ว กรมวิทย พ 2569; 68 (3): 485-506

การวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อวัคซีนป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก โดยวิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay

พยอม เอกศิริ ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์ วิภาวี วงศ์ชนะ สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์ และ สุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูกจัดอยู่ในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศไทย การตรวจระดับภูมิคุ้มกันในคนที่ได้รับวัคซีนและการประเมินความแรงเพื่อการควบคุมคุณภาพวัคซีนจึงมีความสำคัญ การศึกษานี้ได้พัฒนาการวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีต่อ Human Papillomavirus (HPV) ด้วยวิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay (PBNA) โดยศึกษาความสามารถของซีรั่มคนมาตรฐานที่จำเพาะต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 ในการยับยั้ง HPV pseudovirions ในการเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT (IC_{50}/100µL) และนำวิธีดังกล่าวมาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ พบว่า HPV pseudovirions ที่ผลิตขึ้นมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีแต่ละสายพันธุ์และไม่ถูกยับยั้งด้วย negative serum มีความแม่นโดยมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 70-130% การทดสอบความเป็นเส้นตรง พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง log fluorospot และระดับความเจือจางของซีรั่มมาตรฐาน มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีค่า correlation coefficient ≥ 0.98 และกราฟที่ได้เป็นเส้นตรงตลอดช่วง 20-80% ของ %inhibitory rate สำหรับขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีต่อสายพันธุ์ 16 และ 18 มีค่าเท่ากับ 1.49 IC_{50}/100µL และ 1.56 IC_{50}/100µL ตามลำดับ ค่าความเที่ยงของผลการทดสอบมีค่า % coefficient of variance ไม่เกิน 25% และเมื่อทดสอบความทนของวิธีโดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ต่างกัน และใช้ cell passage ที่แตกต่างกัน พบว่าค่า IC_{50}/100µL ที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p-value > 0.05) โดยสรุปวิธี PBNA ที่พัฒนาขึ้นผ่านการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับ HPV16 และ HPV18 ทั้งในซีรั่มคนมาตรฐานและซีรั่มหนูจำเพาะต่อสายพันธุ์ จึงสามารถใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาสารมาตรฐานจากสัตว์ทดลองให้ครอบคลุม HPV-VLP สายพันธุ์อื่นที่ใช้ในการผลิตวัคซีนต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีนป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก, HPV, แอนติบอดี, Pseudovirion-based neutralization assay (PBNA), การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

Corresponding author E-mail: payom.a@dmsc.mail.go.th

Received: 10 September 2025 *Revised: 7 April 2026* *Accepted: 6 June 2026*

บทนำ

การติดเชื้อไวรัส human papillomavirus (HPV) ยังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศรายได้น้อยถึงปานกลาง สายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูง เช่น HPV สายพันธุ์ 16 และสายพันธุ์ 18 เป็นสาเหตุของมะเร็งปากมดลูกประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วยทั้งหมด[1,2] องค์การอนามัยโลกระบุว่ามะเร็งปากมดลูกเป็นหนึ่งในโรคมะเร็งที่มีอัตราการตายสูง โดยมีผู้หญิงมากกว่า 500,000 คน ได้รับผลกระทบในแต่ละปี[3] การฉีดวัคซีน HPV จึงเป็นมาตรการป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยช่วยลดอัตราการติดเชื้อและลดความเสี่ยงต่อการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็งและมะเร็งปากมดลูกได้อย่างมีนัยสำคัญ[1] ปัจจุบันวัคซีนที่ใช้แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ วัคซีนชนิด 2 สายพันธุ์ (bivalent) 4 สายพันธุ์ (quadrivalent) และ 9 สายพันธุ์ (nonavalent) ซึ่งแต่ละชนิดมีการป้องกันตามสายพันธุ์ที่ครอบคลุม[4] ประสิทธิภาพของวัคซีนขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น อายุผู้รับวัคซีนและจำนวนโดส โดยเฉพาะการฉีดวัคซีนในช่วงวัยเด็กสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงและยาวนาน[5] มีรายงานการให้วัคซีนเพียงหนึ่งโดสสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เป็นเวลาอย่างน้อย 5 ปี และให้ผลใกล้เคียงกับการให้สองโดส[6] สอดคล้องกับข้อมูลจาก World Health Organization (WHO) และ Program for Appropriate Technology in Health (PATH) ที่ผลักดันแนวคิดการให้วัคซีนแบบโดสเดียวเพื่อเพิ่มการเข้าถึงวัคซีน โดยเฉพาะวัคซีนชนิด 9 สายพันธุ์ สามารถป้องกันการติดเชื้อสายพันธุ์เสี่ยงสูงได้ถึงร้อยละ 90[7] ประเทศไทยได้กำหนดกลยุทธ์ส่งเสริมการฉีดวัคซีนในกลุ่มเด็กหญิงชั้นประถมศึกษาปีที่ 5 และกลุ่มวัยรุ่นตามนโยบายของกระทรวงสาธารณสุข ควบคู่กับการดำเนินแผนยุทธศาสตร์ความมั่นคงด้านวัคซีนภายในประเทศตามนโยบายระดับชาติ[8-10] การประเมินระดับภูมิคุ้มกันหลังการได้รับวัคซีนมีความสำคัญในการพิจารณาประสิทธิผลของวัคซีน โดยเฉพาะการตรวจวัด neutralizing antibodies ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สำคัญของ protective immunity ตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกและ United States Food and Drug Administration (U.S. FDA)[4,11]

วิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay (PBNA) เป็นวิธีมาตรฐานสากลที่ใช้ประเมินภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ HPV เนื่องจากมีความจำเพาะสูงและสามารถผลิตไวรัสเทียม (pseudovirion) ได้หลายสายพันธุ์สำหรับใช้ในการทดสอบ[12-15] จากงานวิจัยของ Nie J และคณะ (2014) ได้พัฒนา high-throughput PBNA ซึ่งมีความเป็นเส้นตรงของ neutralization curve เหมาะสมต่อการคำนวณค่า IC_{50} และสามารถประเมินภูมิคุ้มกันจำเพาะต่อสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นหลักฐานเชิงประจักษ์ว่า PBNA สามารถตรวจวัดแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ในซีรั่มหนูได้จริง จากผลการศึกษาใช้ pooled serum จากหนู Balb/c ที่ถูกกระตุ้นด้วยวัคซีน quadrivalent HPV virus-like particles (VLPs) ประกอบด้วย HPV6/11/16/18 ทดสอบกับ HPV pseudovirions ร่วมกับ bovine papillomavirus (BPV) pseudovirion ซึ่งใช้เป็น heterologous control พบว่าซีรั่มหนูสามารถยับยั้ง HPV16 และ HPV18 ได้ในระดับสูง (ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 80–90% ในขณะที่ให้ค่าการยับยั้งต่อ BPV pseudovirion ในระดับต่ำอยู่ในช่วง 0–10% ใกล้เคียงกับซีรั่มหนูก่อนการกระตุ้นภูมิที่ให้ค่าใกล้ 0 ต่อ HPV ทุกสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งที่ตรวจพบเป็น type-specific neutralization ต่อ HPV16 และ HPV18[14] ต่อมาในปี ค.ศ. 2016 Nie J และคณะ ได้พัฒนา triple-color PBNA ซึ่งใช้ซีรั่มหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยวัคซีนหลายสายพันธุ์ (nonavalent HPV vaccine) และมีรายงานค่า neutralization titers ของ HPV16 และ HPV18 ที่ได้จากการทดสอบแบบหลายสีมีค่าใกล้เคียงกับการทดสอบแบบ single-color โดยมีความแตกต่างไม่เกิน 2 เท่า และไม่พบสัญญาณการยับยั้งในช่องสัญญาณของสายพันธุ์ที่ไม่ตรงกับแอนติบอดี รวมทั้งให้ค่าการยับยั้งต่อ BPV pseudovirion ในระดับต่ำใกล้ค่าพื้นฐาน[16] การพัฒนาวิธีดังกล่าวเพื่อรองรับการตรวจหลายสายพันธุ์ในกลุ่มเดียวกันเพิ่มความไวและความแม่น จึงเหมาะต่อการประเมินวัคซีนหลายสายพันธุ์ เช่น วัคซีน 9 สายพันธุ์ ที่อยู่ระหว่างการพัฒนาใน

หลายประเทศ นอกจากใช้ในการตรวจระดับภูมิคุ้มกันในซีรั่มคนแล้ว PBNA ยังถูกนำมาใช้กับซีรั่มจากสัตว์ทดลอง เช่น หนูที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย HPV-VLP ทั้งชนิด monovalent และ multivalent ซึ่งให้ผลการทดสอบที่มีความสอดคล้องกับวิธีอื่น เช่น Luminex immunoassay และ ELISA[13,14,17,18] โดยเฉพาะงานของ Bei L และคณะ (2025) ซึ่งประเมินภูมิคุ้มกันจากวัคซีน 14-valent ในหนู และพบว่าซีรั่มสัตว์ทดลองสามารถใช้ประเมิน neutralizing antibodies ได้อย่างมีประสิทธิภาพ[18] และสอดคล้องกับหลักการของ PBNA สนับสนุนแนวคิดว่าซีรั่มสัตว์ทดลองสามารถใช้แทนซีรั่มคนในการประเมินวัคซีนระยะ pre-clinical[19]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำวิธี PBNA มาพัฒนาใช้ในห้องปฏิบัติการในการตรวจวัดระดับ neutralization antibodies ที่จำเพาะต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 โดยเบื้องต้นใช้สารมาตรฐานอ้างอิงที่มาจากคน เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ ได้แก่ anti-HPV16 human serum (NIBSC code 05/134) และ anti-HPV18 human serum (NIBSC code 10/140) เมื่อวิธีทดสอบผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี จะนำมาใช้เป็นต้นแบบสำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจหาระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อวัคซีนป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก โดยใช้ซีรั่มจากหนูทดแทนสารมาตรฐานอ้างอิงที่มาจากคน ซึ่งซีรั่มหนูได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย HPV-VLP สายพันธุ์เดี่ยว (monovalent HPV VLP) ในหนูถีบจักรแทนสารมาตรฐานอ้างอิงจากคน เพื่อพัฒนาเป็นต้นแบบของสารมาตรฐานที่มีความจำเพาะต่อแต่ละสายพันธุ์ และใช้เป็นแนวทางสำหรับห้องปฏิบัติการในการพัฒนาสารมาตรฐานจากซีรั่มสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ เช่น กระต่าย หนูถีบจักร หนูแรท และลิงในกลุ่ม macaques ให้สามารถครอบคลุมทุกสายพันธุ์ของ HPV-VLP ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน และรองรับการควบคุมคุณภาพรวมถึงการพัฒนาวัคซีนภายในประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT

เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เป็นอนุพันธ์ของเซลล์ 293 cell line ที่แยกได้จาก human embryonic kidney cells มีการแสดงออกของ SV40 large T antigen จากพลาสมิด the pCMVSPORT6TAg.neo โดยการแสดงออกของ SV40 large T antigen ดังกล่าวถูกควบคุมโดย human cytomegalovirus (CMV) promoter (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ใช้ในการทดสอบ นำมาเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 175 ตารางเซนติเมตร เพื่อนำไปใช้ทดสอบ กำหนดเซลล์มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง $0.8-2.0\times10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้อบเพาะเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (CO_2 incubator model NU-5510E, NUAIRE, UK) นาน 2-3 วัน สังเกตเซลล์เพิ่มจำนวนเต็มพื้นที่ผิวขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (ความหนาแน่นประมาณ 80%) ไม่มีเซลล์ลอยหลุดจากพื้นผิวและเป็น monolayer จำนวน cell passage ที่ใช้ในการทดสอบนับตั้งแต่เปิดใช้งานไม่ควรเกิน 20 passages ซึ่งเป็นช่วง cell passage ที่เหมาะสมต่อการนำมาทดสอบ PBNA โดยเซลล์จะถูกย่อยด้วย 0.05% trypsin-EDTA (Gibco, USA) และ phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, USA)

อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์

ในการทดสอบใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose 1X (Invitrogen, USA) ที่มี 10% inactivated FBS (Invitrogen, USA), 1% non-essential amino acids (Invitrogen, USA), 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen, USA) และ 2% 1M HEPES buffer solution (Invitrogen, USA) สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

ซีรั่มมาตรฐาน

สารมาตรฐาน Anti-HPV16 human serum 10 IU/mL (NIBSC code no. 05/134, National Institute of Biological Products (NIBSC), UK) และ Anti-HPV18 human serum 16 IU/mL (NIBSC code no. 10/140, National Institute of Biological Products (NIBSC), UK)

Pseudovirion และ monovalent HPV-VLP

HPV pseudovirion สำหรับ HPV16 รุ่นการผลิตที่ PsHPV16-08032019 และสำหรับ HPV 18 รุ่นการผลิตที่ PsHPV18-28022019 ผลิตโดยสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์[20] และ monovalent HPV-VLP สายพันธุ์ 16 และ 18 ได้รับจากบริษัท Xiamen Innovax Biotech Co., Ltd. สาธารณรัฐประชาชนจีน

การเตรียมหนูถีบจักร

ดำเนินการสุ่มหนูถีบจักร Outbred Balb/c เพศเมีย 120 ตัว น้ำหนัก 15–20 กรัม หรืออายุ 4–5 สัปดาห์ ด้วยวิธีทางสถิติในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Bioassay assist หัวข้อ RANDAMIAZE จากนั้นชั่งน้ำหนักหนูที่ได้รับในแต่ละตัว จัดแบ่งหนูตามการสุ่มหนูกรงละ 10 ตัว เพื่อให้แต่ละกรงมีน้ำหนักของหนูใกล้เคียงกัน และพักหนู 1 วันก่อนฉีดสัตว์ทดลอง

การเตรียมซีรั่มควบคุม

การเตรียม positive serum สำหรับ HPV type 16 antibody และ HPV type 18 antibody โดยฉีดกระตุ้นหนูที่พัก 1 วันแล้ว ด้วย monovalent HPV-VLP type 16 และ 18 monovalent HPV-VLP ที่เจือจางในสารละลาย aluminium hydroxide gel (InvivoGen, USA) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน phosphate buffer saline (PBS) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ monovalent HPV-VLP type 16 และ monovalent HPV-VLP type 18 อยู่ที่ 13 และ 7.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal) ของหนูถีบจักร 10 ตัวต่อสายพันธุ์ HPV แอนติเจน ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อเป็น positive serum หลังจากนั้น 25–28 วัน[21] เจาะเลือดหนูจากหัวใจและปั่นแยกซีรั่มด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge model Multi RF, Thermo IEC, USA) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath model SW22, Julabo, Germany) ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเก็บซีรั่มในตู้แช่แข็ง (deep freezer model 8417, Forma Scientific, USA) ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -70 องศาเซลเซียส

การเตรียม negative serum โดยการฉีดกระตุ้นหนูที่พัก 1 วันแล้ว ด้วยสารละลาย aluminium hydroxide gel ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน PBS จำนวน 10 ตัว ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 25–28 วัน เจาะเลือดหนูจากหัวใจ และปั่นแยกซีรั่มด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเก็บซีรั่มในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -70 องศาเซลเซียส

ไวรัสควบคุม (Virus control, VC)

ใช้ HPV pseudovirion สายพันธุ์ 16 รุ่นการผลิต PsHPV16-08032019 และสายพันธุ์ 18 รุ่นการผลิต PsHPV18-28022019 ได้จากสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อนำมาพัฒนาวิธี PBNA จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี ได้เลือกระดับความเจือจางของ pseudovirion สำหรับใช้เป็น virus control (VC) ที่ 1/8,000 สำหรับ HPV16 และ 1/2,500 สำหรับ HPV18 ซึ่งเป็นระดับที่ให้สัญญาณอยู่ในช่วง 250-1,000 fluorospots/100µL ทั้งนี้ VC เป็นกลุ่มอ้างอิงที่เติมเฉพาะ pseudovirion โดยไม่เติมซีรั่ม เพื่อแทนสภาวะการติดเชื้อไวรัสสูงสุดของการทดสอบหรือการยับยั้ง 0% และใช้เป็นค่าอ้างอิงในการคำนวณอัตราการยับยั้ง (% inhibition rate) และ IC_{50} ด้วยวิธี Reed–Muench[14,16]

เซลล์ควบคุม (Cell Control, CC)

เซลล์ควบคุม คือ กลุ่มทดสอบที่มีเพียงเซลล์เพาะเลี้ยงโดยไม่มี pseudovirion ไม่มีซีรั่ม ซึ่งแสดงถึงสภาวะเซลล์มีชีวิต 100% (0% infection) ใช้เป็นจุดอ้างอิงสูงสุดสำหรับการคำนวณ %viability

การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อ HPV Pseudovirion โดยวิธี PBNA

เติมเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ความเข้มข้น 1.5×10^5 เซลล์ต่อ 100 ไมโครลิตร ลงในเพลทปลอดเชื้อชนิด 96 หลุม (96-wells flat tissue culture plate, Corning®, USA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 3–6 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเพลท 96 หลุม (96-well round bottom cell culture plate, Corning®, USA) เพื่อทำการเจือจางซีรั่มมาตรฐานที่ได้มาจากคน ได้แก่ Anti-HPV16 human serum (NIBSC code no. 05/134) 10 IU/mL และ Anti-HPV18 human serum (NIBSC code no. 10/140) 16 IU/mL ถูกเตรียมเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/20 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 และ 1/1,280 โดยปริมาตรของซีรั่มหลังจากเจือจางแล้วในแต่ละหลุมต้องมีปริมาตร 60 ไมโครลิตร และทำการเจือจางซีรั่มที่ได้จากหนูถีบจักร (positive serum) ต่อ HPV16 ที่ความเจือจางเริ่มต้น (pre-dilution) 1:2,000 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1/4,000, 1/8,000, 1/16,000, 1/32,000, 1/64,000 และ 1/128,000 และสำหรับ positive serum-HPV18 เตรียมเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/2,500 และเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1/5,000, 1/10,000, 1/20,000, 1/40,000, 1/80,000 และ 1/160,000 โดยปริมาตรของซีรั่มหลังจากเจือจางแล้วในแต่ละหลุมต้องมีปริมาตร 60 ไมโครลิตร เมื่อเตรียมซีรั่มเสร็จเติม HPV pseudovirions ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 250 ถึง 1,000 Fluorospot ต่อ 50 ไมโครลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ทุกหลุม เขย่าเพลทเบา ๆ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้อบเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาย้ายสารจากหลุมแต่ละหลุมไปยังเพลทที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงที่บ่ม นาน 3–6 ชั่วโมง โดยทุกเพลทที่ทำการทดสอบจะต้องมีกลุ่มไวรัสควบคุม (virus control, VC) ไม่น้อยกว่า 6 ซ้ำ (หลุม) เซลล์ควบคุม (cell control, CC) ไม่น้อยกว่า 6 ซ้ำ (หลุม) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้อบเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 72±12 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการอ่านผลการทดสอบ[14] เมื่อครบกำหนดนับจำนวนเซลล์เรืองแสง (fluorospot) ในแต่ละระดับความเจือจางด้วยโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 ที่ติดตั้งในเครื่องนับจุดของปฏิกิริยาบนไมโครเพลตและอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลตแบบมัลติดีเทคชั่น (ELISPOT) (CTL ImmunoSpot®, OH, USA) จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณค่าระดับแอนติบอดีที่จำเพาะและจับ pseudovirions ไม่ให้เข้าเซลล์เพาะเลี้ยงได้ 50% (The 50% maximal inhibitory concentration, IC_{50}) ด้วยสูตรคำนวณ Reed-Muench[14,16]

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์[22,23]

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (specificity)

การทดสอบความจำเพาะของวิธี PBNA ดำเนินการตามแนวทาง ICH guideline หัวข้อความจำเพาะของวิธี[22] โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเจือจางของซีรั่มมาตรฐานและการเกิด fluorospots แยกตามสายพันธุ์ HPV ได้แก่ HPV16 และ HPV18 โดยใช้ HPV pseudovirion[20] เปรียบเทียบการเกิด fluorospots ในกลุ่มควบคุม ประกอบด้วย หลุมที่เติม negative serum กับหลุม virus control ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 6 หลุมต่อเพลท และเปรียบเทียบรูปแบบ dose response ในหลุมที่มี pseudovirion และซีรั่ม โดยใช้ซีรั่มมาตรฐานความเจือจางเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/20 ส่วน negative serum และ positive serum-HPV16 เตรียมเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/2,000 และ positive serum-HPV18 เตรียมเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/2,500

