บทความการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

การทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ (inactivation) ในการผลิตวัคซีนเชื้อตาย

ผู้เขียนบทความ

ภก.ศิโรตม์ คชภูมิ, นศภ.นิยตา สุวรรณเกิด, นศภ.ภคพงศ์ พัฒนากุล และ นศภ.พิชญธิดา สุขานนท์

ฝ่ายประกันคุณภาพ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. ผู้อ่านสามารถอธิบายหลักการและกลไกในการทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ด้วยวิธีทางเคมีและกายภาพ
2. ผู้อ่านทราบวิธีการกำจัดสารตกค้างจากการทำให้เชื้อหมดฤทธิ์
3. ผู้อ่านทราบหลักการในการทดสอบประสิทธิภาพหลังการทำให้เชื้อหมดฤทธิ์

บทคัดย่อ

วัคซีนชนิดเชื้อตาย (Inactivated vaccine) เป็นวัคซีนที่ผลิตจากไวรัสหรือแบคทีเรียที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์ โดยการทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ (inactivation) มีทั้งวิธีทางเคมี เช่น การใช้ฟอร์มาลดีไฮด์, β-propiolactone, ฟีนอล INA หรือซอราเลน และวิธีกายภาพ เช่น การให้ความร้อน รังสี UV หรือรังสีแกมมา ซึ่งแต่ละวิธีจะมีกลไกลที่แตกต่างกัน มีปัจจัยและความเหมาะตามชนิดของเชื้อที่ต้องการจะทำให้หมดฤทธิ์ การใช้สารเคมีจะต้องมีวิธีในการกำจัดสารตกค้างที่เหมาะสม และหลังการทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ และจำเป็นต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของกระบวนการ (inactivation test) เพื่อยืนยันว่าไม่มีเชื้อที่ยังมีชีวิตหรือสารพิษหลงเหลือจากการทำให้หมดฤทธิ์ เพื่อให้มั่นใจว่าวัคซีนปลอดภัยและมีประสิทธิภาพก่อนนำไปใช้

คำสำคัญ: วัคซีนเชื้อตาย, Inactivated vaccine, Formaldehyde, β-propiolactone, inactivation test

บทนำ

วัคซีน (Vaccine) คือ ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์หรือกระบวนการอื่นใด ที่นำมาใช้กระตุ้นหรือสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค เพื่อป้องกัน ควบคุม รักษา หรือ ลดความรุนแรงของโรคทั้งในคนและสัตว์[1] วัคซีนที่ใช้ในมนุษย์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของแอนติเจน ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในร่างกายมนุษย์ ทั้งระบบภูมิคุ้มกันตั้งแต่กำเนิด (Innate immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immunity) เพื่อต่อต้านเชื้อก่อโรค สารพิษ หรือแอนติเจนที่สร้างขึ้นโดยเชื้อนั้น ๆ วัคซีนที่ใช้ในมนุษย์จะต้องได้รับการพิสูจน์แล้วว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Immunogenicity) และมีความปลอดภัยในระดับที่ยอมรับได้สำหรับการใช้ตามแผนการให้วัคซีนที่กำหนดไว้ [2] การได้รับวัคซีนก่อให้เกิดประโยชน์ทั้งต่อตัวผู้ที่ได้รับวัคซีนและสังคม โดยวัคซีนจะทำให้ผู้ที่ได้รับมีภูมิคุ้มกันต่อโรค ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเจ็บป่วยหรือภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง นอกจากนี้การได้รับวัคซีนอย่างครอบคลุมจะส่งเสริมให้เกิดภูมิคุ้มกันกลุ่ม (herd immunity) ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการจำกัดการแพร่ระบาดของโรค และช่วยลดภาระด้านค่าใช้จ่ายทางสาธารณสุขอย่างมีประสิทธิภาพ[3]

วัคซีนสามารถแบ่งได้หลายรูปแบบ หากแบ่งตามการผลิต[4] จะสามารถแบ่งวัคซีนออกได้เป็น 6 ประเภท ได้แก่ วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (Live attenuated vaccine) วัคซีนเชื้อตาย (killed vaccine, Inactivated vaccine) ท็อกซอยด์ (Toxoid) วัคซีนเอ็ม อาร์ เอน เอ (mRNA Vaccine) วัคซีนที่ใช้ไวรัสเป็นพาหะ (Viral vector vaccine) และวัคซีนคอนจูเกต (Conjugate vaccine) หากแบ่งตามลักษณะการใช้งาน [5] จะแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ วัคซีนชนิดฉีดและวัคซีนชนิดกิน และหากแบ่งตามลักษณะของแอนติเจน[5] จะแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ วัคซีนชนิดเชื้อตาย (Killed vaccine, Inactivated vaccine) และ วัคซีนชนิดเชื้อเป็น (Live attenuated vaccine) โดยวัคซีนชนิดเชื้อตาย อาจแบ่งออกได้เป็น วัคซีนที่ทำจากแบคทีเรียหรือไวรัสทั้งตัวที่ทำให้ตายแล้ว (Whole cell vaccines) และวัคซีนที่มีการนำเอาชิ้นส่วนของแบคทีเรียหรือไวรัสมาใช้ทำวัคซีน (Subunit vaccines) โดยในบทความฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเสนอการทำให้เชื้อหมดฤทธิ์เพื่อใช้ผลิตวัคซีนชนิดเชื้อตาย

