

การทำแห้งและกำหนดค่าความแรงวัคซีนไอกรนไร้เซลล์เพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ

วิริยามาศย์ เจริญคุณธรรม¹ อภิชัย ศุภสารสาทร¹ อัครจรรย์ อาเมน¹ ดวงพร อังศุประเวศ²

พรรณนิภา เอกไทยเจริญ² และสุภาพร ภูมิอมร¹

บทคัดย่อ

วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเป็นสารสำคัญในการทดสอบความแรงของวัคซีน ซึ่งต้องใช้ตรวจวิเคราะห์ไปพร้อมกับตัวอย่าง ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสำหรับใช้กับวัคซีนไอกรนไร้เซลล์ (aP) ที่ผลิตในประเทศ ห้องปฏิบัติการภาครัฐและผู้ผลิตจึงร่วมมือกันที่จะจัดเตรียมวัคซีน aP มาตรฐานอ้างอิงของประเทศ วัตถุประสงค์การศึกษานี้คือการทำแห้งวัคซีน aP ที่มีส่วนประกอบของ Pertussis Toxin (PT) และ Filamentous Hemagglutinin (FHA) และกำหนดค่าความแรงเพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ ขั้นตอนประกอบด้วย การเตรียมสูตรผสมวัคซีนเหลว aP การทำแห้งวัคซีนแบบเยือกแข็ง การประเมินประสิทธิภาพการทำแห้งโดยตรวจสอบคุณภาพวัคซีนเบื้องต้น และการกำหนดค่าความแรง aP ผลการศึกษาได้วัคซีน aP ผงแห้งบรรจุในขวดแก้วปิดผนึกที่มีคุณภาพผ่านการทดสอบเบื้องต้นของลักษณะกายภาพ ความแรง ปริมาณแอนติเจน ระดับการดูดซับของแอนติเจน ความชื้น การละลาย กรด-ด่าง ปริมาณเอ็นโดทอกซิน และความปราศจากเชื้อ ผลการสอบเทียบค่าความแรงด้วยวิธี mouse immunogenicity โดยห้องปฏิบัติการภาครัฐและผู้ผลิตแต่ละแห่ง 4 ครั้ง พบว่าได้ช่วงค่าความแรงสัมพัทธ์ระดับภูมิคุ้มกันต่อ PT เท่ากับ 0.8-1.2 และ 0.3-0.6 โดยมีช่วงค่าต่ำสุด-สูงสุด ของความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ละแห่งอยู่ระหว่าง 0.4-1.8 และ 0.2-0.8 ตามลำดับ ขณะที่ช่วงค่าความแรงสัมพัทธ์ระดับภูมิคุ้มกันต่อ FHA ของภาครัฐและผู้ผลิตเท่ากับ 0.8-1.4 และ 0.6-0.9 และมีช่วงค่าต่ำสุด-สูงสุดความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ละแห่งเท่ากับ 0.4-2.6 และ 0.4-1.2 ตามลำดับ การคำนวณค่าความแรงจากสองห้องปฏิบัติการได้ค่าเฉลี่ยถ่วงน้ำหนักเรขาคณิตความแรงสัมพัทธ์ PT เท่ากับ 0.51 มีช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ระหว่าง 0.45-0.59 และได้ค่าเฉลี่ยถ่วงน้ำหนักเรขาคณิตความแรงสัมพัทธ์ของ FHA เท่ากับ 0.83 มีช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ระหว่าง 0.72-0.96 ซึ่งได้กำหนดและประกาศให้เป็นค่าความแรงของวัคซีน aP อ้างอิงมาตรฐานของประเทศ สรุปได้ว่าการศึกษานี้สามารถจัดเตรียมวัคซีน aP ผงแห้งเพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศที่ใช้ควบคุมคุณภาพความแรงวัคซีน aP ได้สำเร็จ เพื่อผู้บริโภคได้รับวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ ความปลอดภัยตามมาตรฐาน

คำสำคัญ : การทำแห้ง ความแรง วัคซีนไอกรนไร้เซลล์

รับต้นฉบับ : 14 มกราคม 62 ฉบับปรับปรุง 8 มีนาคม 62 รับตีพิมพ์ 20 มีนาคม 62

ผู้สนับสนุน : สังกัด ¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ²บริษัท ไบโอเนท-เอเชีย จำกัด

wiriya.c@dmsc.mail.go.th

Freeze-Drying and Potency Value Establishment of Acellular Pertussis Vaccine for Using as National Reference Standard

Wereyarmarst Jaroenkunathum¹, Apichai Supasarnsathon¹, Assajun Amen¹
Duangporn Ungsupravate², Pannipa Ekthaichareon², and Supaporn Phumiamorn¹

Abstract

Reference standard vaccine is an important substance that must be analyzed with sample. Currently, there is no the national reference standard vaccine for controlling the potency assay of acellular pertussis (aP) vaccine produced in country. Therefore, national control laboratory (NCL) and a manufacturer collaborated to produce a national reference freeze-dried aP vaccine. The objective of this study was to freeze-dry aP vaccine, which contained pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) and established the potency value for using as a national reference standard. The procedures consisted of formulating the liquid aP vaccine, freeze-drying, evaluating freeze-drying effectiveness by preliminary testing and establishment aP potency. The result showed that the freeze-dried aP vaccine produced in glass vials with stopper closures were tested and passed the preliminary tests including appearance, potency, antigen content, degree of adsorption, moisture content, reconstitution, pH, endotoxin content and sterility. The potency determined by mouse immunogenicity test, four assays from each laboratory, revealed that range of relative potency of PT from NCL and manufacturer were 0.8-1.2 and 0.3-0.6 with range of 95% confidence limits of 0.4-1.8 and 0.2-0.8, respectively. Range of relative potency of FHA from NCL and manufacturer were 8-1.4 and 0.6-0.9 with range of 95% confidence limits each of 0.4-2.6 and 0.4-1.2, respectively. The weighted geometric mean of relative potency of PT calculated from both labs was 0.51 with 95% confidence limits of 0.45 -0.59 while weighted geometric mean of relative potency of FHA was 0.83 with 95% confidence limits of 0.72-0.96. These values were established and announced as the potency of national reference standard aP vaccine. In conclusion, this study succeed to produced freeze-dried aP for using as the national reference standard to control potency of aP vaccine for consumers getting effective and safe vaccine according to standards.

