



การตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ Indirect ELISA สำหรับการหาปริมาณแอนติบอดี Pertussis Toxin (PT) ในวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ ด้วยวิธี Mouse Immunogenicity Test

Determination of Analytical Method Validation for Indirect ELISA Quantification of Antibody Titer against PT Antigen in Acellular Pertussis Vaccine Using Mouse Immunogenicity Test

อภิชัย ศุภสารสาร
รัชชานนท์ รักชีพ
อัสจรรย์ อาเมน
วิริยามาศย์ เจริญคุณธรรม
สุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Email: apichai.s@dmisc.mail.go.th
รับต้นฉบับ 22 พฤษภาคม 2562 ปรับปรุง 30 มีนาคม 2563 รับผิดชอบ 24 มีนาคม 2563

Apichai Supasansatorn
Ratchanon Rakcheep
Assjan Amen
Weryamarst Jaroenkunathum
Supaporn Phumiamorn
Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

วัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ที่ผลิตในประเทศไทยมี pertussis toxin เป็นองค์ประกอบหลัก ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการตรวจความแรงต่อ pertussis toxin ในวัคซีนโดยวิธี Mouse Immunogenicity Test (MIT) ซึ่งเป็นการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อ pertussis toxin (anti-PT) โดยฉีดวัคซีนในหนูถีบจักรและนำเลือดที่ได้มาตรวจหาปริมาณ anti-PT ด้วยเทคนิค ELISA ผลการทดสอบพบว่า วิธีนี้มีความจำเพาะ สามารถบอกความแตกต่างของปริมาณ anti-PT ระหว่างกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุมได้ โดยกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ anti-PT ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ anti-PT ระหว่าง 1.95–4,000.00 mlU/mL ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) มากกว่า 0.99 ซ้ำจำกัดในการวัดมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 1.95 mlU/mL และค่าสูงสุดเท่ากับ 4,000.00 mlU/mL ช่วงค่าพิสัยมีค่าระหว่าง 7.81–500.00 mlU/mL การทดสอบความแม่นยำพบมีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง -2.11–2.37 การทดสอบความเที่ยงมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 5.57–11.51 การทดสอบความทนของวิธีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน อยู่ระหว่าง 6.47–9.08 จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าข้อมูลข้างต้นอยู่ในเกณฑ์ที่สากลยอมรับ แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องแม่นยำเชื่อถือได้ สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ความแรงโดยตรวจปริมาณ anti-PT ด้วยวิธี MIT เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพด้านความแรงวัคซีนของไอกรนชนิดไร้เซลล์ได้อย่างเหมาะสม

คำสำคัญ: วัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ ปริมาณแอนติบอดีต่อ Pertussis toxin indirect ELISA Mouse Immunogenicity test

Abstract

Acellular pertussis vaccines are contained pertussis toxin (PT) as a major active substrate component, which are produced in Thailand. Then, the researchers developed a method for determination of the anti-PT antibody titer used to control the potency of the vaccine using mouse immunogenicity test (MIT). The MIT is a non-lethal animal model designed to evaluate antibody responses in immunized mice to the PT antigen claimed to contribute to vaccine efficacy by ELISA technique. The validation method showed a good specification by separation of anti-PT antibody titer between vaccine test group and negative control group. The linearity was found at the range of anti-PT antibody titer from 1.95 to 4000.00 mIU/mL, with the coefficient of correlation and the coefficient of determination were greater than 0.99. The lower limit of quantitation was 1.95 mIU/mL and the upper limit of quantitation was 4,000.00 mIU/mL. The range ranged from 7.81 to 500.00 mIU/mL. The accuracy had the percentage relative error (%RE) between -2.11 to 2.37%. The precision varied from 5.57 to 11.51 percentage of variance coefficient (%CV). The method was robust to the test system and analyzers, %CV was 6.47 to 9.08. Based on the validation results, the method demonstrates that the method is reliable and suitable. It can be used as a standard method for the detection of anti-PT antibody to effectively control the quality of acellular pertussis vaccine.

Key words: acellular pertussis vaccine, Anti-PT antibody titer, indirect ELISA, mouse immunogenicity test

บทนำ

วัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ (acellular) เป็นวัคซีนที่ผลิตจากส่วนสารสกัดเฉพาะบางส่วนของตัวเชื้อไอกรน ที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรค โดยส่วนประกอบของเชื้อไอกรนที่มีรายงานนำมาผลิตวัคซีน ได้แก่ Pertussis Toxin (PT), Filamentous Hemagglutinin (FHA), Pertactin (PRN) และ Fimbrial agglutinin (FIM) ซึ่งวัคซีนที่ผลิตจากแต่ละบริษัทอาจมีส่วนประกอบของเชื้อไอกรนแตกต่างกันได้ ตั้งแต่ 2 ถึง 4 ส่วนประกอบข้างต้น แต่ทั้งนี้วัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์จะมี PT และ FHA เป็นส่วนประกอบหลัก โดยจะใช้ร่วมกับท็อกซอยด์ของเชื้อคอตีบและบาดทะยักเป็นวัคซีนรวมคอตีบ-บาดทะยัก-ไอกรนชนิดไร้เซลล์ (DTaP) ซึ่งข้อดีของวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ ทำให้มีปฏิกิริยาที่ไม่พึงประสงค์น้อยกว่าวัคซีนเดิมที่เป็นวัคซีนรวมคอตีบ-บาดทะยัก-