ความหมาย และหลักการทำงานของวัคซีนเชื้อตาย

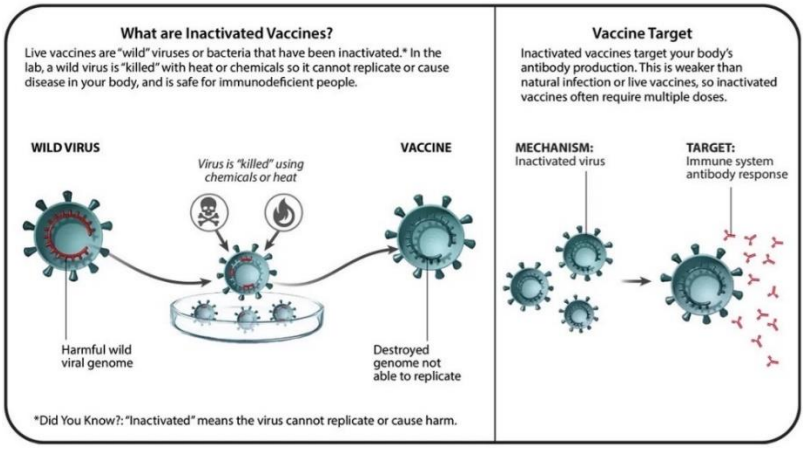
วัคซีนเชื้อตาย เป็นวัคซีนที่ทำจากแบคทีเรียหรือไวรัสทั้งตัว หรือบางส่วนของแบคทีเรียหรือไวรัส เมื่อนำเข้าสู่ร่างกายจะทำให้เกิดปฏิกิริยาภายหลังฉีดประมาณ 3-4 ชั่วโมง และมีอาการเจ็บ บวม แดงบริเวณที่ฉีดคงอยู่นาน 1-2 วัน[4] วัคซีนเชื้อตายประกอบด้วยเชื้อที่ตายและไม่สามารถเพิ่มจำนวนหรือแบ่งตัวได้ จึงไม่สามารถก่อโรคได้แม้ในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยแอนติเจนจากวัคซีนชนิดนี้จะไม่ได้รับผลกระทบจากแอนติบอดี้ที่มีอยู่ในเลือดมากเท่ากับแอนติเจนจากวัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ ดังนั้นจึงสามารถให้วัคซีนได้แม้ในช่วงที่ร่างกายมีแอนติบอดี้อยู่แล้ว เช่น ในทารก หรือหลังจากที่ได้รับเลือดที่มีแอนติบอดี้[6]

อย่างไรก็ตาม ภูมิคุ้มกันที่ได้จากวัคซีนเชื้อตายส่วนมากจะไม่ยาวนานเท่ากับวัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ จึงจำเป็นที่จะต้องได้รับวัคซีนหลายเข็มในระยะเวลาที่ห่างกันเพื่อให้มีภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง โดยทั่วไปเข็มแรกของวัคซีนยังไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันที่เพียงพอต่อการป้องกันโรคได้ แต่จะทำหน้าที่กระตุ้นหรือเตรียมความพร้อมให้กับระบบภูมิคุ้มกัน และภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันโรคได้จะเกิดขึ้นหลังจากเข็มที่ 2 หรือ 3 ต่าง

จากวัคซีนเชื้ออ่อนฤทธิ์ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันคล้ายกับการติดเชื้อตามธรรมชาติ ดังนั้นวัคซีนบางชนิดอาจต้องมีการฉีดกระตุ้นเป็นระยะ เพื่อเพิ่มระดับแอนติบอดี้ให้สูงพอที่จะป้องกันโรคได้[6]

วัคซีนชนิดเชื้อตายสามารถแบ่งออกได้เป็นหลายประเภท[6] ได้แก่

1. วัคซีนที่ทำจากแบคทีเรียหรือไวรัสทั้งตัวที่ทำให้ตายแล้ว (Whole cell vaccines) คือ วัคซีนที่ผลิตจากแบคทีเรียหรือไวรัสทั้งตัวที่ถูกทำให้ตายด้วยวิธีทางกายภาพหรือทางเคมี ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อทำลายสารพันธุกรรมที่อยู่ภายใน ซึ่งทำให้ไวรัสหรือแบคทีเรียไม่สามารถเพิ่มจำนวนหรือก่อโรคได้ แต่จะยังคงโปรตีนที่ภูมิคุ้มกันสามารถจดจำได้อยู่[7] ดังแสดงในรูปที่ 1 ตัวอย่างของวัคซีนชนิดนี้ เช่น วัคซีนป้องกันโรคโปลิโอ วัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบเอ วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า วัคซีนป้องกันโรคไข้สมองอักเสบเจอี และวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 บางชนิด ฯ[6]



รูปที่ 1 การทำให้ไวรัสหรือแบคทีเรียหมดฤทธิ์ด้วยวิธีทางกายภาพหรือทางเคมี[7]