Keywords : freeze-drying, potency, acellular pertussis vaccine

วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเป็นสารสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ความแรงของวัคซีนซึ่งต้องใช้ทดสอบควบคู่ไปกับวัคซีนตัวอย่างทุกครั้ง เป็นตัวบ่งบอกถึงความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ และเนื่องจากการกำหนดค่าความแรงของวัคซีนบางชนิดไม่สามารถกำหนดเป็นค่าที่แน่นอนได้สาเหตุจากองค์ประกอบของวัคซีนผลิตจากสิ่งมีชีวิต การทดสอบความแรงต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตเช่นกัน ทำให้ผลการทดสอบมีความแปรปรวนสูง จึงต้องกำหนดค่าความแรงเป็นค่าความแรงสัมพัทธ์ที่สามารถสอกลับไปยังวัคซีนมาตรฐานที่ใช้ทดสอบในมนุษย์แล้วให้ผลในการป้องกันโรคได้ดีสำหรับวัคซีนไอกรนใช้ป้องกันโรคไอกรนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Bordetella pertussis* ปัจจุบันมีวัคซีนไอกรนอยู่สองชนิด ได้แก่ วัคซีนไอกรนที่ผลิตโดยใช้เชื้อทั้งตัว (whole cell pertussis (wP) vaccine) และวัคซีนที่ผลิตโดยใช้ส่วนสกัดของตัวเชื้อที่เรียกว่า วัคซีนไอกรนไร้เซลล์ (acellular pertussis (aP) vaccine) โดยส่วนสกัดของเชื้อที่นำมาผลิตวัคซีน aP ปัจจุบันประกอบด้วยส่วนหนึ่งหรือหลายส่วนของ Pertussis Toxin (PT) ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษ หรือ Filamentous Hemagglutinin (FHA), 69 kDa outer-membrane protein ที่เรียกอีกชื่อว่า pertactin (PRN) และ fimbrial-2 and fimbrial-3 antigens (FIM) ซึ่งสูตรวัคซีนของแต่ละผู้ผลิตจะมีความแตกต่างกันในการเลือกใช้ส่วนสกัดอย่างหนึ่งอย่างใดหรือหลายส่วนข้างต้นมาผลิตวัคซีนขึ้นอยู่กับการวิจัยพัฒนาและการผลิตของแต่ละบริษัท^(1,2) ด้วยความหลากหลายของสูตรตำรับวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ ส่งผลถึงกลไกในการออกฤทธิ์ที่มีความหลากหลายด้วยเช่นกัน ทำให้

ผู้ผลิตต้องจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานขึ้นใช้เองเนื่องจากไม่มีวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่จะนำมาใช้ควบคุมคุณภาพความแรงที่เป็นมาตรฐานสากลสำหรับวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ ดังนั้นความแรงของวัคซีนในแต่ละผู้ผลิตจึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ การตรวจวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีน aP อาจใช้วิธีตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง เช่น Mouse Immunogenicity Test (MIT), Modified Intracerebral Challenge Assay (MICA) หรือวิธีวิเคราะห์อื่นที่ได้รับ การอนุมัติจากหน่วยงานควบคุมกำกับของประเทศ⁽³⁾ ซึ่งมีความต่างจากวัคซีนไอกรนชนิดทั้งตัวที่มีวิธีการตรวจวิเคราะห์ และวัคซีนมาตรฐานสากล สามารถกำหนดเกณฑ์มาตรฐานสำหรับการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนไอกรนได้เหมือนกันทุกบริษัท ตามที่องค์การอนามัยโลกกำหนดค่าความแรงไว้ให้ไม่น้อยกว่า 4 หน่วยสากลต่อโดส⁽⁴⁾ การตรวจสอบความแรงวัคซีนโดยห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพภาครัฐ กรณีที่ไม่มีวัคซีนมาตรฐานสากลต้องใช้วัคซีนอ้างอิงของผู้ผลิตนั้นๆ และใช้วิธีตรวจวิเคราะห์เดียวกันในการตัดสินผล ดังนั้นการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานร่วมกับผู้ผลิตจะช่วยลดความขัดแย้งของผลการทดสอบที่แตกต่างกันได้ และหากสามารถจัดเตรียมให้อยู่ในรูปวัคซีนผงแห้งได้ จะทำให้วัคซีนมีความคงสภาพสูงเนื่องจากความชื้นต่ำเก็บไว้ได้นาน มีความสะดวกในการขนส่งเก็บรักษา ทั้งนี้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานต้องมีค่าความแรงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แต่เนื่องจากแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบในวัคซีนเป็นสารจำพวกโปรตีนมีความเสื่อมสลายได้ง่าย การพัฒนาสูตรตำรับและกระบวนการทำแห้งจึงมีความสำคัญ การทำแห้งที่นิยมใช้สำหรับวัคซีนหรือยาชีววัตถุวิธีหนึ่งคือการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying)^(5,6) ซึ่งสูตรตำรับและรูปแบบสถานะการทำแห้ง

ที่เหมาะสมนั้นต้องทำการศึกษาเฉพาะของแต่ละราย เพื่อให้ได้วัคซีนมาตรฐานตรงตามคุณสมบัติข้างต้น

