
การศึกษาความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี ต่อ Filamentous Haemagglutinin ในซีรัม หนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีนไกรณชนิดไรเซลล์โดย ELISA

อภิชัย ศุภสารสาทร รัชชานนท์ รักชีพ อัจฉรย์ อาเมน วิริยามาศย์ เจริญคุณธรรม และสุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วัคซีนไกรณชนิดไรเซลล์ที่ผลิตในประเทศไทย Filamentous Hemagglutinin (FHA) เป็นสารสำคัญชนิดหนึ่ง ซึ่งต้องมีการควบคุมความแรงให้ได้มาตรฐาน การศึกษานี้จึงทำการพัฒนางานตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้ดำเนินการศึกษาความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อ Filamentous Haemagglutinin ในซีรัม หนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีนไกรณชนิดไรเซลล์โดย ELISA ผลการศึกษา พบว่าวิธีมีความจำเพาะและมีความเป็นเส้นตรงในช่วง ความเข้มข้นของ anti-FHA ระหว่าง 1.95-4,000 mIU/ml มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.99 ซีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 3.91 และ 4,000 mIU/ml ช่วงค่าพิสัยอยู่ระหว่าง 15.62-1,000 mIU/ml ความแม่นยำมีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง -1.34-1.69% ความเที่ยงมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 2.23-20.00% และความทนของวิธีมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 12.21-19.68% ผลแสดงให้เห็นว่าวิธีมีความถูกต้องเหมาะสม สามารถใช้ตรวจความแรงต่อ FHA ของวัคซีนไกรณชนิดไรเซลล์ได้

คำสำคัญ: วัคซีนไกรณชนิดไรเซลล์, ความแรง, anti-FHA, ELISA

Corresponding author E-mail: apichai.s@dmsc.mail.go.th

Received: 1 October 2019

Revised: 1 July 2020

Accepted: 10 February 2021

บทนำ

โรคไอกรน (Pertussis) เป็นโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจส่วนบน ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Bordetella pertussis* ผู้ป่วยมีอาการไอที่เป็นเอกลักษณ์ เป็นเสียงที่เกิดจากการหายใจลำบากตามหลังอาการไอที่เรียกว่า Whooping cough โรคไอกรนติดต่อกันได้ง่าย โดยเชื้อจะกระจายอยู่ในละอองของเสมหะ น้ำมูก น้ำลายของผู้ป่วย และจะติดต่อกันเมื่อละอองเชื้อเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ ส่วนใหญ่ติดเชื้อมาจากผู้ใหญ่ในครอบครัวซึ่งมีการติดเชื้อแต่ไม่มีอาการ (carrier) หรือมีอาการไม่มาก โรคไอกรนเป็นได้กับทารกตั้งแต่เดือนแรก⁽¹⁾ เด็กทารกอายุน้อยกว่า 6 เดือนที่มีภาวะแทรกซ้อน เกิดปอดอักเสบจากการติดเชื้อจะมีอาการรุนแรงและอัตราการเสียชีวิตสูง⁽²⁾ ปัจจุบันแม้ว่ามีวัคซีนสำหรับป้องกันโรคไอกรนแต่ยังไม่สามารถกำจัดให้หมดไปได้⁽³⁾

วัคซีนป้องกันโรคไอกรนมี 2 ชนิด คือ วัคซีนไอกรนชนิดที่ทำจากแบคทีเรียทั้งเซลล์ (whole cell: wP) และชนิดไร้เซลล์ (acellular: aP) ซึ่งผสมอยู่กับวัคซีนรวมคอตีบ-บาดทะยัก เป็นวัคซีน DTwP หรือ DTaP วัคซีนทั้ง 2 ชนิดนี้มีประสิทธิภาพไม่ต่างกัน โดย DTwP เป็นวัคซีนที่ใช้ในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520 แต่ DTwP นั้น จะทำให้เกิดอาการข้างเคียงมากกว่า DTaP โดยเด็กที่ได้รับวัคซีน DTwP อาจจะมีไข้สูง มีอาการชัก กรีดร้องนาน หรือมีภาวะตัวอ่อนและไม่ตอบสนอง (hypotonic hyporesponsive episode) ซึ่งเกิดขึ้นภายใน 48 ชั่วโมง หลังได้รับวัคซีน wP ซึ่งวัคซีน aP ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่พึงประสงค์ดังกล่าว⁽⁴⁾ วัคซีน aP เป็นวัคซีนที่ผลิตจากสารสกัดเฉพาะบางส่วนของตัวเชื้อไอกรนที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรค โดยส่วนประกอบของเชื้อไอกรนที่นำมาผลิตวัคซีน ได้แก่ Pertussis toxin (PT), Filamentous hemagglutinin (FHA), Pertactin (PRN) และ Fimbrial agglutinin (FIM) โดยวัคซีนที่ผลิตมาจากแต่ละบริษัท จะมีส่วนประกอบของเชื้อไอกรนแตกต่างกันได้ตั้งแต่ 2 ถึง 4 ส่วนประกอบ ทั้งนี้วัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์จะมี PT และ FHA เป็นส่วนประกอบหลัก FHA เป็นโมเลกุลใหญ่ขนาด 367-kDa มีโครงสร้างเป็นรูป hairpin-shaped เมื่อเชื้อไอกรนเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจส่วนบน FHA จะทำหน้าที่เกาะกับ ciliated respiratory epithelium ทำให้ตัวเชื้ออยู่ในระบบทางเดินหายใจได้ แล้วปล่อย PT ซึ่งเป็น exotoxin ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพกระตุ้น lymphocytosis และ pancreatic islet cell activity รวมทั้งเหนี่ยวนำทำให้ร่างกายไวต่อฮิสตามีน⁽²⁾