ไอกรน ชนิดทั้งเซลล์ (whole cell)⁽¹⁾ PT เดิม นั้น เรียกว่า lymphocytosis-promoting factor เป็นส่วนประกอบหลักในกลไกการก่อโรคไอกรน และมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย 5 subunits คือ S1 ถึง S5 ที่แตกต่างกัน โดยส่วนของ subunit S1 เป็น A protomer ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า subunits อื่น และเป็นส่วนที่ออกฤทธิ์ (active) ที่เชื่อมเป็น A-B class กับ S5 ของ B oligomer ที่มี S2, S3 และ S5 อย่างละหนึ่งชุด และ S4 สองชุด (S2-S4-S5-S4-S3) เชื่อมกัน โดย B oligomer ทำหน้าที่ช่วยให้ตัว PT จับ (binding) กับ ciliated cell ของทางเดินหายใจ ส่วน FHA มีโมเลกุลขนาดใหญ่ 367-kDa รูป hairpin-shaped เมื่อเชื้อเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจส่วนบน จะทำหน้าที่เกาะกับ ciliated respiratory epithelium ทำให้ตัวเชื้อไอกรนอยู่ในระบบทางเดิน

หายใจได้⁽²⁾ เชื้อไอกรนมีการเจริญเติบโตและหลัง PT ซึ่งเป็น exotoxin ที่มี Biological activity กระตุ้น lymphocytosis และ pancreatic islet cell activity รวมทั้งเหนี่ยวนำทำให้ไวต่อฮิสตามีนออกมา ในการผลิตวัคซีนของแต่ละบริษัทจะมีความแตกต่างกัน ได้แก่ ความหลากหลายของสายพันธุ์ตัวเชื้อไอกรน วิธีที่ใช้ในการผลิต วิธีการทำให้ PT หมดพิษ (detoxified) กลายเป็น Pertussis Toxoid (PTxd) และปริมาณ PT และ FHA ที่ใช้ผลิตวัคซีน ทำให้วัคซีนมีข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ต่างกัน (product-specific) ส่งผลต่อประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวัคซีนที่ผู้บริโภค จะได้รับการตรวจสอบคุณภาพ ประสิทธิภาพของวัคซีน ไอกรนชนิดไร้เซลล์ก่อนผลิตภัณฑ์ออกสู่ท้องตลาด จึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญและจำเป็นที่ต้องตรวจวิเคราะห์ยืนยันโดยห้องปฏิบัติการภาครัฐ ซึ่งวิธีการตรวจความแรงของวัคซีนทำได้โดยการประเมินการสร้างภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีต่อส่วนประกอบของเชื้อใน วัคซีนจากหนูถีบจักรที่ได้รับวัคซีน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ความแรงวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ ด้วยวิธี Mouse Immunogenicity Test (MIT)
2. เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพ ประสิทธิภาพ ประกอบการขึ้นทะเบียนยา และก่อนการจำหน่ายวัคซีนแต่ละรุ่น

ระเบียบวิธีการวิจัย

วิธีการศึกษา

เริ่มจากการตรวจวิเคราะห์ความแรงหาระดับภูมิคุ้มกันต่อส่วน PT ที่มีอยู่ในวัคซีน โดยทีมวิจัยได้ประสานความร่วมมือกับผู้ผลิตวัคซีนในประเทศในการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สำหรับนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการการควบคุมคุณภาพภาครัฐ โดยวิธีความแรงวัคซีน ไอกรนชนิดไร้เซลล์ ใช้วิธี MIT⁽³⁾ เป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อท็อกซอยด์ (PTxd) จากซีรัมหนูถีบจักร

ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนไอกรน ชนิดไร้เซลล์ โดยใช้เทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (serology in mice)⁽⁴⁾ และได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นตามหลักเกณฑ์ของ ICH Guideline⁽⁵⁾ โดยมีรายการศึกษาความเหมาะสมของวิธีได้แก่ ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ ความจำเพาะ ชีตจำกัดเชิงปริมาณ ความแม่นยำ และความทนของวิธี

สารเคมีและสารมาตรฐาน

In-house PT standard for coating ELISA plate (Bio-net Asia), Secondary antibody: Rabbit anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate Cat. No. ab 6728 (Abcam), KPL SureBlue Reserve™ TMB Microwell Peroxidase Substrate 1-component (SeraCare), Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma Aldrich), Sodium chloride (NaCl), Potassium chloride (KCl), Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), Sodium carbonate (Na_2CO_3), Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3), Tween 20, Hydrochloric acid (HCl) 37%, High-Purity water และ WHO Reference Reagent *Bordetella pertussis* anti-serum (mouse) 1RR NIBSC code: 97/642⁽⁶⁾ (WHO Ref. 97/642), วัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ของผู้ผลิตในประเทศ

การเตรียมสาร

สารมาตรฐาน

ทำการเจือจาง WHO Ref. 97/642 ด้วย Diluent buffer ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156 และ 0.0078 IU/mL

Coating buffer (pH 9.6)