สำหรับวัคซีน aP ที่ผลิตในประเทศไทย เป็นวัคซีนที่ผลิตโดยใช้เทคนิคการตัดต่อยีนของเชื้อ *B. pertussis* ให้สามารถผลิต recombinant PT ที่ไม่เป็นพิษ และสามารถผลิต FHA โดยมีส่วนประกอบ PT และ FHA ชนิดละ 5 ไมโครกรัมต่อโดส ดูดซับ บน aluminium hydroxide ที่เป็นสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) ใช้สำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในผู้ที่มีอายุ ตั้งแต่ 11 ขึ้นไป⁽⁷⁾ การตรวจวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนใช้วิธี MIT ซึ่งต้องใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน สำหรับการตรวจวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบค่าระดับภูมิคุ้มกันของวัคซีนรุ่นที่ตรวจ โดยแสดงค่าเป็น ความแรงสัมพัทธ์ (relative potency) ของระดับภูมิคุ้มกันต่อ PT และ FHA ในสัตว์ทดลอง เนื่องจาก ยังไม่มีวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศที่จะนำมาใช้ ตรวจวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนจึงได้มีความร่วมมือกันระหว่างผู้ผลิตและสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพ วัคซีนภาครัฐของประเทศ ที่จะจัดเตรียมวัคซีน aP อ้างอิงมาตรฐานของประเทศ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์หลักคือ การทำแห้งวัคซีน aP ที่มี ส่วนประกอบของ PT และ FHA และกำหนดค่าความแรง เพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศในการ ควบคุมคุณภาพวัคซีนไก่อกรณชนิดไร้เซลล์ที่ผลิต ในประเทศต่อไป โดยมีขั้นตอนการศึกษาประกอบด้วย การเตรียมสูตรผสมวัคซีนเหลว aP การทำแห้งวัคซีน แบบเยือกแข็ง การประเมินประสิทธิภาพการทำแห้ง โดยตรวจสอบคุณภาพวัคซีนเบื้องต้น และการกำหนด ค่าความแรงโดยวิธี MIT

ระยะเวลาดำเนินการ

ระหว่างปีงบประมาณ พ.ศ. 2560-2561

วิธีการศึกษา

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: AR grade, NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaOH , HCl , NaCl , KCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , Tween 20, Dextran, 3.5% Polygeline, Bovine Serum Albumin (BSA) (Cat.No. A3059, Sigma-Aldrich), Rabbit anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Cat. No. ab 6728, Abcam), SureBlue ReserveTM (Cat no. 53-00-00, TMB microwell peroxidase substrate 1-component, KPL)

สารมาตรฐาน: วัคซีน aP มาตรฐานอ้างอิง (In-house reference acellular pertussis vaccine, code No. FB-PE25001) เพื่อใช้สอบเทียบค่าความแรง กับวัคซีนตัวอย่าง In-house PT standard in 40% glycerol ที่ได้สอบเทียบกับ 1st international reference standard PT (Code: JN1H-5, NIBSC, UK) และ In-house FHA standard in 40% glycerol ที่ได้สอบเทียบกับ international reference standard FHA (Code: 90/520, NIBSC, UK) จากบริษัทไบโอเนท-เอเชีย WHO reference reagent, *Bordetella pertussis* anti-serum (mouse) 1RR Code: 97/642, NIBSC, UK) ซึ่งกำหนดค่า anti-FHA antibody titer และ anti-PT antibody titer ในหน่วยสากลต่อมิลลิลิตร

วัคซีนเหลว aP (10X final bulk) จากบริษัท ไบโอเนท-เอเชีย ที่มีความเข้มข้นของสารเป็น 10 เท่า ของวัคซีนสำเร็จรูป ประกอบด้วย PT และ FHA

ความเข้มข้นชนิดละ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\text{Al}(\text{OH})_3$ 4.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NaCl 150 มิลลิโมลาร์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอ่านไอโซซาแบบไมโครเพลท เครื่องซังสาร กระบอกละและเข็มฉีดยาสำหรับฉีดสัตว์ทดลอง ตู้เย็น ควบคุมอุณหภูมิ $2-8^\circ\text{C}$ ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -20°C ตู้ชีวนิรภัย เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) รุ่น Lyolab, LT ของ lyophilization systems, INC. ประเทศสหรัฐอเมริกา

การเตรียมสูตรตำรับวัคซีนเหลวและการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ผสม 10X final bulk กับสารละลาย Dextran และ 3.5% Polygeline ที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรอง ขนาด 0.22 ไมครอน ในขวดแก้ว Duran ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ 10X final bulk 50%(v/v), Dextran 4%(w/v) และ 3.5% Polygeline 10%(v/v)

กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ $2-8^\circ\text{C}$ ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ในตู้ชีวนิรภัย แล้วแบ่งบรรจุลงในขวดแก้วชนิด borosilicate type I ขนาด 3 มิลลิลิตร ขวดละ 0.5 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดแบบครึ่งเดียวด้วยจุกยาง แล้วนำไปทำแห้งด้วย lyophilizer ที่ตั้งค่าสภาวะการทำงานของเครื่องในขั้นตอนแช่แข็ง (freezing process) ให้มีอุณหภูมิ -50°C ความดัน (vacuum) 3000 mTorr นาน 5 ชั่วโมง ขั้นปฐมภูมิของการทำแห้ง (primary drying phase) คงอุณหภูมิเริ่มต้นที่ -50°C , vacuum 3000 mTorr จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิ และลด vacuum ไปตามลำดับ จนถึงอุณหภูมิ 36°C , vacuum 23 mTorr รวมระยะเวลาประมาณ 47 ชั่วโมง ขั้นทุติยภูมิของการทำแห้ง (secondary drying phase) คงอุณหภูมิที่ 36°C , vacuum 23 mTorr นาน 50 ชั่วโมง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การกำหนดสภาวะการทำแห้ง

ตัวแปร	Freezing process				Primary drying phase					Secondary drying phase
ระยะ	1	2	1	2	3	4	5	6	7	1
อุณหภูมิ ($^\circ\text{C}$)	-50	-50	-50	-50	-35	-30	-25	-25	36	36
เวลา (min)	0	300	0	60	60	1176	300	1176	60	3000
Vacuum (mTorr)	3000	-	3000	75	75	75	75	75	23	23