จากนั้นซีรั่มทั้งหมดจะถูกเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ก่อนนำไปทดสอบในระบบ PBNA และผลการทดสอบถูกนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ dose response โดยสร้างกราฟระหว่าง log dilution และ log fluorospot เกณฑ์การพิจารณากำหนดให้กลุ่มควบคุมต้องมีจำนวน fluorospots ไม่แตกต่างกันตลอดช่วงความเจือจางและไม่แสดงลักษณะ dose response เพื่อยืนยันว่าไม่เกิดการรบกวนจากองค์ประกอบต่าง ๆ ในระบบทดสอบ ขณะที่กลุ่มทดสอบต้องแสดงการยับยั้งแบบ dose response อย่างชัดเจน การวิเคราะห์ใช้ผลจากการทดสอบ 3 ครั้ง ทดสอบต่างวันกัน จากนั้นตรวจสอบการแจกแจงแบบปกติของข้อมูลด้วย Shapiro–Wilk test ก่อนวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง log fluorospot ของ negative serum และ virus control ด้วยสถิติ independent *t*-test ซึ่งผลการทดสอบต้องไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (p-value > 0.05)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range)

เตรียมซีรั่มมาตรฐานทั้ง 2 สายพันธุ์ เริ่มต้นที่อัตราส่วน 1/20 (pre-dilution) ทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 และ 1/1,280 และ positive serum-HPV16 เตรียมเริ่มต้นที่อัตราส่วน 1/2,000 (pre-dilution) และ positive serum-HPV18 เตรียมเริ่มต้นที่อัตราส่วน 1/2,500 (pre-dilution) จากนั้นซีรั่มทั้งหมดจะถูกเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี PBNA เมื่ออ่านผลด้วยเครื่อง ELISPOT ปริมาณ fluorospots จะแปลผันกับระดับความเจือจางของซีรั่ม ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง log fluorospot ที่นับได้กับ log ความเจือจางของซีรั่ม โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ต้องมีค่ามากกว่า 0.98 และค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) ต้องมีค่ามากกว่า 0.96 กราฟที่ได้เป็นเส้นตรงตลอดช่วง 20–80% ของ %inhibition rate

การทดสอบความแม่น (accuracy)

ทำการประเมินความแม่นของวิธี PBNA โดยใช้ซีรั่มมาตรฐานจาก NIBSC เป็นตัวแทนในการตรวจสอบความถูกต้องเชิงระบบ ซีรั่มมาตรฐานถูกเตรียมเริ่มต้น (pre-dilution) ที่อัตราส่วน 1/20 จากนั้นทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 และ 1/1,280 แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี PBNA เพื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ (%inhibition rate) ในแต่ละระดับความเจือจาง ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่สามารถยับยั้ง pseudovirion ไม่ให้เข้าภายในเซลล์ได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ถูกคำนวณจากข้อมูล %inhibition rate ตามวิธี Reed–Muench และรายงานเป็นค่า IC_{50}/100µL นำค่า IC_{50}/100µL ที่ได้จากการทดสอบแต่ละครั้งมากำหนดค่า IC_{50} target ของซีรั่มมาตรฐาน โดยคำนวณจากค่าเฉลี่ย (mean) ของค่า IC_{50}/100µL จากการทดสอบในแต่ละครั้ง ต่อจำนวนครั้งที่ทำการทดสอบของมาตรฐาน NIBSC ภายใต้เงื่อนไขการทดสอบเดียวกัน ดังสมการ

$$IC_{50,target} = \frac{\sum_{i=1}^{n} IC_{50,run,i}}{n}$$

คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ใช้ n-1) รวมทั้งหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เพื่อแสดงความแปรปรวนของซีรั่มมาตรฐาน ดังสมการ

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (IC_{50,run,i} - IC_{50,target})^{\wedge 2}}{n-1}},$$

$$\%CV = \frac{SD}{IC_{50,target}} \times 100$$

จากนั้นคำนวณร้อยละการคืนกลับ (%recovery) โดยเทียบค่า IC_{50}/100µL ที่ทำการทดสอบแต่ละครั้งกับค่า IC_{50} target ดังสมการ

$$\%Recovery = \left(\frac{IC_{50,run}}{IC_{50,target}}\right) \times 100$$

กำหนดให้ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ควรอยู่ในช่วง 70–130%[24]

การประเมินความถูกต้องของ positive serum ตรวจสอบด้วยวิธี spiked sample โดยการผสม positive serum กับ negative serum ในอัตราส่วน 1:1 ทำการเจือจางเริ่มต้นที่อัตราส่วน 1/2,000 และ 1/2,500 สำหรับซีรั่มที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 ตามลำดับ จากนั้นทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ ก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธี PBNA ภายใต้เงื่อนไขเดียวกันทั้งหมด นำมาหาค่า %recovery ของแต่ละสายพันธุ์ควรอยู่ในช่วง 70–130%

การทดสอบความเที่ยง (precision)

repeatability ทำการทดสอบหาค่าระดับแอนติบอดีต่อ HPV โดยสายพันธุ์ 16 และ 18 ใช้ Anti-HPVhuman serum ทำปฏิกิริยากับ pseudo-virions สายพันธุ์ที่จำเพาะ ด้วยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน ทำการทดสอบซ้ำภายในวันเดียวกัน 3 ครั้ง นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ต้องไม่เกิน 25%

intermediate precision ทำการทดสอบหาค่าแอนติบอดีต่อ HPV โดยสายพันธุ์ 16 และ 18 ใช้ Anti-HPV human serum ทำปฏิกิริยากับ pseudo-virions ด้วยนักวิเคราะห์คนเดียวกันทำการทดสอบต่างวันกัน 3 ครั้ง นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า %CV ต้องไม่เกิน 25% และทดสอบหาค่าระดับแอนติบอดีต่อ HPV ด้วยนักวิเคราะห์ 2 คน ทำการวิเคราะห์คนละ 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า %CV ต้องไม่เกิน 25% และค่าความต่างของผลการตรวจวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ด้วยสถิติ independent *t*-test ต้องไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า *p*-value < 0.05

การทดสอบช่วงรายงานผลของค่า IC_{50} (reportable IC_{50} range)[22]

การศึกษานี้เพื่อประเมินช่วงรายงานผลของค่า IC_{50} ของวิธี PBNA ยึดหลักการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทาง ICH guideline หัวข้อ 2.3 โดยพิจารณาจากความจำเพาะ ความแม่น ความเที่ยง และความเป็นเส้นตรงของวิธี กำหนดให้ reportable IC_{50} range คือ ช่วงของค่า IC_{50}/100µL ที่คำนวณได้จริงจากช่วงความเจือจางที่ทดสอบ และให้ผลผ่านเกณฑ์ยอมรับของวิธี ซีรั่มที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ซีรั่มมาตรฐาน Anti-HPV16 human serum และ Anti-HPV18 human serum เตรียม pre-dilution ที่อัตราส่วน 1/20 จากนั้นทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold serial dilution จำนวน 6 ระดับ และ positive serum ที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 ซึ่งเตรียม pre-dilution ที่ 1/2,000 และ 1/2,500 ตามลำดับ และเจือจางต่อแบบเดียวกัน ภายใต้สภาวะการทดสอบ PBNA เดียวกันทั้งหมด การกำหนด reportable IC_{50} range คือ ช่วงของค่า IC_{50}/100µL ที่คำนวณได้จากข้อมูลการทดสอบภายในช่วงความเจือจางที่คร่อมจุด 50% inhibition โดยอาศัยค่า upper 0.5 และ lower 0.5 ตามวิธี Reed–Muench และให้ผลอยู่ในช่วงเชิงเส้นของกราฟ

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ทดสอบค่าแอนติบอดีต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยทำการทดสอบ 3 ครั้งต่อสายพันธุ์ ทำการทดสอบต่างวันกันและนำผลที่ได้มาคำนวณค่า LOQ จากค่า IC_{50}/100µL และค่าระดับความเจือจางที่สามารถจับกับ pseudovirions ไม่ให้เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้ที่ 50% (The 50% maximal inhibitory concentration, IC_{50}) โดยใช้สูตร

$$LOQ = A/B$$

A = The 50% maximal inhibitory concentration (IC_{50}/100µL)

B = ระดับค่าความเจือจางของแอนติบอดีที่ยับยั้ง pseudovirions ไม่ให้เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้ที่ 50% ตัวอย่างการคำนวณ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การหาค่า LOQ ของแอนติบอดีที่ยับยั้ง pseudovirions ไม่ให้เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้ที่ 50%

HPV	Dilution of Ab reduce PsV at 50% relative VC (B)	IC_{50}/100µL (A)	LOQ (IC_{50}/100µL)
16	160	204.92	204.92/160 = 1.28

การทดสอบความทน (robustness)

การใช้ความเข้มข้นเซลล์เพาะเลี้ยง ทำการทดสอบหาค่าระดับแอนติบอดีต่อ HPV โดยสายพันธุ์ 16 และ 18 ใช้ Anti-HPV human serum ทำปฏิกิริยากับ pseudovirions โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ความเข้มข้น 1.5×10^5, 1.7×10^5 และ 2.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน ทำต่างวันกัน นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า %CV ซึ่งต้องไม่เกิน 25% และค่าความต่างของผลการตรวจวิเคราะห์เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เพาะเลี้ยงต่างกันด้วยสถิติ one-way ANOVA ซึ่งต้องไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value > 0.05

การเปลี่ยน cell passage ของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT วิเคราะห์โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่มี passage number ที่แตกต่างกัน กำหนดเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบต้องไม่เกิน passage number ที่ 20 โดยทำการทดสอบสำหรับ HPV สายพันธุ์ 16 ใช้ #5, #12, #14 และ #16 และ HPV สายพันธุ์ 18 ใช้ #7, #10, #16 และ #18 ทำการทดสอบซ้ำ duplicate ในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบโดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า %CV ซึ่งต้องไม่เกิน 25% และค่าความต่างของผลการตรวจวิเคราะห์เมื่อใช้ passage number ที่แตกต่างกันด้วยสถิติ one-way ANOVA ซึ่งต้องไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.05)

จริยธรรมการวิจัยในสัตว์

ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 61/038 เมื่อวันที่ 27 สิงหาคม 2561 และขอขยายการรับรองได้รับอนุมัติเมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562