การผลิตวัคซีน aP ของแต่ละบริษัทจะมีความแตกต่างกัน ได้แก่ ความหลากหลายของสายพันธุ์ตัวเชื้อไอกรน วิธีที่ใช้ในการผลิต วิธีที่ใช้สกัดส่วนประกอบของเชื้อ วิธีการทำให้ PT หมดพิษ (detoxified) กลายเป็น Pertussis toxoid (PTxd) รวมทั้งปริมาณ PT และ FHA ที่ใช้เข้าสู่สูตรผสมเป็นวัคซีน จึงทำให้วัคซีนมีข้อกำหนดเฉพาะ (product-specific) ของแต่ละชนิด (brand) ต่างกัน⁽²⁾ วัคซีนเหล่านี้ต้องได้รับการตรวจสอบคุณภาพ ประสิทธิภาพ ประกอบการขึ้นทะเบียนยา และก่อนการจำหน่ายแต่ละรุ่น⁽⁵⁾ ปัจจุบันวัคซีน aP ที่ผลิตในประเทศเป็นวัคซีน aP แบบรีคอมบิแนนท์ ซึ่งเป็นวัคซีนตัวแรกที่ได้พัฒนาขึ้นโดยนักวิจัยไทย ได้รับการจดสิทธิบัตรในหลายประเทศ⁽⁶⁾ ใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อทำให้ความเป็นพิษของโปรตีนแอนติเจนหมดไป ซึ่งให้ผลดีกว่า ปลอดภัยกว่า และมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารเคมี⁽⁷⁾

การตรวจสอบคุณภาพวัคซีน aP ด้านความแรง เป็นการวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immunological activity) ซึ่งมี 2 วิธี คือ mouse immunogenicity test (MIT) และ modified mouse intracerebral challenge assay (MICA) โดยวิธี MIT เป็นวิธีการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีในซีรัมของหนูถีบจักรที่กระตุ้นด้วยวัคซีน aP โดยใช้ ELISA^(8,9) เป็นวิธีที่ใช้วัดระดับภูมิคุ้มกันที่ไม่ต้องใช้ตัวเชื้อไอกรนฉีดเข้าสมองหนูถีบจักรซึ่งจะทำให้สัตว์ทดลองมีความเจ็บปวดทรมานมากเหมือนการทดสอบด้วยวิธี MICA แต่อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำวิธีการทดสอบมาใช้งาน หน่วยงานผู้ควบคุมคุณภาพภาครัฐ คือ สถาบันชีววัตถุ ต้องทำการศึกษาความถูกต้องของวิธีก่อน เนื่องจากความจำเพาะของวัคซีน (Product-specific vaccine) ต่อการทดสอบ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองที่ใช้และความแตกต่างในรายละเอียดขั้นตอนวิธีของแต่ละห้องปฏิบัติการ⁽⁶⁾ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการ

ตรวจสอบคุณภาพวัคซีน aP โดยทำการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีน aP โดย ELISA แบบ Indirect เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพด้านความแรงของวัคซีน aP ของประเทศ ซึ่งมีหลักการการทดสอบที่ใช้เฟลทที่มี FHA แอนติเจนของวัคซีน aP เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม แล้วใส่ตัวอย่างซีรัมลงไปหลุม บ่มในอุณหภูมิที่ 37 °C แอนติบอดีในซีรัมจะจับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะ และเมื่อเติมเอนไซม์ HRP conjugated ลงไปจับกับแอนติบอดีแอนติเจนคอมเพล็กซ์ แล้วเติม substrate จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ HRP เกิดสารสีน้ำเงิน จากนั้นเติมสารเพื่อหยุดปฏิกิริยา สารสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งความเข้มของสีจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของแอนติบอดีในตัวอย่าง

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: WHO Reference Reagent *Bordetella pertussis* anti-serum (mouse) 1RR (Code: 97/642, NIBSC, UK) ที่มี anti-FHA antibody (WHO Ref. 97/642), In-house FHA standard in 40% glycerol สารมาตรฐานจากผู้ผลิตที่ได้สอบเทียบกับ international reference standard FHA (Code: 90/520, NIBSC, UK) และวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ (acellular pertussis vaccine)

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบเป็นชนิด Analytical Reagent grade (AR grade) ได้แก่ Sodium chloride (Merck, Germany), Potassium chloride (Sigma-Aldrich, USA), Sodium hydrogen phosphate (Merck, Germany), Potassium hydrogen phosphate (Merck, Germany), Sodium carbonate (Merck, Germany), Sodium hydrogen carbonate (Sigma-Aldrich, USA), Tween 20 (Merck, Germany), Hydrochloric acid 37% (Merck, Germany), Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA), Rabbit anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate (Abcam, England), TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL, USA)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง Microplate reader infinite F200 Pro (Tecan สวิตเซอร์แลนด์) เครื่อง Microplate wash: ImmunoWash™ 1575 (BIO-RAD สหรัฐอเมริกา) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C (memmert สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

ตัวอย่าง

ซีรัมหนูถีบจักรที่ได้รับการฉีดการกระตุ้นด้วยวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์

การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมวัคซีนสำหรับฉีดสัตว์ทดลอง: ทำการเตรียมวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ (acellular pertussis vaccine, code No. FB-PE25001) โดยเตรียมวัคซีน 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นวัคซีนไม่เจือจาง (undiluted) กลุ่มที่ 2 เป็นวัคซีนเจือจางด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) ได้เป็นวัคซีนความเจือจาง 1/6.25 และกลุ่มที่ 3 เป็นวัคซีนความเจือจางด้วย PBS ได้เป็นวัคซีนความเจือจาง 1/15.625

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการเตรียมซีรัมจากสัตว์ทดลอง: ทำการฉีดวัคซีนหนูถีบจักรกลุ่มละ 16 ตัว จำนวน 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนที่ไม่เจือจาง (undiluted) กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนความเจือจาง 1/6.25 และกลุ่มที่ 3 ฉีดวัคซีนความเจือจาง 1/15.625 และฉีดหนูด้วย PBS จำนวน 10 ตัว เป็นกลุ่มควบคุม โดยฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal) ตัวละ 0.5 ml หลังจากนั้น 35 วัน ทำการสลับหนูด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ก่อนเจาะเลือด นำเลือดแต่ละตัวแยกใส่ในหลอด ปั่นแยกซีรัมด้วยเครื่องปั่นความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดซีรัมของแต่ละหลอดมารวมกัน (Pooled serum) ในแต่ละกลุ่มแล้วเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20°C

