อนแห้ง (heat sterilization) ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 200-300°C ในอุตสาหกรรมยามักพบการปนเปื้อนของเอนโดทอกซิน จากน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต วัตถุดิบการผลิต เครื่องมือ เครื่องแก้วและภาชนะบรรจุ รวมทั้งจากกระบวนการผลิต เป็นต้น (USP, 2012a)

เอนโดทอกซิน เป็นสารพิษที่สามารถออกฤทธิ์ทันทีโดยไม่มีระยะพักตัว เมื่อเอนโดทอกซินเข้าสู่ร่างกายจะก่อให้เกิดอาการไข้ (pyrogenicity) เนื่องจากเอนโดทอกซินจะไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้หลั่งสารที่มีผลต่อสมองส่วนไฮโพทาลามัส (hypothalamus) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย ทำให้อุณหภูมิของร่างกายสูงขึ้น หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเลือด (blood change) โดยการทำให้จำนวนเม็ดเลือดลดลงชั่วขณะแล้วจึงมีจำนวนสูงขึ้น สามารถทำลายเกล็ดเลือด (platelet) ทำให้เกล็ดเลือดปล่อยสารที่ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด ภายในเส้นเลือดฝอยเกิดการบวมน้ำและทำให้เลือดออกได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนของความดันโลหิต และหากปริมาณเอนโดทอกซินในกระแสเลือดมีสูงจะทำให้เกิดอาการช็อก โดยความดันโลหิตลดต่ำลง อ่อนเพลีย ชีพจรเต้นเร็ว การหายใจช้าลง หมดสติ ระบบการไหลเวียนของเลือดล้มเหลวและตาย (Mark and Shauna, 2005) ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โค และกระบือ เมื่อได้รับเอนโดทอกซินในปริมาณมาก เอนโดทอกซินจะเหนี่ยวนำให้สัตว์แสดงอาการพิษของเอนโดทอกซิน เช่น มีไข้สูง หอบ และช็อก เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสาร โปรสตาแกลนดินในระดับสูงมากทันทีหลังจากที่สัตว์ได้รับเอนโดทอกซิน และพบว่าระดับแคลเซียมและเม็ดเลือดขาวลดลง (สุณีรัตน์ และคณะ, 2536)

การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในผลิตภัณฑ์ยาฉีดตามมาตรฐานเภสัชตำรับมี 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 Rabbit pyrogen test เป็นวิธีการทดสอบด้วยกระต่าย โดยฉีดสารที่ต้องการทดสอบเข้าเส้นเลือดดำริมใบหูของกระต่ายแล้วบันทึกอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง ซึ่งวิธีนี้จะใช้เวลาในการทดสอบนาน มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อความไวของการทดสอบ ซึ่งอาจทำให้ผลการทดสอบคาดเคลื่อน เช่น ฤดูกาล การให้อาหาร อุณหภูมิแวดล้อม เป็นต้น วิธีที่ 2 Limulus Amebocyte Lysate test หรือ LAL test เป็นวิธีการทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro) โดยอาศัย

หลักการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดจากเลือดแมงดาทะเลกับสาร bacterial endotoxins ซึ่งเฉพาะเจาะจงสำหรับการหาปริมาณเอนโดทอกซิน จากแบคทีเรียแกรมลบ (ฐิติพร, 2554) ปัจจุบันนิยมใช้วิธี LAL test ในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน เนื่องจากเป็น in vitro test ให้ผลทดสอบที่รวดเร็ว และมีความไว (Sensitivity) ในการทดสอบมากกว่าวิธี Rabbit pyrogen test

LAL test มี 3 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 Gel-clot techniques อาศัยหลักการ LAL จะเกิดการแข็งตัว เมื่อมีเอนโดทอกซิน ซึ่งผู้ทดสอบต้องสังเกตการเกิดเจลด้วยตา วิธีที่ 2 Turbidimetric method อาศัยการวัดความขุ่นหลังการแข็งตัวเป็นเจล สามารถอ่านค่าปริมาณเอนโดทอกซินต่ำสุดได้ตั้งแต่ 0.01-100 EU/ml และวิธีที่ 3 Kinetic Chromogenic LAL อาศัยการเกิดสีหลังจากการแตกออกของ synthetic peptide chromogen complex ซึ่งความเข้มของสีจะขึ้นกับปริมาณเอนโดทอกซิน สามารถอ่านค่าปริมาณเอนโดทอกซินต่ำสุดได้ตั้งแต่ 0.005–50 EU/ml (USP, 2012b)