เมื่อครบระยะเวลาแล้วเติมแก๊สไนโตรเจนด้วยความดัน 450,000 mTorr ปิดฝาขวดวัคซีนให้สนิท แล้วนำออกจากเครื่องปิดครอบทับด้วยฟอลูมิเนียม ติดฉลากนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

การประเมินประสิทธิภาพการทำแห้ง

ก่อนการทำแห้ง: สุ่มขวดที่บรรจุวัคซีนเหลว ก่อนการทำแห้งมาชั่งน้ำหนัก เพื่อตรวจความสม่ำเสมอ

ของการแบ่งบรรจุ (%CV of aliquot) โดยชั่งน้ำหนักของขวดบรรจุวัคซีนเหลวพร้อมจุกยางปิดฝาของแต่ละขวด ด้วยเครื่องชั่งความละเอียด 0.0001 กรัม แล้วหักค่าน้ำหนักของขวดเปล่าและจุกยาง คำนวณค่าเฉลี่ยน้ำหนักของวัคซีนแต่ละขวด และร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV)

หลังการทำแห้ง: สุ่มตัวอย่างวัคซีนผงแห้งที่เตรียมได้มาตรวจสอบคุณภาพในรายการ คุณลักษณะทางกายภาพ (appearance) ด้วยตาเปล่า⁽⁸⁾ ปริมาณความชื้น (moisture content) ด้วยวิธี Volumetric Karl-Fisher titration⁽⁹⁾ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter⁽¹⁰⁾ ระยะเวลาการละลาย (reconstitution time)⁽¹¹⁾ ความปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย (sterility) ด้วยวิธี direct inoculation⁽¹²⁾ การปนเปื้อนเชื้อมัยโคพลาสมาด้วยวิธี Polymerase chain reaction⁽¹³⁾ ปริมาณเอนโดทอกซิน (endotoxin content) ด้วยวิธี gel clot⁽¹⁴⁾ relative potency ของ PT และ FHA ตรวจด้วยวิธี MIT สำหรับปริมาณแอนติเจน (antigen content) PT และ FHA ร้อยละการดูดซับของแอนติเจนกับ adjuvant (degree of adsorption) ตรวจด้วย Sandwich ELISA มีขั้นตอนโดยย่อดังนี้

Antigen content (PT/FHA): เคลือบเพลท 96 หลุมด้วย polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อ PT หรือ FHA แล้วเติม 3% BSA (blocking agent) จากนั้นเติมวัคซีนที่จะทดสอบ แอนติเจนมาตรฐาน PT หรือ FHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป นำไปอบที่อุณหภูมิ 37°C, 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย phosphate buffer saline ที่มี 0.05% Tween 20 (PBST) เติม monoclonal antibody ต่อ PT หรือ FHA จากนั้นจึงเติม secondary antibody ที่ติดอยู่กับ enzyme horseradish peroxidase แล้วจึงเติมสาร 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate ให้เกิดสี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

Degree of adsorption: ตรวจหาปริมาณทั้งหมดของแอนติเจน (total antigen content) PT

หรือ FHA โดยเติมสารละลาย 20% (w/v) tri-sodium citrate ที่ผสมใน 2XPBST ลงในวัคซีนด้วยอัตราส่วน 1:1 นำไปอบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-20 ชั่วโมง จากนั้นปั่นที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เก็บส่วนใสไปตรวจหาปริมาณแอนติเจน PT หรือ FHA ด้วยวิธี Sandwich ELISA ข้างต้น สำหรับการหาปริมาณแอนติเจนที่เป็นอิสระ (non-adsorbed antigen) ให้ทำการปั่นวัคซีนที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เก็บส่วนใสไปตรวจหาปริมาณแอนติเจน PT หรือ FHA ด้วยวิธี Sandwich ELISA คำนวณ Degree of adsorption ด้วยสมการ

$$\text{Degree of adsorption(\%)} = \frac{(\text{Total antigen content} - \text{Non adsorbed antigen content})}{\text{Total antigen content}} \times 100$$

เกณฑ์ยอมรับของการตรวจสอบ %CV of aliquot ใช้เกณฑ์กำหนดจากตัวอย่างของ National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) สหราชอาณาจักร ที่กำหนดไว้ไม่เกิน 1% สำหรับสารที่มีความหนืด⁽¹⁵⁾ ส่วนรายการและเกณฑ์ในการตัดสินผลของการทดสอบอื่นๆ มาจากการประยุกต์ใช้เกณฑ์ที่กำหนดในวัคซีนสำเร็จรูปชนิดน้ำ aP ของผู้ผลิต ซึ่งสอดคล้องกับข้อแนะนำขององค์การอนามัยโลกสำหรับวัคซีน aP⁽³⁾ ร่วมกับข้อมูลการควบคุมคุณภาพของวัคซีนผงแห้งทั่วไป เช่น ปริมาณความชื้น วัคซีนผงแห้งส่วนมากกำหนดการยอมรับที่ไม่เกิน 3% ความปราศจากเชื้อต้องไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย ความเป็นกรด-ด่าง ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 6-8, Degree of adsorption ต้องไม่ต่ำกว่า 90% เป็นต้น และมีรายการที่เป็นการตรวจสอบเพื่อเป็นข้อมูลของวัคซีนด้วยไม่มีมาตรฐานอ้างอิงเฉพาะกำหนดไว้

การเตรียมสาร

WHO reference reagent, *Bordetella pertussis* anti-serum (mouse) 1RR stock solution: ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20°C

coating buffer: 0.1 M Sodium carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6

phosphate buffer saline 10 X (PBS), pH 7.4: ชั่ง NaCl 80 กรัม, KCl 2 กรัม, Na₂HPO₄ • 2H₂O 14.4 กรัม KH₂PO₄ 2.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.4 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C

washing buffer: phosphate Buffer Saline with 0.05% Tween20, pH 7.4 (PBST)

diluent buffer: 0.3% (w/v) BSA in PBST

blocking buffer: 3% (w/v) BSA in PBST

secondary antibody: เจือจาง Rabbit anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate ด้วย diluent buffer 1/20,000