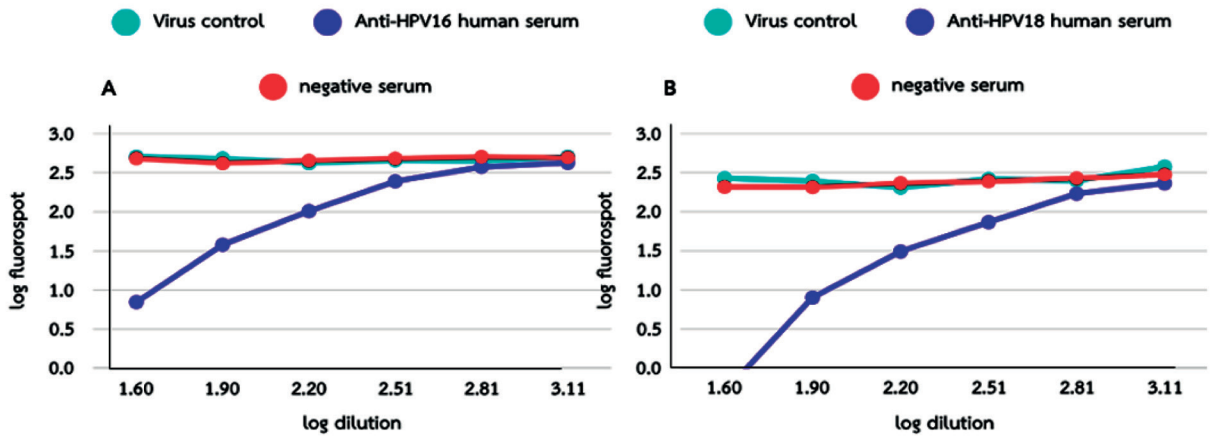
ผล

การทดสอบ specificity

จากการทดสอบเพื่อหาระดับแอนติบอดีต่อ HPV 16 และ 18 สายพันธุ์ละ 3 ครั้ง ต่างวันกัน ค่าความเจือจางของ negative serum ทั้ง 6 ระดับ ไม่สามารถยับยั้งการติดเชื้อของ HPV pseudovirion สายพันธุ์ 16 และ 18 โดยพบว่าจำนวน HPV pseudovirion ที่ได้มีจำนวน log fluorospot ระหว่าง log 2.0–3.0 ซึ่งไม่แตกต่างจากไวรัสควบคุม (VC) และจากการทดสอบ normal distribution ด้วย Shapiro-Wilk ผล log fluorospot ของกลุ่มควบคุมจาก negative serum จำนวน 18 ค่าต่อสายพันธุ์ และ virus control จำนวน 18 ค่าต่อสายพันธุ์ พบว่าผลการทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการแจกแจงแบบปกติ ซึ่งค่านัยสำคัญของกลุ่ม negative serum และ virus control สำหรับ HPV สายพันธุ์ 16 ได้ระดับค่านัยสำคัญ เท่ากับ 0.776 และ 0.948 ตามลำดับ สำหรับสายพันธุ์ 18 ระดับค่านัยสำคัญ เท่ากับ 0.874 และ 0.396 ตามลำดับ ผลการทดสอบไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อค่า p-value มากกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 2 ขณะที่ซีรั่มมาตรฐาน (Anti-HPV16 human serum และ Anti-HPV18 human serum) ดังแสดงในภาพที่ 1 และ positive serum ดังแสดงในภาพที่ 2 แสดงการเกิด dose-response จากการเติมซีรั่ม ซึ่งเกิดการยับยั้ง pseudovirion ได้ตามระดับความเจือจางซีรั่ม ลักษณะการเกิด fluorospot ดังแสดงในภาพที่ 3

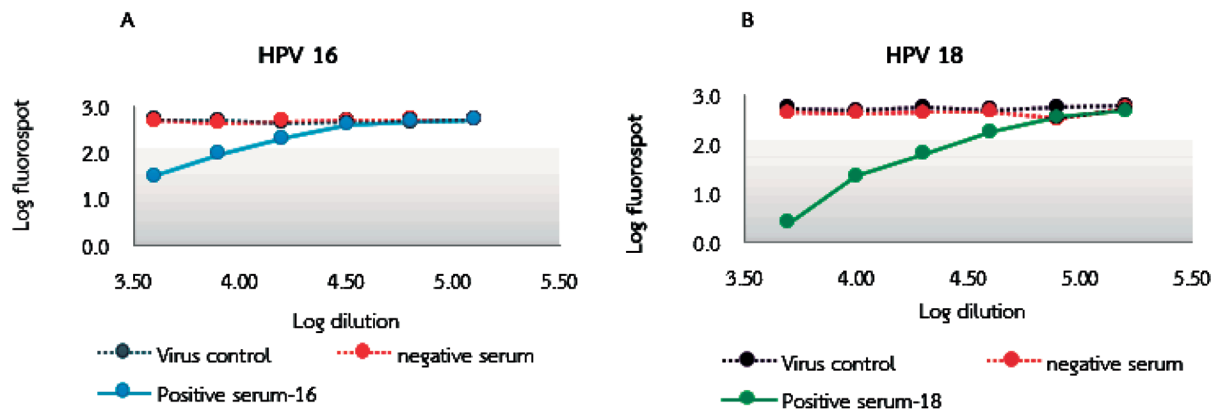
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบ log fluorosopt ของ negative serum และ log fluorospot ของ virus control ของการทดสอบ PBNA สำหรับ HPV สายพันธุ์ 16 และ HPV สายพันธุ์ 18

สายพันธุ์ HPV	Negative serum log (mean fluorospot)	Virus control log (mean fluorospot)	SD	%CV	*p*-value (independent *t*-test)
16	2.67	2.67			
	2.74	2.77	0.07	2.69	0.873
	2.83	2.82			
18	2.39	2.40			
	2.43	2.44	0.05	2.13	0.259
	2.38	2.42			

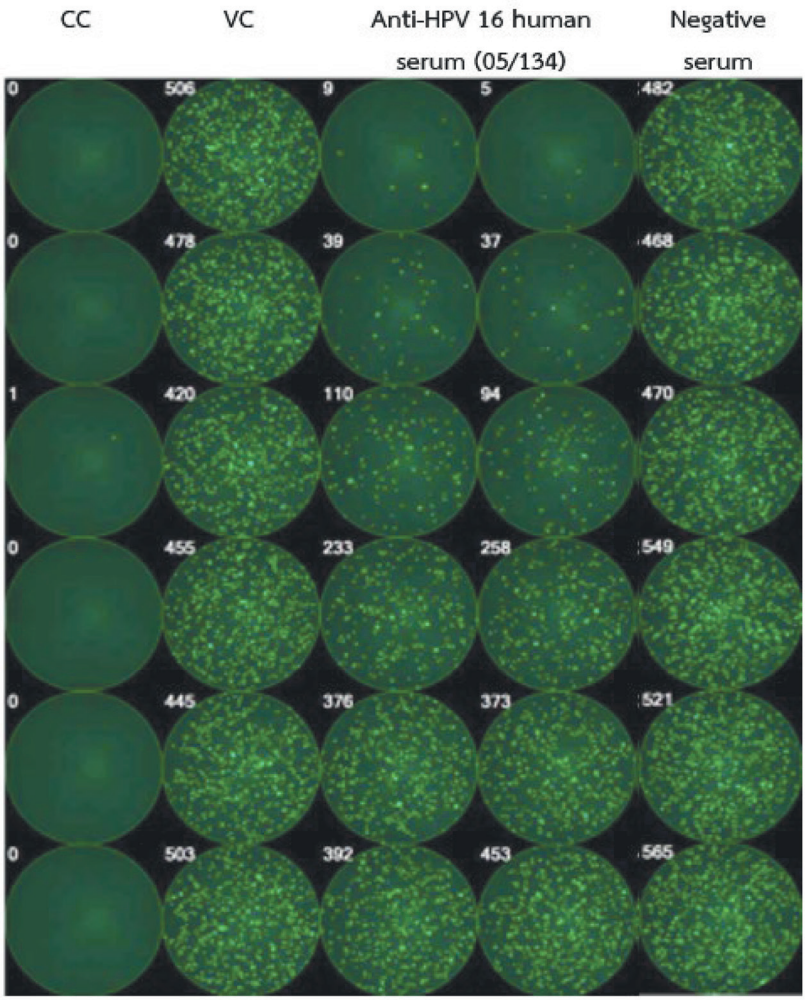


ระดับความเจือจางของ Anti-HPV16 ระดับความเจือจางของ Anti-HPV18

ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า log ระดับความเจือจาง (log dilution) ของ Anti-HPV human serum กับค่า log ของจำนวนเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorospot) (A) HPV สายพันธุ์ 16 และ (B) HPV สายพันธุ์ 18



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorospot) กับค่า log ระดับความเจือจาง (log dilution) ของ positive serum ของ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 กับ (A) HPV สายพันธุ์ 16 และ (B) HPV สายพันธุ์ 18



ภาพที่ 3 การเกิด fluorospot จากการทดสอบค่าความแรงของ HPV vaccine ด้วยวิธี pseudovirion-based neutralization assay