การกำหนดปริมาณเอนโดทอกซิน (Endotoxin limit) ของยาหรือวัคซีนในคนจะคำนวณจากขนาดสูงสุดที่ให้ได้ในรูปมิลลิกรัมหรือมิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม ซึ่งกรณียาสัตว์ให้คำนวณเช่นเดียวกับยาที่ใช้ในคน (USP, 2012b) แต่ยังไม่มีการกำหนดปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนสัตว์ และยังไม่เคยมีรายงานปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน

ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน โดยวิธี LAL test ด้วยเทคนิค Kinetic Chromogenic method ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบที่เฉพาะเจาะจงสำหรับการหาปริมาณเอนโดทอกซินจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (USP, 2012b) และหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการนำไปปรับปรุงกระบวนการผลิตเพื่อลดปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีน

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างทดสอบ

1. บรอทแบคเทอริน จากเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptose phosphate broth เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน
2. บรอทแบคเทอรินที่ผ่านกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration
3. วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน จำนวน 20 ตัวอย่าง ได้แก่วัคซีนชุดการผลิตที่ 1-2/55, 1-5/56, 1-2/57, 1-7/58 และ 1-4/59

ชุดทดสอบและน้ำยาทดสอบปริมาณเอนโดทอกซิน

1. Kinetic - QCL™ Kinetic Chromogenic LAL Assay[1]
2. PYROSPERSE™ เป็นสารกลุ่ม metallo - modified polyanionic มีหน้าที่เป็นสารช่วยการกระจายตัว (Dispersing agent)[2]

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอนโดทอกซิน (Endotoxin standard)

1. เติม LAL Reagent Water (LRW) ลงใน *E.coli* O55:B5 Endotoxin ตามปริมาตรที่ระบุไว้ในใบ Certificate of Analysis เมื่อเติม LRW ตามปริมาตรที่กำหนดจะได้ Control Standard Endotoxin (CSE) ที่มี Endotoxin Potency 50 EU/ml
2. เติม CSE ปริมาตร 100 µl ใส่ในหลอดทดสอบที่มี LRW ปริมาตร 900 µl จะได้ Endotoxin Potency 5 EU/ml

[1] Lonza Walkersville, Inc., USA

[2] Lonza Walkersville, Inc., USA

3. เจือจาง CSE ด้วย LRW ให้มีความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 5 EU/ml ตามตาราง

Endotoxin concentration (EU/ml)	Volume of LAL reagent water	Volume of endotoxin solution added to LAL reagent water
5	900 µl	100 µl of 50 EU/ml solution
0.5	900 µl	100 µl of 5 EU/ml solution
0.05	900 µl	100 µl of 0.5 EU/ml solution
0.005	900 µl	100 µl of 0.05 EU/ml solution

การเตรียมตัวอย่างทดสอบเพื่อหาความเจือจางที่เหมาะสม

1. บรอทแบคเทอรินและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน

   ทำ ten fold dilution บรอทแบคเทอรินที่ผ่านกระบวนการกรอง และวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันด้วย LRW ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6}

2. วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent

   ทำ ten fold dilution วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน ด้วย LRW ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} จากนั้นเติม dispersing agent ปริมาตร 10 µl ลงในตัวอย่างวัคซีนที่เจือจางแล้ว 4 dilution สุดท้าย (10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6})

การหาความเจือจาง (dilution) ที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน

1. เติม LRW (Blank) ลงใน 96-wells plate จำนวน 3 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 µl
2. เติม standard endotoxin ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5, 5 และ 50 EU/ml โดยเติม standard endotoxin ความเข้มข้นละ 3 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 µl โดยเรียงลำดับจาก standard endotoxin ที่มีความเข้มข้นน้อยไปมาก
3. ทำ Positive Product Control (PPC) โดยเติม standard endotoxin ความเข้มข้น 5.0 EU/ml ลงใน plate จำนวน 3 หลุมต่อตัวอย่าง ปริมาตรหลุมละ 11 µl
4. เติมบรอทแบคเทอริน วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน และวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent โดยเลือก dilution ที่ 10^{-3} ถึง 10^{-6} เติมตัวอย่างละ 6 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 µl (หลุมตัวอย่าง 3 หลุม และหลุมตัวอย่าง + PPC 3 หลุม)
5. นำ plate ใส่ลงในเครื่อง microplate reader[3] บ่มเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากับ 37°C ทั่วทั้ง plate
6. เติม Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) ปริมาตร 100 µl ลงในทุกหลุมอ่านค่าการเกิดปฏิกิริยาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm
7. อ่านค่าเอนโดทอกซินที่วิเคราะห์โดยโปรแกรม WinKQCL Version 4[4] และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