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักร สายพันธุ์ IRC เพศเดียวกัน น้ำหนักระหว่าง 14-16 กรัม หรืออายุ 5 สัปดาห์ แบ่งหนูทดลองออกเป็น 3 กลุ่มด้วยวิธีการสุ่ม กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม จำนวน 10 ตัว กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานจำนวน 16 ตัวต่อความเจือจาง และกลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนทดสอบจำนวน 16 ตัวต่อความเจือจาง (โครงการได้รับการอนุมัติใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัยโดยคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขโครงการ 61-023)

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างสำหรับสอบเทียบ และกำหนดค่าความแรงด้วยวิธี MIT

ตัวอย่าง: วัคซีน aP ชนิดผงแห้ง รุ่นการผลิต ที่ aP110817 ที่ได้จากการเตรียมตามวิธีการข้างต้น การกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการเตรียมซีรัมจากสัตว์ทดลอง

ละลายวัคซีนผงแห้ง 2 ขวด ด้วย PBS buffer 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียว และนำวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน 10 มิลลิลิตร มาเจือจางแต่ละชุดต่อด้วย PBS buffer ให้เป็น 3 ระดับความเจือจางในอัตราส่วน ตัวอย่างวัคซีน:PBS buffer เท่ากับ 1:1.5 (high titer), 1:5.25 (medium titer) และ 1:14.625 (low titer) แล้วแยกฉีดวัคซีนและวัคซีนมาตรฐานเข้าช่องท้องของหนูถีบจักรตัวละ 0.5 มิลลิลิตร กลุ่มความเจือจางละ 16 ตัว ในขณะที่กลุ่มควบคุมฉีดด้วย PBS buffer จำนวน 10 ตัว หลังจากนั้น 35 วัน ทำการสลับหนูด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ก่อนเจาะเลือดแยกแต่ละตัว ใส่ในหลอด ปั่นแยกซีรัมด้วยเครื่องปั่นความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ในหลอด เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจวิเคราะห์หาระดับภูมิคุ้มกันต่อ FHA และ PT ด้วยเทคนิค indirect ELISA

เคลือบเพลท 96 หลุมด้วย FHA หรือ PT ที่เจือจางด้วย coating buffer มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 1.0-1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 2-8°C ทิ้งไว้หนึ่งคืน ล้างเพลทด้วย PBST จากนั้นเติม blocking buffer นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±2°C นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

เจือจางสารมาตรฐาน anti-FHA antibody ด้วย diluent buffer ให้มีความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 และ 0.0156 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตร และเจือจางสารมาตรฐาน anti-PT antibody ให้มีความเข้มข้น 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156 และ 0.0078 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตร

เจือจางซีรัมของหนูแต่ละตัวในกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนและกลุ่มวัคซีนมาตรฐานรวมถึงกลุ่มควบคุม โดยเริ่มต้นเจือจางด้วย diluent buffer ในอัตราส่วนซีรัม:diluent buffer เท่ากับ 1:49 จากนั้นเจือจางซีรัมของหนูในแต่ละกลุ่มต่อด้วย diluent buffer ให้มีระดับการเจือจางของซีรัมเป็น 1/1,000, 1/2,000, 1/4,000 และ 1/8,000 สำหรับกลุ่ม high titer และเจือจางเป็น 1/400, 1/800, 1/1,600 และ 1/3,200 สำหรับกลุ่ม medium titer โดยกลุ่ม low titer เจือจางเป็น 1/150, 1/300, 1/600 และ 1/1,200 ตามลำดับ

นำสารละลายมาตรฐาน anti-FHA antibody หรือ anti-PT antibody และซีรัมของหนูที่เจือจางแล้วแต่ละตัวในแต่ละกลุ่ม รวมถึงซีรัมที่เจือจางของกลุ่มควบคุม แยกใส่ลงในหลุมที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที ล้างเพลทด้วย PBST แล้วเติมสารละลาย Rabbit anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที ล้างเพลทด้วย PBST เติมสาร SureBlue Reserve™ ที่ไว้อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3-5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N HCl อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA microplate reader คำนวณค่าเฉลี่ย anti-FHA antibody titer และ anti-PT antibody titer ของสัตว์ทดลองแต่ละตัวด้วยโปรแกรม

Bio assay assist, parallel line ที่พัฒนาโดย National Institute of Infectious Diseases ประเทศญี่ปุ่น

การกำหนดค่าความแรงของวัคซีน aP

ทำการตรวจวิเคราะห์ความแรงระดับภูมิคุ้มกันต่อ PT และ FHA ของวัคซีน aP ผงแห้ง โดยเปรียบเทียบกับค่าความแรงของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน (code No. FB-PE25001) ด้วยวิธี MIT รายงานเป็น relative potency โดยห้องปฏิบัติการผู้ผลิต และห้องปฏิบัติการภาครัฐ ห้องปฏิบัติการละ 4 การทดสอบ แล้วนำผลจากสองห้องปฏิบัติการมาคำนวณค่าเฉลี่ยถ่วงน้ำหนักเรขาคณิต (weighted geometric mean) ของ relative potency และค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดในช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แล้วจึงกำหนดและประกาศค่าความแรงของระดับภูมิคุ้มกันต่อ PT และ FHA วัคซีนที่ได้เพื่อนำมาใช้เป็นวัคซีน aP อ้างอิงมาตรฐานของประเทศ

ผลการศึกษา

การจัดเตรียมครั้งนี้ได้วัคซีนไอกรนไร้เซลล์ ผงแห้งขนาดบรรจุขวดละ 0.5 มิลลิลิตร ประมาณ 800 ขวด โดยในขั้นตอนหลังแบ่งบรรจุวัคซีนเหลวลงขวดก่อนทำแห้งได้ตรวจสอบความสม่ำเสมอของการแบ่งบรรจุ พบมีค่าน้ำหนักเฉลี่ยของวัคซีนต่อขวดเท่ากับ 0.5161 กรัม %CV เท่ากับ 0.23 ผลวิเคราะห์คุณภาพเบื้องต้นของวัคซีนผงแห้งพบ ลักษณะทางกายภาพมีลักษณะเป็นผงแห้งจับตัวเป็นก้อนเค้กสีขาว (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ภาพถ่ายวัคซีนผงแห้ง aP ที่เตรียมได้ในขวดแก้วปิดผนึก

