



การตรวจวิเคราะห์ระดับการดูดซับของท็อกซอยด์เชื้อคอตีบและเชื้อบาดทะยัก ในวัคซีนรวมด้วยเทคนิค Sandwich ELISA

อภิชัย ศุภสารสาทร¹ สุภาภรณ์ ชุมพล¹ กนกพร ฤทธิธรรม¹ วิริยามาศย์ เจริญคุณธรรม¹ สุภาพร ภูมิอมร¹

¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี

ที่อยู่ติดต่อ: อภิชัย ศุภสารสาทร สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
apichai.s@dmisc.mail.go.th

Determination of Degree Adsorption of Diphtheria and Tetanus Toxoid in Vaccine by Using Sandwich ELISA

Apichai Supasansatorn¹, Supaporn Chumpol¹, Kanokphon Ritthitham¹, Wereyamarst Jaroenkunathum¹,
Supaporn Phumiamorn¹

¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand

Contact address: Apichai Supasansatorn, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences,
Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, apichai.s@dmisc.mail.go.th

Received: 18 September 2020, **Revised:** 7 December 2020, **Accepted:** 19 January 2021

Abstract

Background: Diphtheria and Tetanus are able to prevent as a combined vaccine that containing Diphtheria Toxoid (DT) and Tetanus Toxoid (TT) that are adsorbed on aluminum gel to boost the immune response. Therefore, the adsorption level of toxoids must be controlled according to the product specifications in order to ensure vaccine quality. The determination of degree adsorption of DT and TT in the combined vaccine was conducted by a Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique which was performed to be used as an analytical method.

Objectives: To be used as the determination of degree adsorption of Diphtheria Toxoid and Tetanus Toxoid in combined vaccine.

Methods: Validation method study of analyzing the adsorption level of DT and TT in combined vaccines by using Sandwich ELISA technique in parameters of accuracy, precision, robustness, specificity, linearity, Limits of Quantification (LOQ), and range.

Results: The results showed that the accuracy, precision, and robustness met the acceptance criteria. The specificity result of the method was compliance with the standard. The linearity yielded the correlation coefficient (r) greater than 0.99. The LOQ ranged from 1.72 to 880

mLf/mL for DT and 0.07 to 550 mLf/mL for TT. The range of DT concentrations was between 3.44 and 110 mLf/mL, while the range of TT concentrations was between 1.08 and 34.50 mLf/mL.

Conclusions: This assay was appropriate to be adopted as a nation standard method. The average adsorption degree of DT and TT from four lots of vaccines manufactured in 2019–2020 were more than 90%, and in accordance with product specifications.

Keywords: degree adsorption, diphtheria toxoid, tetanus toxoid, sandwich ELISA

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: โรคคอตีบและบาดทะยักสามารถป้องกันด้วยวัคซีนรวมที่มีท็อกซอยด์เชื้อคอตีบ (Diphtheria Toxoid: DT) และท็อกซอยด์เชื้อบาดทะยัก (Tetanus Toxoid: TT) เป็นองค์ประกอบจะถูกดูดซับบนอลูมิเนียมเจล ซึ่งทำหน้าที่เสริมการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จึงต้องมีการควบคุมระดับการดูดซับให้ได้ตามข้อกำหนดมาตรฐานของวัคซีน เพื่อการควบคุมคุณภาพ

วัตถุประสงค์: เพื่อใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับการดูดซับของท็อกซอยด์เชื้อคอตีบ และท็อกซอยด์เชื้อบาดทะยัก ในวัคซีนรวม

วิธีการวิจัย: ศึกษาความถูกต้องของวิเคราะห์ระดับการดูดซับของท็อกซอยด์เชื้อคอตีบ และท็อกซอยด์เชื้อบาดทะยักในวัคซีนรวมด้วยเทคนิค Sandwich ELISA ในพารามิเตอร์ ความแม่นยำ ความเที่ยง ความทน ความจำเพาะ ความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดต่ำสุดและสูงสุด และพิสัย

ผลการศึกษา: ค่าความแม่นยำ ความเที่ยงและความทนของวิธี ผ่านเกณฑ์การทดสอบ มีความจำเพาะ และความเป็นเส้นตรงของ DT และ TT มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.99 พบ DT มีขีดจำกัดต่ำสุดและสูงสุด (Limits of Quantification: LOQ) เท่ากับ 1.72 และ 880 mLf (Limit of Flocculation)/mL ช่วงค่าพิสัยอยู่ระหว่าง 3.44–110 mLf/mL ขณะที่ค่า LOQ ของการตรวจ TT เท่ากับ 0.07 และ 550 mLf/mL ช่วงค่าพิสัยอยู่ระหว่าง 1.08–34.50 mLf/mL

สรุป: วิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับการดูดซับของท็อกซอยด์เชื้อคอตีบ และบาดทะยักในวัคซีนรวม ด้วย sandwich ELISA มีความถูกต้องเหมาะสมที่นำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศ เมื่อนำมาดำเนินการตรวจวิเคราะห์ระดับการดูดซับของ DT และ TT ตัวอย่างวัคซีนรวมคอตีบ บาดทะยักในปี พ.ศ. 2562 และ 2563 รวมจำนวน 4 รุ่นการผลิต พบว่ามีระดับการดูดซับของ DT และ TT มากกว่าร้อยละ 90 เป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์

คำสำคัญ: ระดับการดูดซับ ท็อกซอยด์เชื้อคอตีบ ท็อกซอยด์เชื้อบาดทะยัก Sandwich ELISA