[3] รุ่น ELx808IU ยี่ห้อ BioTek, USA

[4] Lonza Walkersville, Inc., USA

การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน

1. เติม LRW (Blank) ลงใน 96-wells plate จำนวน 3 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 µl
2. เติม standard endotoxin ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5, 5 และ 50 EU/ml ลงใน plate โดยเติม standard endotoxin ความเข้มข้นละ 3 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 µl โดยเรียงลำดับจาก standard endotoxin ที่มีความเข้มข้นน้อยไปมาก
3. ทำ PPC โดยเติม standard endotoxin ความเข้มข้น 5.0 EU/ml ลงใน plate จำนวน 3 หลุมต่อตัวอย่าง ปริมาตรหลุมละ 11 µl
4. เติมบรอทแบคเทอริน วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน และวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent ตัวอย่างละ 6 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 µl (หลุมตัวอย่าง 3 หลุม และหลุมตัวอย่าง + PPC 3 หลุม) โดยเลือกจากผลการทดสอบการหาความเจือจาง (dilution) ที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน (ข้อ7)
5. นำ plate ใส่ลงในเครื่อง microplate reader บ่มเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากับ 37°C ทั่วทั้ง plate
6. เติม LAL ปริมาตร 100 µl ลงในทุกหลุมอ่านค่าการเกิดปฏิกิริยาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm
7. อ่านค่าเอนโดทอกซินที่วิเคราะห์โดยโปรแกรม WinKQCL Version 4 และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

การวิเคราะห์ผล

1. เปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินของบรอทแบคเทอรินและบรอทแบคเทอรินที่ผ่านกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration โดยการหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) และเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณเอนโดทอกซิน
2. เปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน และวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent โดยวิธี Paired sample T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 20

ผล

1. การหาความเจือจางที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน

จากการอ่านค่าปริมาณเอนโดทอกซิน พบว่าความเจือจางที่เหมาะสมของบรอทแบคเทอรินและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน คือ dilution ที่ 10^{-5} และ 10^{-4} ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

2. การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน

ปริมาณเอนโดทอกซินในบรอทแบคเทอรินก่อนกรองและหลังการกรองด้วย cross flow filtration พบว่ามีค่าเฉลี่ย (mean) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) เท่ากับ $4.31\pm0.59 \times 10^5$ และ $7.92\pm0.88 \times 10^4$ EU/ml ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณเอนโดทอกซินเท่ากับ 81.51±1.94% (ตารางที่ 2)

ปริมาณเอนโดทอกซินของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน และวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent จำนวน 20 ชุด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $7.29\pm1.63 \times 10^3$ และ $7.98\pm1.79 \times 10^3$ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อนำมาคำนวณค่าทางสถิติโดยวิธี Paired sample T-test พบว่าปริมาณเอนโดทอกซิน

ของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 4)

วิจารณ์

การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันโดยวิธี LAL test เทคนิค Kinetic Chromogenic LAL จะอาศัยการเกิดสีหลังจากการแตกออกของ synthetic peptide chromogen complex ความเข้มของสีจะขึ้นกับปริมาณเอนโดทอกซิน (ประพิมพ์พักตร์, 2558) และการอ่านค่าเอนโดทอกซินมีเกณฑ์กำหนดว่าเปอร์เซ็นต์ Positive Product Control Recovered (%PPC Recovery) ต้องอยู่ในช่วง 50-200% และเปอร์เซ็นต์ Coefficient of Variation (%CV) ต้องมีค่า <10% จึงถือว่าไม่เกิด Inhibition/Enhancement ปริมาณเอนโดทอกซินในตัวอย่างทดสอบนั้นจึงจะนำมาใช้ได้ (USP, 2012b) เนื่องจากบรอทแบคเทอรินและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันมีความขุ่นทำให้ไม่สามารถอ่านค่าได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหา dilution ที่เหมาะสมก่อนนำไปตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน จากผลการทดสอบพบว่า dilution ที่เหมาะสมของบรอทแบคเทอรินและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน คือ 10^{-5} และ 10^{-4} ตามลำดับ โดยมีค่า %PPC Recovery และ %CV ที่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีความแตกต่างน้อยที่สุด (ธานินทร์, 2548) (ตารางที่ 1)

กระบวนการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันจะเริ่มจากการเพาะเชื้อ *P. multocida* ในอาหารเลี้ยงเชื้อและฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน ซึ่งในขั้นตอนนี้จะเรียกสารแขวนลอยของแบคทีเรียที่ถูกฆ่าเชื้อแล้วว่าบรอทแบคเทอริน การฆ่าเชื้อนี้จะทำให้เชื้อ *P. multocida* ตายและปล่อยเอนโดทอกซิน ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินจึงพบว่ามีปริมาณเอนโดทอกซินสูงกว่าตัวอย่างในขั้นตอนอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการหาปริมาณเอนโดทอกซินในบรอทแบคเทอรินระหว่างการเพาะเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ รวม 24 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเอนโดทอกซินเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเชื้อโดยพบปริมาณเอนโดทอกซิน 718,500 EU/ml ณ เวลา 24 ชั่วโมงหลังการเพาะเชื้อ (รัชนี และคณะ, 2546) จากนั้นนำบรอทแบคเทอรินมาผ่านกระบวนการกรอง cross flow filtration พบว่าปริมาณเอนโดทอกซินลดลง เนื่องจากกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration มีการเจือจางบรอทแบคเทอรินด้วยน้ำเกลือและกรองหลายรอบ เอนโดทอกซินบางส่วนไหลผ่านรูพรุนของเมมเบรนไปพร้อมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้ปริมาณเอนโดทอกซินลดลงจาก $4.31\pm0.59 \times 10^5$ เหลือ $7.9\pm0.88 \times 10^4$ คิดเป็น 81.51±1.94% (ตารางที่ 2)

มีการศึกษาพบว่าตัวอย่างบางประเภท เช่น Human serum albumin, 5% and 25% Plasma protein fraction, Electrolyte solutions, Antihemophilic factor และ Lipid emulsions จะมีสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินได้ โดยองค์ประกอบของเอนโดทอกซินได้แก่ Lipid A จะเข้าไปจับกับสารประกอบของตัวอย่าง ทำให้ LAL ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับเอนโดทอกซินในตัวอย่างได้ (Hochstein *et al.*, 1979) ดังนั้นในการตรวจตัวอย่างที่มีแนวโน้มว่าจะเกิดการยับยั้งปฏิกิริยากับการทดสอบด้วยวิธี LAL test จำเป็นต้องมีการเติมสารช่วยการกระจายตัว (dispersing agent) ระหว่างสารประกอบกับ Lipid A ให้เป็นสารที่มีอนุภาคขนาดเล็ก เพื่อทำให้ LAL สามารถทำปฏิกิริยากับเอนโดทอกซินได้ เช่นการเติมคลอโรฟอร์มในซีรัมหรือพลาสมาเพื่อช่วยการกระจายตัวระหว่าง serum protein กับ Lipid A (Levin *et al.*, 1970) ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน โดยพบว่าเมื่อเติม dispersing agent ลงในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน แล้วนำไปตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินพบว่าปริมาณเอนโดทอกซินที่อ่านค่าได้ส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่าวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่ไม่ได้เติม dispersing agent และเมื่อนำมาหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานพบว่าแต่ละชุดที่มีการทดสอบซ้ำจะมี

ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีความแตกต่างกันน้อยมากเมื่อเทียบกับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่ไม่ได้เติม dispersing agent (ตารางที่ 3) และเมื่อนำค่าปริมาณเอนโดทอกซินมาคำนวณค่าทางสถิติโดยวิธี Paired sample T-test ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่าการเติม dispersing agent จะช่วยในการกระจายตัวระหว่างสารประกอบกับ Lipid A ทำให้สามารถหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันโดยวิธี LAL ได้

