

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administrationวารสารอาหารและยา
ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 (2567): มกราคม - เมษายน
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 31 No. 1 (2024): January – April

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีน ป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA

สุภาภรณ์ ชุมพล¹ สุกัลยาณี ไชยมี¹ อภิชัย ศุภสารสาทร¹ สุภาพร ภูมิอมร¹¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรีที่อยู่ติดต่อ: สุภาภรณ์ ชุมพล สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง
จังหวัดนนทบุรี 11000 supaporn.c@dmsc.mail.go.th

Method Development and Validation of Identity Test for Meningococcal Conjugate Vaccine by Indirect ELISA

Supaporn Chumpol¹, Sukanlayanee Chaimee¹, Apichai Supasarnsathorn¹, Supaporn Phumiamorn¹¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Public Health, Nonthaburi, Thailand**Contact address:** Supaporn Chumpol, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road,
Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, supaporn.c@dmsc.mail.go.th**Received:** 2 December 2023, **Revised:** 14 March 2024, **Accepted:** 14 March 2024

Abstract

Background: An identity test is an important test that is performed on the meningococcal vaccine to verify its identity for quality control of the vaccine. The meningococcal conjugate vaccine consists of purified polysaccharides from *Neisseria meningitidis*, and each serogroup of meningococcal polysaccharide conjugates with a diphtheria toxoid carrier protein that corresponds to the registration dossier, so that vaccine recipients can be confident in the quality of the vaccine according to the product's standards. Therefore, the agency has expanded its ability to validate the identity of meningococcal vaccines. This testing has not been previously available for the quality control service of meningococcal conjugate vaccines.

Objective: To develop and validate method of the identity test of the meningococcal conjugate vaccine for use as standard methods in the laboratory.

Methods: The optimum conditions were determined by the specific reaction between the antigen and the antibody that was suitable for testing. In addition, the method validation was verified for two parameters, including specificity and intermediate precision.

Results: The results of the optimum conditions of the identity test for meningococcal conjugate vaccine by indirect ELISA showed that the optimum dilution level of each antibody has a specified dilution factor. The *N. meningitidis* antiserum group A was diluted at 1:10,000, while the *N. meningitidis* antiserum C, Y, and W135 groups were diluted at 1:5,000, respectively. In addition, this assay must be tested according to the designated plate templates so that it can be a valid analysis because each type of antigen has a specific antibody. Moreover, the result of the validation method was found that this method was highly specific to the reaction between antigen and antibody. These were calculated from the ratio values of each type of antigen, which presented the ratio values in the range of 17.69 - 40.78, while there were no specific reactions between antigen and antibody; the ratio values were very low, in the range of -0.02 - 4.95. Thus, the identity of each antigen can be determined, and there was no cross-reaction among the serogroups. The OD_{450 nm} value of the blank was less than 0.1, which met the acceptance criteria. The results of intermediate precision by two independent analysts showed that the results of both analysts met the criteria, and the average ratios of standard substances and vaccine samples were not significantly different between the two analysts at the 95% confidence interval.

Conclusions: The results of the study revealed that the identity test for the meningococcal conjugate vaccine using the indirect ELISA technique met the requirements for validation. Therefore, it is suitable for use as a standard method for submitting the registration of the meningococcal vaccine in Thailand.

Keywords: Identity test, meningococcal conjugate vaccine, method validation, ELISA technique

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: การตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น เป็นรายการทดสอบหนึ่งที่มีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพวัคซีน เพื่อยืนยันว่าวัคซีนประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Neisseria meningitidis* แต่ละซีโรกรุ๊ปเชื่อมต่อกับที่อกซอยด์เชื้อคอตีบที่ใช้เป็นโปรตีนพาหะ ตรงตามซีโรกรุ๊ปที่ระบุในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ เพื่อสร้างความมั่นใจในคุณภาพของวัคซีนตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นหน่วยงานได้ขยายขีดความสามารถในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ซึ่งเป็นรายการทดสอบที่ยังไม่เคยให้บริการมาก่อนสำหรับการตรวจควบคุมคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการในการตรวจยืนยันเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต

วิธีการวิจัย: การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของวิธีด้วยการศึกษาปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี และศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ หัวข้อความจำเพาะ และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ผลการศึกษา: การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบว่าระดับการเจือจางความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมต่อการทดสอบสำหรับแอนติเจนแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยสารแอนติบอดี *N. meningitidis* antiserum group A เตรียมที่ระดับเจือจางความเข้มข้น 1:10,000 ในขณะที่แอนติบอดี *N. meningitidis* antiserum group C, Y และ W135 เตรียมที่ระดับเจือจางความเข้มข้น 1:5,000 ตามลำดับ และวิธีการทดสอบนี้ต้องการทดสอบตามแม่แบบของเพลททดสอบที่กำหนดไว้ จึงสามารถตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์ของวัคซีนได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อแอนติบอดี และผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีนี้ พบว่าวิธีมีความจำเพาะสูง โดยคำนวณจากค่า Ratio ของแอนติเจนแต่ละชนิด ซึ่งมีค่า Ratio อยู่ในช่วง 17.69 – 40.78 ในขณะที่หากไม่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ค่า Ratio มีค่าน้อยมากอยู่ในช่วง -0.02 – 4.95 จึงสามารถระบุเอกลักษณ์ของแอนติเจนแต่ละชนิดได้อย่างจำเพาะ โดยไม่มีการเกิด cross reaction ข้ามซีโรกรุ๊ปกัน และค่า OD_{450 nm} ของ blank ในเพลททดสอบมีค่าน้อยกว่า 0.1 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด และผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน พบว่าผลการทดสอบทั้ง 2 คนเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด และค่าเฉลี่ย Ratio ของสารมาตรฐานและตัวอย่างวัคซีนจากการทดสอบของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุป: การศึกษานี้พบว่าวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำวิธีมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้ประกอบการขอขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุจำหน่ายในประเทศ