การเจือจางซีรัมหนูถีบจักร: เจือจางซีรัมหนูด้วย diluent Buffer 0.3% (w/v) BSA ใน PBST โดยกลุ่มที่ 1 เป็นซีรัมหนูที่ฉีดวัคซีน undiluted เป็นกลุ่มที่มีระดับ anti-FHA สูง (High titer group) เจือจาง 1,000, 2,000, 4,000 และ 8,000 เท่า กลุ่มที่ 2 เป็นซีรัมหนูที่ฉีดวัคซีนความเจือจาง 1/6.25 เป็นกลุ่มที่มีระดับ anti-FHA ปานกลาง (Medium titer group) เจือจาง 400, 800, 16,000 และ 3,200 เท่า กลุ่มที่ 3 เป็นซีรัมหนูที่ฉีดวัคซีนความเจือจาง 1/15.625 เป็นกลุ่มที่มีระดับ anti-FHA ต่ำ (Low titer group) เจือจาง 150, 300, 600 และ 1,200 เท่า ส่วนกลุ่มควบคุม (Normal mouse serum) เจือจาง 50 เท่า

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR อายุ 5 สัปดาห์ หรือน้ำหนัก 25–30 กรัม จำนวน 46 ตัว จำนวน 1 กลุ่ม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม (โครงการได้รับการอนุมัติใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย โดยคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขโครงการ 59-033)

การตรวจวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA แบบ Indirect โดยใช้เพลทที่มี FHA แอนติเจนของวัคซีน aP เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม แล้วใส่ตัวอย่างซีรัมลงไปหลุม บ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม Anti-FHA ในซีรัมจะจับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะ และเมื่อเติมเอนไซม์ HRP conjugated ลงไปจับกับแอนติบอดีแอนติเจนคอมเพล็กซ์ แล้วเติม substrate จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ HRP เกิดสารสีน้ำเงิน จากนั้นเติม stop solution เพื่อหยุดปฏิกิริยา สารสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งความเข้มของสีจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของแอนติบอดีในตัวอย่าง โดยมีรายละเอียดดังนี้

เคลือบเพลท 96 หลุม (Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates, Thermo Scientific™, USA) ด้วย FHA antigen (In-house FHA standard in 40% glycerol) ที่เจือจางด้วย coating buffer ให้มีความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บที่อุณหภูมิ $2-8^{\circ}\text{C}$ ข้ามคืนล้างเพลทด้วย PBST โดยใช้เครื่อง Microplate wash: ImmunoWash™ 1575 (BIO-RAD, USA) จากนั้นเติม blocking buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 1 ชั่วโมง ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37°C (Memmert, Germany) ใส่สารมาตรฐาน anti-FHA (WHO Ref. 97/642) และซีรัมของหนูแต่ละกลุ่มปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที ล้างเพลทด้วย PBST แล้วเติมสารละลาย Rabbit anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate (Abcam, UK) ที่เจือจาง 20,000 เท่า ด้วย diluent Buffer (0.3% (w/v) BSA ใน PBST ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที ล้างเพลทด้วย PBST เติมสาร SureBlue Reserve™, TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL, USA) ทั้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N HCl, Hydrochloric acid 37% (Merck, Germany) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL, USA) ได้ค่า FHA แอนติบอดี โดยโปรแกรมให้เครื่องคำนวณค่า FHA แอนติบอดี ของตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐานที่ทราบค่า FHA แอนติบอดีให้อัตโนมัติ

การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์^(10,11)

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ทำการเจือจาง WHO Ref. 97/642 ที่มี Anti-FHA antibody ด้วย diluent buffer จากระดับความเข้มข้น 286,000 mIU/ml เป็น 4,000, 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.95 mIU/ml ระดับความเข้มข้นละ 6 ขั้ว ตรวจหาปริมาณด้วยเทคนิค Indirect FHA ELISA และวิเคราะห์ข้อมูลโดย software ของเครื่อง Microplate reader infinite F200 Pro (Tecan, Switzerland) คำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแอนติบอดีกับค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ความสมรูป (Equality) คือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (goodness of fit with a coefficient of correlation (r)) ต้องมีค่ามากกว่า 0.95 และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นแอนติบอดีจริงกับค่าความเข้มข้นแอนติบอดีที่วัดได้ โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination (r^2)) ต้องมีค่ามากกว่า 0.95

ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ) จากการทดสอบความเป็นเส้นตรง สามารถอ่านค่าต่ำของขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (the lower limit of quantification (LLOQ)) และค่าสูงของขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (the upper limit of quantification (ULOQ)) พิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ต่ำสุดและที่สูงสุด ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ไม่เกิน 20% และค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%relative error (%RE)) อยู่ระหว่าง $\pm 20\%$ ของความเข้มข้นแอนติบอดี โดย %RE คำนวณได้จาก $\%RE = 100 \times (BC - NC) / NC$, BC = ความเข้มข้นที่คำนวณได้ และ NC = ความเข้มข้นจริง

พิสัย (Range) จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ สามารถเลือกพิสัยช่วงที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติบอดีที่มีค่าอยู่ระหว่าง LLOQ และ ULOQ มีจำนวนค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานอย่างน้อย 6 ค่า โดยค่า %CV ไม่เกิน 15% และค่า %RE ของความเข้มข้นแอนติบอดีมาตรฐานอยู่ระหว่าง $\pm 15\%$ ของความเข้มข้นแอนติบอดี

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ทดสอบหาค่า Anti-FHA antibody ในตัวอย่าง

- ซีรัมหนูถีบจักรจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนความเข้มข้นต่างๆ ตามการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการเตรียมซีรัมจากสัตว์ทดลองข้างต้น (High titer group, Medium titer group, Low titer group, Normal mouse serum) และ Diluent buffer ที่ความเจือจาง 1, 4, 16, 32, 64, 256, 1,024, 4,096 และ 16,384 เท่า
- แอนติบอดีมาตรฐาน: WHO Ref. 97/642 ที่มี Anti-FHA ความเจือจาง 64, 256, 1,024, 4,096 และ 16,384 เท่า

นำค่าดูดกลืนแสง (OD) แต่ละความเจือจางมาประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง the specific signal to noise (S/N) ratio กับ Serum dilution โดยนำค่า OD ของ Diluent buffer ที่วัดได้ไปหารกับค่า OD ของตัวอย่างอื่นๆ ซึ่ง S/N ratio จะแสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยซีรัมหนูถีบจักร High titer group, Medium titer group, Low titer group ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนควรแสดง antibody response ในระดับสูงกว่ากลุ่มควบคุม Normal mouse serum ที่แสดง antibody response ในระดับต่ำ และไม่ควรมีพบ antibody response ใน Diluent buffer เนื่องจากไม่ได้ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) เจือจาง WHO Ref. 97/642 ที่มี anti-FHA ด้วย diluent buffer จากระดับความเข้มข้น 286,000 mIU/ml เป็น 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 และ 15.62 mIU/ml ระดับความเข้มข้นละ 2 ขั้ว ต่อการทดสอบจำนวน 3 การทดสอบ นำผลการทดสอบมาคำนวณค่า %RE โดยค่า %RE ต้องอยู่ระหว่าง $\pm 20\%$ ⁽¹¹⁾ ของความเข้มข้นแอนติบอดี

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability) ทำการทดสอบค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมหนูถีบจักรจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การเตรียมซีรัมจากสัตว์ทดลองและการเจือจางซีรัมหนูถีบจักรข้างต้น คือ

High titer group, Medium titer group, Low titer group และ Normal mouse serum โดยทดสอบในวันและเวลาเดียวกันจำนวน 3 การทดสอบ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณ %CV ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 20%⁽¹¹⁾

การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediated Precision) ทำการทดสอบค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมหนูถีบจักรตามการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การเตรียมซีรัมจากสัตว์ทดลองและการเจือจางซีรัมหนูถีบจักรข้างต้น คือ High titer group, Medium titer group, Low titer group และ Normal mouse serum โดยทดสอบต่างวันและเวลาอย่างน้อย 3 ครั้ง ครั้งละ 1 การทดสอบ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณ %CV ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 20%⁽¹¹⁾

การทดสอบความทนของวิธี (Robustness) การทดสอบค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมตามการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การเตรียมซีรัมจากสัตว์ทดลองและการเจือจางซีรัมหนูถีบจักรข้างต้น คือ High titer group, Medium titer group, Low titer group และ Normal mouse serum ด้วยผู้วิเคราะห์ 2 คน โดยทดสอบคนละ 3 การทดสอบ นำผลที่ได้จากทั้ง 2 คน มาคำนวณ %CV กำหนดเกณฑ์ยอมรับไว้ที่ %CV ไม่เกิน 20%⁽¹¹⁾

ผล

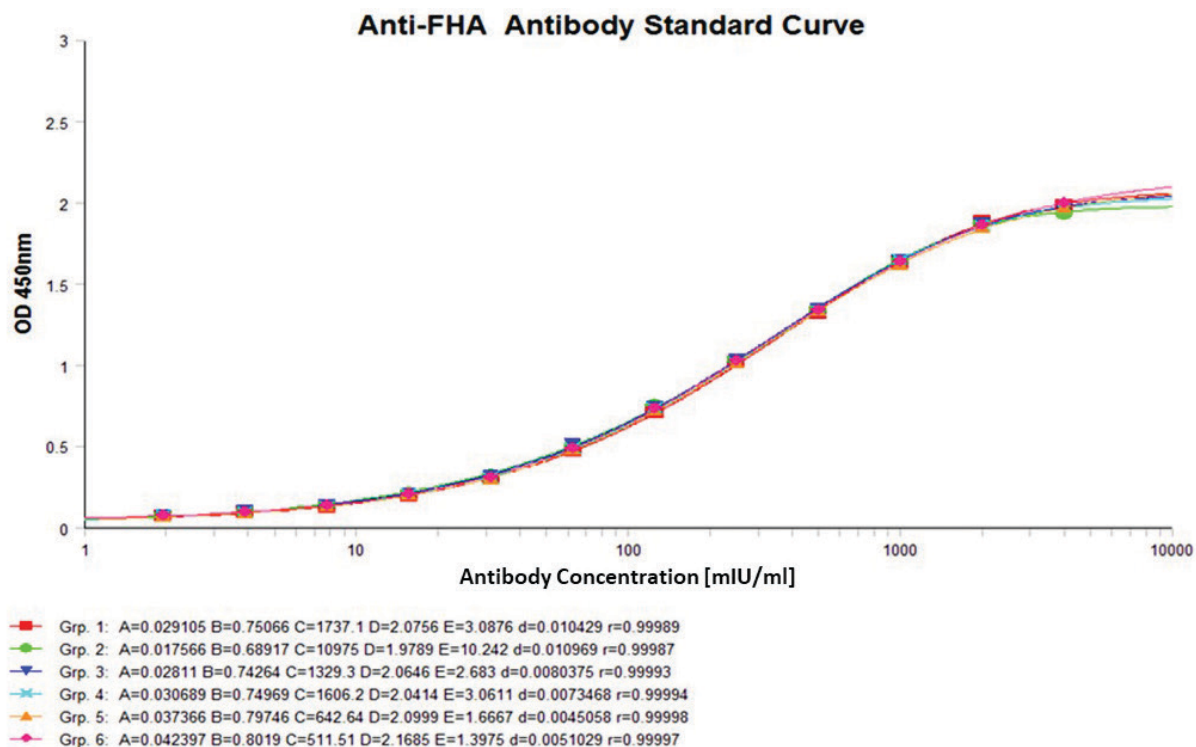
การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงที่ระดับความเข้มข้น 4,000, 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90 และ 1.95 mIU/ml ระดับความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ได้ค่าความเข้มข้นของ anti FHA antibody เฉลี่ยของแต่ละระดับความเข้มข้นมีความลดหลั่นกันตามลำดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบจาก 3,782.45 ถึง 2.41 mIU/ml ดังแสดงในตารางที่ 1 และพบว่ามีความ goodness of fit with a coefficient of correlation (r) เฉลี่ยจากกราฟแต่ละเส้นได้เท่ากับ 0.99993 ดังแสดงในภาพที่ 1 และมีค่า a coefficient of determination (r^2) เท่ากับ 0.9973 ดังแสดงในภาพที่ 2