ในประเทศอิหร่านเคยมีรายงานว่าสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจล 3-12% ของสัตว์เกิดอาการช็อก (Vesal and Maleki, 2000) จึงเริ่มมีการศึกษาเปรียบเทียบวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลที่ผลิตด้วยวิธีเดิมกับวัคซีนที่มีการปรับปรุงกระบวนการผลิต โดยการนำบรอทแบคเทอรินที่เติมฟอร์มาลินมา centrifuged จากนั้นนำตะกอนเชื้อที่ได้มาเติม 0.9% โซเดียมคลอไรด์เพื่อให้เชื้อเข้มข้น $3x10^9$ CFU/ml และเติม 10% อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลผสมให้เข้ากัน เมื่อนำมาทดสอบความปลอดภัย (safety test) พบว่าสัตว์ไม่เกิดภาวะช็อกจากการแพ้วัคซีน (Jabbari and Monzeni, 2002) และเมื่อตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน พบว่าวัคซีนที่มีการปรับปรุงกระบวนการผลิตจะมีปริมาณเอนโดทอกซินต่ำกว่าวัคซีนที่ผลิตด้วยวิธีเดิม (Jabbari and Monzeni, 2007) เนื่องจากในขั้นตอนการ centrifuged จะปั่นเพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งทั้งหมดเหลือไว้แต่ตะกอนเชื้อ จึงทำให้เอนโดทอกซินที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกขจัดออกปริมาณมาก

ดังนั้นหากในกระบวนการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันเปลี่ยนจากการนำบรอทแบคเทอรินที่เติมฟอร์มาลินมาผ่านกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration เป็นการ centrifuged อาจเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพื่อลดปริมาณเอนโดทอกซินในกระบวนการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันได้ และเป็นการป้องกันไม่ให้สัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนเกิดการแพ้วัคซีนจากเอนโดทอกซิน

สรุป

การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินโดยวิธี LAL test เทคนิค Kinetic Chromogenic LAL ในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันควรมีการเติม dispersing agent เพื่อช่วยการกระจายตัวระหว่างสารประกอบของวัคซีนกับ Lipid A ของเอนโดทอกซิน ทำให้ปริมาณเอนโดทอกซินที่อ่านค่าได้มีความถูกต้อง และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีความแตกต่างกันน้อยมาก สามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้เพื่อศึกษาวิธีการลดปริมาณเอนโดทอกซินในกระบวนการผลิตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะกรรมการพัฒนาวิชาการ เจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัตถุดิบการผลิต เจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรีย และเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตวัคซีนแบคทีเรียทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืองานทดลองครั้งนี้ให้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ฐิติพร ภาคภูมิพงศ์ 2554 การทดสอบสารไพโรเจนในผลิตภัณฑ์ยาฉีดปราศจากเชื้อ วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 21(1): 37-40

ธานินทร์ ศิลป์จารุ 2548 การวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS บริษัท วี อินเตอร์ พริ้นท์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 167-172

ประพิมพ์พักตร์ เถื่อนสุคนธ์ 2558 การทดสอบ Bacterial Endotoxins ในผลิตภัณฑ์ยาฉีดปราศจากเชื้อ วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม 22(2): 2-4

รัชนี อัตถิ 2553 โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียและการควบคุมป้องกันโรค วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 19(1-2): 37-51

รัชนี อัตถิ รวินันท์ ฉ่ำเฉลิม นิตยา รักศรี และจันทร์ทิพย์ แสงทอง 2546 การศึกษาเบื้องต้นเพื่อลดปริมาณ Endotoxin ในวัคซีน Haemorrhagic septicaemia ประมวลเรื่องการประชุมสัมมนาวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ครั้งที่ 9: 77-80

สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย ฮันส์ ดินดอล์ล กุลน่า เฟรดริคสัน และลาร์ เอดควิสท์ 2536 โปรสต้าแกลนดินและเอนโด-ท็อกซินกับโรคที่มีความสัมพันธ์ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31 สาขาสัตว์ประมง สัตวแพทยศาสตร์: 615-618

De Alwis, M. C. L. 1999. Vaccine. *In* Haemorrhagic septicaemia. ACIAR Monograph No. 57. Australian Centre for International Agriculture Research, Canberra, Australia. pp. 1-11.

Harper, M., Boyce, J. D. and Adler, B. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbio. Lett. 265(1): 1-10.

Hochstein, H. D., Seligmann, E. G., Marquina, R. B. and Rivera, E. 1979. Limulus amebocyte lysate testing in normal serum albumin (human). Develop. Biol. Standard. 44: 35-52.