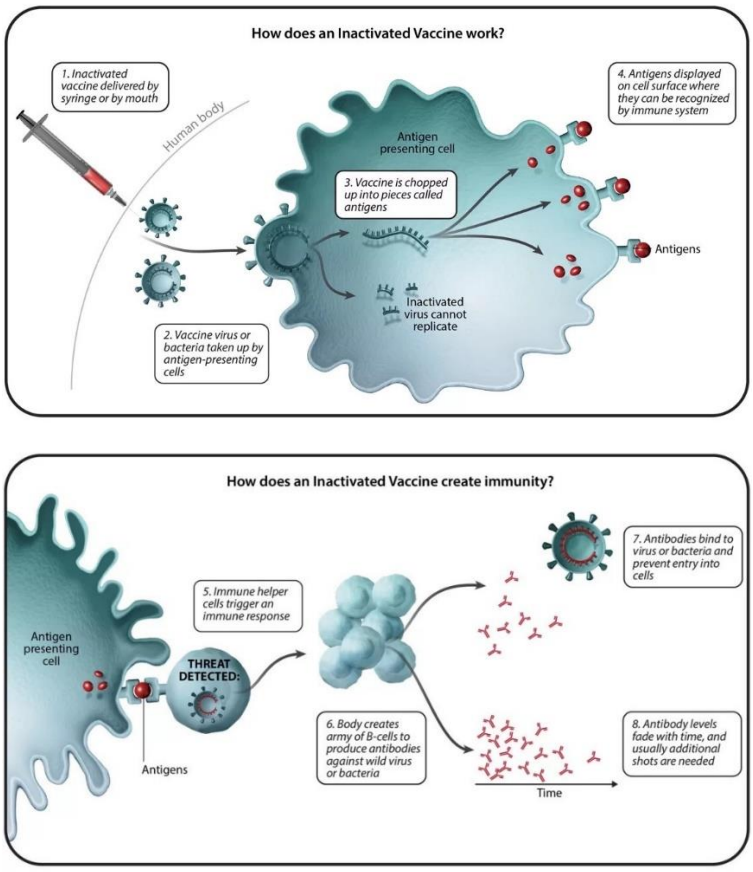
2. วัคซีนที่ทำจากบางส่วนของแบคทีเรียหรือไวรัส (Subunit Vaccines) คือ เป็นวัคซีนที่ประกอบด้วยบางส่วนของแบคทีเรียหรือไวรัสเท่านั้น ส่วนที่นำมาใช้คือส่วนที่จำเป็นต่อการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (แอนติเจน) ในวัคซีนชนิดนี้อาจเป็นโปรตีน พอลิแซ็กคาไรด์ หรือเป็นการรวมกันของพอลิแซ็กคาไรด์จากผิวของแบคทีเรียกับโปรตีน เรียกว่า วัคซีนคอนจูเกต (Conjugate vaccine) ตัวอย่างของวัคซีนชนิดนี้ เช่น วัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่ และวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อนิวโมคอคคัส ฯลฯ[6]

3. วัคซีนชนิดท็อกซอยด์ (Toxoids) คือ วัคซีนที่ผลิตจากสารพิษของแบคทีเรียที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์ แล้วสารพิษเหล่านี้เป็นโปรตีนที่ผ่านการทำลายฤทธิ์ด้วยความร้อน สารเคมี หรือวิธีอื่น ๆ แบคทีเรียบางชนิดก่อโรคโดยการสร้างสารพิษ เมื่อร่างกายสามารถจดจำและกำจัดสารพิษเหล่านี้ได้ ก็จะช่วยป้องกันไม่ให้เกิดโรคตามมา ตัวอย่างของวัคซีนชนิดนี้ ได้แก่ วัคซีนป้องกันโรคคอตีบและวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยัก[6]

4. วัคซีนชนิดพันธุวิศวกรรม (Recombinant Vaccines) คือ วัคซีนที่ผลิตขึ้นโดยใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอพันธุวิศวกรรม (Recombinant DNA technology) ซึ่งช่วยให้สามารถรวมดีเอ็นเอจากแหล่งต่าง ๆ ได้ การใช้เทคโนโลยีนี้จะมีการแทรกชิ้นส่วนของยีนจากไวรัสเข้าไปในยีนของเซลล์ยีสต์หรือไวรัสอื่น โดยเมื่อเซลล์ยีสต์หรือไวรัสที่ได้รับการดัดแปลงเติบโตขึ้น จะผลิตแอนติเจนที่จำเป็น เช่น แอนติเจนพื้นผิวของไวรัสตับอักเสบบี โปรตีนแคปซิดของไวรัสเอชพีวี หรือฮีแมกกลูตินินของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ตัวอย่างของวัคซีนที่ผลิตด้วยวิธีนี้ เช่น

วัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบบี วัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูก (HPV) วัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่บางชนิด (Recombinant flu vaccine) และวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 บางชนิด ฯ[6]

หลักการทำงานของวัคซีนเชื้อตายสามารถอธิบายได้จากรูปที่ 2 โดยหลังจากนำวัคซีนเชื้อตายเข้าสู่ร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการฉีดหรือการกิน เซลล์นำเสนอแอนติเจน (Antigen-presenting cell) ที่อยู่ภายในร่างกายจะกินไวรัสดังกล่าวเข้าไปแล้วย่อยให้กลายเป็นแอนติเจน แอนติเจนจะแสดงบนผิวเซลล์เพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถตรวจจับได้ เซลล์ทีเฮลเปอร์ (T-helper cells) จะเข้ามาจับกับแอนติเจนแล้วส่งสัญญาณกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงาน หลังจากนั้นร่างกายจะสร้างเซลล์ลิมโฟไซต์ B (B-cells) เพื่อที่จะผลิตแอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อไวรัสหรือแบคทีเรียนั้น แอนติบอดี้จะไปจับกับไวรัสหรือแบคทีเรียเพื่อป้องกันไม่ให้เข้าสู่เซลล์ของร่างกาย และเมื่อเวลาผ่านไปแอนติบอดี้จะลดลง จึงมักจำเป็นต้องมีการฉีดกระตุ้นเพิ่มเติมในอนาคต[7]



รูปที่ 2 หลักการทำงานของวัคซีนเชื้อตาย (Inactivated vaccine or Killed vaccine)[7]

วิธีการทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ (Inactivation methods)