คำสำคัญ: การตรวจสอบเอกลักษณ์ วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี เทคนิค Indirect ELISA

บทนำ

โรคไข้กาฬหลังแอ่นเกิดจากเชื้อ *Neisseria meningitidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปร่างกลม คล้ายเม็ดถั่ว อยู่กันเป็นคู่ ๆ สามารถแพร่กระจายได้ทางการไอ จาม การสัมผัสกับน้ำมูก น้ำลาย และมักพบในสถานที่ที่คนอยู่รวมกันหนาแน่น และมีสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อมไม่ถูกสุขลักษณะ¹ เชื้อ *N. meningitidis* ถูกจำแนกตามโพลีแซคคาไรด์แคปซูล อย่างน้อย 13 ซีโรกรุ๊ป ได้แก่ A, B, C, E, X, Y, Z, W, H, I, K และ L¹ โดยซีโรกรุ๊ปสำคัญในการก่อโรคในคนมี 6 ซีโรกรุ๊ป คือ ซีโรกรุ๊ป A, B, C, W, X และ Y2 วิธีการป้องกันโรคทำได้โดยการฉีดวัคซีนเพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่งวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นมีความสำคัญมากสำหรับผู้ที่ต้องเดินทางไปยังต่างประเทศในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเป็นประจำ โดยผู้ที่จะเดินทางควรได้รับการฉีดวัคซีนก่อนการเดินทาง 7-10 วัน³

วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ที่ใช้ในปัจจุบันผลิตมาจากส่วนโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *N. meningitidis* โดยวัคซีนป้องกันโรคป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นมี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดโพลีแซคคาไรด์และชนิดคอนจูเกต แต่ปัจจุบัน

มีการขึ้นทะเบียนเฉพาะวัคซีนชนิดคอนจูเกต เนื่องจากสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยผ่านระบบ T cell dependent เกิดการตอบสนองได้ดีในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 2 ปี และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อมีการฉีดซ้ำได้⁴ วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นที่มีจำหน่ายในประเทศไทยมีองค์ประกอบของแอนติเจนจากเชื้อ *N. meningitidis* จำนวน 4 ซีโรกรุ๊ป คือ A, C, Y และ W135 จับกับท็อกซอยด์ของเชื้อคอตีบซึ่งใช้เป็นโปรตีนพาหะ และเพื่อให้ผู้ได้รับวัคซีนมีความมั่นใจในความปลอดภัย และประสิทธิภาพ จึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบคุณภาพให้มีความปลอดภัย และประสิทธิภาพในการป้องกันโรค การตรวจสอบคุณภาพของวัคซีนสามารถตรวจสอบโดยใช้วิธีทางด้านชีวภาพ กายภาพ และเคมีในห้องปฏิบัติการ ซึ่งรายการตรวจสอบเอกลักษณ์ เป็นการตรวจวิเคราะห์หนึ่งที่มีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพวัคซีน⁴ เพื่อยืนยันว่าวัคซีนนั้นประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ตรงตามซีโรกรุ๊ปที่ระบุในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ และเพื่อสร้างความมั่นใจในคุณภาพของวัคซีนตรงตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ ดังนั้น จึงได้ขยาย

ขีดความสามารถทางห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต ซึ่งเป็นรายการทดสอบที่หน่วยงานยังไม่เคยให้บริการมาก่อน ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาสถานะที่เหมาะสม และดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต โดยใช้เทคนิค Indirect ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ สถาบันชีววัตถุต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต ด้วยเทคนิค Indirect ELISA
2. เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ระเบียบวิธีการวิจัย

สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่มีความจำเพาะสำหรับแอนติเจนแต่ละชนิด ได้แก่ WHO International standard for Meningococcal serogroup A polysaccharide (13/246, NIBSC), Meningococcal serogroup C polysaccharide

(08/214, NIBSC), Meningococcal serogroup Y polysaccharide (16/206, NIBSC) และ Meningococcal serogroup W135 polysaccharide (16/152, NIBSC)

ตัวอย่าง

วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต (Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine) จำนวน 1 รุ่นการผลิต และวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต (Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine) จำนวน 1 รุ่นการผลิต ซึ่งเป็นตัวแทนตัวอย่างวัคซีนที่มีการนำเข้ามาวางจำหน่ายในประเทศไทย

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ELISA reader) ยี่ห้อ Tecan รุ่น Infinite F200 Pro, เครื่องล้างไมโครเพลทอัตโนมัติ ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น ImmunoWash 1575, ตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิต่ำ (อุณหภูมิ 25°C), ตู้ชีวนิรภัย (Biological Safety Cabinet, Class II, BSC Type B2), 96 well plate Maxisorp NUNC-IMMUNO PLATE (Cat. No. 439454, Thermo Fisher Scientific), หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียว ขนาด 15 และ 50 ml, หลอดทดลอง Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml, Automatic pipette ขนาด 5-50 µl, 20-200 µl และ 100-1,000 µl และ Multichannel pipette ขนาด 50-300 µl

สารแอนติบอดี

สารแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสำหรับแอนติเจนแต่ละชนิด ได้แก่ *N. meningitidis* antiserum group A (Cat. No. 222281, BD), *N. meningitidis* antiserum group C (Cat. No. 222301, BD), *N. meningitidis* antiserum group Y (Cat. No. 228811, BD), *N. meningitidis* antiserum group W135 (Cat. No. 222531, BD), Rabbit anti-Diphtheria toxin (Ab53828, Abcam), Rabbit anti-Tetanus toxin (Ab53829, Abcam) และ Goat polyclonal antibody to Rabbit IgG (H+L) HRP conjugated (Ab6721, Abcam)