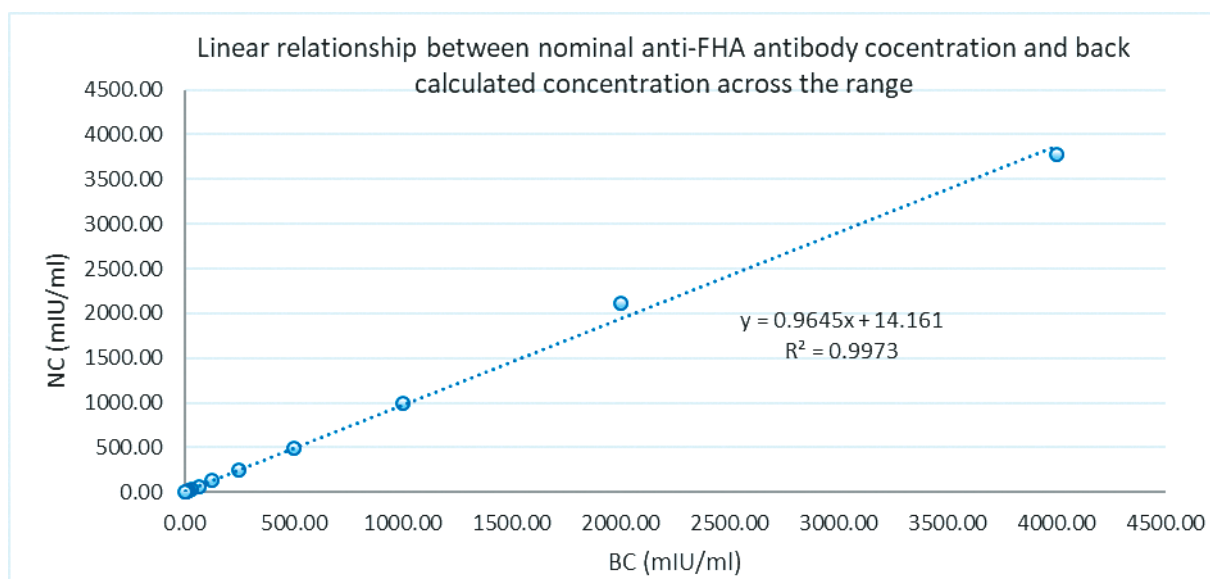
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงด้วยเทคนิค Indirect FHA ELISA

No.	Nominal concentra- tion	Indirect FHA ELISA							Average (mIU/ml)	SD	%CV	%RE
		Back calculation anti FHA antibody centration (mIU/ml)										
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6					
1	4,000.00	3,715.5	3,539.3	3,800.1	3,849.8	3,885.2	3,904.8	3,782.45	137.10	3.62	-5.44	
2	2,000.00	2,183.4	2,214.4	2,116.1	2,067.4	2,077.4	2,057	2,119.28	65.56	3.09	5.96	
3	1,000.00	976.66	987.05	991.03	1004	987.96	1,002	991.45	10.19	1.03	-0.86	
4	500.00	484.19	482.72	489.46	490.12	496.16	489.61	488.71	4.80	0.98	-2.26	
5	250.00	257.18	252.5	250.93	247.58	250.12	250.92	251.54	3.20	1.27	0.62	
6	125.00	126.79	129.54	126.83	130.38	126.54	127.8	127.98	1.61	1.26	2.38	
7	62.50	63.321	64.199	65.114	62.957	63.302	62.483	63.56	0.95	1.49	1.70	
8	31.25	29.782	29.385	29.817	29.718	30.04	29.987	29.79	0.23	0.78	-4.68	
9	15.63	14.936	14.72	14.587	15.208	15.648	15.792	15.15	0.49	3.25	-3.08	
10	7.81	7.218	7.0903	7.1835	7.3313	7.631	7.7302	7.36	0.26	3.52	-5.71	
11	3.91	3.9943	4.0776	4.2254	3.9511	3.8807	3.8726	4.00	0.13	3.35	2.31	
12	1.95	2.6113	2.5523	2.4327	2.4675	2.2154	2.1518	2.41	0.18	7.64	23.34	

Rep. = การทดสอบซ้ำ



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Anti-FHA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm (Linear Relationship of Indirect FHA ELISA)