เพื่อให้วัคซีนเชื้อตายปลอดภัยและยังคงความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จำเป็นต้องทำให้เชื้อไวรัสหมดฤทธิ์โดยไม่ทำลายโครงสร้างแอนติเจน กระบวนการนี้สามารถทำได้ทั้งด้วยสารเคมี เช่น ฟอร์มาลดีไฮด์ หรือ β-propiolactone และด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น ความร้อน หรือรังสี UV โดยแต่ละวิธีมีผลต่อความคงตัวของแอนติเจนและประสิทธิภาพของวัคซีนต่างกัน ซึ่งจะกล่าวถึงในลำดับถัดไป

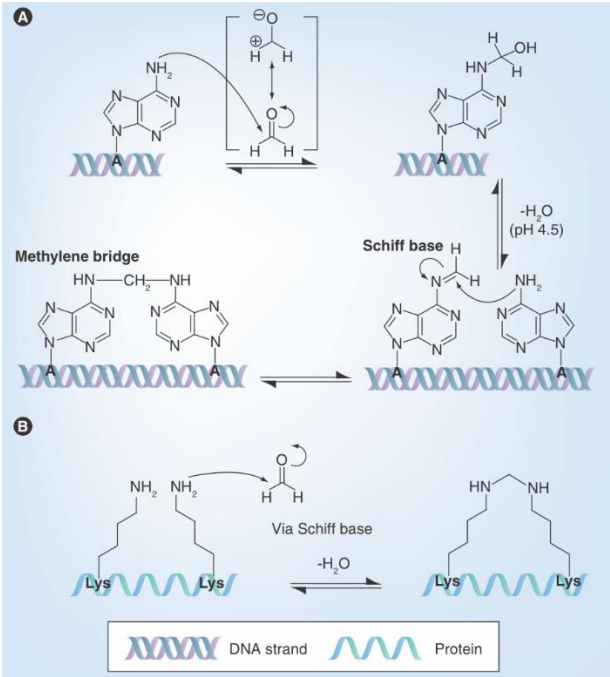
การทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ด้วยวิธีทางเคมี

1. ฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde)

เป็นสารกลุ่มอัลดีไฮด์ (aldehydes) มีสูตรเคมีคือ CH_2O เป็นสารเคมีที่มีความสำคัญและถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในกระบวนการทำให้เชื้อไวรัสและแบคทีเรียหมดฤทธิ์[8] เพื่อการผลิตวัคซีนชนิดเชื้อตาย กลไกการออกฤทธิ์ของฟอร์มาลดีไฮด์อาศัยกระบวนการ *cross-linking* ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกอย่างถาวรดังรูปที่ 3 โดยกลไกสำคัญได้แก่ การสร้างกลุ่ม methylol, การเกิด Schiff bases[10] และการเกิด Methylene bridges[9] ส่งผลให้โปรตีนของไวรัสสูญเสียสภาพจึงทำให้ไวรัสไม่สามารถก่อโรคได้

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของฟอร์มาลดีไฮด์ในการทำลายเชื้ออาจแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อในแต่ละรูปแบบของวัคซีน ในขั้นตอนการทำลายเชื้อในกระบวนการผลิตวัคซีนอาจมีการปรับความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ตั้งแต่ 0.009 ถึง 0.08 % w/v โดยมีระยะเวลาในการทำลายเชื้อที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบเอ (ชื่อการค้า Havrix) ใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 วัน ขณะที่วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบเอ (ชื่อการค้า Vaqta) ใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 วัน[9] การเพิ่มความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์หรือใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นสามารถเร่งกระบวนการทำลายเชื้อให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม ปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิของวัคซีน เนื่องจากอุณหภูมิสูงและฟอร์มาลดีไฮด์ในระดับสูงอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือทำลายโครงสร้างของเอพิโทป (epitopes) ที่จำเป็นต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้ประสิทธิภาพของวัคซีนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันลดลง[9]

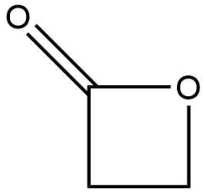
ฟอร์มาลดีไฮด์จัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง ดังนั้นในกระบวนการผลิตวัคซีน ฟอร์มาลดีไฮด์จะถูกเจือจาง ให้มีปริมาณตกค้างที่น้อยมากเมื่อเทียบกับที่ร่างกายสร้างขึ้นเองตามธรรมชาติ จึงไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพ วัคซีนที่มีการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ในการทำให้เชื้อหมดฤทธิ์จะต้องมีการตรวจหาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่หลงเหลือในผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นวิธีที่ระบุไว้ในตำรายา (pharmacopoeia) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานเชื่อมโยงการได้รับฟอร์มาลดีไฮด์ปริมาณน้อยจากการฉีดวัคซีนกับการเพิ่มความเสี่ยงของโรคมะเร็ง[8,11]



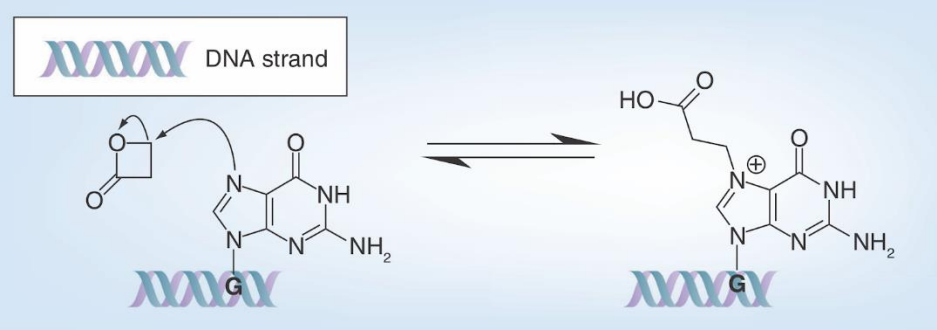
รูปที่ 3 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของฟอร์มาลดีไฮด์กับ DNA/RNA[10]