บทนำ

โรคคอตีบ (diphtheria) เป็นโรคที่เกิดจากติดเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium diphtheria* โดยการหายใจเอาละอองอากาศจากผู้ป่วยหรือผู้ที่เป็นพาหะของเชื้อ ผู้ป่วยมีอาการติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนบน มีไข้หากเป็นรุนแรงจะมีการเจ็บคอ เกิดการเน่าตายของเซลล์เยื่อผิวและเนื้อเยื่อในบริเวณที่ติดเชื้อเป็นแผ่นสีเทา (pseudo membrane) ที่คอดหอยซึ่งอาจอุดกั้นทางหายใจและทำให้เกิดอาการไอเสียงก้อง ส่วนโรคบาดทะยัก (tetanus) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium tetani* เข้าสู่ร่างกายทางบาดแผลที่สัมผัสกับเชื้อ ส่วนในเด็กแรกเกิดจะเกิดจากการตัดสายสะดือที่ไม่สะอาดและมารดาไม่มีภูมิคุ้มกันต่อสารพิษของเชื้อ โดยตัวเชื้อจะสร้างสารพิษ tetanus toxin ยับยั้งการทำงานของเซลล์เส้นประสาทส่วนปลาย ทำให้เกิดอัมพาตของกล้ามเนื้อโดยมีอาการขาเกร็งเกร็งแข็ง อ้าปากไม่ได้ มีคอแข็ง¹ ซึ่งโรคติดเชื้อจากคอตีบและบาดทะยักสามารถป้องกันด้วยวัคซีน

วัคซีนคอตีบและบาดทะยักเป็นวัคซีนเชื้อตายประกอบด้วยท็อกซอยด์จากเชื้อคอตีบและท็อกซอยด์จากเชื้อบาดทะยัก มีอะลูมิเนียมเจลเป็นสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) เป็นวัคซีนรวมป้องกันโรคคอตีบ-บาดทะยัก (dT, DT) และรวมวัคซีนอื่นได้แก่ วัคซีนรวมป้องกันโรคคอตีบ-บาดทะยัก-ไอกรน (DTP) วัคซีนรวมคอตีบ-บาดทะยัก-ไอกรน-ตับอักเสบบี (DTP-HB) และวัคซีนรวมคอตีบ-บาดทะยัก-ไอกรน-ไวรัสตับอักเสบบี และเชื้ออีโชมพิลลัส อินฟลูเอนเซ ชนิดบี (DTP-HB-Hib) โดย DTP เป็นวัคซีนที่ใช้ในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520 และนำวัคซีน dT เข้ามาใช้เมื่อปี พ.ศ. 2525 ใช้เพื่อสร้างเสริมภูมิคุ้มกันปฐมภูมิ และเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังจากการวัคซีนมาแล้ว² โดยวัคซีนที่จะนำไปใช้ต้องได้รับการขึ้นทะเบียนตำรับและผ่านกระบวนการรับรองรุ่นการผลิตก่อนการจำหน่ายในท้องตลาด

วัคซีนรวมที่มี diphtheria และ tetanus มีการควบคุมคุณภาพด้านความแรง ความปลอดภัย

และคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ วัคซีนแต่ละรุ่นต้องได้รับการตรวจสอบคุณภาพ ประสิทธิภาพทุกขั้นตอนการผลิต การตรวจวิเคราะห์ระดับการดูดซับของท็อกซอยด์เชื้อคอตีบ (Diphtheria Toxoid: DT) และท็อกซอยด์เชื้อบาดทะยัก (Tetanus Toxoid: TT) ในวัคซีนรวมด้วยเทคนิค Sandwich ELISA เป็นวิธีที่ใช้ควบคุมคุณภาพ ความสม่ำเสมอของวัคซีนที่มี diphtheria และ tetanus เป็นองค์ประกอบ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับการดูดซับของท็อกซอยด์เชื้อคอตีบและท็อกซอยด์เชื้อบาดทะยักในวัคซีนรวมด้วยเทคนิค Sandwich ELISA
2. เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพ ประสิทธิภาพ ประกอบการขึ้นทะเบียนยา และก่อนการจำหน่ายวัคซีนแต่ละรุ่น

ระเบียบวิธีการวิจัย

วิธีการวิจัย

การวิเคราะห์ระดับการดูดซับ (degree of adsorption) ของ DT และ TT ในวัคซีน เป็นการวิเคราะห์ระดับการดูดซับของแอนติเจนกับสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) โดยคำนวณเป็นค่าร้อยละการดูดซับของแอนติเจนในวัคซีนระหว่างแอนติเจนทั้งหมด (total antigen) และแอนติเจนที่ไม่ถูกดูดซับด้วยสารเสริมฤทธิ์ (non-adsorbed antigen) โดยการวิเคราะห์ปริมาณ total antigen นำตัวอย่างวัคซีนมา desorb เพื่อให้แอนติเจนถูกแยกออกจาก adjuvant ด้วยสาร desorption solution ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณ non-adsorbed antigen จะไม่มีการเติม desorption solution ลงในตัวอย่างวัคซีน เพื่อให้ทราบว่าแอนติเจนที่ไม่ถูกดูดซับด้วย adjuvant จะหลงเหลืออยู่ในตัวอย่างวัคซีนในปริมาณมากน้อยเพียงใด

หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนด้วยวิธี Sandwich ELISA ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาการจับ

อย่างจำเพาะของแอนติเจนต่อแอนติบอดี โดยเติม coating antibody (mouse monoclonal antibody to diphtheria toxin or Mouse monoclonal antibody to tetanus toxin) ที่จำเพาะต่อแอนติเจน เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม แล้วเติมตัวอย่างวัคซีนที่ต้องการ ทดสอบลงในเพลทที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นเติม detection antibody (rabbit polyclonal antibody to diphtheria toxin or rabbit polyclonal antibody to tetanus toxin) และใช้การตรวจติดตามปฏิกิริยาด้วย secondary antibody (goat polyclonal secondary antibody to Rabbit IgG (H+L) HRP conjugated) หากตัวอย่างมีแอนติเจน ที่ต้องการทดสอบ เมื่อเติม substrate solution, Tetramethylbenzidine (TMB) แล้ว TMB จะถูกย่อย ด้วยเอนไซม์ HRP จะเกิดสารสีน้ำเงิน และเติม stop solution (1N HCl) เพื่อหยุดปฏิกิริยา ซึ่งจะทำให้ สารสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีเหลือง นำเพลททดสอบ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 450 nm ($OD_{450\text{ nm}}$) ด้วยโปรแกรม Tecan, Magellan ของ เครื่อง ELISA reader