สารเคมีและน้ำยาทดสอบ

สารเคมีและน้ำยาทดสอบที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ 10x phosphate buffered saline pH 7.4, 10% normal goat serum (GNS) ยี่ห้อ Thermo Fisher Scientific, bovine serum albumin (BSA) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich, 1x phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 with 0.05% tween 20 (washing buffer), 1x PBS pH 7.4 (diluent), coating buffer for positive control (2 µg/ml BSA in 1x PBS), 1M sulfuric acid (stop solution) ยี่ห้อ Merck และสารสับสเตรท SureBlue Reserve™ TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate (Cat. No. 5120-0080, KPL)

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรค ใช้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA

1. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และสารมาตรฐานใช้สำหรับเคลือบกันเพลททดสอบ ทำการเจือจางตัวอย่างวัคซีนให้มีความเข้มข้นของ meningococcal polysaccharide แต่ละซีโรกรุ๊ป ประมาณ 1 µg/ml ด้วย 1x PBS และเตรียมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นของ meningococcal polysaccharide แต่ละซีโรกรุ๊ป ประมาณ 1 µg/ml ด้วย 1x PBS ที่เติม BSA 2 µg/ml หลังจากนั้นเติมตัวอย่างวัคซีน และสารมาตรฐานลงในเพลททดสอบ (96 well plate) เติมน้ำในตำแหน่งที่กำหนดไว้ ปริมาตรหลุมละ 100 µl โดยเพลททดสอบ 1 plate สามารถตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนได้สูงสุด 7 ตัวอย่าง แล้วนำเพลททดสอบไปบ่มที่ตู้บ่ม อุณหภูมิ 25°C นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเพลททดสอบล้างด้วย washing buffer หลุมละ 300 µl จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้เครื่องล้างไมโครเพลทอัตโนมัติ และเคาะเพลทบนกระดาษซับให้แห้ง

2. ขั้นตอน Blocking plate เติมน้ำ 10% GNS ปริมาตรหลุมละ 100 µl แล้วนำเพลททดสอบไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเพลททดสอบล้างตามวิธีข้างต้น และเคาะเพลทบนกระดาษซับให้แห้ง

3. ขั้นตอนการเติม Primary antibody เตรียม primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อ แอนติเจนแต่ละซีโรกรุ๊ป โดยเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย diluent ดังนี้ *N. meningitidis* antiserum group A, Rabbit anti-Diphtheria toxin และ Rabbit anti-Tetanus toxin เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 1:10,000 ส่วน *N. meningitidis* antiserum group C, *N. meningitidis* antiserum group Y และ *N. meningitidis* antiserum group W135 เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 1:5,000 ตามลำดับ แล้วเติม primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อแต่ละแอนติเจน เติมลงในตำแหน่งที่กำหนดไว้ ปริมาตรหลุมละ 100 μ l แล้วนำเพลททดสอบไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเพลททดสอบล้างตามวิธีข้างต้น และเคาะเพลทบนกระดาษซับให้แห้ง

4. ขั้นตอนการเติม Secondary antibody เตรียม Goat polyclonal antibody to Rabbit IgG (H+L) HRP conjugated เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 1: 25,000 ด้วย diluent แล้วเติมลงในเพลททดสอบทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 μ l นำเพลททดสอบไปบ่มที่ตู้บ่ม อุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเพลททดสอบล้างตามวิธีข้างต้น และเคาะเพลทบนกระดาษซับให้แห้ง

5. ขั้นตอนปฏิกิริยาการเกิดสี และการอ่านผล เติมสารสับสเตรท (TMB substrate)

ปริมาตรหลุมละ 100 μ l ลงในเพลททดสอบทุกหลุม บ่มให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที มีการป้องกันแสง หากเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีตรวจติดตามด้วย secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เมื่อเติมสับสเตรทลงไป สับสเตรทจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ HRP เกิดเป็นสารสีน้ำเงิน และเมื่อครบเวลา 10 นาที เติม 1M sulfuric acid (stop solution) ปริมาตรหลุมละ 50 μ l เพื่อหยุดปฏิกิริยาโดยจะเกิดการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง แล้วนำเพลททดสอบไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 450 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader และนำผลมาคำนวณ ratio ระหว่างค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่างวัคซีน ต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank รายงานผลบวกเมื่อค่า ratio ของตัวอย่างวัคซีนมีค่ามากกว่า 7.0 และรายงานผลเป็นลบเมื่อค่า ratio มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.0

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยหาระดับเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Primary และ Secondary antibody เพื่อใช้สำหรับการทดสอบทำการเจือจางระดับความเข้มข้นของ primary antibody ในแต่ละชนิด ดังนี้ *N. meningitidis* antiserum group A, *N. meningitidis* antiserum group C, *N. meningitidis* antiserum group Y, *N. meningitidis* antiserum group W135,

anti-diphtheria toxoid และ anti-Tetanus toxin เจือจางความเข้มข้นด้วยสาร diluent ที่ระดับ 1:1,000, 1:5,000 และ 1:10,000 และทำการเจือจางระดับความเข้มข้นของ secondary antibody (anti-rabbit IgG HRP conjugated) ด้วยสาร diluent ที่ระดับ 1:10,000 และ 1:25,000 หลังจากนั้นดำเนินการทดสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอนชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA และพิจารณาค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีแต่ละชนิด โดยค่าการดูดกลืนแสง OD_{450 nm} ของสารมาตรฐาน และตัวอย่างวัคซีนจะต้องมีค่าน้อยกว่า 3.0 และค่าการดูดกลืนแสง OD_{450 nm} ของ blank ต้องมีค่าน้อยกว่า 0.16-8