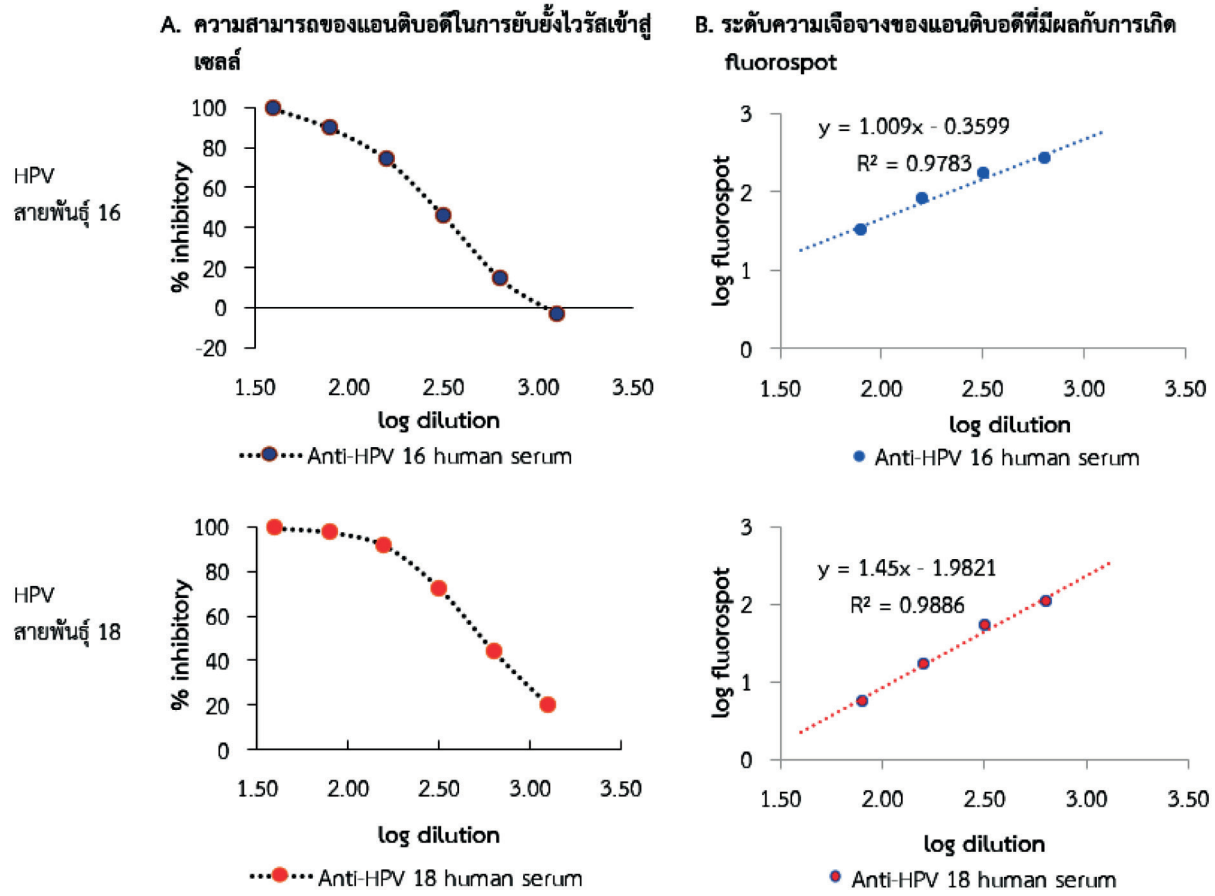
การทดสอบ linearity and range

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorospot) กับค่า log ระดับความเจือจางของซีรั่มมาตรฐานของ HPV ทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งทำการทดสอบที่ระดับความเจือจางของซีรั่ม จำนวน 6 ระดับ ที่ถูกเจือจางแบบ 2-fold dilution เริ่มต้นที่ 1/40 (log 1.60), 1/80 (log 1.90), 1/160 (log 2.20), 1/320 (log 2.51), 1/640 (log 2.81) และ 1/1,280 (log 3.11) พบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorospot) กับค่า log ระดับความเจือจางของซีรั่มมาตรฐานของ HPV ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความเป็นเส้นตรงโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ≥ 0.98 และค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (r^2) ≥ 0.96 จากการทดสอบ 3 ครั้งต่อสายพันธุ์ โดยช่วงการทดสอบข้อมูลที่ใช้คำนวณอยู่ในช่วงร้อยละ 20–80 ของ %inhibition rate สอดคล้องกับช่วงความเจือจาง log 1.90–2.81 ซึ่งเป็นช่วงที่กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงอย่างเหมาะสมสำหรับการคำนวณผลการทดสอบ จึงกำหนดให้ช่วงดังกล่าวเป็นช่วงการทดสอบที่เหมาะสมของวิธีสำหรับการวิเคราะห์ซีรั่มมาตรฐาน HPV16 และ HPV18 ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 4

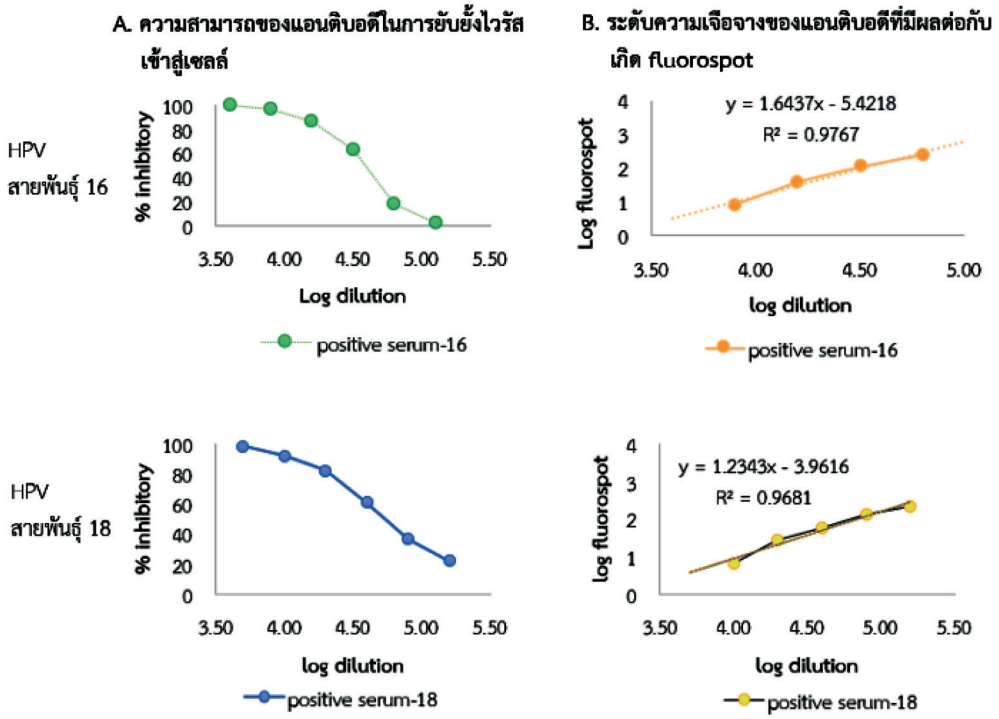
เมื่อทดสอบด้วย positive serum ที่จำเพาะต่อ HPV ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง log fluorospot กับ log dilution ยังคงมีลักษณะเชิงเส้นโดยมีค่า r^2 ≥ 0.96 ดังแสดงในภาพที่ 5

ตารางที่ 3 แสดงค่า correlation coefficient (r) และ coefficient of determination (r^2) จาก Dose response ใน HPV แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์ HPV	Test no.	Linearity	
		r (≥ 0.98)	r^2 (≥ 0.96)
16	1	0.99	0.98
	2	0.99	0.99
	3	0.98	0.96
18	1	0.98	0.96
	2	0.99	0.99
	3	0.99	0.99



ภาพที่ 4 การทดสอบความสามารถของซีรั่มมาตรฐานที่สามารถยับยั้ง pseudovirion เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงจากการนับจำนวน fluorospot ที่แสดงออกโดยค่า r^2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใน linear regression model (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งเซลล์ (% inhibitory) กับ log ระดับความเจือจางของ Anti-HPV human serum สายพันธุ์ 16 และ 18 (log dilution) และ (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorospot) กับ log ระดับความเจือจางของ Anti-HPV human serum สายพันธุ์ 16 และ 18 (log dilution)



ภาพที่ 5 ทดสอบความสามารถของ positive serum ที่สามารถยับยั้ง pseudovirion เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงจากการนับจำนวน fluorospot ที่แสดงออกโดยค่า r^2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใน linear regression model (A) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งเซลล์ (% inhibitory) กับ log ระดับความเจือจางของ positive serum ที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 และ (B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของเซลล์ที่เรืองแสง (log fluorospot) กับ log ระดับความเจือจางของ positive serum ที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 (log dilution)

การทดสอบ accuracy

ผลการทดสอบ accuracy ของวิธีเมื่อนำผลการทดสอบค่า IC_{50}/100µL ของซีรั่มมาตรฐานทั้ง 2 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 12 ค่า มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อกำหนดค่า IC_{50} Target ของซีรั่มมาตรฐานในแต่ละสายพันธุ์ เมื่อนำมาหาค่า %recovery ของการทดสอบในแต่ละครั้งของสายพันธุ์ HPV16 ได้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 75.63–118.95% และสำหรับสายพันธุ์ HPV18 ได้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 76.62–121.58% ดังแสดงในตารางที่ 4

จากการวิเคราะห์ค่า IC_{50}/100µL ของ positive serum ทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อ spiked sample โดยผสม positive serum กับ negative serum ในอัตราส่วน 1:1 และทำการเจือจางต่อแบบ 2-fold dilution เช่นเดียวกับการทดสอบ positive serum โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ต่างวันกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของระดับแอนติบอดีต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 มีค่า %recovery อยู่ที่ 73.88% ถึง 115.69% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด คือ 70–130% โดยมีค่า %CV น้อยกว่า 25% ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 การทดสอบความถูกต้องของวิธี PBNA ต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 เมื่อใช้ซีรั่มมาตรฐาน

สายพันธุ์ HPV	จำนวนครั้งการทดสอบ	IC_{50}/100µL	IC_{50} Target (Mean)	SD	%CV	%Recovery	Acceptance criteria
	1	251.82				117.10	
	2	240.93				112.04	
	3	200.44				93.21	
	4	162.64				75.63	
	5	204.92				95.29	

ตารางที่ 4 การทดสอบความถูกต้องของวิธี PBNA ต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 เมื่อใช้ซีรั่มมาตรฐาน (ต่อ)

สายพันธุ์ HPV	จำนวนครั้งการทดสอบ	IC_{50}/100µL	IC_{50} Target (Mean)	SD	%CV	%Recovery	Acceptance criteria
16	6	200.40	215.04	30.18	14.03	93.19	70-130%
	7	164.45				76.47	
	8	255.79				118.95	
	9	211.14				98.19	
	10	214.71				99.85	
	11	247.33				115.02	
18	12	225.89	560.06	31.18	5.57	105.05	70-130%
	1	475.91				108.17	
	2	488.70				111.97	
	3	522.01				114.67	
	4	588.55				84.98	
	5	529.47				87.26	
	6	563.51				93.21	
	7	567.31				105.09	
	8	429.13				94.54	
	9	680.93				100.62	
	10	475.91				101.29	
	11	488.70				76.62	
	12	522.01				121.58	

ตารางที่ 5 การทดสอบความถูกต้องของวิธี PBNA ต่อ HPV สายพันธุ์ 16 เมื่อใช้ positive serum-HPV16 และ positive serum-HPV18 ในการทดสอบ

สายพันธุ์ HPV	Positive serum (IC_{50}/100µL)	Spike	%Recovery	Mean	SD	%CV
16	38866.19	35250.29	90.70	104.87	12.83	12.24
	30637.69	33158.76	108.23			
	36619.57	42366.53	115.69			
18	87296.45	64495.68	73.88	98.01	21.018	21.44
	67263.28	75518.66	112.27			
	67869.17	73208.94	107.87			