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: AR grade, Sodium chloride (NaCl), Potassium chloride (KCl), Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), Potassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4), Sodium carbonate (Na_2CO_3), Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$), Tri-sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7$), Tween 20, Hydrochloric acid (HCl) 37%, Bovine Serum Albumin (BSA) (Cat. No. A3059, Sigma Aldrich), Mouse monoclonal antibody to Diphtheria toxin (Cat. No. Ab51882, Abcam), Rabbit polyclonal antibody to Diphtheria toxin (Cat. No. Ab53828, Abcam), Goat polyclonal secondary antibody to Rabbit IgG (H+L) HRP conjugated (Cat. No. Ab6721, Abcam), SureBlue Reserve™ (Cat. No. 5120-0080, TMB Microwell Peroxidase Substrate 1-component, KPL), WHO International

Standard 2nd International Standard for Diphtheria Toxoid (Code: 02/176, NIBSC) และ WHO International standard for Tetanus Toxoid (NIBSC Code: 04/150, NIBSC)

การเตรียมสาร

สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน WHO International Standard 2nd International Standard for Diphtheria Toxoid (Code: 02/176, NIBSC) ทำการเจือจางให้ได้ 6 ความเข้มข้นด้วย diluent buffer ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 3.44, 6.88, 13.75, 27.50, 55.00 และ 110.00 mLf/mL เพื่อใช้สำหรับ เป็นกราฟมาตรฐานในการคำนวณปริมาณแอนติเจน DT ในตัวอย่างวัคซีน ในขณะที่สารมาตรฐาน WHO International standard for Tetanus Toxoid (NIBSC Code: 04/150, NIBSC) ทำการเจือจางให้ได้ 6 ความเข้มข้นด้วย diluent buffer ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 1.08, 2.16, 4.31, 8.63, 17.25 และ 34.50 mLf/mL เพื่อใช้สำหรับเป็นกราฟมาตรฐาน ในการคำนวณหาปริมาณแอนติเจน TT ในตัวอย่าง วัคซีน

Coating buffer (pH 9.6)

ชั่ง Na_2CO_3 น้ำหนัก 1.59 g. และ $NaHCO_3$ น้ำหนัก 2.93 g. ละลายด้วย high-purity water ปริมาตร 800 mL ปรับ pH ให้มีค่า 9.6 ด้วย 1N NaOH หรือ 20% HCl แล้วจึงเติม high-purity water ให้ครบปริมาตร 1,000 mL

Phosphate buffer saline (10X PBS) pH 7.4

ชั่ง NaCl น้ำหนัก 80 g., KCl น้ำหนัก 2 g., $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ น้ำหนัก 14.4 g., KH_2PO_4 น้ำหนัก 2.4 g. ละลายด้วย High-Purity water ปริมาตร 800 mL ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1N NaOH หรือ 20% HCl แล้วจึงเติม High-Purity water ให้ครบ ปริมาตร 1000 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 2000 mL

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

ชั่ง BSA น้ำหนัก 3 g. 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: 20000

1N HCl

ผสม HCl 37% ปริมาตร 20.73 mL กับ High-Purity water ปริมาณ 229.27 mL ในขวดแก้วให้เข้ากัน

การเตรียมตัวอย่างวัคซีน

Tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and recombinant acellular pertussis vaccine (Tdap) รุ่นการผลิตที่ 6005A ทำการเตรียมตัวอย่างวัคซีน โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วน total antigen และ non-adsorbed antigen สำหรับตัวอย่างส่วน total antigen เตรียมได้จากการเติม desorption solution (20% (w/v) trisodium citrate in 2XPBST) ลงในตัวอย่างวัคซีนในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มในตู้บ่มควบคุมที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16–20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (supernatant) ในขณะทำการเตรียมตัวอย่างส่วน non-adsorbed antigen ให้นำตัวอย่างวัคซีน บ่มในตู้บ่มควบคุมที่อุณหภูมิเป็นเวลา 16–20 ชั่วโมง โดยไม่ต้องเติม

desorption solution เมื่อครบเวลาจึงปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (supernatant) เพื่อนำมาใช้สำหรับการทดสอบ

เครื่องมือทดสอบ

Microplate reader รุ่น infinite F200 Pro ผลิตภัณฑ์ของ Tecan ประเทศสวิตเซอร์แลนด์, Microplate wash: ImmunoWash™ 1575 ผลิตภัณฑ์ของ BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ผลิตภัณฑ์ของ Memmert ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

การทดสอบ

การเจือจางความเข้มข้นตัวอย่างวัคซีนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับการทดสอบระดับการดูดซับของแอนติเจน DT ทำการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนในส่วน total antigen ทำการเจือจางความเข้มข้นตัวอย่างจำนวน 4 dilutions คือ 1/50, 1/100, 1/200 และ 1/400 ซึ่งเจือจางแบบ two-fold serial dilution ด้วย diluent buffer ในขณะที่การวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนในส่วน non-adsorbed antigen จะทำการเจือจางความเข้มข้นตัวอย่างจำนวน 4 dilutions คือ 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 ซึ่งเจือจางแบบ two-fold serial dilution ด้วย diluent buffer สำหรับการทดสอบหาระดับการดูดซับของแอนติเจน TT ทำการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนในส่วน Total antigen ทำการเจือจางความเข้มข้นตัวอย่างจำนวน 4 dilutions คือ 1/200, 1/400, 1/800 และ 1/1,600 ซึ่งเจือจางแบบ two-fold serial dilution ด้วย diluent buffer ในขณะที่การวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนในส่วน non-adsorbed antigen เตรียมการเจือจางความเข้มข้นตัวอย่างจำนวน 4 dilutions คือ 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 ซึ่งปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดสอบระดับการดูดซับของแอนติเจน DT

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ระดับการดูดซับของ DT และ TT ในวัคซีนรวมด้วยวิธี Sandwich ELISA

เคลือบเพลททดสอบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะสำหรับการทดสอบระดับการดูดซับของแอนติเจน DT ทำการเคลือบเพลททดสอบด้วย mouse mAb to Diphtheria toxin (Cat No. Ab51882, Abcam) เจือจางความเข้มข้นที่ 1/700 เติมหลุมละ 100 μ L ลงใน 96 wells plate (Nunc MaxiSorp™ flat-bottom, Thermo Fisher Scientific Inc.) และสำหรับการทดสอบระดับการดูดซับของแอนติเจน TT ทำการเคลือบเพลททดสอบด้วย mouse mAb to Tetanus toxin (Cat no. Ab26247, Abcam) เจือจางความเข้มข้นที่ 1/5,000 เติมหลุมละ 100 μ L ลงใน 96 wells plate แล้วจึงปิดเพลทด้วยแผ่น plate sealer แล้วนำเพลททดสอบเก็บไว้ที่ตู้เย็น อุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเพลททดสอบออกจากตู้เย็น แล้วล้างด้วย washing buffer หลุมละ 300 μ L จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Microplate washer แล้วเติม blocking buffer หลุมละ 150 μ L จากนั้นปิดเพลทด้วยแผ่น plate sealer และบ่มในตู้บ่มควบคุมที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการล้างด้วย washing buffer หลังจากนั้นเติมสารมาตรฐาน WHO International Standard 2nd International Standard for Diphtheria Toxoid (Code: 02/176, NIBSC) ที่ทำการเจือจางความเข้มข้น 3.44, 6.88, 13.75, 27.50, 55.00 และ 110.00 mLf/mL เติมลงในเพลททดสอบปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม

สำหรับการทดสอบของแอนติเจน TT เติมสารมาตรฐาน WHO International standard for Tetanus Toxoid (NIBSC Code: 04/150, NIBSC) ทำการเจือจางความเข้มข้น 1.08, 2.16, 4.31, 8.63, 17.25 และ 34.50 mLf/mL เติมลงในเพลททดสอบปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม ถัดมาเติมตัวอย่างวัคซีนที่เจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสมดังคำอธิบายข้างต้น ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม และเติม blank (diluent buffer) ปริมาตร 100 μ L จากนั้นปิดเพลทด้วย plate sealer แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเพลทล้างด้วย washing

buffer หลังจากนั้นสำหรับเพลททดสอบของแอนติเจน DT เติม Rabbit polyclonal antibody to Diphtheria toxin (Cat. No. Ab53828, Abcam) เจือจางความเข้มข้นที่ 1/7,000 หลุมละ 100 μ L ในขณะที่เพลททดสอบของแอนติเจน TT เติม Rabbit polyclonal antibody to Tetanus Toxin (Cat. No. Ab53829, Abcam) เจือจางความเข้มข้นที่ 1/3,000 หลุมละ 100 μ L และบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเพลทด้วย washing buffer และทิ้งเพลททดสอบแอนติเจน DT และ TT เติม Goat-polyclonal secondary antibody to rabbit IgG (H+L) HRP conjugated (Cat no. Ab6721, Abcam) ด้วยระดับการเจือจางความเข้มข้น 1/70,000 หลุมละ 100 μ L และบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเพลทด้วย washing buffer และเติม TMB substrate หลุมละ 100 μ L แต่ละแถวหยุดห่างกัน 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้องและป้องกันแสง เป็นเวลา 3.50-4.00 นาที แล้วจึงเติม Stop solution (1N HCl) หลุมละ 100 μ L เพื่อหยุดปฏิกิริยา ทำการอ่านค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่นแสง 450 nm ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

การคำนวณค่าระดับการดูดซับของ DT และ TT ในวัคซีน (degree of adsorption)

โปรแกรม Tecan, Magellam™ ของเครื่อง ELISA reader จะนำค่า OD ของตัวอย่าง เทียบกับค่า OD ของสารมาตรฐาน และคำนวณค่าเป็นปริมาณแอนติเจนที่วัดได้ และนำมาวิเคราะห์ระดับการดูดซับของแอนติเจนด้วยการใช้สมการดังนี้ $\text{degree of adsorption (\%)} = [(\text{total antigen content} - \text{non adsorbed antigen}) / \text{total antigen content}] \times 100$

โดย total antigen content คือ ปริมาณแอนติเจนทั้งหมดที่ได้จากตัวอย่างวัคซีนในส่วนที่ถูก desorbed ด้วย desorption solution และ non-adsorbed antigen content คือ ปริมาณแอนติเจนที่ได้จากตัวอย่างวัคซีนที่ไม่ผ่านการ desorbed

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (method validation)³

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

ทำการเจือจางสารมาตรฐาน WHO International Standard 2nd for Diphtheria Toxoid (Code: 02/176, NIBSC) โดยกำหนดความเข้มข้น 16 จุดความเข้มข้น (nominal concentration) ได้แก่ 0.05, 0.11, 0.21, 0.43, 0.86, 1.72, 3.44, 6.88, 13.75, 27.50, 55.00, 110.00, 220.00, 440.00, 880.00 และ 1,760.00 mLf/mL โดยมีการเจือจางแบบ Two-fold serial dilution และเตรียม 6 ชุดการทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน ซึ่งปฏิบัติเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน WHO International standard for Tetanus Toxoid (NIBSC Code: 04/150, NIBSC) โดยกำหนดความเข้มข้น 16 จุดความเข้มข้น (nominal concentration) ได้แก่ 0.03, 0.07, 0.13, 0.27, 0.54, 1.08, 2.16, 4.31, 8.63, 17.25, 34.50, 69.00, 138.00, 276.00, 552.00 และ 1,104.00 mLf/mL แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Sandwich ELISA และอ่านผลที่ OD_{450 nm} เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแอนติเจนกับค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ความสมรูปค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (goodness of fit with a coefficient of correlation (r)) ต้องมีค่ามากกว่า 0.95 และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นแอนติเจนจริงกับค่าความเข้มข้นแอนติเจนที่วัดได้ โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination (r^2)) ต้องมีค่ามากกว่า 0.95

ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation: LOQ)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรง สามารถอ่านค่าต่ำของขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Lower limit of quantification: LLOQ) และค่าสูงของขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Upper limit of quantification: ULOQ) โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติเจนที่ต่ำสุดและที่สูงสุด ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20%

และค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%relative error: %RE) ของความเข้มข้นแอนติเจนมาตรฐานอยู่ระหว่าง $\pm 20\%$ โดย %RE คำนวณได้จาก $\%RE = 100 \times (BC-NC)/NC$, BC คือ ความเข้มข้นที่คำนวณได้ และ NC คือ ความเข้มข้นจริง

พิสัย (range)

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ สามารถเลือกพิสัยช่วงที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติเจนที่มีค่าอยู่ระหว่าง LLOQ และ ULOQ มีจำนวนค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานอย่างน้อย 6 ค่า โดยค่า %CV ไม่เกิน 15% และค่า %RE ของความเข้มข้นแอนติเจนมาตรฐานอยู่ระหว่าง $\pm 15\%$

การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

เป็นการทดสอบหาปริมาณแอนติเจนจำเพาะในตัวอย่างแต่ละชนิด เพื่อทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ โดยทดสอบกับตัวอย่าง ดังนี้

- ตัวอย่างวัคซีน Tdap เจือจางความเข้มข้นที่ 1/200, 1/400, 1/800 ด้วยการเจือจางแบบ Two-fold serial dilution ซึ่งคิดเป็น 125, 62.5, และ 31.25 mLf/mL

- สารมาตรฐาน WHO International Standard 2nd International Standard for Diphtheria Toxoid (Code: 02/176, NIBSC) เจือจางความเข้มข้นที่ 12.5, 25, 50 และ 100 mLf/mL

- สารมาตรฐาน WHO International standard for Tetanus Toxoid (Code: 04/150, NIBSC) เจือจางความเข้มข้นที่ 12.5, 25, 50 และ 100 mLf/mL

- In-house PT standard (Bio-net Asia) เจือจางความเข้มข้นที่ 12.5, 25, 50 และ 100 ng/mL

- In-house FHA standard (Bio-net Asia) เจือจางความเข้มข้นที่ 12.5, 25, 50 และ 100 ng/mL

- DT standard (NIBSC Code: 02/176) เจือจางความเข้มข้นที่ 12.5, 25, 50 และ 100 mLf/mL

- TT standard (NIBSC Code: 04/150) เจือจางความเข้มข้นที่ 12.5, 25, 50 และ 100 mLf/mL

นำค่าดูดกลืนแสง (OD) แต่ละความเจือจาง มาประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง the specific signal to noise (S/N) ratio กับความเข้มข้นของแอนติเจนมาตรฐาน โดยตัวอย่างวัคซีนในแต่ละความเจือจาง จะแสดงค่า S/N ratio ซึ่งแปรผันตรงกับปริมาณแอนติเจนที่เพิ่มขึ้น และไม่ควรมี response ใน Diluent buffer

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

เป็นการทดสอบความแม่นยำในการหาปริมาณแอนติเจน DT โดยทำการเจือจางความเข้มข้นสารมาตรฐาน WHO International Standard 2nd International Standard for Diphtheria Toxoid (Code: 02/176, NIBSC) ด้วย diluent buffer ให้เท่ากับ 200, 500 และ 1,000 mLf/mL แล้วจึง spiked สารมาตรฐานที่เตรียมไว้ ลงในตัวอย่างวัคซีน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นท้ายสุดเท่ากับ 10, 25 และ 50 mLf/mL ตามลำดับ สำหรับการทดสอบความแม่นยำในการหาปริมาณแอนติเจน TT โดยทำการเจือจางความเข้มข้นสารมาตรฐาน WHO International standard for Tetanus Toxoid (Code: 04/150, NIBSC) ด้วย diluent buffer ให้เท่ากับ 40, 100 และ 300 mLf/mL แล้วจึง spiked สารมาตรฐานที่เตรียมไว้ ลงในตัวอย่างวัคซีนเพื่อให้ได้ความเข้มข้นท้ายสุดเท่ากับ 2, 5 และ 15 mLf/mL ซึ่งทำการศึกษาในตัวอย่างวัคซีนทั้งในส่วน Total antigen และ Non-adsorbed antigen โดย Total antigen สำหรับการทดสอบ DT ทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างวัคซีนเท่ากับ 1:400 และสำหรับการทดสอบ TT ทำการเจือจางความเข้มข้นวัคซีนเท่ากับ 1: 800 ในขณะที่ Non-adsorbed antigen ทั้งการทดสอบ DT และ TT ใช้ตัวอย่างวัคซีนแบบ Undilute ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำผลการวิเคราะห์มาคำนวณค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) ซึ่งต้องอยู่ภายในช่วง 70-130%

การทดสอบความเที่ยง (precision)

การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ DT และ TT

antigens ในตัวอย่างวัคซีนส่วน total antigen และ non-adsorbed antigen จำนวน 6 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น โดยผู้วิเคราะห์ 1 คน ทำการทดสอบวันเดียว จากนั้นนำค่าปริมาณแอนติเจนที่ได้ มาคำนวณ %CV ซึ่งจะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 15%

การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (intermediate precision) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ DT และ TT ในตัวอย่างวัคซีนทั้งในส่วน total antigen และ non-adsorbed antigen จำนวน 6 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น โดยผู้วิเคราะห์ 1 คน ทำการทดสอบต่างวัน จากนั้นนำค่าปริมาณแอนติเจนที่ได้มาคำนวณค่า %CV ซึ่งจะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 15%

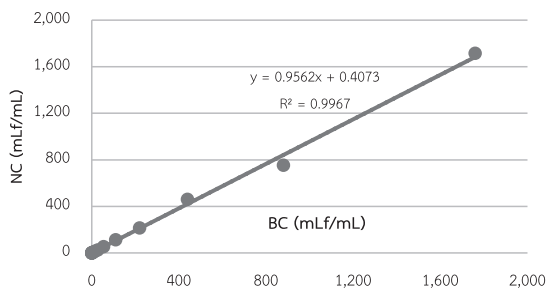
การทดสอบความทนของวิธี (robustness)