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอนชนิดคอนจูเกตโดยใช้เทคนิค Indirect ELISA เป็นรายการทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative assay) เพื่อระบุความจำเพาะของ Meningococcal polysaccharide ในแต่ละซีโรกรุป A, C, Y และ W135 ที่เชื่อมต่อกับ Diphtheria Toxoid carrier protein โดยรายงานผลเป็นบวก (positive) หรือลบ (negative) จึงมีการดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีใน 2 พารามิเตอร์ ได้แก่ การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (specificity) และความเที่ยงของวิธี (intermediate precision)⁵

การหาความจำเพาะของวิธี เพื่อยืนยันว่าวิธีมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่จำเพาะแต่ละชนิดเท่านั้น ต้องไม่เกิด cross reaction ระหว่าง non-target antigen กับ antibody ศึกษาโดยทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างวัคซีน และสารมาตรฐานของแต่ละซีโรกรุป เท่ากับ 1 µg/ml จากนั้นดำเนินการทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA แล้วอ่านผลการทดสอบด้วยการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่าง ต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งเกณฑ์กำหนดมีดังนี้ (1) ตัวอย่างวัคซีนและสารมาตรฐานจะต้องมีค่า Ratio มากกว่า 7.0 (2) Non-target จะต้องไม่เกิด cross reaction ระหว่างแอนติเจน polysaccharide กับแอนติบอดีของซีโรกรุปอื่น ๆ เช่น การเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนซีโรกรุป A ต่อแอนติบอดี Anti-Men C, Anti-Men Y และ Anti-Men W135 จะต้องมีค่า Ratio น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.0 (3) Non-target จะต้องไม่เกิด cross reaction ระหว่างแอนติเจน DT carrier protein กับแอนติบอดีของ Anti-Tetanus toxoid จะต้องมีค่า Ratio น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.0 และ (4) ค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank จะต้องมีค่าน้อยกว่า 0.1

การทดสอบความเที่ยงของวิธี ทำการทดสอบโดยนักวิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน ใช้ตัวอย่างวัคซีน Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine จำนวน 1 รุ่นการผลิต และทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง ทดสอบต่างวันกัน

โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างวัคซีน และสารมาตรฐานของแต่ละซีโรกรุ๊ป เท่ากับ 1 µg/ml จากนั้นดำเนินการทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA อ่านผลการทดสอบด้วยการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่าง ต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank ทำการทดสอบ จำนวน 3 ครั้ง ซึ่งเกณฑ์กำหนด ดังนี้ (1) ผลการทดสอบของผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน ต้องมีค่า Ratio ของตัวอย่างวัคซีน และสารมาตรฐาน เป็นไปในรูปแบบเดียวกัน และ (2) ค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank จะต้องมีย่าน้อยกว่า 0.1 นอกจากนี้ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบระหว่าง นักวิเคราะห์ 2 คนทางสถิติ โดยใช้ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances

การวิเคราะห์ข้อมูล

รายงานผลการทดสอบ แปลผลเป็นบวก (positive) หรือ ลบ (negative) โดยคำนวณจาก สัดส่วนค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่างวัคซีนในแต่ละ แอนติเจน ต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank ตาม สูตรคำนวณ

$$\text{Ratio} = \frac{(A450 \text{ value of sample})}{(\text{Average A450 value of plate blank})}$$

เมื่อสัดส่วนของค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่าง ต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank มีค่ามากกว่า 7.0 ให้รายงานผลเป็นบวก รายงานผลลบเมื่อสัดส่วน ของค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่างต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.0 ทั้งนี้

แอนติเจนแต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบในวัคซีน ต้องเป็นไปตามที่ได้รับการขึ้นทะเบียนตำรับยา ชีววัตถุ

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมของวิธี

พบว่าระดับเจือจางความเข้มข้นของสาร primary antibody ที่เหมาะสมต่อการทดสอบ สำหรับแอนติเจนแต่ละซีโรกรุ๊ปแตกต่างกัน คือ สารแอนติบอดี *N. meningitidis* antiserum group A ต้องเจือจางระดับความเข้มข้นที่ 1:10,000 ในขณะที่แอนติเจนซีโรกรุ๊ป *N. meningitidis* antiserum group C, Y และ W135 ต้องเจือจาง ระดับความเข้มข้นที่ 1:5,000 ตามลำดับ และสาร แอนติบอดี Rabbit anti-Diphtheria toxin และ Rabbit anti-Tetanus toxin ใช้สำหรับตรวจ เอกลักษณะโปรตีนพาหะต้องเจือจางระดับความเข้มข้น ที่ 1:10,000 ซึ่งระดับเจือจางความเข้มข้นของสาร แต่ละชนิดดังกล่าว มีผลโดยตรงต่อค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 nm ของแอนติเจนแต่ละชนิด ในขณะที่สารแอนติบอดี secondary antibody (Goat polyclonal antibody to Rabbit IgG (H+L) HRP conjugated) ต้องเจือจางที่ระดับ 1: 25,000 ส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 450 nm ของแอนติเจนแต่ละชนิด และค่า blank ให้เป็นไปตามเกณฑ์กำหนด โดยค่า blank จะต้องมีย่าน้อยกว่า 0.1 หากใช้ความเข้มข้นของ secondary antibody ที่สูงเกินไป จะส่งผลให้ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank มีค่าสูงเกิน 0.1

ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์กำหนด จึงไม่สามารถวิเคราะห์ผลการทดสอบได้

ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของวิธี

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (specificity) เมื่อทดสอบกับสารมาตรฐาน Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y และ W135 (NIBSC) ที่ใช้เป็น positive control จำนวน 3 ครั้ง เพื่อยืนยันว่าวิธีมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่จำเพาะแต่ละชนิด ผลการทดสอบพบว่าแอนติเจนแต่ละชนิด มีค่า ratio >7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นบวก มีความจำเพาะเจาะจงในแอนติเจนแต่ละชนิด เป็นไปตามเกณฑ์