การทดสอบ precision

จากการทดสอบหาค่า IC_{50} ของซีรั่มมาตรฐาน Anti-HPV16 human serum และ Anti-HPV18 human serum โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน นักวิเคราะห์คนเดียวกัน พบว่าค่า %CV อยู่ที่ 11.68% และ 10.79% ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (%CV ≤ 25%) และเมื่อทำการวิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์คนเดียว 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน พบว่าความแปรปรวนและการกระจายของข้อมูลเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (%CV ≤ 25%) คือ มีค่า %CV อยู่ที่ 15.37% และ 13.60% ของผลการทดสอบค่า IC_{50} ของแอนติบอดีต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 ตามลำดับ

และจากการทดสอบหาค่า IC_{50} ของ positive serum-HPV16 และ HPV18 โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน นักวิเคราะห์คนเดียวกัน พบว่าค่า %CV ของผลการทดสอบค่า IC_{50} ของแอนติบอดีต่อ HPV แต่ละสายพันธุ์มีค่า %CV ≤ 25% และเมื่อทำการวิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์คนเดียว 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน พบว่าความแปรปรวนและการกระจายของข้อมูลเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (%CV ≤ 25%) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ repeatability และ intermediate precision เมื่อใช้ซีรั่มมาตรฐาน และ positive serum

สายพันธุ์ HPV	Repeatability				Intermediate precision			
	IC_{50}/100µL	Mean	SD	%CV	IC_{50}/100µL	Mean	SD	%CV
ซีรั่มมาตรฐาน anti-HPV human serum								
16	204.92 200.40 164.45	189.92	22.18	11.68	164.16 162.67 211.14	179.32	27.56	15.37
18	529.47 563.51 454.69	515.89	55.67	10.79	461.18 529.47 605.82	532.16	72.36	13.60
positive serum จากหนูไมซ์								
16	49,458.37 31,142.24 39,184.78	39,928.46	9,180.68	22.99	23,705.05 33,387.21 36,740.02	31,277.43	6,768.75	21.64
18	54,578.11 87,296.45 64,495.68	68,790.08	16,776.6	24.39	50,241.88 62,590.06 67,263.28	60,031.74	8,794.36	14.65

ผลการทดสอบหาระดับของแอนติบอดี โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ทำการวิเคราะห์คนละ 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน (independent *t*-test) พบว่าผลการทดสอบค่า IC_{50} ของแอนติบอดีต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 มีความแปรปรวนและการกระจายของข้อมูลเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (%CV ≤ 25%) คือ มีค่า %CV อยู่ในช่วง 11.86–19.47% และแสดงผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 7

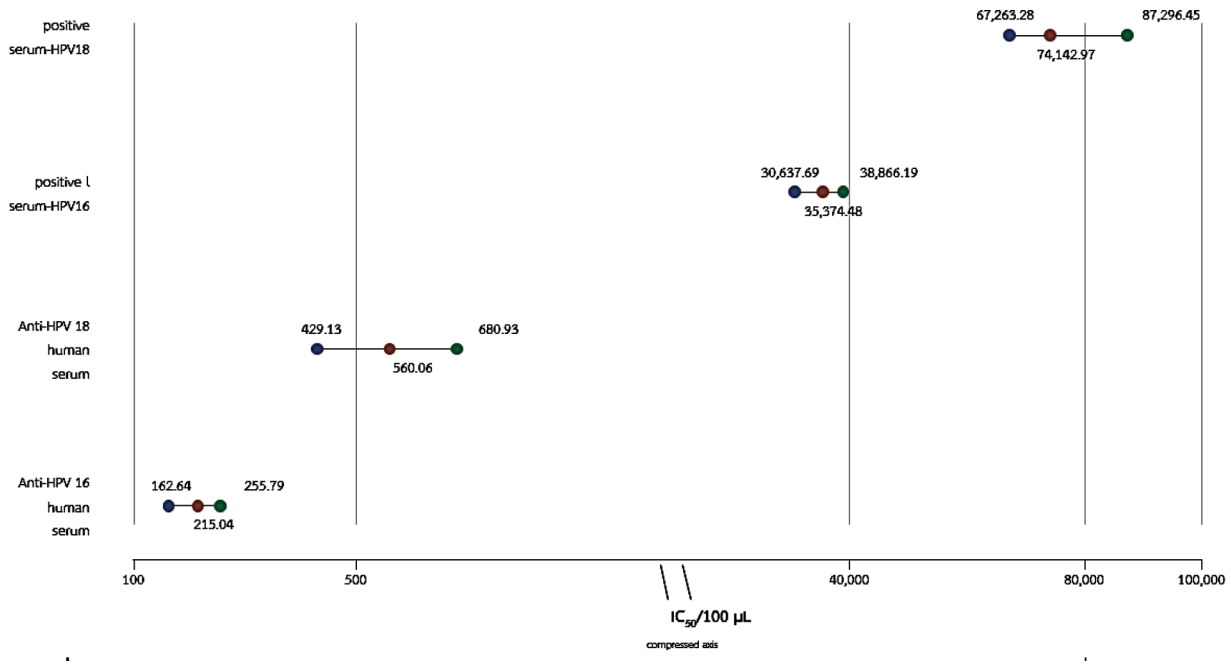
ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบในพารามิเตอร์ intermediate precision เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์ 2 คน

สายพันธุ์ HPV	Antibodies titer (IC_{50}/100µL)						Mean	%CV	*p*-value (*t*-test)
	Analyst 1 (n = 3)			Analyst 2 (n = 3)					
	1	2	3	1	2	3			
16	229.31	231.06	213.11	180.58	307.78	284.44	241.05	19.47	0.487
18	515.89	624.73	461.18	703.39	627.88	579.52	585.43	14.81	0.162

การทดสอบ reportable IC_{50} range ของค่า IC_{50}

การทดสอบ reportable IC_{50} range ของค่า IC_{50} ด้วยวิธี PBNA พิจารณาจากช่วงการยับยั้งที่เหมาะสม ร้อยละ 20–80 ของ %inhibition rate ร่วมกับความแม่นและความเที่ยงของวิธี ในการทดสอบ 12 ครั้งของซีรั่มมาตรฐาน Anti-HPV16 human serum พบว่าค่าความเจือจางที่ใช้คำนวณจุดยับยั้ง ร้อยละ 50 มีค่า upper 0.5 อยู่ที่ 1/160 และ lower 0.5 อยู่ที่ 1/320 ส่งผลให้ reportable IC_{50} range อยู่ในช่วง 162.64–255.79 และในการทดสอบ 12 ครั้งของ Anti-HPV18 human serum พบว่าค่า upper 0.5 อยู่ที่ 1/640 และ lower 0.5 อยู่ที่ระดับความเจือจางถัดไป ส่งผลให้ reportable IC_{50} range อยู่ในช่วง 429.13–680.93

ในส่วนของ positive serum การทดสอบ 3 ครั้งของ positive serum-HPV16 พบว่าค่า upper 0.5 อยู่ที่ 1/32,000 และ lower 0.5 อยู่ที่ 1/64,000 ทุกรายการจึงได้ reportable IC_{50} range อยู่ในช่วง 30,637.69–38,866.19 และการทดสอบ 3 ครั้งของ positive serum-HPV18 พบว่าค่า upper 0.5 อยู่ที่ 1/40,000, 1/40,000 และ 1/80,000 ตามลำดับ ขณะที่ค่า lower 0.5 อยู่ที่ 1/80,000, 1/80,000 และ 1/160,000 ตามลำดับ ส่งผลให้ reportable IC_{50} range อยู่ในช่วง 67,263.28–87,296.45 ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดง reportable IC_{50} range ของ Anti-HPV human serum และ positive serum ที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 แสดงค่าต่ำสุด ค่าเฉลี่ย และค่าสูงสุดของ IC_{50}/100µL ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

การทดสอบ LOQ

ค่า LOQ ของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 ในซีรั่มมาตรฐานมีค่า IC_{50}/100µL อยู่ที่ 1.49 และ 1.56 ตามลำดับ และ positive serum-16 และ 18 มีค่า IC_{50}/100µL อยู่ที่ 1.69 และ 1.49 ที่สามารถจับกับ pseudovirions ไม่ให้เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้ที่ 50% (The 50% maximal inhibitory concentration, IC_{50}) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่า LOQ ของ Anti-HPV 16 และ 18 ผลิตจาก mouse serum และ human serum ที่สามารถอ่านผลการทดสอบได้

No. of test	LOQ (IC_{50}/100µL)			
	Positive serum -16	Positive serum -18	Anti-HPV human serum	
			05/134 (NIBSC/16)	10/140 (NIBSC/18)
1	1.5571	1.0912	1.4706	1.6121
2	1.8310	1.6967	1.4422	1.6183
3	1.6916	1.6816	1.5600	1.4412
Mean	1.6932	1.4898	1.4909	1.5572

การทดสอบ robustness

ผลการทดสอบ robustness ของวิธีที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบที่อาจส่งผลต่อการทดสอบหาระดับของแอนติบอดี Anti-HPV human serum สายพันธุ์ 16 และ 18 ที่ทำปฏิกิริยากับ pseudo-virions โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ความเข้มข้น 1.5×10^5, 1.7×10^5 และ 2.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน ทำต่างวันกัน นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ พบว่ามีความแปรปรวนและการกระจายของข้อมูลเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (%CV ≤ 25%) คือ มีค่า %CV อยู่ในช่วง 4.41-18.83% และแสดงผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า *p*-value มากกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีไตเตอร์เมื่อทำการทดสอบที่ความเข้มของเซลล์แตกต่างกัน

สายพันธุ์ HPV	ความเข้มข้นของเซลล์ (cells/mL)	Mean IC_{50}/100µL	SD	%CV	*p*-value (One-Way Anova)
16	1.5×10^5	224.496	9.895	4.41	
	1.7×10^5	178.473	31.685	17.75	0.212
	2.0×10^5	219.022	41.248	18.83	
18	1.5×10^5	554.209	61.146	11.03	
	1.7×10^5	548.185	52.596	9.59	0.973
	2.0×10^5	542.406	70.564	13.01	

การทดสอบความคงทนของวิธี โดยการเปลี่ยน cell passage ของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT จำนวน 4 passage number ต่อ HPV แต่ละสายพันธุ์ โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน ทำต่างวันกัน นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ พบว่ามีความแปรปรวนและการกระจายของข้อมูลเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (%CV ≤ 25%) คือ มีค่า %CV อยู่ในช่วง 8.29-20.54 และแสดงผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า *p*-value มากกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีไตเตอร์เมื่อทำการทดสอบที่ passage number ของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT แตกต่างกัน