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ DT และ TT antigens ในตัวอย่างวัคซีนทั้งในส่วน total antigen และ non-adsorbed antigen ซึ่งทำการทดสอบจำนวน 6 ซ้ำ ต่อ 1 ความเข้มข้นโดยผู้ทดสอบ 3 คน และทำการทดสอบคนละวัน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจนที่ได้ นำมาคำนวณค่า %CV ซึ่งจะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 15%

ผลการศึกษา

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

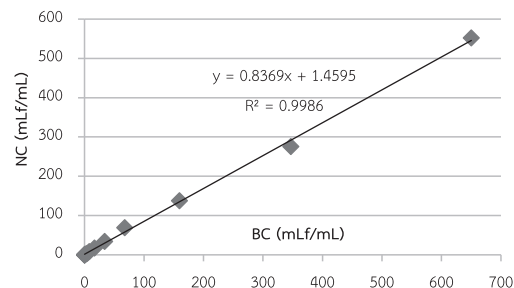
ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง แสดงค่า OD_{450 nm} ที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณแอนติเจน DT และ TT ในแต่ละจุดความเข้มข้น และค่าเฉลี่ยค่า SD %CV และ %RE โดยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{450 nm} และปริมาณแอนติเจนของ DT และ TT แสดงค่า goodness of fit with a coefficient of correlation (r) เฉลี่ยจากกราฟแต่ละเส้นได้เท่ากับ 1.000 และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนติเจนที่คาดหวัง (nominal antigen concentration) และปริมาณแอนติเจนที่วิเคราะห์ได้ (back calculation) สำหรับแอนติเจน DT มีค่า coefficient of determination (r^2) เท่ากับ 0.9967 ดังรูปที่ 1 ในขณะที่แอนติเจน TT มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9986 ดังรูปที่ 2 ซึ่งสอดคล้องตามเกณฑ์กำหนด



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่าง nominal antigen concentration [NC] กับค่า back calculated concentration [BC] สำหรับการหาปริมาณ DT antigen ในช่วงความเข้มข้น 0.05–1,760 mLf/mL ที่มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9967

ผลการศึกษาชี้แจงจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ สำหรับแอนติเจน DT พบว่า ค่า LLOQ เท่ากับ 1.72 mLf/mL โดย %CV เท่ากับ 8.67 และ %RE เท่ากับ 18.70 ในขณะที่ค่า ULOQ เท่ากับ 880 mLf/mL โดย %CV เท่ากับ 7.99 และ %RE เท่ากับ -14.21 ซึ่งสอดคล้องตามเกณฑ์กำหนด ส่วนชี้แจงจำกัดในการวัดเชิงปริมาณสำหรับแอนติเจน TT พบว่า ค่า LLOQ เท่ากับ 0.07 mLf/mL โดย %CV เท่ากับ 11.18 และ %RE เท่ากับ 14.29 ในขณะที่ค่า ULOQ เท่ากับ 552 mLf/mL โดย %CV เท่ากับ 15.41 และ %RE เท่ากับ 17.79

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและชี้แจงจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ สามารถเลือกพิสัยช่วงที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติเจน DT ที่มีค่าอยู่ระหว่าง LLOQ และ ULOQ ได้ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 6 ค่า คือ 3.44, 6.88, 13.75, 27.50, 55.00 และ 110.00 mLf/mL โดยมี %CV เท่ากับ 10.96, 8.50, 10.49, 3.23, 2.81 และ 1.43 ตามลำดับ และมีค่า %RE เท่ากับ -7.61, -0.49, 0.97, -1.87, -0.97 และ 3.76 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบความเป็นเส้นตรงและชี้แจงจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ สามารถเลือกพิสัยช่วงที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติเจน TT ที่มีค่าอยู่ระหว่าง LLOQ และ ULOQ ได้ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 6 ค่า คือ 1.08, 2.16, 4.31, 8.63,



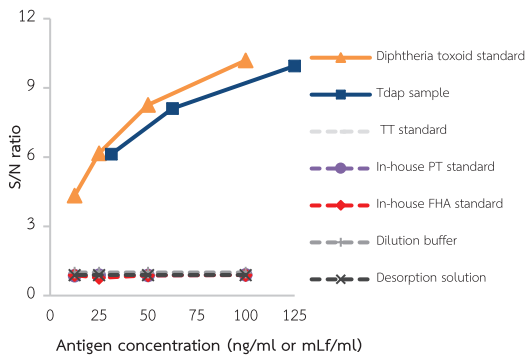
รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง nominal antigen concentration [NC] กับค่า back calculated concentration [BC] สำหรับการหาปริมาณ TT antigen ในช่วงความเข้มข้น 0.03–1,104 mLf/mL ที่มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9986

17.25 และ 34.50 mLf/mL โดยมี %CV เท่ากับ 10.68, 9.23, 11.72, 8.09, 2.76 และ 5.06 ตามลำดับ และมีค่า %RE เท่ากับ -8.49, 6.71, 9.16, -7.67, -0.74 และ -1.60 ตามลำดับ

ผลการทดสอบ specificity ของวิธี Sandwich ELISA สำหรับ DT พบว่าค่า S/N ratio ของ DT standard และ Tdap vaccine มีค่าเพิ่มสูงขึ้นแปรผันตรงกับระดับความเข้มข้นของตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 3 ในขณะที่ผลการทดสอบของ non-target antigen ได้แก่ in-house PT standard, in-house FHA standard และ in-house TT standard พบว่าค่า S/N ratio น้อยกว่า 1.00 เช่นเดียวกับผลการทดสอบของ desorption solution และ dilution buffer ที่มีค่า S/N ratio น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1.00 จึงสรุปได้ว่า วิธีทดสอบนี้มีความจำเพาะสำหรับการหาปริมาณ DT