Jabbari, A. R. and Moazeni Jula, G. R. 2002. Improvement of haemorrhagic septicaemia vaccine by removing of anaphylactic agents. Arch. Razi Ins. 54: 85-92.

Jabbari, A. R. and Moazeni Jula, G. R. 2007. Measuring of free endotoxin in alum-precipitated vaccine of haemorrhagic septicaemia by limulus amebocyte lysate test. Iranian J. Vet. Res. 8 (1): 83-85.

Levin, J., Tomasulo, P. A. and Oser, R. S. 1970. Detection of endotoxin in blood and demonstration of an inhibitor. J. Lab. Clin. Med. 75(6): 903 -911.

Marina Harper, John D. Boyce and Ben Adler. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiology Letters. Volume 265. Issue 1: 1-10.

Mark, E. B. and Shauna, N. H. 2005. Bacterial contamination of blood components. Clinical Microbiology Reviewers. 18: 195-204.

United States Pharmacopeia. 2012a. Sterilization and sterility assurance/Generalinformation. In The United States Pharmacopeia, 37thed. United States Pharmacopeia Convention, Rockville, MD. pp. 1141-1145.

United States Pharmacopeia. 2012b. Bacterial endotoxin test/Biological test. In The United States Pharmacopeia, 37th ed. United States Pharmacopeia Convention, Rockville, MD. pp. 92-96.

Verma, R. and Jaiswal, T. N. 1998. Haemorrhagic septicaemia vaccines. Vaccine. 16: 1184-1192

Vesal, N. and Maleki, M. 2000. Anaphylactic reaction following vaccination in herd of dairy cattle. Iranian J. Vet. Res. 1: 60-66.

ตารางที่ 1 การหา dilution ที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน

ตัวอย่าง	dilution	%PPC Recovery				% cv			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean±SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean±SD
1. บรอทแบคเทอริน ก่อนกรอง	10^{-3}	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	2.56	2.93	2.85	2.78±0.16
	10^{-4}	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	2.37	2.60	2.48	2.48±0.09
	10^{-5}	64	63	65	64±0.82	2.55	2.56	2.55	2.55±0.00
	10^{-6}	153	149	151	151±1.63	1.98	1.73	1.84	1.85±0.10
2. บรอทแบคเทอริน หลังกรองด้วย cross flow filtration	10^{-3}	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	3.10	2.75	2.95	2.93±0.14
	10^{-4}	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	2.53	2.37	2.55	2.48±0.08
	10^{-5}	89	89	91	90±0.94	2.11	2.15	2.13	2.13±0.02
	10^{-6}	133	120	126	126±5.31	3.70	3.77	3.82	3.76±0.05
3. วัคซีนเฮโมรายิก-เซพติซีเมียชนิดน้ำมัน	10^{-3}	23	26	24	24±1.25	1.32	1.28	1.34	1.31±0.02
	10^{-4}	99	100	99	99±0.47	1.01	1.00	1.03	1.01±0.01
	10^{-5}	150	155	151	152±2.16	3.38	3.16	3.40	3.31±0.11
	10^{-6}	100	94	95	96±2.62	1.20	1.40	1.17	1.25±0.10
4. วัคซีนเฮโมรายิก-เซพติซีเมียชนิดน้ำมัน ที่เติม dispersing agent	10^{-3}	15	13	16	15±1.25	1.50	1.45	1.63	1.52±0.08
	10^{-4}	110	110	109	110±0.47	1.90	1.98	1.95	1.94±0.03
	10^{-5}	99	99	94	97±2.36	3.13	3.70	3.00	3.26±0.30
	10^{-6}	136	130	136	134±2.83	2.46	3.40	3.00	2.93±0.39

หมายเหตุ N/A* = ไม่สามารถอ่านค่าได้

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินในบรอทแบคเทอรินก่อนและหลังการกรองด้วย cross flow filtration

การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน	ปริมาณเอนโดทอกซิน (EU/ml)		เปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณเอนโดทอกซิน
	บรอทแบคเทอรินก่อนกรอง	บรอทแบคเทอรินหลังการกรองด้วย cross flow filtration	
ครั้งที่ 1	4.31×10^5	8.74×10^4	79.72%
ครั้งที่ 2	4.90×10^5	8.05×10^4	83.57%
ครั้งที่ 3	3.72×10^5	6.98×10^4	81.24%
Mean ± SD	$4.31 \pm 0.59 \times 10^5$	$7.92 \pm 0.88 \times 10^4$	81.51 ± 1.94%