ซึ่ง Na_2CO_3 น้ำหนัก 1.59 กรัม และ NaHCO_3 น้ำหนัก 2.93 กรัม ละลายด้วย High-Purity water ปริมาตร 800 mL ปรับ pH ให้มีค่า 9.6 ด้วย 1N NaOH หรือ 20% HCl แล้วจึงเติม High-Purity water ให้ครบ ปริมาตร 1,000 mL

Phosphate buffer saline (10X PBS)

pH 7.4

ชั่ง NaCl น้ำหนัก 80 กรัม, KCl น้ำหนัก 2 กรัม, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ น้ำหนัก 14.4 กรัม, KH_2PO_4 น้ำหนัก 2.4 กรัม ละลายด้วย High-Purity water ปริมาตร 800 mL ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1N NaOH หรือ 20% HCl แล้วจึงเติม High-Purity water ให้ครบปริมาตร 1,000 mL

Washing buffer (Phosphate buffer saline with the detergent tween 20: (PBST))

ผสม 10X PBS ปริมาตร 200 mL กับ Tween 20 ปริมาตร 1 mL ในขวดแก้วให้เข้ากัน จากนั้นเติม High-Purity water ให้ครบปริมาตร 2,000 mL

Blocking buffer (3% w/v of BSA in PBST)

ชั่ง BSA น้ำหนัก 3 กรัม แล้วนำไปละลายด้วย PBST ปริมาตร 90 mL ใน volumetric flask จน BSA ละลายหมด จากนั้นเติม PBST ให้ครบปริมาตร 100 mL

Diluent buffer (0.3% v/v of BSA in PBST)

ผสม Blocking buffer (3% w/v of BSA in PBST) ปริมาตร 100 mL กับ PBST ปริมาตร 900 mL ในขวดแก้วให้เข้ากัน

Rabbit-anti-mouse IgG HRP conjugate

เจือจาง Rabbit-anti-mouse IgG HRP conjugate ด้วย PBST ในอัตราส่วน 1:20,000

1N HCL

ผสม Hydrochloric acid 37% ปริมาตร 20.73 mL กับ High-Purity water ปริมาตร 229.27 mL ในขวดแก้วให้เข้ากัน

เครื่องมือทดสอบ

Microplate reader รุ่น infinite F200 Pro ผลิตภัณฑ์ของ Tecan ประเทศสวิตเซอร์แลนด์, Microplate wash: ImmunoWash™ 1575 ผลิตภัณฑ์ของ BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (C°) ผลิตภัณฑ์ของ memmert ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

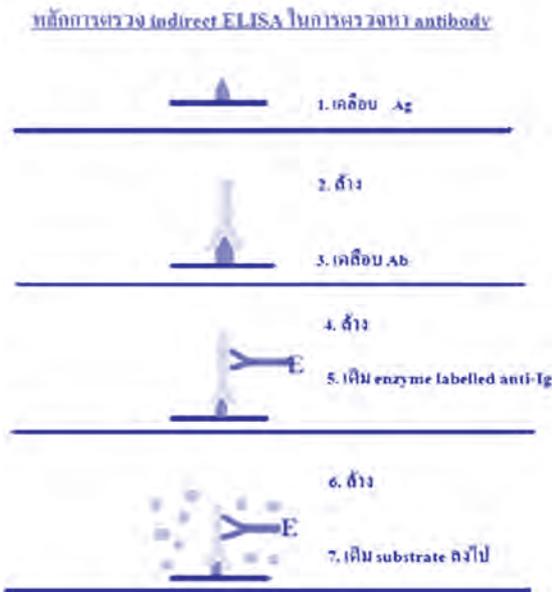
หนูถีบจักร

ใช้หนูถีบจักรอายุ 5 สัปดาห์ กลุ่มละ 16 ตัว จำนวน 3 กลุ่ม สำหรับฉีดวัคซีน กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีน โอเกรนชนิดไรเซลล์ที่ไม่ต้องเจือจาง (undiluted) เป็นกลุ่ม High titer serum กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนโอเกรน ชนิดไรเซลล์ความเจือจาง 1:6.25 เป็นกลุ่ม Medium titer serum และกลุ่มที่ 3 ฉีดวัคซีนโอเกรนชนิดไรเซลล์ ความเจือจาง 1:15.625 เป็นกลุ่ม Low titer serum และใช้หนูถีบจักร กลุ่มละ 10 ตัว จำนวน 1 กลุ่ม ฉีดด้วยตัวทำละลาย เป็นกลุ่มควบคุม (Normal mouse serum) โดยฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal) ตัวละ 0.5 mL หลังจากฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นเวลา 35 วัน ทำการเจาะเลือดจากหัวใจปริมาณตัวละ 1 mL นำเลือดมาปั่นแยกซีรัมแต่ละกลุ่ม เก็บที่อุณหภูมิ -30°C เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์

การทดสอบ

เจือจาง In-house PT standard for coating ELISA plate ให้ได้ความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ด้วย Coating buffer ใส่ลง 96 well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร (μL) นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 2-8°C ไขว้ข้ามคืน ล้าง plate ด้วย Washing buffer 400 μL สามครั้ง ใส่สารละลาย Blocking buffer หลุมละ 150 μL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±2°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate แล้วใส่สารมาตรฐาน (anti-PT antibody, WHO Ref. 97/642) ที่เตรียมไว้ ซีรัมจากหนูกลุ่ม High titer serum, Medium titer serum, Low titer serum และกลุ่มควบคุมหลุมละ 100 μL นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37±2°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate แล้วเติม Rabbit-anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate 100 μL ต่อหลุม นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37±2°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate แล้วใส่ 3,3', 5, 5' - tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase substrate (ready to use) 100 μL ต่อหลุม ทำให้เกิดสีน้ำเงิน จับเวลา 3 นาที แล้วใส่เติม 1N HCL 100 μL ต่อหลุมเพื่อหยุดปฏิกิริยา (ดังรูปที่ 1)