ผลการทดสอบ specificity ของวิธี Sandwich ELISA สำหรับ TT พบว่าค่า S/N ratio ของ TT standard และ Tdap vaccine มีค่าเพิ่มสูงขึ้นแปรผันตรงกับระดับความเข้มข้นของตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4 ในขณะที่ผลการทดสอบของ non-target antigen ได้แก่ in-house PT standard และ in-house DT standard พบว่าค่า S/N ratio น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1.00 เช่นเดียวกับผลการทดสอบของ desorption solution และ dilution buffer ที่มี

ค่า S/N ratio น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1.00 แต่สำหรับ in-house FHA standard พบว่ามีค่า S/N ratio ที่ความเข้มข้นสูงสุดมีค่า S/N ratio เท่ากับ 3.43 ซึ่งถือว่ามียลน้อยมากเมื่อเทียบกับความเข้มข้นสูงสุดของ TT standard ซึ่งมีค่า S/N ratio เท่ากับ 17.22 จึงสรุปได้ว่า วิธีทดสอบนี้มีความจำเพาะสำหรับการหาปริมาณ TT

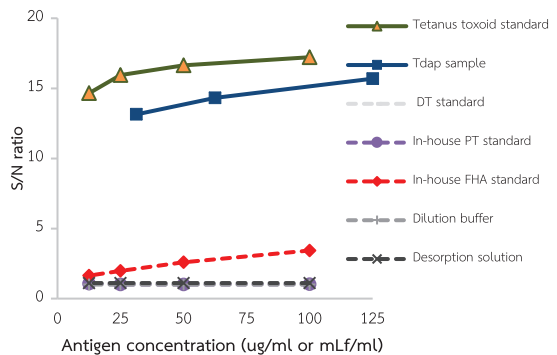


รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่าง S/N ratio กับปริมาณแอนติเจน DT ในตัวอย่างแต่ละประเภทด้วย Sandwich ELISA

ผลการศึกษาความแม่นยำของวิธีทดสอบในการหาปริมาณแอนติเจน DT ในตัวอย่างวัคซีนรวม (Tdap) โดยการ spiked DT standard จำนวน 3 ความเข้มข้นลงในตัวอย่างวัคซีนในส่วน Total antigen และ Non-adsorbed antigen พบว่าให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 83-105% ซึ่งสอดคล้องตามเกณฑ์กำหนด ดังตารางที่ 1 ในขณะที่ผลการศึกษา

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความแม่นยำในการหาปริมาณ DT antigen ในตัวอย่างวัคซีนด้วยวิธี Sandwich ELISA

Sample name	Spiked sample	Back calculation of DT (mLf/mL) Average (n=3)	% Recovery
Spiked antigen in diluent buffer	10 mLf/mL	10.37	104%
	25 mLf/mL	19.30	77%
	50 mLf/mL	40.64	81%
Total antigen of Tdap (1:400)	Unspiked	26.13	N/A
	10 mLf/mL	34.80	83%
	25 mLf/mL	42.74	88%
	50 mLf/mL	68.90	105%
Non-adsorbed antigen of Tdap (Undilute)	Unspiked	2.22	N/A
	10 mLf/mL	11.89	92%
	25 mLf/mL	18.95	88%
	50 mLf/mL	36.90	85%



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่าง S/N ratio กับปริมาณแอนติเจน TT ในตัวอย่างแต่ละประเภทด้วย Sandwich ELISA

ความแม่นยำของวิธีทดสอบในการหาปริมาณแอนติเจน TT ในตัวอย่างวัคซีน โดยการ spiked TT standard จำนวน 3 ความเข้มข้นลงในตัวอย่างวัคซีนในส่วน Total antigen และ Non-adsorbed antigen พบว่าให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 101-129% ซึ่งสอดคล้องตามเกณฑ์กำหนดเช่นกัน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความแม่นยำในการหาปริมาณ TT antigen ในตัวอย่างวัคซีนด้วยวิธี Sandwich ELISA

Sample name	Spiked sample	Back calculation of TT (mLf/mL) Average (n=3)	% Recovery
Spiked antigen in diluent buffer	2 mLf/mL	2.49	121%
	5 mLf/mL	4.79	94%
	15 mLf/mL	13.57	90%
Total antigen of Tdap (1:400)	Unspiked	0.38	N/A
	2 mLf/mL	3.60	129%
	5 mLf/mL	5.89	115%
	15 mLf/mL	14.05	101%
Non-adsorbed antigen of Tdap (Undilute)	Unspiked	0.25	N/A
	2 mLf/mL	2.94	108%
	5 mLf/mL	5.24	104%
	15 mLf/mL	16.44	119%

ผลการศึกษาความเที่ยง ซึ่งศึกษาผลการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability) โดยทดสอบหาปริมาณแอนติเจน DT ในตัวอย่างวัคซีนพบว่าในส่วน total antigen มีค่า %CV เท่ากับ 3.61% และผลการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (intermediate precision) โดยทดสอบหาปริมาณแอนติเจน DT ในตัวอย่างวัคซีน ต่างวัน และเวลาวัน จำนวน 3 การทดสอบ พบว่าในส่วน Total antigen ให้ได้ %CV เท่ากับ 14.92% ในขณะที่ผลการทดสอบในส่วน Non-adsorbed antigen มีค่าน้อยมากไม่สามารถคำนวณได้ (< min) และเมื่อคำนวณ degree of adsorption ของแอนติเจน DT content ในวัคซีนชนิดนี้มีค่าเท่ากับ 100% ในขณะเดียวกันมีการดำเนินการศึกษาความเที่ยงในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน TT โดยดำเนินการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณ DT ในตัวอย่างวัคซีน พบว่าผลการศึกษา repeatability ในส่วน total antigen มีค่า %CV เท่ากับ 14.26% และผลการศึกษา intermediate precision ในส่วน total antigen ให้ได้ %CV เท่ากับ 12.61% ในขณะที่ผลการทดสอบในส่วน non-adsorbed antigen มีค่าน้อยมากไม่สามารถคำนวณได้ (< Min) ดังนั้นเมื่อคำนวณ degree of adsorption ของแอนติเจน TT content ในวัคซีนชนิดนี้มีค่าเท่ากับ 100%