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent

ชุดการผลิต	ปริมาณเอนโดทอกซิน (x 10^3 EU/ml)	
	วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน	วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent
1/55	7.01 ± 1.11	7.63 ± 0.38
2/55	8.45 ± 1.47	9.35 ± 0.02
1/56	8.06 ± 3.37	10.30 ± 0.12
2/56	7.44 ± 2.81	8.55 ± 0.05
3/56	9.21 ± 2.79	9.05 ± 0.02
4/56	7.83 ± 1.34	9.17 ± 0.02
5/56	7.01 ± 2.66	8.30 ± 0.20
1/57	4.37 ± 1.98	4.89 ± 0.29
2/57	4.98 ± 1.48	4.81 ± 0.27
1/58	7.51 ± 1.69	7.36 ± 0.50
2/58	6.86 ± 1.56	7.71 ± 0.32
3/58	6.59 ± 1.86	8.52 ± 0.25
4/58	8.87 ± 0.91	8.61 ± 0.42
5/58	5.26 ± 1.08	6.77 ± 0.34
6/58	5.79 ± 1.12	5.71 ± 0.21
7/58	4.64 ± 0.71	4.97 ± 0.37
1/59	9.08 ± 3.04	8.46 ± 0.41
2/59	7.53 ± 1.99	8.51 ± 0.39
3/59	9.52 ± 0.84	9.80 ± 0.31
4/59	9.73 ± 0.44	11.17 ± 0.35
Mean ± SD	7.29 ± 1.63	7.98 ± 1.79

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม Dispersing agent โดยวิธี Paired sample T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 20

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Type A*	7.2870	20	1.63449	.36548
	Type B**	7.9820	20	1.78870	.39997

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Type A* & Type B**	20	.896	.000

Paired Samples Test

	Paired Differences					T	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Type A* - Type B**	-.69500	.79465	.17769	-1.06691	-.32309	-3.911	19	.001

Type A* = ปริมาณเอนโดทอกซินของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน

Type B** = ปริมาณเอนโดทอกซินของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent

จากผลการวิเคราะห์ ค่า t เท่ากับ -3.911 และค่า Sig. เท่ากับ .001 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปริมาณเอนโดทอกซินของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05

Determination of endotoxin in Haemorrhagic septicaemia vaccine by Limulus Amebocyte Lysate test

Areerat Sutto[1] Puvanat Paopramote[1]

Abstract

Haemorrhagic Septicaemia (HS) vaccine, which are manufactured by the Bureau of Veterinary Biologics, are inactivated *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) serotype B:2,5 in oil adjuvant. *P. multocida* is gram-negative bacteria that can release endotoxin cause hypersensitivity. The objectives of study are finding out optimal solution for endotoxin detection by LAL test with Kinetic Chromogenic method and endotoxin content in HS vaccine for vaccine production processing improvement to reduce endotoxin in vaccine.

This study found that the optimal dilution for broth bacterin and HS vaccine were 10^{-5} and 10^{-4}, respectively. The endotoxin concentration in broth bacterin before crossflow filtration was $4.31\pm0.59\times10^{5}$ EU/ml and after crossflow filtration was $7.92\pm0.88\times10^{4}$ EU/ml. Of 20 sample HS vaccine and 20 sample HS vaccine with dispersing agent added were measured endotoxin concentration. The result show that an average value of endotoxin in HS vaccine with and without dispersing agent were $7.98\pm1.79\times10^{3}$ and $7.29\pm1.63\times10^{3}$ EU/ml, respectively which was statistical significance ($P<0.05$). From this research, the derived data is to be utilized in oil HS vaccine manufacturing process for controlling of endotoxin.

Therefore, the detection of the amount of endotoxin by LAL test, the Kinetic Chromogenic LAL technique in HS vaccine, should be added dispersing agent to ensure accurate readings of the amount of endotoxin. The information obtained can be used to study how to reduce the amount of endotoxin in the production process. As a result, vaccinated animals do not develop further allergic reactions to the vaccine.

Keywords: Haemorrhagic septicaemia vaccine, Endotoxin, Dispersing agent, Limulus Amebocyte Lysate