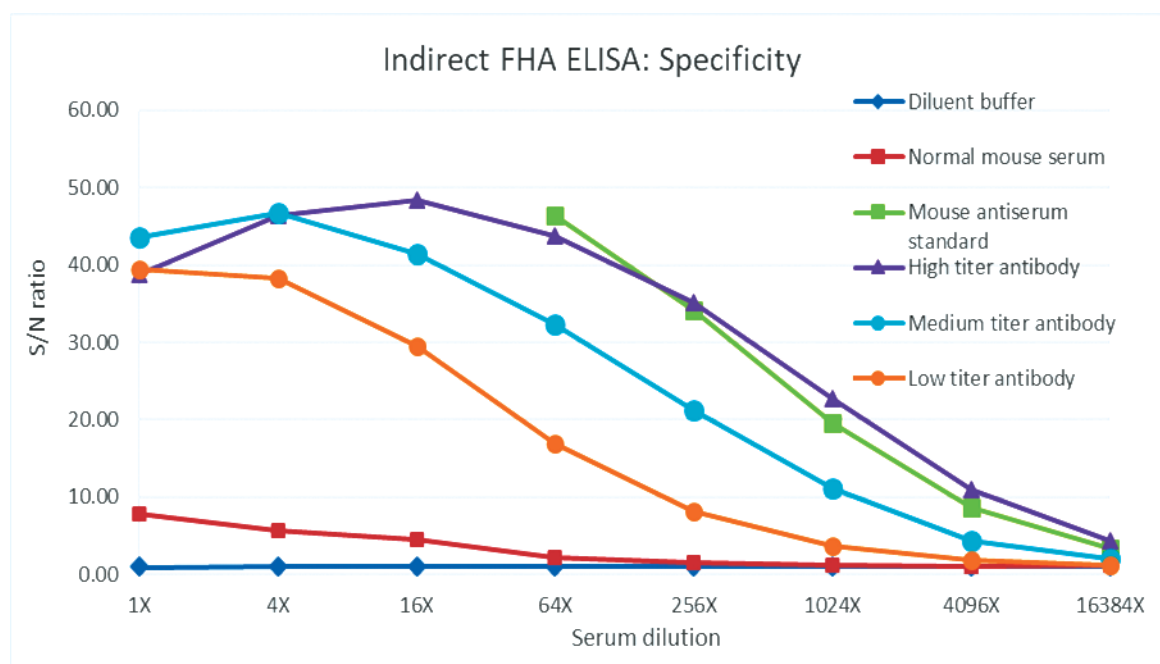


ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง nominal anti-FHA antibody concentration (NC) แกน Y กับค่า back calculated concentration (BC) แกน X

ค่า the lower limit of quantification (LLOQ) และ the upper limit of quantification (ULOQ) พิจารณาจากตารางที่ 1 ได้ค่า LLOQ และค่า ULOQ เท่ากับ 3.91 mIU/ml (%CV = 3.35, %RE = 2.31) และ 4,000 mIU/ml (%CV = 3.62, %RE = -5.44) ตามลำดับ

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ พบว่าพิสัย (Range) มีช่วงที่เหมาะสมคือ 15.63 ถึง 1,000 mIU/ml โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติบอดีที่มีค่าอยู่ระหว่าง LLOQ และ ULOQ ได้ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 7 ค่า คือ แอนติบอดีความเข้มข้นที่ 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250, 500 และ 1,000 mIU/ml โดยมี %CV เท่ากับ 3.25, 0.78, 1.49, 1.26, 1.27, 0.98 และ 1.03 ตามลำดับ และมีค่า %RE เท่ากับ -3.08, -4.68, 1.70, 2.38, 0.62, -2.62 และ -0.86 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการศึกษาความจำเพาะ (Specificity) ค่า Anti-PT antibody ซีรัมหนูถีบจักรที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีน กลุ่ม High titer group, Medium titer group, Low titer group และ Normal mouse serum เมื่อนำค่าดูดกลืนแสง (OD) แต่ละความเจือจางมาประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง S/N ratio กับค่า Anti-FHA antibody ในแต่ละ Serum dilution พบว่าแสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างซีรัมหนูถีบจักร High titer group, Medium titer group, Low titer group ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีน มีระดับ antibody response สูงกว่ากลุ่มควบคุม Normal mouse serum อย่างชัดเจน โดยกลุ่มควบคุม Normal mouse serum จะมี antibody response ในระดับต่ำ และไม่พบ antibody response ใน Diluent buffer ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง S/N ration กับ Anti-FHA antibody ใน Serum dilution

ผลการศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ที่ทดสอบ Anti-FHA ความเข้มข้น 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250, 500 และ 1,000 mIU/ml จำนวน 3 การทดสอบ แสดงค่า %RE ของ Anti-FHA antibody เท่ากับ -0.36, 0.89, -1.34, 1.69, -0.80, -0.73 และ 0.64 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยสรุปค่า %RE อยู่ระหว่าง $\pm 20\%$ ของความเข้มข้นแอนติบอดี

ตารางที่ 2 ค่า %RE ในการทดสอบความแม่นยำของวิธี

Standard Anti-FHA IgG antibody (mIU/ml)	Assay 1	Assay 2	Assay 3	Mean	SD	%CV	%RE
15.63	15.67	15.39	15.66	15.57	0.16	1.00	-0.36
31.25	31.45	31.76	31.38	31.53	0.20	0.63	0.89
62.50	61.04	62.58	61.37	61.66	0.81	1.31	-1.34
125.00	129.01	123.66	128.66	127.11	2.99	2.35	1.69
250.00	243.97	254.17	245.85	248.00	5.43	2.19	-0.80
500.00	505.92	500.11	504.92	503.65	3.11	0.62	0.73
1000.00	998.60	1017.10	1003.60	1006.43	9.57	0.95	0.64

ผลการศึกษาความเที่ยง (Precision) การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability) ที่ทดสอบค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมกลุ่ม High titer, Medium titer, Low titer และกลุ่มควบคุม ในวันและเวลาเดียวกันอย่างน้อยจำนวน 3 การทดสอบ ได้ %CV เท่ากับ 2.30, 9.37, 10.93 และ 12.64 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediated Precision) ที่ทดสอบค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมกลุ่ม High titer, Medium titer, Low titer และกลุ่มควบคุม ต่างวันและเวลากันจำนวน 3 การทดสอบ ได้ %CV 2.36, 20.00, 13.59 และ 15.70 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยสรุป %CV มีค่าไม่เกิน 20%

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ Repeatability

Anti-FHA indirect ELISA: Method validation – Precision (Repeatability)							
Sample name	Sample Dilution	Anti-FHA antibody titer (IU/ml)			Average (IU/ml)	SD	%CV
		Assay 1	Assay 2	Assay 3			
High titer mice sera	1,000X	375.79	345.52	333.15	351.49		
	2,000X	398.48	414.73	393.29	402.17		
	4,000X	414.72	459.12	467.99	447.28		
	8,000X	474.63	520.44	492.98	496.02		
	Mean	415.90	434.95	421.85	424.24	9.74	2.30
Medium titer mice sera	400X	111.28	118.07	121.22	116.86		
	800X	121.41	136.55	147.94	135.30		
	1,600X	130.96	165.63	155.99	150.86		
	3,200X	140.09	178.73	166.27	161.70		
	Mean	125.94	149.75	147.85	141.18	13.23	9.37
Low titer mice sera	150X	16.98	18.53	20.38	18.63		
	300X	19.45	23.55	25.32	22.77		
	600X	22.15	26.85	26.50	25.17		
	1,200X	26.16	30.79	32.89	29.95		
	Mean	21.18	24.93	26.27	24.13	2.64	10.93
Normal mice sera	50X	0.68	1.08a	0.81	0.74	0.09	12.64