2. β-propiolactone

เป็นสารเคมีในกลุ่ม alkylating agents ซึ่งนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ เป็นของเหลวไม่มีสี มีกลิ่นหวานอ่อน ๆ[9] มีโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 4 มีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีสูง สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ได้ง่าย เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (-OH), อะมิโน (-NH_2), คาร์บอกซิล (-COOH), ซัลไฮดริล (-SH) และหมู่ฟีนอล กลไกหลักในการทำลายไวรัสของ β-propiolactone คือการเกิดปฏิกิริยา alkylation, acylation กับเบสนิวคลีโอไทด์ในสารพันธุกรรมของไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับอะตอมไนโตรเจนตำแหน่ง N7 ของ-Guanine แสดงดังรูปที่ 5 และตำแหน่ง N1 ของ Adenine ซึ่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ GC ⟶ AT และอาจทำให้การจำลองตัวของไวรัสล้มเหลว นอกจากนี้ β-propiolactone ยังสามารถทำให้เกิดการ cross-linking ของสาย DNA และโปรตีน ส่งผลให้สารพันธุกรรมของไวรัสเสื่อมสภาพและไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้อีก แม้ว่า β-propiolactone จะสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนได้ แต่โดยธรรมชาติมีความจำเพาะต่อกรดนิวคลีอิกมากกว่า จึงเชื่อว่าอิพิโทปที่จำเป็นต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันยังคงอยู่ในสภาพที่ดี[10] อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาพบว่า β-propiolactone อาจทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนบางชนิดได้ ซึ่งอาจส่งผลต่อโครงสร้างโปรตีนบางส่วนและอาจกระทบต่อคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนได้ในบางกรณี



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ β-propiolactone[12]



รูปที่ 5 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง β-propiolactone และ Guanine[10]

ในด้านประสิทธิภาพ β-propiolactone สามารถทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ได้ภายในระยะที่เวลาสั้นกว่าฟอร์มาลดีไฮด์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัสและสภาวะที่ใช้ เช่น ในการผลิตวัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่นิยมใช้ β-propiolactone ที่ความเข้มข้น 0.011–0.055 M ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 35–170 นาที หรือในวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าใช้ β-propiolactone โดยในอัตราส่วน 1:3,500 ถึง 1:5,000 (v/v) ที่อุณหภูมิ 2–8°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง[9] โดยสรุปแล้ว β-propiolactone เป็นสารทำลายไวรัสที่มีประสิทธิภาพสูง สลายตัวได้เองโดยไม่ทิ้งสารตกค้าง และมีผลกระทบต่อโครงสร้างโปรตีนน้อยกว่าฟอร์มาลดีไฮด์ จึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมในการผลิตวัคซีนที่ต้องการคงโครงสร้างแอนติเจนของไวรัสเพื่อประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มของวัคซีน

3. ฟีนอล (phenol)[13]

เป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลชีพโดยการทำให้โปรตีนเสียสภาพ (protein denaturation) และทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane disruption) ทำให้นำเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียสูญเสียความสามารถในการจำลองตัวเองของ แต่ยังคงเหลือโครงสร้างแอนติเจนบางส่วนไว้เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ การใช้ฟีนอลในการผลิตวัคซีนเชื้อตายมีบันทึกมาตั้งแต่ช่วงต้นคริสตวรรษที่ 20 ตัวอย่างเช่น กระบวนการผลิตวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจากเนื้อเยื่อสมองสัตว์ ซึ่งพัฒนาโดย Sir David Semple ในปี ค.ศ. 1911 มีการใช้ฟีนอลในการทำลายเชื้อไวรัสในสมองของแกะหรือแพะที่ติดเชื้อเพื่อทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ อย่างไรก็ตาม การใช้ฟีนอลในกระบวนการนี้อาจส่งผลต่อโครงสร้างของแอนติเจนที่สำคัญของไวรัส โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโปรตีนและลดคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีน

ในด้านความปลอดภัย มีรายงานเกี่ยวกับอาการไม่พึงประสงค์ที่รุนแรงจากวัคซีนที่มีการใช้ฟีนอลในการทำลายเชื้อจุลชีพ เช่น การเกิดกลุ่มอาการกิลแลง-บาร์เร (Guillain-Barré Syndrome) และสามารถทำให้เกิดโรคสมองอักเสบแบบติดต่อ (Transmissible Spongiform Encephalopathies; TSE) ส่งผลให้ในเวลาต่อมา องค์การอนามัยโลกได้ยุติการใช้วัคซีนชนิดนี้ในหลายประเทศ ปัจจุบันฟีนอลไม่ใช่สารเคมีที่แนะนำให้ใช้ในการทำลายเชื้อสำหรับผลิตวัคซีนอีกต่อไป เนื่องจากสามารถทำให้โครงสร้างของอิพิโทปเสียสภาพ ซึ่งอาจลดประสิทธิภาพของวัคซีนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ขณะที่ฟอร์มาลดีไฮด์ หรือ β-propiolactone ได้รับความนิยมมากกว่า เนื่องจากมีผลต่อโปรตีนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันน้อยกว่า

4. 1,5-Iodonaphtyl Azide (INA)[14]