มีค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.94 มีปริมาณความชื้นเฉลี่ย 0.85% มีค่าเฉลี่ยระยะเวลาในการละลาย 36.09 วินาที มีปริมาณเฉลี่ยแอนติเจน PT และ FHA เท่ากับ 30.70 และ 14.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าเฉลี่ย degree of adsorption ของ PT เท่ากับ 94.3% ขณะที่ค่าเฉลี่ย degree of adsorption ของ FHA มากกว่า 99% การทดสอบความแรงเบื้องต้นได้ค่า relative potency ของ PT เท่ากับ 0.6 และ FHA เท่ากับ 0.6 ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อรา แบคทีเรีย และมัคโคพลาสมาในวัคซีน ผลตรวจปริมาณเอนโดทอกซินมีค่าน้อยกว่า 1.5 EU ต่อโดส ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลทดสอบคุณภาพเบื้องต้นของวัคซีนไอกรนไรโซลต์ ผงแห้ง รุ่นการผลิตที่ aP110817

รายการทดสอบ	ผลวิเคราะห์ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD), n=จำนวนขวด หรือจำนวนครั้งการทดสอบ	เกณฑ์ยอมรับ
%CV of aliquot	น้ำหนักต่อขวด 0.5161 ± 0.0012 g, %CV 0.23, n=14 ขวด	ไม่เกิน 1%
appearance	ผงแห้งจับตัวเป็นก้อนแผ่นสีขาว, n=11 ขวด	ผงแห้งจับตัวเป็นก้อนแผ่นสีขาว
pH	6.94 ± 0.06 , n=3 การทดสอบ	6.0-8.0
moisture content	0.85 ± 0.46 , n=10 ขวด	ไม่เกิน 3%
reconstitution time	36.09 ± 7.75 , n=11 ขวด	ไม่เกิน 180 วินาที
sterility	ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อรา แบคทีเรีย และมัคโคพลาสมา	ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อรา แบคทีเรียและมัคโคพลาสมา
antigen content		รายงานเป็นข้อมูล
- PT	30.70 ± 0.46 μ g/ml, n=3 การทดสอบ	
- FHA	14.8 ± 0.85 μ g/ml, n=3 การทดสอบ	
degree of adsorption		ไม่ต่ำกว่า 90%
- PT	94.3 ± 1.15 , n=3 การทดสอบ	
- FHA	>99, n=3 การทดสอบ	
Relative potency		รายงานเป็นข้อมูล
- PT (95% confidence limit)	0.6 (0.4-0.8)	
- FHA (95% confidence limit)	0.6 (0.4-0.8)	
endotoxin content	< 1.5 EU/โดส (0.5ml)	รายงานเป็นข้อมูล

ผลวิเคราะห์ความแรงระดับภูมิคุ้มกันต่อ PT และ FHA ของวัคซีนไอนุกรนชนิดไร้เซลล์ผงแห้ง รุ่นการผลิต ที่ aP110817 โดยห้องปฏิบัติการภาครัฐจำนวน 4 การทดสอบ ได้ค่า relative potency ของ PT อยู่ระหว่าง 0.8-1.2 โดยที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่าต่ำสุดและสูงสุดอยู่ระหว่าง 0.4-1.8 และมีค่า relative potency ของ FHA อยู่ระหว่าง 0.8-1.4 โดยมีช่วงค่าต่ำสุดและสูงสุดที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ในช่วงค่า 0.4-2.6 ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าความแรงสัมพัทธ์ของระดับภูมิคุ้มกันต่อ PT และ FHA ของวัคซีน aP รุ่นการผลิต 110817 ทำการทดสอบด้วยวิธี MIT โดยห้องปฏิบัติการภาครัฐ จำนวน 4 การทดสอบ

ครั้งที่ทดสอบ	ค่าความแรงสัมพัทธ์ต่อวัคซีนมาตรฐานรุ่นการผลิต FB-PE25001 (95% confidence limit)	
	Anti-PT antibody	Anti-FHA antibody
1	0.8 (0.4-1.4)	1.2 (0.6-2.2)
2	0.8 (0.4-1.0)	1.2 (0.8-2.0)
3	0.8 (0.4-1.2)	0.8 (0.4-1.6)
4	1.2 (0.8-1.8)	1.4 (0.8-2.6)

ผลวิเคราะห์ค่าความแรงโดยห้องปฏิบัติการผู้ผลิตจำนวน 4 การทดสอบ ได้ค่า relative potency ของ PT อยู่ระหว่าง 0.3-0.6 โดยมีช่วงค่าต่ำสุดและสูงสุดที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ระหว่าง 0.2-0.8 และได้ค่า relative potency ของ FHA อยู่ระหว่าง 0.6-0.9 โดยมีช่วงค่าต่ำสุดและสูงสุดที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ในช่วงค่า 0.4-1.2 ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าความแรงสัมพัทธ์ของระดับภูมิคุ้มกันต่อ PT และ FHA ของวัคซีน aP รุ่นการผลิต 110817 ทำการทดสอบด้วยวิธี MIT โดยห้องปฏิบัติการผู้ผลิต จำนวน 4 การทดสอบ

ครั้งที่ทดสอบ	ค่าความแรงสัมพัทธ์ต่อวัคซีนมาตรฐานรุ่นการผลิต FB-PE25001 (95% confidence limit)	
	Anti-PT antibody	Anti-FHA antibody
1	0.6 (0.4-0.8)	0.9 (0.6-1.2)
2	0.3 (0.2-0.4)	0.6 (0.4-0.8)
3	0.3 (0.2-0.4)	0.6 (0.4-0.8)
4	0.4 (0.3-0.6)	0.9 (0.6-1.2)