ที่กำหนด และจากการทดสอบทั้ง 3 ครั้ง ค่าที่ได้เป็นไปในรูปแบบเดียวกัน (ตารางที่ 1) และเมื่อทดสอบกับตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ชนิดคอนจูเกต ผลการทดสอบพบว่า แอนติเจนแต่ละชนิดของ Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y และ W135 มีค่า ratio >7.0 และผลการทดสอบแอนติเจน Diphtheria toxoid ซึ่งใช้เป็น carrier protein ในตัวอย่างวัคซีนพบว่า มีค่า ratio >7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นบวก มีความจำเพาะเจาะจงในแอนติเจนแต่ละชนิด เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด และจากการทดสอบทั้ง 3 ครั้ง ค่าที่ได้เป็นไปในรูปแบบเดียวกัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ชนิดคอนจูเกต (Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine) โดยใช้เทคนิค Indirect ELISA

Specificity test	1 st time		2 nd time		3 rd time	
	OD _{450nm}	Ratio	OD _{450nm}	Ratio	OD _{450nm}	Ratio
Diluent buffer	0.0788*	1.00	0.0613*	1.00	0.0494*	1.00
Positive control (NIBSC)						
PS serogroup A	1.8850	23.93	1.5937	25.99	1.0831	21.94
PS serogroup C	1.5916	20.21	1.7086	27.87	1.5152	30.69
PS serogroup Y	1.8815	23.89	1.4601	23.81	1.3017	26.37
PS serogroup W135	1.8301	23.23	1.4252	23.24	1.1743	23.79
Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135						
Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine						
PS serogroup A in vaccine	1.7922	22.75	1.7886	29.17	1.3026	26.39
PS serogroup C in vaccine	2.4035	30.51	2.6168	42.68	2.0133	40.78
PS serogroup Y in vaccine	1.3937	17.69	2.1645	35.30	1.6711	33.85
PS serogroup W135 in vaccine	1.9706	25.02	2.1729	35.44	1.6459	33.34
Diphtheria toxoid in vaccine	2.5599	32.50	2.4845	40.52	1.9178	38.85

*ค่าเฉลี่ยของค่า blank จำนวน 6 หลุม

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ระหว่างแอนติเจน Meningococcal polysaccharide กับสารแอนติบอดีที่ผลิตจากซีโรกรุ๊ปอื่น

ผลการทดสอบพบว่าวิธีนี้ไม่มีการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ข้ามซีโรกรุ๊ปกัน ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาขึ้นได้เฉพาะแอนติเจนและแอนติบอดีจำเพาะของซีโรกรุ๊ปตัวมันเองเท่านั้น ไม่เกิดปฏิกิริยากับซีโรกรุ๊ปอื่น ๆ โดยแสดงผลการทดสอบดังนี้

- ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน Men A ต่อแอนติบอดี Anti-Men C, Anti-Men Y และ Anti-Men W135 โดยค่า ratio ≤ 7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นลบ เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

- ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน

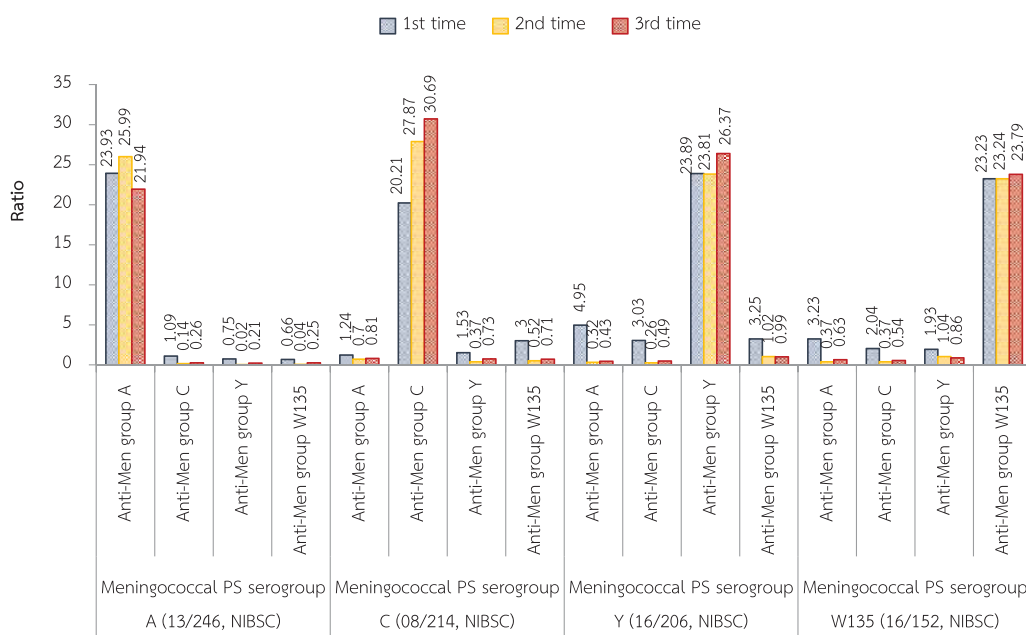
Men C ต่อแอนติบอดี Anti-Men A, Anti-Men Y และ Anti-Men W135 โดยค่า ratio ≤ 7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นลบ เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

- ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน

Men Y ต่อแอนติบอดี Anti-Men A, Anti-Men C และ Anti-Men W135 โดยค่า ratio ≤ 7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นลบ เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

- ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน

Men W135 ต่อแอนติบอดี Anti-Men A, Anti-Men C และ Anti-Men Y โดยค่า ratio ≤ 7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นลบ เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด จึงสามารถยืนยันได้ว่าวิธีนี้มีความจำเพาะสูง (รูปที่ 1)