สายพันธุ์ HPV	Passage no.	Anti-HPV human serum (IC_{50}/100µL)(n = 2)		Positive serum (IC_{50}/100µL)(n = 2)	
		1	2	1	2
16	#5	255.79	164.00	36,740.02	38,866.19
	#12	162.67	214.71	30,637.69	33,808.04
	#14	251.82	146.80	33,831.55	31,142.24
	#16	211.14	229.31	33,387.21	36,619.57
	Mean	204.53		34,379.06	
	SD	42.01		2,848.88	
	%CV	20.54		8.29	
	***p*-value (one-way ANOVA)**	0.937		0.138	
18	#7	522.01	588.55	87,296.45	64,495.68
	#10	605.82	529.47	67,263.28	75,518.66
	#16	482.03	407.41	87,296.45	64,495.68
	#18	461.18	488.70	60,532.40	69,258.00
	Mean	510.65		70,680.32	
	SD	65.48		8,183.01	
	%CV	12.82		11.58	
	***p*-value (one-way ANOVA)**	0.129		0.719	

วิจารณ์

การศึกษานี้ได้ดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี PBNA สำหรับการตรวจวัดระดับ neutralizing antibodies ที่จำเพาะต่อ HPV16 และ HPV18 โดยอาศัยหลักการและเงื่อนไขการทดสอบที่ประยุกต์ตามแนวทางของ Nie J และคณะ[14] เพื่อประเมินความเหมาะสมของวิธีทั้ง specificity, linearity และ precision & robustness ผลการศึกษาความเหมาะสมของวิธี PBNA ที่พัฒนาขึ้นมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Nie J และคณะ[14] และ Bei L และคณะ[18] ซึ่งต่างยืนยันถึงความไว ความจำเพาะ และความสามารถของ PBNA ที่แสดงถึงความสามารถยับยั้งของแอนติบอดีโดยมีความแม่น สนับสนุนการนำไปใช้ประเมินภูมิคุ้มกันจากวัคซีน HPV ทั้งในงานวิจัยและการควบคุมคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ จากผลการศึกษา specificity ของวิธี PBNA แสดงการยับยั้งของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ HPV16 และ HPV18 ได้อย่างชัดเจน ทั้งจากการใช้ซีรั่มมาตรฐานจากคนและซีรั่มอ้างอิง (positive serum) ที่ผลิตจากหนูไมซ์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย monovalent HPV-VLP การศึกษานี้กำหนดให้ Anti-HPV human serum ของ NIBSC (05/134 สำหรับ HPV16 และ 10/140 สำหรับ HPV18) เป็นซีรั่มมาตรฐานและพัฒนาซีรั่มอ้างอิง (positive serum) เพื่อรองรับสายพันธุ์อื่นที่การผลิตซีรั่มมาตรฐานยังไม่ครอบคลุม[13,16,18] จากข้อมูลที่ได้จากซีรั่มหนูไมซ์แสดงรูปแบบการยับยั้งที่สอดคล้องกับซีรั่มมาตรฐาน เป็นการยืนยันว่าโครงสร้าง capsid และ epitope สำคัญของ pseudovirion มีความสมบูรณ์เพียงพอในการ

กระตุ้นและสะท้อนการเกิด neutralizing antibodies ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nie J และคณะ[14,16] ที่แสดงให้เห็นการตอบสนองของ monoclonal antibodies และซีรั่มจากสัตว์ทดลองต่อ pseudovirion ได้อย่างจำเพาะต่อสายพันธุ์[14]

การศึกษา linearity and range โดยควบคุมจำนวนไวรัสในหลุมควบคุม (virus control) ให้อยู่ในช่วงประมาณ 250–1,000 fluorospots และใช้การถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ในการคำนวณค่า IC_{50} ผลที่ได้ชี้ว่าค่า IC_{50} มีความเสถียรและไม่ถูกรบกวนจากปริมาณไวรัสเกินสมดุล จึงสอดคล้องกับแนวโน้มที่ Nie J และคณะ[14] รายงานและสนับสนุนเกณฑ์การกำหนดช่วง virus control ที่เหมาะสม[13,14,16] นอกจากนี้เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการกำหนด reportable IC_{50} range ในการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าค่าที่รายงานได้จริงเป็นผลของการบูรณาการข้อมูลจากความจำเพาะ ความแม่น ความเที่ยง และความเป็นเส้นตรงของวิธี ไม่ได้ใช้เพียงค่า LOQ ที่คำนวณจากสูตรเท่านั้น กล่าวอีกนัยหนึ่งช่วง reportable IC_{50} range ช่วยอธิบายสมรรถนะเชิงปฏิบัติของวิธี PBNA ในฐานะ cell-based neutralization assay ได้ชัดเจนกว่า เนื่องจากค่า IC_{50} ต้องอยู่ภายในช่วงความเจือจางที่คร่อมจุดยับยั้งร้อยละ 50 และยังคงอยู่ในช่วงเชิงเส้นของกราฟตามเกณฑ์ของวิธี[22,23] เกณฑ์การควบคุมไวรัสในงานวิจัยของ Wu X และคณะ[13] กำหนดให้มีค่า virus control ≥ 300 fluorospot และการประยุกต์การอ่านสัญญาณแบบหลายสีเพื่อลดสัญญาณรบกวน[13,16] ช่วยยืนยันว่าช่วงการอ่านสัญญาณในงานวิจัยนี้รองรับความเป็นเส้นตรงได้อย่างเหมาะสม

การศึกษาความเที่ยงและความทนของวิธี (precision & robustness) ผลการทดสอบซ้ำในวันเดียวกันและต่างวันกัน พบว่าค่า %CV อยู่ภายใต้เกณฑ์ยอมรับ (< 25%) และเมื่อเปลี่ยน passage number ของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้เซลล์ที่มี passage ไม่เกิน 20 passage ผลดังกล่าวมีนัยสำคัญเชิงปฏิบัติ เนื่องจากยืนยันว่าภายใต้กรอบการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการ วิธี PBNA ที่พัฒนาขึ้นยังคงให้ผลสม่ำเสมอแม้มีความแปรผันในช่วงการใช้งานของเซลล์ที่เกิดขึ้นจริง[4,11] การศึกษานี้ใช้ cell-based assay จึงมีหลายปัจจัยที่ทำให้เกิดการแปรผัน เช่น ความเข้มข้นของเซลล์เพาะเลี้ยงหรือความแตกต่างระหว่างนักวิเคราะห์ ดังนั้นการทดสอบนี้ยังอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ สอดคล้องกับหลักการของการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี PBNA ในรายงานการตรวจสอบ Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าวิธี neutralization assay ที่อาศัยระบบเซลล์สามารถมีความแปรปรวนระดับหนึ่งได้ตามธรรมชาติของระบบชีวภาพ แต่ยังถือว่าน่าเชื่อถือได้เมื่อมีการกำหนดเกณฑ์ความแม่นและความเที่ยงที่เหมาะสม รวมถึงการควบคุมสภาวะการทดสอบอย่างเป็นระบบ[24] ค่า %CV ที่ได้ยังอยู่ในเกณฑ์สอดคล้องกับรายงานของ Nie J และคณะ ที่พบค่า CV เฉลี่ยประมาณ 14% ในหลายสายพันธุ์เมื่อทดสอบซ้ำหลายรอบ[14] แสดงว่าเมื่อมีการควบคุมสภาพการทดสอบอย่างเหมาะสม ผลการทดสอบที่ได้มีความเชื่อถือ[4,11] การประเมินขีดจำกัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) พบว่าค่า LOQ ที่ได้จากซีรั่มมาตรฐานมีความใกล้เคียงกับค่า LOQ จากซีรั่มหนู แสดงศักยภาพของการใช้ซีรั่มสัตว์ทดลองเป็น in-house reference เพื่อเสริมหรือทดแทนซีรั่มมาตรฐานคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่สารมาตรฐานที่ผลิตจากคนยังไม่ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ตามองค์ประกอบของวัคซีนที่เป็น HPV-VLP หลายสายพันธุ์[18] แนวทางนี้ช่วยให้สามารถติดตามแนวโน้มการตอบสนองของวัคซีนในระยะ pre-clinical ได้อย่างต่อเนื่อง และสอดคล้องกับข้อเสนอของ Nie J และคณะ[14] ที่มองว่าสารอ้างอิงจากสัตว์ทดลองเป็นองค์ประกอบสำคัญในการขยายขีดความสามารถของงานวิเคราะห์ด้าน HPV สู่ระบบที่รองรับหลายสายพันธุ์[13,14,16,18]

การศึกษานี้มีข้อจำกัดด้าน throughput จากการใช้เพลท 96 หลุม ซึ่งอาจไม่เพียงพอเมื่อจำนวนตัวอย่างมากขึ้น การยกระดับไปใช้เพลท 384 หลุม เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดเวลาและต้นทุน ในขณะที่ยังคงอยู่ภายในกรอบการควบคุมคุณภาพและการควบคุมกำกับด้านวัคซีน[4,11] อีกข้อจำกัด คือ ซีรั่มมาตรฐานที่ปัจจุบันครอบคลุมเพียงสายพันธุ์ HPV16

และ HPV18 ทำให้การประเมินวัคซีนที่มีส่วนผสมหลายสายพันธุ์จำเป็นต้องใช้ซีรั่มจากสัตว์ทดลองควบคู่ไปก่อน ข้อจำกัดเหล่านี้สอดคล้องกับประเด็นที่ Nie J และคณะ[14] ที่ระบุถึงความยุ่งยากและปริมาณงานของ PBNA แบบ manual ซึ่งแม้จะมีความแม่นยำสูงกว่าวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) หรือ competitive Luminex immunoassay (cLIA) แต่ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อการขยายไปสู่การใช้งานระดับอุตสาหกรรมหรือระดับประเทศ[13,14,16,17] โดยสรุปผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นความใช้ได้ของวิธี PBNA ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อ HPV16 และ HPV18 ที่มีความจำเพาะ ความเป็นเส้นตรง ความเที่ยง ความแม่น และความทนต่อความแปรปรวนภายใต้การควบคุมสภาวะการทดสอบที่เหมาะสม การใช้ซีรั่มมาตรฐานจาก NIBSC ร่วมกับวัสดุอ้างอิงจากสัตว์ทดลองยังสามารถใช้ได้ในการติดตามความต่อเนื่องและความเทียบเคียงของการประเมินสารมาตรฐานจากซีรั่มคนที่ยังไม่ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ ผลการศึกษานี้จึงสนับสนุนการนำวิธี PBNA ไปใช้ทั้งในด้านงานวิจัย การติดตามภูมิคุ้มกันหลังการฉีดวัคซีน และการควบคุมคุณภาพวัคซีนก่อนการจำหน่าย โดยเฉพาะในระบบที่ต้องประเมินหลายสายพันธุ์ให้เทียบเคียงกันได้ระหว่างห้องปฏิบัติการ[4,11,13,14, 16-18] นอกจากนี้ผลลัพธ์ที่ได้จากการศึกษาชี้ให้เห็นความสำคัญของการเพิ่มบทบาทวัสดุอ้างอิงจากสัตว์ทดลองและการพัฒนาไปสู่ระบบ high-throughput ซึ่งเป็นพื้นฐานสำคัญในการยกระดับ PBNA ให้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการประเมินวัคซีน HPV ในระดับสากลในอนาคต