ผลคำนวณค่า relative potency ของ PT และ FHA ในวัคซีน aP ผงแห้ง รุ่นการผลิตที่ aP110817 จาก 2 ห้องปฏิบัติการ รวม 8 การทดสอบด้วย weighted geometric mean ได้ค่า relative potency ของ PT เท่ากับ 0.51 โดยมีช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ระหว่าง 0.45 และ 0.59 ในขณะที่ relative potency ของ FHA มีค่าเท่ากับ 0.83 และมีช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ระหว่าง 0.72 และ 0.96 เมื่อเทียบกับค่าความแรงของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน รุ่นการผลิต FB-PE25001

อภิปรายผล

การทำแห้งวัคซีนแบบเยือกแข็งนั้นทำให้สามารถคงคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารแอนติเจนที่เป็นโปรตีนไว้ได้ดี โดยในระหว่างการศึกษาคณะผู้วิจัยได้มีการทดลองสูตรส่วนผสมสารเหลวที่จะนำมาผสมกับแอนติเจน PT และ FHA ของวัคซีนแล้วให้ได้รับรูปร่างของเนื้อผงแห้งที่มีลักษณะเป็นแผ่นเค้กสีขาว ความชื้นต่ำ และละลายได้ดี จนเมื่อได้สภาวะเหมาะสมแล้วจึงนำมาผสมรวมกับแอนติเจน ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นกระบวนการประยุกต์ใช้ความรู้และประสบการณ์จากการเตรียมวัคซีนผงแห้งที่ผ่านมาของหน่วยงาน จะเห็นได้ว่าการเติมสารที่ไม่ได้เป็นส่วนผสมในสูตรตำรับวัคซีน aP ที่ผลิตใช้ในคน เช่น Dextran และ polygeline เพื่อทำให้แอนติเจนมีความคงสภาพ และทำให้รูปร่างของผงแห้งมีความสวยงาม ละลายง่าย และในการเตรียมสูตรวัคซีน aP เหลวที่จะเข้าสู่กระบวนการทำแห้งจะต้องใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนที่สูงมากกว่าสูตรที่ใช้ในวัคซีนปกติ เพราะเมื่อผ่านขั้นตอนของการทำแห้งแล้วความแรงของแอนติเจนนั้นจะลดลงไปจากเดิม ประเด็นสำคัญส่วนนี้คือให้สามารถเตรียมวัคซีนผงแห้งที่มีค่าความแรงของวัคซีนระดับสูง เพื่อจะเก็บไว้ใช้เป็นระยะเวลานาน ในการศึกษาที่ใช้วัคซีนเหลวที่มีความเข้มข้นของสารเป็น 10 เท่าของวัคซีนสำเร็จรูปซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้เนื่องจากข้อจำกัดของการละลาย กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยเครื่อง lyophilizer ที่หน่วยงานใช้นั้นกำหนดสภาวะ freezing process, primary drying phase และ secondary drying phase

ตามที่ระบุในวิธีการเป็นสภาวะที่คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาทดสอบและปรับสภาวะให้เหมาะสมสำหรับการทำแห้งวัคซีน aP ซึ่งใช้เวลาในการทำแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer รวมกันประมาณ 4-5 วัน และตลอดกระบวนการในการเตรียมวัคซีนจะต้องทำโดยหลักเทคนิคการปราศจากเชื้อจนกว่าภาชนะที่บรรจุวัคซีนจะถูกปิดสนิท เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จะเห็นได้ว่าสูตรที่ใช้ในการเตรียมวัคซีนและสภาวะการทำแห้งครั้งนี้สามารถผลิตวัคซีน aP ผงแห้งที่ให้รูปร่างของเนื้อเค้กที่ดี มีความชื้นต่ำ สามารถละลายน้ำได้ดี มีคุณลักษณะตามที่ต้องการ จากผลการทดสอบค่าความแรงเบื้องต้น การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ความสามารถในการละลาย ความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น ความปราศจากเชื้อแบคทีเรียเชื้อราและมัคโคพลาสมา ปริมาณเอนโดทอกซิน ระดับการดูดซับของแอนติเจน พบว่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทุกพารามิเตอร์ โดยมีค่า relative potency เบื้องต้นของ PT และ FHA เท่ากับ 0.6 เมื่อเทียบกับวัคซีนมาตรฐานที่ใช้ศึกษา ซึ่งข้อมูลผลการทดสอบเบื้องต้นนี้มีความสำคัญที่ใช้ในการตัดสินใจเลือกวัคซีนสำหรับเข้าสู่ขั้นตอนของการสอบเทียบกำหนดค่าความแรงเพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานต่อไป

สำหรับการกำหนดค่าวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน จะต้องทำการตรวจวิเคราะห์ในจำนวนที่ให้ผลวิเคราะห์เพียงพอเชื่อถือได้ตามข้อเสนอแนะขององค์การอนามัยโลก⁽¹⁵⁾ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีนและสารที่เป็นองค์ประกอบ วิธีการสอบเทียบที่ปฏิบัติโดยทั่วไปจะทำการทดสอบไม่น้อยกว่า 3 ครั้ง ในศึกษานี้จึงได้กำหนดจำนวน