เสร็จแล้วนำไปอ่านด้วย เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ค่าแอนติบอดีที่อ่านได้ ถูกนำมาคำนวณค่าเฉลี่ย (Average) และความแปรปรวน ใน Excel



รูปที่ 1 ขั้นตอนวิธีทดสอบ Indirect ELISA

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method of validation)

ความเป็นเส้นตรง (linearity) : คุณสมบัติที่บอกว่าสัญญาณของเครื่องมือวัดแปรเปลี่ยนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่กำลังศึกษา

ทำการเจือจางสารมาตรฐาน WHO Ref. 97/642 ด้วย diluent buffer จากความเข้มข้น 34000 มิลลิอินเตอร์เนชันแนลยูนิตต่อมิลลิลิตร (mIU/mL) เป็น 4,000 mIU/mL แล้วเจือจางแบบ two folds serial dilution เป็น 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.95 mIU/mL ตามลำดับ และทำซ้ำทั้งหมดรวม 6 ซ้ำต่อความเข้มข้น นำไปทดสอบ Indirect PT ELISA โดยใช้ five parameter model และวิเคราะห์ข้อมูลโดย software ของเครื่อง อ่าน ELISA ประเมินความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแอนติบอดีกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (nm) โดยใช้ความสัมพันธ์ค่าสัมประสิทธิ์

สหสัมพันธ์ (goodness of fit with a coefficient of correlation: r) ต้องมีค่ามากกว่า 0.95 และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นแอนติบอดีจริงกับค่าความเข้มข้นแอนติบอดีที่วัดได้โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination: r^2) ต้องมีค่ามากกว่า 0.95

ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation: LOQ) : ระดับความเข้มข้นต่ำสุดและ

ระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารที่วิธีจะตรวจพบได้ จากการทดสอบความเป็นเส้นตรง สามารถอ่านค่าต่ำของขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (the Lower Limit of Quantification: LLOQ) และค่าสูงของขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (the Upper Limit of Quantification: ULOQ) โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ต่ำสุดและความเข้มข้นของแอนติบอดีที่สูงสุด ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variance: CV) ไม่เกิน 20% และค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (Relative error: RE) ของความเข้มข้นแอนติบอดีมาตรฐานอยู่ระหว่าง 80 ถึง 120% (20% Relative error)

คำนวณได้จาก $RE = [BC-NC]/NC$
โดย BC (Back calculation anti-PT antibody concentration: IU/mL) = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์

NC (Nominal concentration: IU/mL) = ความเข้มข้นสารมาตรฐาน

พิสัย (range) : ช่วงของการใช้งาน ช่วงของความเข้มข้นที่วิธีตรวจวัดสารที่กำลังศึกษาได้ คือ ช่วงระดับความเข้มข้นสูงสุดและต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์นั้นมีค่า linearity, precision และ accuracy อยู่ในเกณฑ์กำหนด

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ สามารถเลือกพิสัยช่วงที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติบอดีที่มีค่าอยู่ระหว่าง LLOQ และ ULOQ มีจำนวนค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานอย่างน้อย 6 ค่า โดยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) ไม่เกิน 15% และค่าความ

คลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (RE) ของความเข้มข้นแอนติบอดีมาตรฐานอยู่ระหว่าง $\pm 15\%$

ความจำเพาะ (specificity) : คุณสมบัติที่บอกว่าวิธีจะไม่ตอบสนองต่อสารอื่นที่ไม่ใช่สารที่กำลังศึกษา ทดสอบหาค่า Anti-PT antibody จำนวนหกกลุ่ม

กลุ่มที่ 1 เป็นซีรัมหนูถีบจักร High titer ความเจือจาง 1X, 4X, 16X, 64X, 256X, 1024X, 4096X และ 16384X

กลุ่มที่ 2 เป็นซีรัมหนูถีบจักร Medium titer ความเจือจาง 1X, 4X, 16X, 64X, 256X, 1024X, 4096X และ 16384X

กลุ่มที่ 3 เป็นซีรัมหนูถีบจักร Low titer ความเจือจาง 1X, 4X, 16X, 64X, 256X, 1024X, 4096X และ 16384X

กลุ่มที่ 4 เป็นซีรัมหนูถีบจักร Normal mouse serum ความเจือจาง 1X, 4X, 16X, 64X, 256X, 1024X, 4096X และ 16384X

กลุ่มที่ 5 เป็น Diluent buffer ความเจือจาง 1X, 4X, 16X, 64X, 256X, 1024X, 4096X และ 16384X

กลุ่มที่ 6 เป็นสารมาตรฐาน WHO Ref. 97/642 ความเจือจาง 64X, 256X, 1024X, 4096X และ 16384X