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี PBNA ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีต่อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 โดยสามารถตรวจปริมาณแอนติบอดีในซีรั่มของหนูได้ แสดงให้เห็นว่าวิธี PBNA รวมถึงแอนติบอดีที่ผลิตจากหนูไมซ์มีความเหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อ HPV สายพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อให้ครอบคลุม HPV ทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่มีอยู่ในวัคซีนปัจจุบัน

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ Claude (Anthropic, USA) ช่วยในการปรับปรุงการใช้ภาษา การแก้ไขไวยากรณ์ภาษาอังกฤษเพื่อให้มีความถูกต้องมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวัคซีนแห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ได้สนับสนุนทุนเพื่อการพัฒนาภายใต้โครงการการเสริมสร้างศักยภาพของห้องปฏิบัติการในการศึกษาวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีต่อ HPV โดย Pseudovirion-Based Neutralization Assay ณ Division of HIV/AIDS and Sex-transmitted Virus Vaccines, NIFDC สาธารณรัฐประชาชนจีน รวมทั้ง Dr. Jianhui Nie ที่ถ่ายทอดองค์ความรู้วิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay และบริษัท Xiamen Innovax Biotech Co., Ltd. สาธารณรัฐประชาชนจีน ผู้สนับสนุน monovalent HPV-VLP antigen และ pseudovirions เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีเบื้องต้น และขอขอบคุณ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนการดำเนินงานในทุกด้าน

เอกสารอ้างอิง

1. De Vincenzo R, Conte C, Ricci C, Scambia G, Capelli G. Long-term efficacy and safety of human papillomavirus vaccination. Int J Womens Health. [serial online]. 2014; [cited 2025 Nov 5]; 6: 999-1009. [12 screens]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4262378.
2. TREAT Asia. Cervical cancer, human papillomavirus (HPV), and HPV vaccines in Southeast Asia. [online]. 2016; [cited 2025 Nov 5]; [20 screens]. Available from: URL: https://www.amfar.org/wp-content/uploads/2022/06/hpva4-TA-8-5x11-1.pdf.

3. World Health Organization. WHO guidelines for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2021.
4. World Health Organization. Annex 2: WHO good manufacturing practices for biological products Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 822. [online]. 2016; [cited 2025 Nov 11]; [38 screens]. Available from: URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/gmp/annex-2-who-good-manufacturing-practices-for-biological-products.pdf.
5. Centers for Disease Control and Prevention. HPV vaccine recommendations. [online]. 2016; [cited 2025 Nov 11]; Available from: URL: https://www.cdc.gov/hpv/hcp/vaccination-considerations/index.html.
6. Watson-Jones D, Changalucha J, Maxwell C, Whitworth H, Mutani P, Kemp TJ, et al. Durability of immunogenicity at 5 years after a single dose of human papillomavirus vaccine compared with two doses in Tanzanian girls aged 9–14 years: results of the long-term extension of the DoRIS randomised trial. Lancet Glob Health 2025; 13(2): e319-28.
7. Single-Dose HPV Vaccine Evaluation Consortium. Evidence to inform decision-making on single-dose HPV vaccination policy. [online]. 2024; [cited 2025 Nov 5]; [5 screens]. Available from: URL: https://media.path.org/documents/HPV_Cnsrt_EvidenceBrief2024_ENGLISH.pdf.
8. Ratanasiripong NT, Sri-Umporn S, Kathalae D, Hanklang S, Ratanasiripong P. Human papillomavirus (HPV) vaccination and factors related to intention to obtain the vaccine among young college women in Thailand. J Health Res 2018; 32(2): 142–51.
9. World Health Organization. Eradicating cervical cancer in Thailand: a journey of hope and progress. [online]. 2025; [cited 2025 Nov 11]; [44 screens]. Available from: URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/thailand/reports/eradicating-cervical-cancer-in-thailand.pdf.
10. สถาบันวัคซีนแห่งชาติ. นโยบายและแผนยุทธศาสตร์ความมั่นคงด้านวัคซีนแห่งชาติ พ.ศ. 2566-2570. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 11 พ.ย. 2568]. Available from: URL: https://nvi.go.th/Information/DataGov/StrategicPlan/NationalVaccineStrategicPlan/NationalVaccineStrategicPlan_2566-2570.pdf.
11. U.S. Department of health and human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry clinical considerations for therapeutic cancer vaccines [excerpts]. Biotechnol Law Rep 2012; 31(3): 303-9.
12. Pinto LA, Dillner J, Beddows S, Unger ER. Immunogenicity of HPV prophylactic vaccines: serology assays and their use in HPV vaccine evaluation and development. Vaccine 2018; 36(32 Pt A): 4792-9.
13. Wu X, Zhang C, Feng S, Liu C, Li Y, Yang Y, et al. Detection of HPV types and neutralizing antibodies in Gansu province, China. J Med Virol 2009; 81(4): 693-702.
14. Nie J, Huang W, Wu X, Wang Y. Optimization and validation of a high throughput method for detecting neutralizing antibodies against human papillomavirus (HPV) based on pseudovirons. J Med Virol 2014; 86(9): 1542-55.
15. Kemp TJ, García-Piñeres A, Falk RT, Poncelet S, Dessy F, Giannini SL, et al. Evaluation of systemic and mucosal anti-HPV16 and anti-HPV18 antibody responses from vaccinated women. Vaccine 2008; 26(29-30): 3608-16.

16. Nie J, Liu Y, Huang W, Wang Y. Development of a triple-color pseudovirion-based assay to detect neutralizing antibodies against human papillomavirus. Viruses 2016; 8(4): 107. (12 pages).
17. Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA, Jansen KU, Smith JF, Chirmule N, et al. Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10(1): 108-15.
18. Bei L, Gao S, Zhao D, Kou Y, Liang S, Wu Y, et al. Immunogenicity assessment of a 14-valent human papillomavirus vaccine candidate in mice. Vaccines. [serial online]. 2024; [cited 2025 May 28]; 12(11): 1262. [19 screens]. Available from: URL: https://www.mdpi.com/2076-393X/12/11/1262.
19. Xu D, Li JD, An J, Ma XX, Wang XL, Zhou Z, et al. A preclinical immunogenicity study of the recombinant human papillomavirus nine-valent virus-like particle vaccine. Vaccines. [serial online]. 2024; [cited 2025 Jun 8]; 12(12): 1356. [17 screens]. Available from: URL: https://www.mdpi.com/2076-393X/12/12/1356.
20. Wongchana W, Trisiriwanic S, Phumiamorn S. Production of HPV type 16 pseudovirion for the development of pseudovirion-based neutralization assay (PBNA). Bull Dept Med Sci 2024; 66(2): 272-84.
21. World Health Organization. Recombinant human papillomavirus virus-like particle vaccines: WHO Expert Committee on Biological Standardization, Annex 4. WHO Technical Report Series, No. 999. [online]. 2016; [cited 2025 Nov 11]. Available from: URL: https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-hpv-like-particle-vaccines-annex-4-trs-no-999.
22. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2(R2) guideline on validation of analytical procedures. [online]. 2023; [cited 2025 Nov 5]; [33 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-2_en.pdf.
23. Association of Southeast Asian Nations (ASEAN). ASEAN guidelines for validation of analytical procedures for vaccines. [online]. 2018; [cited 2025 Nov 5]; [19 screens]. Available from: URL: https://asean.org/wp-content/uploads/2018/01/25PPWG-ANNEX-7-iii-Final-revision-of-analytical-method-validation-for-vaccinesdocx.pdf.
24. Kostense S, Moore S, Companjen A, Bakker AB, Marissen WE, von Eyben R, et al. Validation of the rapid fluorescent focus inhibition test for rabies virus-neutralizing antibodies in clinical samples. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(7): 3524-30.

Analysis of Specific Neutralizing Antibody Titers Against Cervical Cancer Vaccine Using the Pseudovirion-Based Neutralization Assay

Payom Agsiri, Natthakarn Mingngamsup, Wipawee Wongchana, Sakalin Trisiriwanich, and Supaporn Phumiamorn

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Currently, the cervical cancer vaccines have been included in Thailand Expanded Program on Immunization. Therefore, measuring immune responses in vaccinated individuals, as well as assessing vaccine potency for quality control, is important. This study aimed to develop and validate a pseudovirion-based neutralization assay (PBNA) for quantifying antibodies against human papillomavirus (HPV). This study aimed to develop and validate a PBNA for quantifying antibodies against HPV. The ability of human standard sera specific to HPV types 16 and 18 to inhibit the entry of the corresponding HPV pseudovirions into cultured 293FT cells was examined and expressed as IC_{50}/100µL. The developed method was subsequently verified. The produced HPV pseudovirions were found to be specific to the corresponding antibodies of each HPV type and were not inhibited by negative serum. The accuracy showed a %recovery in the range of 70-130%. A linear relationship was observed between log fluorospot and the dilution level of the standard serum for both types, with a correlation coefficient, > 0.98. The resulting graph was linear over the range of 20–80% inhibitory rate. The limits of quantitation for antibodies against types 16 and 18 were 1.49 IC_{50}/100µL and 1.56 IC_{50}/100µL, respectively. The assay also showed good precision, with the % coefficient of variance of no more than 25%. In the ruggedness test, using different cell concentrations and cell passage, the IC_{50}/100µL values were not significantly different at 95% confidence level (p-value > 0.05). In conclusion, the developed PBNA was validated for HPV16 and HPV18 in both standard human sera and type-specific mouse sera. This assay can serve as a platform for the development of animal-derived reference standards for other HPV-VLP types used in vaccine production.

Keywords: Human papillomavirus vaccine, HPV, Antibody, Pseudovirion-based neutralization assay (PBNA), Method validation