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Intermediated Precision

Anti-FHA indirect ELISA: Method validation – Precision (Intermediated Precision)							
Sample name	Sample Dilution	Anti-FHA antibody titer (IU/ml)			Average (IU/ml)	SD	%CV
		Day 1	Day 2	Day 3			
High titer mice sera	1,000X	322.25	411.25	375.79	369.76		
	2,000X	401.82	441.00	398.48	413.77		
	4,000X	446.64	451.22	414.72	437.53		
	8,000X	482.53	423.19	474.63	460.12		
	Mean	413.31	431.67	415.90	420.29	9.93	2.36
Medium titer mice sera	400X	116.40	88.55	111.28	105.41		
	800X	137.50	93.71	121.41	117.54		
	1,600X	153.96	97.23	130.96	127.38		
	3,200X	160.90	92.15	140.09	131.04		
	Mean	139.49	92.91	125.94	119.45	23.96	20.00
Low titer mice sera	150X	15.46	16.23	16.98	16.22		
	300X	22.14	17.69	19.45	19.76		
	600X	24.02	17.42	22.15	21.19		
	1,200X	26.22	16.28	26.16	22.89		
	Mean	21.96	16.91	21.18	20.02	2.72	13.59
Normal mice sera	50X	0.85	1.18a	0.68	0.76	0.12	15.70

ผลการศึกษาความทนของวิธี (Robustness) จากผู้วิเคราะห์ 2 คน ได้ค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมกลุ่ม High titer, Medium titer, Low titer และกลุ่มควบคุม คนละ 3 การทดสอบ ได้ค่า %CV เท่ากับ 12.21, 19.68, 18.27 และ 17.82 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยสรุป %CV มีค่าไม่เกิน 20%

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Robustness

Anti-FHA indirect ELISA: Method validation – Precision (Robustness)										
Sample name	Sample Dilution	Anti-FHA antibody titer (IU/ml)						Average (IU/ml)	SD	%CV
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6			
High titer mice sera	1,000X	322.25	411.25	375.79	322.48	299.20	298.31	338.21		
	2,000X	401.82	441.00	398.48	371.84	328.31	315.48	376.15		
	4,000X	446.64	451.22	414.72	417.26	340.63	329.48	399.99		
	8,000X	482.53	423.19	474.63	456.32	347.87	347.66	422.03		
	Mean	413.31	431.67	415.90	391.97	329.00	322.73	384.10	46.89	12.21

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Robustness (ต่อ)

Anti-FHA indirect ELISA: Method validation – Precision (Robustness)										
Sample name	Sample Dilution	Anti-FHA antibody titer (IU/ml)						Average (IU/ml)	SD	%CV
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6			
Medium titer mice sera	400X	116.40	88.55	111.28	111.55	81.88	74.46	97.35		
	800X	137.50	93.71	121.41	126.35	91.35	82.13	108.74		
	1,600X	153.96	97.23	130.96	134.74	114.52	89.23	120.11		
	3,200X	160.90	92.15	140.09	137.33	151.86	81.22	127.26		
	Mean	139.49	92.91	125.94	127.49	109.90	81.76	112.92	22.22	19.68
Low titer mice sera	150X	15.46	16.23	16.98	17.48	14.63	13.15	15.65		
	300X	22.14	17.69	19.45	22.13	17.34	14.74	18.92		
	600X	24.02	17.42	22.15	23.42	17.84	15.55	20.07		
	1,200X	26.22	16.28	26.16	27.59	18.46	12.55	21.21		
	Mean	21.96	16.91	21.18	22.66	17.07	14.00	18.96	3.46	18.27
Normal mice sera	50X	0.85	1.18	0.68	1.17	1.45	0.88	1.02	0.18	17.82

วิจารณ์

จากผลการศึกษาความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีน aP โดย ELISA ทุกพารามิเตอร์มีผลเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของแต่ละพารามิเตอร์ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่ทำการศึกษามีความถูกต้อง มีความแม่นยำ มีความจำเพาะเจาะจง สอดคล้องกับการศึกษาของผู้ผลิตวัคซีน aP ภายในประเทศ ถึงแม้ว่าผู้วิจัยใช้วัคซีนกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรจำนวนสามความเจือจาง (1/1, 1/6.25 และ 1/15.625) ส่วนผู้ผลิตวัคซีนใช้การกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรจำนวน 4 ความเจือจาง (1/1, 1/2.5, 1/6.25 และ 1/15.625) ผลการทดสอบที่ได้มีความสอดคล้องเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการทดสอบความถูกต้องของวิธีจากผู้ผลิต^{(6), (7)} เนื่องจากเป็นวิธีที่จำเพาะต่อผลิตภัณฑ์ มีการใช้สารมาตรฐานชนิดเดียวกัน สายพันธุ์สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นสายพันธุ์เดียวกัน เครื่องมือและอุปกรณ์เหมือนกัน รวมถึงมีปัจจัยสิ่งแวดล้อมของการทดสอบคล้ายกัน ทำให้ผลการศึกษาที่ได้ไม่แตกต่างกัน สามารถนำไปใช้ทดสอบเพื่อควบคุมคุณภาพวัคซีน aP ได้ ในกรณีการศึกษาความทนของวิธี (Robustness) ใช้ผู้วิเคราะห์ 2 คน เนื่องจากข้อจำกัดของปริมาณซีรัมจากหนูถีบจักรที่นำมาศึกษาเหลือปริมาณน้อย ไม่พอทดสอบด้วยผู้วิเคราะห์ 3 คน อย่างไรก็ตามจะศึกษา robustness ในประเด็นอื่น ๆ เพิ่มเติมต่อไป เช่น อุณหภูมิ และช่วงระยะเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาการทดสอบที่แตกต่างกัน