เป็นสารในกลุ่มเอไซด์ (azides) ที่มีคุณสมบัติไวต่อแสง (photoactive) และมีความชอบไขมัน (hydrophobic) โดยเมื่อได้รับรังสี UV-A จะเปลี่ยนโครงสร้างเป็น nitrene radical ซึ่งมีความไวสูงต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีและสามารถสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับบริเวณที่ชอบไขมันของ envelope glycoproteins บนเยื่อหุ้มของไวรัสได้ การแทรกตัวของ INA เกิดขึ้นบริเวณชั้นลิพิดของเยื่อหุ้มไวรัส หลังจากได้รับรังสี UV จะทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์กับโดเมนของโปรตีนที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มไวรัส (transmembrane domains) โดยที่ ectodomains ที่ยื่นออกมานอกเยื่อหุ้มจะไม่ได้รับผลกระทบ จึงทำให้อิพิโทปของไวรัสยังคงอยู่ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาไวรัสวัคซีนชนิดเชื้อตาย นอกจากผลต่อโปรตีนแล้ว INA ยังส่งผลต่อสารพันธุกรรมของไวรัส ทำให้ไวรัสสูญเสียความสามารถในการก่อโรคอย่างถาวร และสูญเสียความสามารถในการจำลองตัวเอง ในการศึกษาหนึ่งพบว่า INA ที่ความเข้มข้น 100 μM ถูกนำไปใช้บ่มกับ Zaire Ebola virus ที่ความเข้มข้น 2.106 PFU/mL ใน PBS เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น นำตัวอย่างไปฉายรังสี UV ที่ความเข้ม 10 mW/cm² เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้แสง UV ความยาวคลื่น 310 nm ส่งผลให้ไวรัสหมดฤทธิ์โดยสมบูรณ์ ปัจจุบัน INA ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล (serology) และนำไปพัฒนาวัคซีน โดยเฉพาะการพัฒนาไวรัสวัคซีนแบบไม่ทำลายโครงสร้างผิวไวรัส ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. ซอราเลน (psoralens)[15]

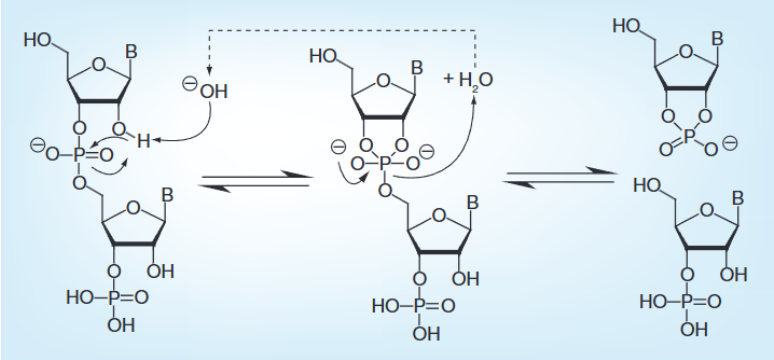
เป็นสารในกลุ่มฟูราโนคูมาริน (furanocoumarin) ที่มีคุณสมบัติไวต่อแสง โfpสามารถแทรกซึมผ่านชั้นฟอสโฟลิพิด (phospholipid bilayers) ได้อย่างอิสระ และแทรกตัวเข้าไปในสายกรดนิวคลีอิกของไวรัสทั้ง DNA และ RNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อได้รับรังสี UV-A (320-400 nm) psoralen จะเกิดสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับเบส pyrimidine โดยเฉพาะเบส thymine และเบส cytosine ซึ่งทำให้เกิดการ cross-linking ของสายพันธุกรรม ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการจำลองและการถอดรหัสของกรดนิวคลีอิกอย่างถาวร ทำให้ไวรัสสูญเสียความสามารถในการก่อโรค กระบวนการนี้มีความจำเพาะต่อกรดนิวคลีอิกและไม่ส่งผลกระทบต่ออิพิโทปของไวรัส จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกชนิดเชื้อตายชนิด (Purified psoralen-inactivated vaccine (PsIVs) และชนิด Formalin-inactivated vaccine (FIVs) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในหนูทดลองและไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ พบว่า PsIVs สามารถกระตุ้นการตอบสนองของ neutralizing antibodies ได้ดีกว่า FIVs อย่างมีนัยสำคัญ และยังคงสภาพของอิพิโทปไว้ได้[17] ซึ่งเป็นประโยชน์ในการพัฒนาไวรัสวัคซีนแบบไม่ทำลายโครงสร้างผิวไวรัส

การทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ด้วยวิธีทางกายภาพ

1. การทำลายไวรัสด้วยความร้อน (Heat/Pasteurization Inactivation)[16]

การใช้ความร้อนหรือนำไวรัสไปผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์สามารถทำให้ไวรัสสูญเสียความสามารถในการก่อโรคได้ โดยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนไวรัสทั้งโครงสร้างทุติยภูมิและ/หรือโครงสร้างตติยภูมิ ซึ่งมีผลต่อการจับกับเซลล์เจ้าบ้านและการจำลองตัวของไวรัส อีกหนึ่ง

กลไกคือ การทำลายสาย RNA โดยการแตกของพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester bond) ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญของสาย RNA ดังแสดงในรูปที่ 6 โดยทั่วไปเชื่อว่าการทำลายเชื้อไวรัสโดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 41°C ทำให้เกิดการสลายตัวของกรดนิวคลีอิก ในขณะที่การทำลายเชื้อไวรัสที่อุณหภูมิสูงจะสัมพันธ์กับการเสื่อมสภาพของโปรตีนของไวรัส (protein denaturation)



รูปที่ 6 การทำลายสาย RNA โดยการแตกของพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์[16]

อุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้ไวรัสสูญเสียความสามารถในการก่อโรคขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัส มีการศึกษาพบว่า การให้ความร้อนที่ 56°C และ 65°C เป็นเวลา 60 นาที สามารถทำลายไวรัส SARS-CoV ได้ในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ยังมีการตรวจพบว่าเชื้อไวรัสบางส่วนยังคงมีความสามารถในการก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ในระดับใกล้เคียงกับขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ แต่ไวรัสจะถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 75°C หลังการให้ความร้อนเป็นเวลา 45 นาที อุณหภูมิที่สูงอาจส่งผลกระทบต่อโปรตีนของไวรัส ในขณะที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 41°C ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อระดับโปรตีน ตัวอย่างเช่น ไวรัส Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) หลังจากได้รับความร้อนที่ 37°C ไวรัสจะไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้อีก แต่โดเมนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเข้าสู่เซลล์ยังคงสภาพได้ หรือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ถูกทำลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 55°C จะสูญเสียการทำงานของ Hemagglutinin และ Neuraminidase activity

โดยสรุป จากการศึกษาพบว่าแม้อุณหภูมิสามารถทำลายไวรัสได้ แต่ไวรัสบางส่วนอาจทนความร้อนได้และยังคงหลงเหลืออยู่ วัคซีนที่ได้จากไวรัสที่ถูกทำลายด้วยความร้อนบางชนิดสามารถกระตุ้นแอนติบอดีได้ แต่บางชนิดไม่สามารถป้องกันโรคได้ อาจเกิดจากการที่โปรตีนของไวรัสถูกเปลี่ยนแปลงมากเกินไปจากอุณหภูมิสูง

2. การฉายรังสี (Irradiation)

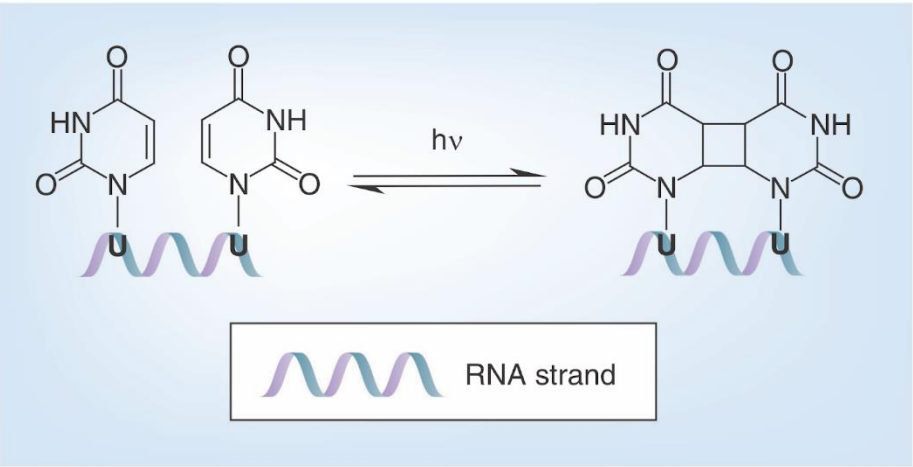
การใช้รังสีเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความสนใจในการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ โดยมีเป้าหมายหลักคือการทำลายสารพันธุกรรมหรือโปรตีนที่จำเป็นของไวรัส เพื่อป้องกันไม่ให้ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนหรือก่อโรคได้ โดยรังสีที่นิยมใช้ ได้แก่

2.1. รังสียูวี (Ultraviolet Light)[16]

รังสียูวีแบ่งออกเป็น 3 ประเภทตามความยาวคลื่น ได้แก่ UVA (320–400 nm) UVB (280–320 nm) และ UVC (200–280 nm) ซึ่งรังสี UVC มีพลังงานมากที่สุดและสามารถถูกดูดซับโดย DNA และ RNA ทำให้เกิดการจับคู่ (dimer) ของเบส Pyrimidines เช่น Uracil และ Thymine ที่อยู่ติดกัน ซึ่งจะรบกวนโครงสร้างของสายพันธุกรรม UVB ก็สามารถทำให้เกิดการจับคู่ได้เช่นกัน แต่ประสิทธิภาพต่ำกว่า UVC ประมาณ 20–100 เท่า และ UVA มีพลังงานน้อยที่สุด จึงไม่ส่งผลต่อ RNA และ DNA ผลกระทบของรังสียูวีต่อไวรัส คือการทำให้เกิดการจับคู่ของเบส Pyrimidines ซึ่งเปลี่ยนโครงสร้างของสาย RNA/DNA และอาจทำให้เกิดการขาดสายหรือใช้งานไม่ได้ในการจำลองพันธุกรรมอีกต่อไป

โดยทั่วไปแล้ว รังสียูวีจะกระตุ้นให้เกิดการจับคู่ระหว่างเบส Pyrimidines สองตัวที่อยู่ติดกันหรืออยู่ตรงข้ามกัน โดย Pyrimidines ทั้งสองจะเกิดปฏิกิริยาแบบ Pericyclic 2π–2π cycloaddition ส่งผลให้เกิดวงแหวน Cyclobutane ขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 7 การจับคู่เหล่านี้ก่อให้เกิดความเครียดในโครงสร้างน้ำตาลของสายพันธุกรรม ซึ่งอาจนำไปสู่การแตกหักของจีโนมได้ นอกจากนี้ การจับคู่ของ Uracil ที่เกิดจากการฉายรังสียูวียังทำให้โมเลกุล RNA สูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการถอดรหัสอีกด้วย