Antigen and antibody complex in each serogroup of Meningococcal polysaccharide

รูปที่ 1 ผลการทดสอบการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ระหว่างแอนติเจน Meningococcal polysaccharide กับสารแอนติบอดีที่ผลิตจากซีโรกรุ๊ปอื่น ๆ

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ระหว่างแอนติเจน Diphtheria toxoid กับแอนติบอดีของ anti-Tetanus

ผลการทดสอบพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา

cross reaction ระหว่าง DT กับ anti-Tetanus จึงสามารถยืนยันได้ว่าวิธีนี้มีความจำเพาะสูง ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาขึ้นได้เฉพาะแอนติเจนและแอนติบอดีจำเพาะของตัวมันเองเท่านั้น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ระหว่างแอนติเจน Diphtheria toxoid carrier protein ในวัคซีนต่อชนิดของสารแอนติบอดี ได้แก่ Rabbit anti-Diphtheria toxin และ Rabbit anti-Tetanus toxin

Antigen		1 st time	2 nd time	3 rd time
		Ratio	Ratio	Ratio
Diphtheria toxoid (Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine)	Rabbit anti-Diphtheria toxin	32.50	40.52	38.85
	Rabbit anti-Tetanus toxin	0.16	-0.02	0.12

การทดสอบความเที่ยงของวิธี (Inter-mediate precision)

1. เมื่อทดสอบความเที่ยงของวิธี โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน ผลการทดสอบพบว่าสารมาตรฐานของแอนติเจนแต่ละชนิด Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y และ W135 (NIBSC) มีค่า ratio > 7.0 ให้เป็นการทดสอบเป็นบวกทุกซีโรไทป์ ซึ่งผู้วิเคราะห์ทั้งสองคนให้ผลการทดสอบไปในรูปแบบเดียวกัน และเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (ตารางที่ 3) และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้สถิติ F-Test

Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances ในการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบระหว่างนักวิเคราะห์ 2 คน พบว่าค่าเฉลี่ย Ratio ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ซีโรกรุ๊ปจากการทดสอบของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ค่า $P(T \leq t)$ two-tail = 0.086 ซึ่งมีความมากกว่า p-value ดังนั้นข้อมูลค่าเฉลี่ย Ratio ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ซีโรกรุ๊ปจากการทดสอบของผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คน จึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี ทดสอบด้วยสารมาตรฐานของแอนติเจนแต่ละชนิด Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y และ W135 (NIBSC)

Serogroup/ Analyst	Ratio of WHO International standard for Meningococcal polysaccharide in each serogroup			
	A	C	Y	W135
Analyst 1	42.74	41.37	43.72	39.74
	32.47	31.90	33.46	31.10
	23.56	22.00	23.19	22.01
Analyst 2	23.20	17.64	19.41	17.43
	29.72	27.67	29.84	29.25
	36.02	33.21	31.59	28.19

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของชุดข้อมูลสารมาตรฐาน โดยใช้สถิติ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances

F-Test Two-Sample for Variances	ผู้วิเคราะห์ 1	ผู้วิเคราะห์ 2
Mean	32.27166667	26.93083333
Variance	68.30428788	37.68811742
df	11	11
F	1.812356057	
P(F<=f) one-tail	0.169245309	
F Critical one-tail	3.473699051	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	ผู้วิเคราะห์ 1	ผู้วิเคราะห์ 2
Mean	32.27166667	26.930833
Variance	68.30428788	37.688117
Pooled Variance	52.99620265	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	22	
t Stat	1.797058747	
P(T<=t) one-tail	0.043034681	
t Critical one-tail	1.717144374	
P(T<=t) two-tail	0.086069361	
t Critical two-tail	2.073873068	

2. เมื่อทดสอบความเที่ยงของวิธี โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน ผลการทดสอบพบว่าตัวอย่างวัคซีน Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine มีค่า ratio > 7.0 ให้เป็นการทดสอบเป็นบวก ทุกซีโรไทป์ และแอนติเจน Diphtheria toxoid ในตัวอย่างวัคซีน พบว่ามีค่า ratio > 7.0 ให้เป็นการทดสอบเป็นบวก และผู้วิเคราะห์ทั้งสองคน ให้ผลการทดสอบไปในรูปแบบเดียวกัน ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (ตารางที่ 5) และนำข้อมูล

มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้สถิติ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances ในการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบระหว่างนักวิเคราะห์ 2 คน พบว่าค่าเฉลี่ย Ratio ของตัวอย่างวัคซีน ทั้ง 4 ซีโรกรุปจากการทดสอบของนักวิเคราะห์ ทั้ง 2 คน ค่า $P(T \leq t)$ two-tail = 0.6573 ซึ่งมีค่ามากกว่า p-value ดังนั้นข้อมูลค่าเฉลี่ย Ratio ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ซีโรกรุปจากการทดสอบของผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คนจึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี ทดสอบด้วยตัวอย่างวัคซีน Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine

Serogroup/ Analyst	Ratio of Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine				
	A	C	Y	W135	DT
Analyst 1	36.52	43.61	43.33	43.16	44.30
	36.30	45.77	42.49	43.28	45.16
	21.49	28.68	25.29	25.12	29.21
Analyst 2	25.84	35.66	35.31	34.01	36.93
	30.91	38.05	35.62	36.10	40.63
	37.21	47.16	45.39	44.55	48.79

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของชุดข้อมูลตัวอย่างวัคซีน โดยใช้สถิติ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances

F-Test Two-Sample for Variances	ผู้วิเคราะห์ 1	ผู้วิเคราะห์ 2
Mean	36.914	38.144
Variance	74.10058286	38.73296857
df	14	
F	1.913113959	
$P(F \leq f)$ one-tail	0.118567124	
F Critical one-tail	2.978587524	