การทดสอบของแต่ละห้องปฏิบัติการไว้ที่ 4 การทดสอบ หรือ 8 ค่าผลการทดสอบจากสองห้องปฏิบัติการซึ่งนับว่าเพียงพอต่อการนำมากำหนดค่าร่วมกัน ผลการสอบเทียบวัคซีน aP ที่เตรียมได้ร่วมกันระหว่างห้องปฏิบัติการ มีค่าเฉลี่ยถ่วงน้ำหนักเรขาคณิตความแรงสัมพัทธ์ของ PT และ FHA เท่ากับ 0.51 และ 0.83 เมื่อเทียบค่าความแรงกับวัคซีนมาตรฐานรุ่นการผลิตที่ FB-PE25001 ซึ่งเป็นวัคซีนรุ่นที่ได้ผ่านการศึกษาในมนุษย์มาแล้ว หากพิจารณาผลจากแต่ละแห่งจะเห็นได้ว่าค่าความแรงของ PT และ FHA จากห้องปฏิบัติการเดียวกันจะมีค่าใกล้เคียงกัน ขณะที่ค่าความแรงจากต่างห้องปฏิบัติการจะมีค่าค่อนข้างต่างกัน ซึ่งเป็นค่าเบี่ยงเบนที่พบได้เสมอระหว่างห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะการทดสอบที่ใช้สัตว์ทดลองจะให้ค่าเบี่ยงเบนที่สูงกว่าการทดสอบในหลอดทดลอง และเป็นจุดสำคัญที่ทำให้เกิดความแตกต่างในการตัดสินผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการศึกษาค่าความแรงร่วมกันจะทำให้การกำหนดค่าความแรงนั้นรวมปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ที่ได้ในแต่ละห้องปฏิบัติการไว้แล้ว ลดความต่างของผลวิเคราะห์ ซึ่งค่าความแรงที่สอบเทียบร่วมกันนี้ได้ถูกกำหนดและประกาศให้เป็นค่าความแรงของวัคซีน aP ผงแห้งอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ ที่จะใช้ทดสอบค่าความแรงของห้องปฏิบัติการผู้ผลิตและหน่วยควบคุมคุณภาพภาครัฐเพื่อการควบคุมคุณภาพของวัคซีน aP ที่ผลิตในประเทศต่อไป ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการยังคงต้องติดตามตรวจสอบความคงตัวของวัคซีนนี้เป็นระยะเพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในระยะเวลายาวนาน 3-5 ปี

สรุปผล

การศึกษานี้สามารถทำแห่งวัคซีนไอกรนไร้เซลล์ซึ่งมีส่วนประกอบของแอนติเจน PT และ FHA ที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ ได้วัคซีน aP ผงแห้งที่มีคุณภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐาน มีค่าความแรงสัมพัทธ์ทดสอบโดยวิธี MIT ของ PT เท่ากับ 0.51 ที่ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ระหว่าง 0.45-0.59 และ FHA มีค่าเท่ากับ 0.83 มีช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ระหว่าง 0.72-0.96 ซึ่งค่าที่ได้ถูกกำหนดและประกาศให้เป็นค่าความแรงของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานไอกรนไร้เซลล์ของประเทศ เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนที่ผลิตในประเทศ ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคได้ใช้วัคซีนไอกรนไร้เซลล์ที่มีคุณภาพตามมาตรฐานสามารถป้องกันโรคได้ตามวัตถุประสงค์

ข้อเสนอแนะ

การผลิตวัคซีนหรือยาชีววัตถุผงแห้งอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ ยังต้องมีการการพัฒนาต่อยอดต่อไปเพื่อรองรับอุตสาหกรรมยาชีวเภสัชภัณฑ์ในประเทศที่จะมีเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งภายใต้ยุทธศาสตร์ขับเคลื่อนประเทศไทย 4.0 จึงควรมีการเตรียมความพร้อมด้านคน เครื่องมือ และเทคนิคการทำแห่งที่ทันสมัย ที่สามารถผลิตสารมาตรฐานได้ครั้งละปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสุกัลยาณี ไชยมี ที่ช่วยประสาน
ในการจัดทำข้อมูล เจ้าหน้าที่ของสถาบันชีววัตถุ และ
เจ้าหน้าที่ของผู้ผลิตที่มีส่วนเกี่ยวข้องในโครงการนี้
ทุกท่าน ที่ทำให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Pertussis vaccines. [Internet]. 2015 [cited 2018 Oct 20]; [1 screen]. Available from: <https://www.who.int/biologicals/vaccines/pertussis/en/>
2. World Health Organization. Acellular pertussis vaccines. [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 20]; [1 screen]. Available from: <https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/apertussis/en/>
3. World Health Organization. WHO expert committee on biological standardization sixty-second report. WHO Technical report series 2013;979:187-260.
4. World Health Organization. WHO expert committee on biological standardization fifty-sixth report. WHO Technical report series 2007;941:301-33.
5. Hansen LJJ, Daoussi R, Vervaet C, Remon JP, Beer TRMD. Freeze-drying of live virus vaccines: A review. Vaccine 2015;33:5507-19.
6. Wikipedia. Freeze-drying. [Internet]. 2019 [cited 2019 Feb 19]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Freeze-drying>.
7. Bionet-Asia Co.,Ltd. Summary of product characteristics: Pertagen. [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 20];[7 screens]. Available from: <http://www.fda.moph.go.th/sites/drug/Shared%20Documents/Vaccine/U1DR2A1072590000211C-SPC.pdf>.
8. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพ. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาสิน ไตรศิริวานิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุพ จตุรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิถีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพฯ: บริษัท Full Force จำกัด; 2558. หน้า 38-40.
9. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำ. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาสิน ไตรศิริวานิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุพ จตุรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิถีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพฯ: บริษัท Full Force จำกัด; 2558. หน้า 41-3.
10. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การวัดค่า pH. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาสิน ไตรศิริวานิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุพ จตุรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิถีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพฯ: บริษัท Full Force จำกัด; 2558. หน้า 64-5.
11. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. SOP 03 02 015 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติการละลาย. Rev. No. 2; 2554.

12. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. SOP 03 02 001 การตรวจวิเคราะห์ความปลอดเชื้อโดยวิธี Direct inoculation. Rev. No. 15; 2561.
13. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. SOP 03 02 068 การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อมัยโคพลาสมาในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส. Rev. No. 9; 2561.
14. The European directorate for the quality of medicines & healthcare of the council of Europe. 2.6.14. Bacterial endotoxins (Method A). In: European pharmacopoeia. Vol.1. 9th ed.. Nördlingen:Druckerei C.H. Beck; 2017.p. 204-6.
15. World Health Organization. WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines. Switzerland: The immunization, vaccines and Biologicals; 2011.