นำค่าดูดกลืนแสง (Absorbance: OD) แต่ละความเจือจางมาประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง Signal to noise (S/N) ratio กับ Serum dilution ซึ่งจะแสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม โดยซีรัมหนูถีบจักรที่ถูกฉีดยากระตุ้นด้วยวัคซีนควรแสดง response ในระดับสูง ในขณะที่กลุ่มควบคุมแสดง response ในระดับต่ำ และไม่ควรมี response ใน Diluent buffer

ความแม่นยำ (accuracy) : คุณสมบัติที่บอกความใกล้เคียงของค่าที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีกับค่าอ้างอิง ทำการเจือจาง WHO Ref. 97/642 ด้วย diluent buffer จากความเข้มข้น 34000 mIU/mL เป็น 500 mIU/mL แล้วเจือจางแบบ two folds

serial dilution เป็น 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 mIU/mL ตามลำดับ และทำสองซ้ำต่อความเข้มข้นจำนวนสามการทดสอบ นำผลการทดสอบ มาคำนวณค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RE) ของความเข้มข้นแอนติบอดีมาตรฐาน ต้องมีค่าอยู่ระหว่าง $\pm 20\%$

การทดสอบความเที่ยงตรง (precision) : คุณสมบัติที่บอกการกระจายของค่าแต่ละค่าที่วิเคราะห์ได้รอบๆ ค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability)
ทำการทดสอบค่า Anti-PT antibody titer ในตัวอย่างซีรัมหนูถีบจักรกลุ่ม High titer group, Medium titer group, Low titer group และ Normal mouse serum โดยทดสอบในวันและเวลาเดียวกัน อย่างน้อยจำนวนสามการทดสอบ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 20%

การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (reproducibility)
ทำการทดสอบค่า Anti-PT antibody titer ในตัวอย่างซีรัมหนูถีบจักรกลุ่ม High titer group, Medium titer group, Low titer group และ Normal mouse serum โดยทดสอบต่างวันและเวลาเดียวกัน อย่างน้อยสามครั้งๆ ละหนึ่งการทดสอบ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 20%

ความทนของวิธี (robustness) : คุณสมบัติที่บอกความทนของวิธีเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงหรือเบี่ยงเบนสภาวะบางประการไปจากที่กำหนดไว้ หรือหมายถึงคุณสมบัติที่บอกระดับความเที่ยงของผลวิเคราะห์ที่ได้จากการทำซ้ำภายใต้ผู้วิเคราะห์หรือสภาวะที่เปลี่ยนไป

ผู้วิเคราะห์ 2 คน ทำการทดสอบค่า Anti-PT antibody titer ในตัวอย่างซีรัมกลุ่ม High titer group, Medium titer group, Low titer group และ Normal mouse serum โดยทดสอบคนละสามการทดสอบ นำผลที่ได้จากทั้งสองคนมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) กำหนดเกณฑ์ยอมรับไว้ ไม่เกิน 20%

ผลการศึกษา

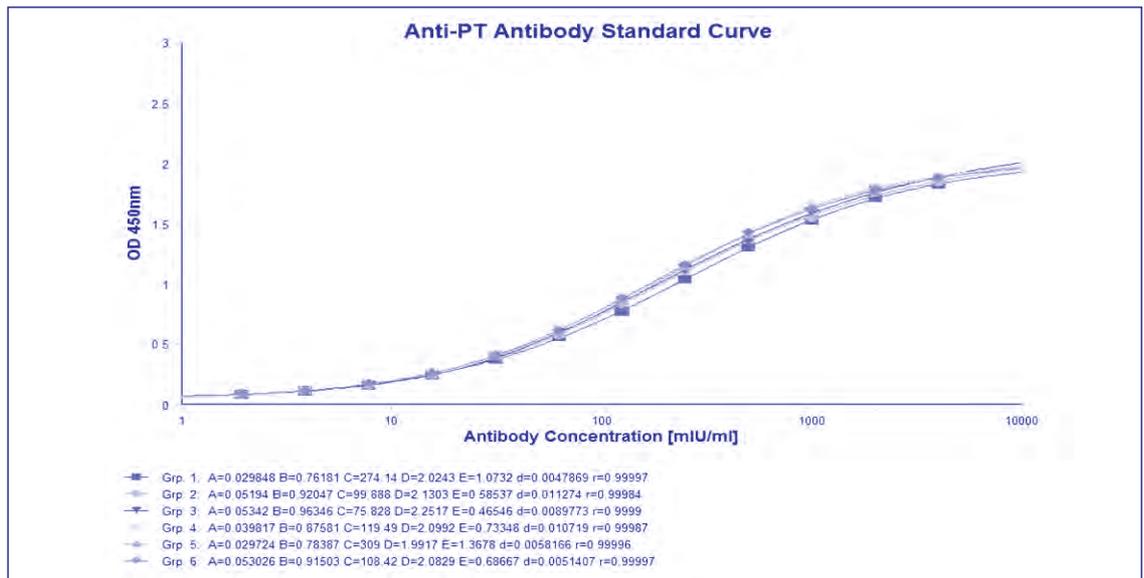
การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)
ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงโดยใช้สาร
มาตรฐาน WHO Ref. 97/642 ที่ความเข้มข้น 4,000,
2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62,
7.81, 3.90, 1.95 mIU/mL จำนวน 6 ซ้ำต่อความเข้มข้น