ผลการศึกษาความทนของวิธี (robustness) จากผู้วิเคราะห์จำนวน 3 คน ภายใต้การทดสอบต่างวัน และต่างเวลา พบว่าปริมาณแอนติเจน DT ในส่วน total antigen โดยผู้วิเคราะห์ 3 คน มีค่าเท่ากับ 4.47, 3.97 และ 4.27 Lf/mL เมื่อคำนวณค่า %CV เท่ากับ 5.99% ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์ที่กำหนดไว้ (ตารางที่ 5) ในขณะที่ปริมาณแอนติเจน DT ในส่วน non-adsorbed antigen มีค่าน้อยมากไม่สามารถคำนวณได้ (< min) และเมื่อคำนวณ degree of adsorption ของ DT antigen ในวัคซีนชนิดนี้มีค่าเท่ากับ 100% ในขณะเดียวกันมีการดำเนินการศึกษาความคงทนของวิธีในการหาวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน TT โดยดำเนินการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณ

DT ในตัวอย่างวัคซีน พบว่าในส่วน total antigen โดยผู้วิเคราะห์ 3 คน มีค่าเท่ากับ 1.78, 1.68 และ 2.13 Lf/mL เมื่อคำนวณค่า %CV เท่ากับ 12.68% ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์ที่กำหนดไว้ โดยปริมาณแอนติเจน TT ในส่วน non-adsorbed antigen มีค่าน้อยมากไม่สามารถคำนวณได้ (< min) และเมื่อคำนวณ degree of adsorption ของ TT antigen ในวัคซีนชนิดนี้มีค่าเท่ากับ 100%

อภิปรายผล

วัคซีนรวมที่มีองค์ประกอบของ DT และ TT เป็นวัคซีนที่ผลิตจาก diphtheria toxin และ tetanus toxin ตามลำดับ ซึ่งทำให้หมดฤทธิ์ด้วยสารเคมีกลายเป็น toxoid และนำ toxoid ที่บริสุทธิ์แล้วไป adsorbed ด้วยสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) ชนิด aluminium salt ซึ่งใช้สำหรับสร้างเสริมภูมิคุ้มกันเพื่อใช้ในการป้องกันโรคคอตีบและบาดทะยัก

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) ของวิธีวิเคราะห์ระดับการดูดซับของ ที่กอกซอยด์เชื้อคอตีบ และที่กอกซอยด์เชื้อบาดทะยัก ในวัคซีนรวมด้วยวิธี Sandwich ELISA ผลการทดสอบพบว่า เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดในทุกพารามิเตอร์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ที่ทำการศึกษา มีความถูกต้องเหมาะสม สามารถนำมาใช้ควบคุมคุณภาพ วัคซีนรวม tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, recombinant acellular pertussis vaccine (Tdap) เพื่อใช้ในการตรวจประเมินคุณภาพวัคซีนรวมในประเทศไทย โดยสามารถประเมินคุณภาพได้ทั้ง ปริมาณแอนติเจน DT, TT ในหน่วย Lf/mL และระดับ การดูดซับของ ที่กอกซอยด์เชื้อคอตีบ (DT antigen)⁴ และและที่กอกซอยด์เชื้อบาดทะยัก (TT antigen)⁵ ด้วย adjuvant ในหน่วย degree of adsorption (%) และสามารถนำหลักการการวิเคราะห์นี้ไปปรับใช้ในการหา ระดับการดูดซับของแอนติเจนชนิดอื่นที่ adsorbed ด้วยสารเสริมฤทธิ์ชนิด aluminium salt ในวัคซีนอื่น ๆ เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพได้

แต่ต้องพิจารณาถึงปริมาณแอนติเจนในแต่ละวัคซีนที่แตกต่างกันตามรูปแบบการผลิตและการศึกษาทางคลินิกส่งผลให้ข้อกำหนดการดูดซับของแอนติเจนบนอะลูมิเนียมเป็นข้อกำหนดที่จำเพาะของแต่ละผลิตภัณฑ์ (product specific) ตามที่ผู้ผลิตระบุไว้

สรุปผล

วิธีวิเคราะห์ระดับการดูดซับของท็อกซอยด์เชื้อคอตีบและบาดทะยักในวัคซีนรวมด้วยวิธี Sandwich ELISA สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณ DT และ TT ในวัคซีน เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนในประเทศไทยก่อนที่จะจำหน่ายเมื่อนำมาทดสอบระดับการดูดซับของท็อกซอยด์เชื้อคอตีบและบาดทะยักในวัคซีน Tdap ที่ผลิตปี พ.ศ. 2562 และ 2563 มีค่าระดับการดูดซับเป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐานของผู้ผลิต และข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์ในการยืนยันคุณภาพวัคซีน Tdap ที่ใช้ในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวัคซีนแห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ได้มอบทุนสนับสนุนโครงการ และขอขอบคุณบริษัท ไบโอเนท เอเซีย จำกัด ในการสนับสนุนตัวอย่างวัคซีนเพื่อใช้ในการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

1. วีรวรรณ หัตถสิงห์. วัคซีนป้องกันโรคคอตีบ-บาดทะยัก-ไอกรน. ใน: โอฬาร พรหมลิขิต, อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์, อุษา ทิสยากร, บรรณาธิการ. วัคซีน. กรุงเทพฯ: นพชัย; 2554. หน้า 165-66.
2. สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา; 2556.
3. International Council for Harmonization of Technical Terms for Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use [Internet]. 2005 [cited 2020 Dec 18]:1-17. Available from: [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2\(R1\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf)
4. World Health Organization. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis: capture and direct ELISA. Geneva: WHO; 2013: 91-97.
5. World Health Organization. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis: antigen content and degree of adsorption. Geneva: WHO; 2013: 165-172.