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของชุดข้อมูลตัวอย่างวัคซีน โดยใช้สถิติ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances (ต่อ)

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	ผู้วิเคราะห์ 1	ผู้วิเคราะห์ 2
Mean	36.914	38.144
Variance	74.10058286	38.73296857
Pooled Variance	56.41677571	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	28	
t Stat	-0.448468157	
P(T<=t) one-tail	0.328633378	
t Critical one-tail	1.701130934	
P(T<=t) two-tail	0.657266756	
t Critical two-tail	2.048407142	

อภิปรายผล

รายการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต (Identity test) เป็นรายการทดสอบที่ใช้ตรวจสอบควบคุมคุณภาพกระบวนการผลิตวัคซีน ตั้งแต่ขั้นตอนระหว่างการผลิตไปจนถึงได้เป็นผลิตภัณฑ์วัคซีน ได้แก่ ขั้นตอนผลิต purified polysaccharide, purified carrier protein, monovalent bulk conjugates และ final product^{4, 6} สำหรับวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต World Health Organization (WHO) แนะนำให้ใช้วิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR) หรือวิธี serological test⁴ ซึ่งวิธี NMR เป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือจำเพาะซึ่งไม่ได้เป็นเครื่องมือที่ใช้ทั่วไปจึงเป็นข้อจำกัดในการนำใช้เพื่อการควบคุมคุณภาพในระหว่างกระบวนการผลิต⁶ ในขณะที่วิธี serological test

เป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยเทคนิค enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการ อาศัยหลักการแอนติเจนที่สนใจจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะ เกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อกัน และตรวจวัดผลการทดสอบด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง จึงเหมาะสำหรับใช้ในการควบคุมคุณภาพกระบวนการผลิต การศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิค Indirect ELISA มาใช้เป็นวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต โดยดำเนินการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี โดยกำหนดความเข้มข้นของแอนติเจนแต่ละซีโรกรุ๊ปคงที่ประมาณ 1 µg/ml เพื่อหาระดับเจือจางความเข้มข้นของสาร primary antibody และสาร secondary antibody ที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่สนใจ

โดยรายการทดสอบนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์แอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต ได้แก่ Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y และ W135 โดยมีโปรตีนพาหะ ได้แก่ Diphtheria toxoid หรือ Tetanus toxoid ซึ่งชนิดของโปรตีนพาหะที่เป็นส่วนประกอบในวัคซีนขึ้นอยู่กับการศึกษาส่วนประกอบทางการค้าของผู้ผลิต การเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับปัจจัยจากระดับความเข้มข้นของแอนติบอดี⁵ โดยค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ของตัวอย่างจะต้องมีค่าน้อยกว่า 3.0 หากมีค่า OD มากกว่า 3.0 ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการอ่านผล และผลการทดสอบไม่มีความน่าเชื่อถือ ต้องมีการเจือจางระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีให้ค่า OD อยู่ในช่วงที่อ่านค่าได้ถูกต้อง⁷ จากการศึกษาอัตราการเจือจางความเข้มข้นของสาร primary antibody และ secondary antibody พบว่าแอนติบอดีแต่ละชนิดมีระดับเจือจางความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยา antigen-antibody reaction ที่จำเพาะ โดยสารแอนติบอดี *N. meningitidis* antiserum ในแต่ละซีโรกรุ๊ป ระดับการเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 1:5,000 (สำหรับซีโรกรุ๊ป C, Y และ W135) และ 1:10,000 (สำหรับซีโรกรุ๊ป A) ส่วนสารแอนติบอดี Rabbit anti-Diphtheria toxin และ Rabbit anti-Tetanus toxin ใช้สำหรับตรวจเอกลักษณ์โปรตีนพาหะ ระดับเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสม

เท่ากับ 1:10,000 ในขณะที่สารแอนติบอดี secondary antibody (Goat polyclonal antibody to Rabbit IgG (H+L) HRP conjugated) ระดับการเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 1: 25,000 ส่งผลให้ค่า OD ของตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ อ่านค่า OD_{450nm} อยู่ในช่วง 1.1 - 2.6 ซึ่งอยู่ในช่วงการวัดผลที่มีความถูกต้อง และไม่เกินความสามารถของเครื่อง ELISA reader ในการอ่านค่าได้อย่างถูกต้อง และเกณฑ์กำหนดมาตรฐานค่า OD ของ blank ในเพลททดสอบจะต้องมีค่าน้อยกว่า 0.18 ผลจากการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบว่าค่า OD_{450nm} ของ blank มีค่าน้อยกว่า 0.1 ซึ่งผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดเมื่อวิธีผ่านการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมแล้ว ดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตาม ICH guideline⁵ ผลการศึกษาคความจำเพาะของวิธีให้ผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด (ตารางที่ 1, 2 และรูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความจำเพาะสูง โดยแอนติบอดีแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ไม่มีการเกิด cross reaction ข้ามแอนติเจนกัน เนื่องจากแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบในวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ผลิตจากแคปซูลของเชื้อแบคทีเรีย *N. meningitidis* ซึ่งเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ โดยโพลีแซคคาไรด์แต่ละซีโรกรุ๊ป จำแนกจากโครงสร้างโพลีแซคคาไรด์แคปซูลและความจำเพาะทางภูมิคุ้มกัน⁹⁻¹⁰ โดยจากผล

การศึกษาการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ระหว่างแอนติเจน Meningococcal polysaccharide กับแอนติบอดีของซีโรกรุ๊ปอื่น ๆ ยืนยันว่าวิธีนี้สามารถระบุเอกลักษณ์ของแอนติเจนแต่ละชนิดอย่างจำเพาะและถูกต้อง และผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกันพบว่าผลการทดสอบทั้ง 2 คนไปในรูปแบบเดียวกันและเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (ตารางที่ 3 และ 5) เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances พบว่าค่าเฉลี่ย Ratio ของสารมาตรฐานและตัวอย่างวัคซีนจากการทดสอบของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4 และ 6) แสดงว่าวิธีนี้มีความเที่ยงสูง สามารถใช้วิธีนี้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA ได้ และวิธีนี้ได้ถูกนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาในประเทศไทย

สรุปผล

การศึกษานี้ได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะสูงต่อโพลีแซคคาไรด์ในแต่ละซีโรกรุ๊ป ได้แก่ serogroups A, C, Y and W135 ซึ่งแต่ละซีโรกรุ๊ป

ไม่เกิด cross reaction ต่อกัน จึงสามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ของโพลีแซคคาไรด์แต่ละซีโรกรุ๊ปได้ และสามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ของโปรตีนพาหะ (carrier protein) ที่เชื่อมต่ออยู่กับโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งวิธีนี้สามารถบ่งชี้โปรตีนพาหะชนิด Diphtheria toxoid และ Tetanus toxoid carrier protein ได้ โดยโปรตีนพาหะแต่ละชนิดไม่เกิด cross reaction ต่อกัน และวิธีนี้มีความเที่ยง โดยผลการทดสอบจากผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คนเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความถูกต้อง และเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการได้

ข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงต่อแอนติเจนจำเพาะเท่านั้น วิธีนี้จึงสามารถตรวจวิเคราะห์ได้เฉพาะแอนติเจนจำเพาะ ได้แก่ *N. meningitidis* serogroup A, C, Y และ W135 และ carrier protein ชนิด Diphtheria toxoid และ Tetanus toxoid เท่านั้น หากวัคซีนมีส่วนประกอบเป็นแอนติเจนชนิดอื่น ๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ซีโรกรุ๊ปอื่น หรือ carrier protein ชนิดอื่น ต้องดำเนินการศึกษาความเหมาะสมของวิธี และศึกษาความถูกต้องของวิธีให้จำเพาะสำหรับแอนติเจนนั้น ๆ ต่อไป ได้แก่ การเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม

ขึ้นอยู่กับ การเจือจางระดับความเข้มข้นของ แอนติบอดี โดยค่าการดูดกลืนของตัวอย่างและ สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบควรอ่านค่า OD_{450nm} อยู่ในช่วง 1.1 - 2.6 ซึ่งเป็นช่วงการวัดผล ที่มีความถูกต้อง และไม่เกินความสามารถของ เครื่องอ่านผล และค่าการดูดกลืนแสงของ blank ต้องมีค่าน้อยกว่า 0.1 นอกจากนี้การเก็บรักษา สารมาตรฐาน สารแอนติบอดีต้องเก็บรักษาในช่วง อุณหภูมิที่กำหนดไว้ และทำการแบ่งสาร (aliquot) ใส่หลอดทดลอง ปริมาตรให้เพียงพอสำหรับการ นำมาใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง เพื่อลดการแช่แข็งและ การละลายหลายครั้ง (Freeze-Thaw cycle) และการทดสอบในแต่ละครั้งควรเตรียมสารเคมี ใหม่ทุกครั้ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการ ส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกว.) ที่ได้มอบทุนสนับสนุนการพัฒนาภายใต้โครงการ การพัฒนานวัตกรรม การควบคุมคุณภาพวัคซีน แบบที่เรียกชนิดโพลีแซ็กคาไรด์ และขอขอบคุณ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการสนับสนุนการดำเนินงานในทุกด้าน

เอกสารอ้างอิง

1. Mahmoud FM, Harhara T. *Neisseria meningitidis* pneumonia with bacteremia without meningitis: An atypical presentation. IDCases 2020; 21:e00897: 1-3.

2. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำรา วัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค: วัคซีน ป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น. กรุงเทพฯ: เวิร์ค พริ้นท์; 2562.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Meningococcal Disease [Internet]. [cited 2023 Aug 21]; [6 screens]. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/meningococcal-disease>
4. World Health Organization. Annex 2 Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of group A meningococcal conjugate vaccines. Technical Report Series No. 962, Geneva; 2011. p. 134–7.
5. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) [Internet]. 2005; [cited 2022 Jun 18]; [17 screens]. Available from: [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2\(R1\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf)
6. Sharma N, Hanif S, Upadhyay D, Chhikara MK. Inhibition ELISA as a putative tool for the identification and quantification of meningococcal A and X polysaccharides at various stages of vaccine development. J. Immunol Methods 2019; 493: 1-7.

7. Dell EJ. Optical Density for Absorbance Measurements [Internet]. BMG LABTECH; 2021 Oct 22- [cited 2022 Apr 7]. Available from: <https://www.bmglabtech.com/en/blog/optical-density-for-absorbance-assays/>
8. World Health Organization. Training manual for Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitation of *Streptococcus pneumoniae* serotype specific IgG (Pn PS ELISA) (007sp Version). Birmingham, AL, University of Alabama [Internet]. 2010; [cited 2022 May 18]; [29 screens]. Available from: [https://www.vaccine.uab.edu/uploads/mdocs/ELISAProtocol\(007sp\).pdf](https://www.vaccine.uab.edu/uploads/mdocs/ELISAProtocol(007sp).pdf)
9. Harrison OB, Claus H, Jiang Y, Bennett JS, Bratcher HB, Jolley KA, et al. Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus. Emerg Infect Dis [Internet]. 2013. [cited 2023 Oct 12]. Available from: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1904.111799>
10. Spinoso MR, Progida C, Tala A, Cogli L, Alifano P, Bucci C. The *Neisseria meningitidis* Capsule Is Important for Intracellular Survival in Human Cells. Infect Immun 2007; 75(7): 3594-603.