จากข้อมูล (ดังตารางที่ 1 และ ดังรูปที่ 2) พบว่า
มีค่า goodness of fit with a coefficient of
correlation (r) เฉลี่ยเท่ากับ 0.99993 และมีค่า
a coefficient of determination (r^2) เท่ากับ
0.99987 ดังรูปที่ 3

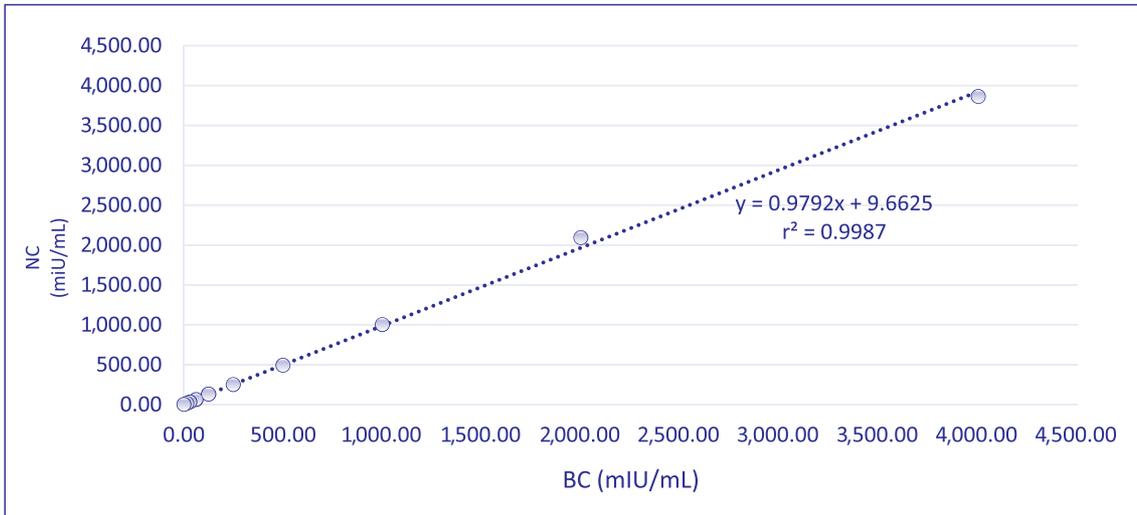
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงด้วยเทคนิค Indirect PT ELISA

No.	Nominal concentration (NC) (mIU/mL)	Back calculation (BC) anti PT antibody centration (mIU/mL)						Average (mIU/mL)	SD	CV	RE
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6				
1	4,000.00	3,968.60	3,765.30	3,785.00	3,753.30	3,832.40	4,071.30	3,862.65	128.95	3.34	-3.43
2	2,000.00	2,023.50	2,272.20	2,125.10	2,072.10	2,068.70	1,996.60	2,093.03	98.28	4.70	4.65
3	1,000.00	991.17	921.78	1035.00	1077.10	1017.40	965.30	1001.29	54.52	5.45	0.13
4	500.00	505.00	501.09	473.00	471.63	488.69	514.92	492.39	17.68	3.59	-1.52
5	250.00	248.90	256.79	247.78	243.68	248.32	249.71	249.20	4.27	1.71	-0.32
6	125.00	122.32	123.84	129.83	129.36	126.99	124.95	126.22	3.03	2.40	0.97
7	62.50	64.80	61.49	61.75	63.49	62.51	61.16	62.54	1.39	2.22	0.06
8	31.25	31.54	32.27	31.30	31.37	32.13	32.10	31.78	0.43	1.36	1.71
9	15.63	15.12	15.04	15.17	14.55	14.53	15.51	14.99	0.38	2.52	-4.13
10	7.81	7.44	7.75	7.92	7.71	7.82	8.05	7.78	0.21	2.65	-0.38
11	3.91	3.85	4.45	3.91	3.94	3.77	3.63	3.93	0.28	7.11	0.39
12	1.95	2.20	1.66	2.05	2.25	2.24	2.00	2.07	0.23	10.92	6.02

Indirect PT ELISA standard plot



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Anti-PT กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm (Linear Relationship of Indirect PT ELISA)



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง nominal anti-PT antibody concentration (NC) แกน Y กับค่า back calculated concentration (BC) แกน X

ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation: LOQ)

ค่า the lower limit of quantification (LLOQ) และ the upper limit of quantification (ULOQ) พิจารณาขีดจำกัดต่ำสุดในการวัดเชิงปริมาณ (LLOQ) และขีดจำกัดสูงสุดในการวัดเชิงปริมาณ (ULOQ) จากข้อมูลตารางที่ 1 ค่า LLOQ และค่า ULOQ เท่ากับ 1.95 mIU/mL (%CV = 10.92, %RE = 6.02) และ 4000 mIU/mL (%CV = 3.34, %RE = -3.43) ตามลำดับ