การหาระดับแอนติบอดีเป็นขั้นตอนหนึ่งของการวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immunological activity) ที่เรียกว่า mouse immunogenicity test (MIT) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีในซีรัมของหนูถีบจักรที่กระตุ้นด้วยวัคซีน aP เพื่อใช้ในการประเมินความแรงของวัคซีน โดยต้องทดสอบเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีนตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเทียบกับระดับแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีนอ้างอิงจำเพาะหรือวัคซีนควบคุม (a product-specific reference or control vaccine)⁽⁸⁾

การศึกษาคความถูกต้องของวิธีการวัดปริมาณแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีน aP ด้วย ELISA นี้ เมื่อนำไปทดสอบตัวอย่างวัคซีน Boostagen ที่ผู้ผลิตส่งตรวจเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนยาและควบคุมคุณภาพ

ก่อนจำหน่าย พบว่าความแรง FHA ผ่านเกณฑ์ตามข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 6 และวิธีการทดสอบยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางพัฒนาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ความแรงต่อแอนติเจนอื่นในวัคซีนไอกรนไร้เซลล์ได้ รวมถึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกันจากวัคซีนชนิดอื่นหรือระดับภูมิคุ้มกันจากมนุษย์ที่ได้รับวัคซีนชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 6 ความแรง FHA ในวัคซีน Boostagen

ปี พ.ศ.	รุ่นการผลิต	Relative potency of FHA		ข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์
		สถาบันชีววัตถุ	ผู้ผลิตวัคซีน	
2559	A	0.79	1.39	
2560	B	0.68	0.90	
	C	0.80	1.60	≥ 0.5
2561	D	0.61	1.20	
2562	E	0.90	1.10	

สรุป

จากการประเมินความถูกต้องของวิธีการวัดปริมาณแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีน aP ด้วย ELISA ทำให้ได้วิธีวิเคราะห์ความแรงวัคซีนที่เป็นการวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immunological activity) ใช้เป็นคู่มือมาตรฐานการปฏิบัติงาน สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อ FHA ในวัคซีน aP ได้ถูกต้องแม่นยำ และนำไปใช้ทดสอบความแรง (Anti-FHA antibody titer determination) วัคซีน aP ที่ผลิตในประเทศตั้งแต่ปี 2559 จนถึงปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่เป็นผู้สนับสนุนงบประมาณ และขอขอบคุณบริษัท ไบโอเนท เอเซีย จำกัด ที่ให้คำแนะนำ การสนับสนุน Antigen-FHA และตัวอย่างวัคซีน ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จ ล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. โรคไอกรน. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 13 ส.ค. 2563]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://ddc.moph.go.th/disease_detail.php?d=29.
2. Edwards KM, Decker MD. Pertussis vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. Vaccines. 6th ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 2013. p. 447-492.
3. สำนักโรคติดต่อฯ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์โรคปีปัจจุบัน. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 13 ส.ค. 2563]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/disease.php?dcontent=situation&ds=24>
4. กุลกัญญา โชคไพบูลย์กิจ, และคณะบรรณาธิการ. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค ปี 2556. นนทบุรี: กองโรคป้องกันด้วยวัคซีน กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2556.

5. กฎกระทรวงว่าด้วยการรับรองรุ่นการผลิตยาแผนปัจจุบันที่เป็นยาชีววัตถุ พ.ศ. 2553. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนที่ 66 ก (วันที่ 3 พฤศจิกายน 2553). หน้า 7-9.
6. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care. European pharmacopoeia 8.0: assay of pertussis vaccine (acellular). Nördlingen: Druckerei; 2014. p. 252-255.
7. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. Geneva: ICH Steering Committee; 2005.
8. WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-second report. WHO technical report series No. 979. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2013. p. 205-206, 241-244.
9. ยาวลักษณ์ ชนะหาญ. ไบโอะเนท-เอเซีย จากผู้ผลิตวัคซีนไทยสู่ฐานวิจัยพัฒนาในยุค “ประเทศไทย 4.0”. วารสารส่งเสริมการลงทุน 2560; 28(5): 18-23.
10. Rappuoli R, Pizza M, Covacci A, Bartoloni A, Nencioni L, Podda A, et al. Recombinant acellular pertussis vaccine--from the laboratory to the clinic: improving the quality of the immune response. FEMS Microbiol Immunol 1992; 5(4): 161-70.
11. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. New York: United Nations; 2009.

Analytical Method Validation of ELISA for Quantification of Mouse Antibody Titer Against Filamentous Haemagglutinin of Acellular Pertussis Vaccine

Apichai Supasansatorn Ratchanon Rakcheep Assjan Amen Wereyamarst Jaroenkunathum and Supaporn Phumiamorn

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000,

ABSTRACT Acellular pertussis vaccine produced in Thailand contains filamentous haemagglutinin (FHA) whose potency needs to be controlled. This study aims to develop an analytical method to quantify a mouse antibody titer against FHA using the ELISA. The method showed a specificity detection of anti-FHA antibody titer in the vaccine test group compared with the control group. The linearity in concentrations ranged from 1.95 to 4,000 mIU/ml, the coefficient of correlation(r) was greater than 0.99. The limit of quantification ranged from 3.91 to 4,000 mIU/ml. The range of anti-FHA titer was between 15.625 and 1,000 mIU/ml. Its accuracy showed a percentage relative error between -1.34% and 1.69%. Its precision varied from 2.23% to 20.00% of variance coefficient (%CV). The %CV of the robustness of the assay was 12.21–19.68%. The data demonstrate that the method is reliable and suitable for use as a standard method for the potency assay against FHA in acellular pertussis vaccine.

Keywords: Acellular pertussis vaccine, Potency, Anti-FHA, ELISA