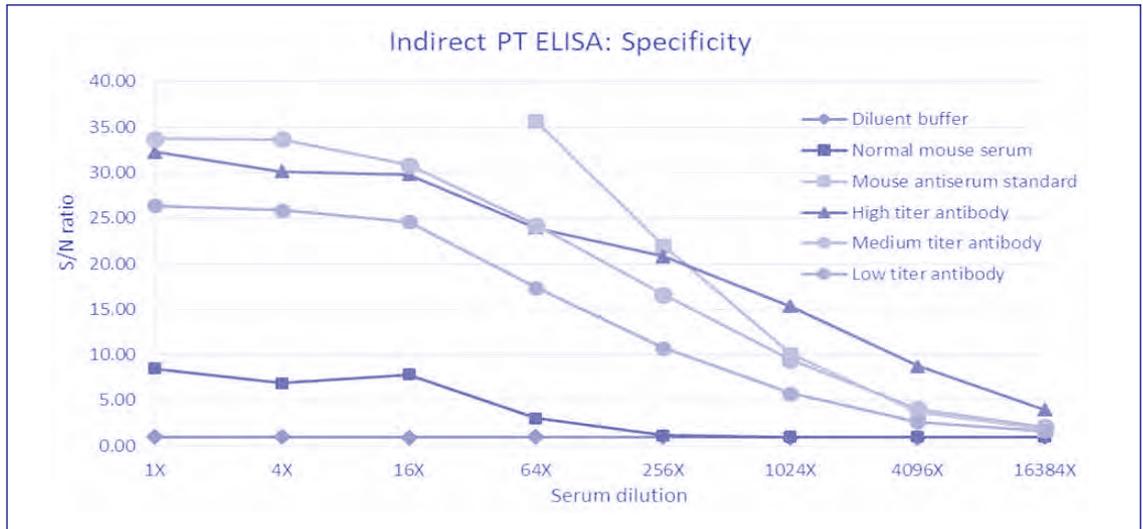
พิสัย (range)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ สามารถเลือกพิสัยช่วงที่เหมาะสม โดยพิจารณาพิสัยจากความเข้มข้นของแอนติบอดีที่มีค่าอยู่ระหว่าง LLOQ และ ULOQ จากข้อมูลตารางที่ 1

ได้ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 7 ค่า คือแอนติบอดีความเข้มข้นที่ 7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 mIU/mL โดยมี %CV เท่ากับ 2.65, 2.52, 1.36, 2.22, 2.40, 1.71 และ 3.59 ตามลำดับ และมีค่า %RE เท่ากับ -0.38, -4.13, 1.71, 0.06, 0.97, -0.32 และ -1.52 ตามลำดับ

ความจำเพาะ (specificity)

ผลการทดสอบหาค่า Anti-PT antibody ซีรัมหนูถีบจักรที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีน (High titer group, Medium titer group, Low titer group) พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง S/N ratio กับ Anti-PT antibody ใน Serum dilution แสดง response ในระดับที่สูงกว่าซีรัมหนูถีบจักรกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน และไม่พบ response ใน diluent buffer ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่าง S/N ratio กับ Anti-PT antibody ใน Serum dilution

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)
 ผลการทดสอบ WHO Ref. 97/642
 ความเข้มข้น 7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250
 และ 500 mIU/mL จำนวน 3 การทดสอบ แสดงค่า

%RE ของ Anti-PT antibody เท่ากับ -1.19, 2.37,
 -1.89, 0.09, 2.10, -2.11, และ 0.14 ตามลำดับ
 ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า Relative Error (RE) ในการทดสอบความแม่นยำของวิธี

Standard Anti-PT IgG antibody (mIU/mL)	Assay 1	Assay 2	Assay 3	Mean	SD	CV	RE
7.81	7.56	7.81	7.79	7.72	0.14	1.82	-1.19
15.63	16.53	15.77	15.70	16.00	0.46	2.90	2.37
31.25	30.04	30.68	31.26	30.66	0.61	2.00	-1.89
62.50	62.93	62.75	61.98	62.56	0.51	0.81	0.09
125.00	126.65	129.55	126.66	127.62	1.67	1.31	2.10
250.00	247.47	238.83	247.84	244.71	5.10	2.08	-2.11
500.00	502.34	513.56	486.24	500.71	13.73	2.74	0.14

การทดสอบความเที่ยง (precision)
การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability)
 จากการทดสอบค่า Anti-PT antibody titer
 ในตัวอย่างซีรัมกลุ่ม High titer, Medium titer,

Low titer และกลุ่มควบคุม ในวันและเวลาเดียวกัน
 อย่างน้อยจำนวนสามการทดสอบ ได้ %CV เท่ากับ
 5.57, 11.51, 7.81 และ 4.46 ตามลำดับ

การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (reproducibility)

จากการทดสอบค่า Anti-PT antibody titer ในตัวอย่างซีรัมกลุ่ม High titer, Medium titer, Low titer และกลุ่มควบคุม ต่างวัน และเวลา กัน จำนวนสามการทดสอบ ได้ %CV เท่ากับ 10.97, 7.53, 8.77 และ 17.23 ตามลำดับ

การทดสอบความทนของวิธี (robustness)

ผลการทดสอบจากผู้วิเคราะห์สองคน ได้ค่า Anti-PT antibody titer ในตัวอย่างซีรัมกลุ่ม High titer, Medium titer, Low titer และกลุ่มควบคุม คนละสามการทดสอบ ได้ค่า %CV เท่ากับ 7.62, 6.47, 9.08 และ 18.93 ตามลำดับ

อภิปรายผล

จากผลการทดสอบในทุกพารามิเตอร์มีผลเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของแต่ละพารามิเตอร์แสดงให้เห็นว่า วิธีตรวจวิเคราะห์ความแรงวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ด้วยวิธี Mouse Immunogenicity Test (MIT) ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องเหมาะสมสามารถนำมาใช้ควบคุมคุณภาพความแรงวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ โดยใช้เทคนิค indirect ELISA ในการตรวจประเมินระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีในซีรัมหนูถีบจักรที่ได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ที่มี PT เป็นส่วนประกอบ เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความแม่นยำสามารถจำแนกระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีในซีรัมหนูถีบจักรโดยผลการทดสอบความจำเพาะแสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีในซีรัมหนูถีบจักรที่ได้รับการกระตุ้นด้วยวัคซีนสูงกว่าในซีรัมหนูถีบจักรที่ได้รับการฉีดด้วยตัวทำลาย

ผู้วิจัยใช้ วิธี MIT เป็นวิธีทาง serological หาค่าระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีตามข้อกำหนดของตำรายายุโรป⁽⁴⁾ ซึ่งเป็นวิธีเดียวกับผู้ผลิตวัคซีน Tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, Recombinant acellular pertussis vaccine (Tdap)

โดยวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ที่นำมารวมเป็นวัคซีนรวมนี้ ผลิตในประเทศ เป็นชนิดรีคอมบิแนนท์ ซึ่งเป็นวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ตัวแรกที่ได้พัฒนาขึ้นโดยนักวิจัยไทย การควบคุมคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ด้านความแรงใช้วิธี MIT เนื่องจากเป็นวิธีที่จำเพาะต่อผลิตภัณฑ์ โดยผู้วิจัยและผู้ผลิตวัคซีนใช้สารมาตรฐานชนิดเดียวกัน ใช้สัตว์ทดลองคือหนูถีบจักรที่มีสายพันธุ์ และแหล่งขยายพันธุ์สัตว์ทดลองมาจากแหล่งเดียวกัน ปัจจัยสิ่งแวดล้อมของการทดสอบคล้ายกัน ส่งผลให้ลดปัญหาการตัดสินใจในกรณีใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ต่างกัน ผลการวิจัยที่ได้มีความสอดคล้องเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีจากผู้ผลิต ส่วนความต่างกันระหว่างผู้ผลิตกับผู้วิจัยคือจำนวนระดับความเจือจางของวัคซีนที่นำไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักร โดยผู้ผลิตวัคซีนใช้การกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรจำนวนสี่ความเจือจาง (1:1, 1:2.5, 1:6.25 และ 1:15.625) ส่วนทางผู้วิจัยใช้วัคซีนกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรจำนวนสามความเจือจาง (1:1, 1:6.25 และ 1:15.625) แต่ใช้ความเจือจางความเข้มข้นหัวและท้าย คือ 1:1 และ 1:15.625 เช่นเดียวกับกับทางผู้ผลิต เนื่องจากข้อจำกัดทางจำนวนสัตว์ทดลอง บุคลากร และงบประมาณที่ใช้ในการทดสอบ รวมทั้งข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลกที่ระบุไว้ว่าสามารถใช้ความเจือจางที่เหมาะสมหนึ่งความเจือจางในการทดสอบ⁽³⁾ โดยยังคงให้ความเชื่อมั่นเช่นเดิม

การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ความแรงต่อ PT ในวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ด้วยวิธี Mouse Immunogenicity test นี้สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ความแรงต่อแอนติเจนอื่นในวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ได้ รวมถึงการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาระดับภูมิคุ้มกันจากวัคซีนชนิดอื่นหรือระดับภูมิคุ้มกันจากมนุษย์ที่ได้รับวัคซีนชนิดต่างๆ

สรุปผล

วิธีการตรวจวิเคราะห์ความแรงวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Anti-PT antibody titer determination) ด้วยวิธี Mouse Immunogenicity Test (MIT) ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Antibody ต่อ PT ในวัคซีนป้องกันโรคไอกรนชนิดไร้เซลล์ได้อย่างเหมาะสม สามารถใช้ทดสอบเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาและการขอรับรองรุ่นการผลิตก่อนที่วัคซีนจะจำหน่าย เมื่อนำมาทดสอบความแรง (Anti-PT antibody titer determination) วัคซีน TdaP ที่ผลิตในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2559, 2560, 2561 และ 2562 มีค่าความแรงเป็นไปตามข้อกำหนดเช่นเดียวกับผลของผู้ผลิต และข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์ยืนยันคุณภาพวัคซีน TdaP ที่ผลิตในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่เป็นผู้สนับสนุนงบประมาณ และขอขอบคุณ บริษัทไบโอเนท เอเชีย จำกัด ในการจัดหา Antigen-PT และข้อเสนอแนะ

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคปี 2556. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี:มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา;2556
2. Stanley A. Plotkin, Water A. Orenstein and Paul A. Offit. Vaccine 6TH Edition, Philadelphia, PA: Elsevier, 2013: 449-50
3. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series No. 979; 2013: 205-206, 241-4.
4. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. European pharmacopoeia 8.0: Assay of pertussis vaccine (acellular). Nördlingen: Druckerei; 2014: 252-5.
5. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Geneva: ICH Steering Committee; Nov 2005
6. R.G. Das, D. Xing, P. Newland and MJ Corbel. International collaborative Study: Evaluation of Proposed International Reference Reagent of Pertussis Antiserum Mouse) 97/642 Biologicals (2001) 29,137-48.