มีรายงานการศึกษาว่า วัคซีนเชื้อตายที่ใช้กระบวนการทำลายไวรัสด้วยรังสียูวีหลายชนิดเช่น วัคซีนป้องกัน Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) วัคซีนป้องกัน murine leukemia virus และวัคซีนป้องกัน Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ทำให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันและสามารถป้องกันโรคได้จริง รวมถึงสามารถลดการจำลองตัวของไวรัสในสัตว์ทดลองได้ อย่างไรก็ตาม วัคซีนเชื้อตายบางชนิดที่ผลิตจากไวรัสซึ่งถูกทำลายด้วยรังสียูวีไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสได้ เช่น Mengovirus ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่รังสียูวีก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเปลือกโปรตีนของไวรัส ส่งผลให้เกิดสารประกอบจากแสง (photoproducts) ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันลดลง



รูปที่ 7 การจับคู่ของเบส Pyrimidines จากการใช้รังสียูวี[16]

2.2. รังสีแกมมา (Gamma Irradiation)

การฉายรังสีแกมมาเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ โดยมี 2 กลไกหลักคือ กลไกทางตรง โดยรังสีแกมมาทำให้พลังงานเข้าสู่เป้าหมายโดยตรง ส่งผลให้เกิดการสลายพันธะโควาเลนต์และการหลุดของอิเล็กตรอน ซึ่งนำไปสู่การทำลายสารพันธุกรรมของไวรัสโดยตรง และกลไกทางอ้อม ซึ่งเกิดจากการที่รังสีทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) หลังจากเกิดการสลายพันธะโควาเลนต์ ซึ่งอนุมูลอิสระจะไปทำลายโครงสร้างภายในไวรัสต่อไป[16]

เมื่ออิเล็กตรอนพลังงานสูงจากเครื่องเร่งอนุภาคหรือโฟตอนแกมมาที่ปล่อยออกมาจากไอโซโทปรังสีเข้าไปทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบภายในเซลล์ จะทำให้เกิดการไอออไนซ์ของโมเลกุลโดยมีการขับอิเล็กตรอนออกจากวาเลนซ์ชั้นนอกสุด อิเล็กตรอนที่ถูกขับออกนี้จะก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการไอออไนซ์กับอะตอมที่อยู่รอบข้าง จนกระทั่งพลังงานทั้งหมดถูกปลดปล่อยออกมา โดยในจุลินทรีย์ DNA ถือเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ที่สุด จึงกลายเป็นเป้าหมายหลักของการเกิดการไอออไนซ์โดยตรง การไอออไนซ์ของ DNA ทำให้เกิดการแตกของพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ตามแนวโครงสร้างหลัก (backbone) ของสาย DNA แม้ว่าการขาดของสายเดี่ยว (single-stranded break) อาจสามารถซ่อมแซมได้ แต่การขาดของสายคู่ (double-stranded break) ที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง เป็นเรื่องยากที่จุลินทรีย์จะสามารถซ่อมแซมและฟื้นฟูได้อย่างสมบูรณ์ส่งผลให้จุลินทรีย์หมดสภาพการทำงาน และไม่สามารถอยู่รอดได้[17]

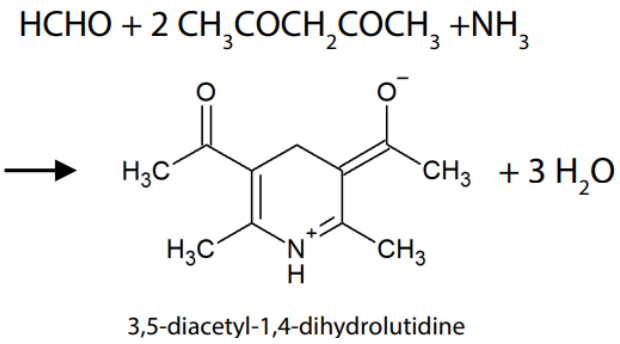
โดยสรุป การฉายรังสีแกมมาสามารถทำลายความสามารถในการติดเชื้อของไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ วัคซีนเชื้อตายบางชนิดที่พัฒนาจากไวรัสซึ่งถูกทำลายด้วยรังสีแกมมาสามารถป้องกันโรคได้หลังจากได้รับเชื้อไวรัส เช่น วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย (PfSPZ vaccine)[18] วัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 บางชนิด[19] ฯ อย่างไรก็ตาม วัคซีนบางชนิดไม่สามารถป้องกันการการมีไวรัสในเลือด (Viremia) และการเกิดโรคได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างการฉายรังสีไปทำลายโครงสร้างโปรตีนสำคัญของไวรัส[16]

การกำจัดและตรวจสารตกค้างที่ใช้ในการ inactivation

ภายหลังการใช้สารเคมีเพื่อทำลายความสามารถในการก่อโรคของไวรัสและแบคทีเรีย การกำจัดสารตกค้างที่หลงเหลืออยู่ในวัคซีนจากขั้นตอนดังกล่าวเป็นขั้นตอนสำคัญ เพื่อป้องกันความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นจากสารเคมีนั้น และคงไว้ซึ่งความเสถียรของแอนติเจน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวต้องอาศัยเทคนิคเฉพาะที่เหมาะสมกับคุณสมบัติของสารแต่ละชนิด เช่น ฟอร์มาลดีไฮด์สามารถทำให้หมดฤทธิ์ได้โดยการเติมโซเดียมไบซัลไฟต์ (sodium bisulfite) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากันได้เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำ นอกจากนี้ยังมีข้อกำหนดในการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่ตกค้างตามข้อกำหนดของ British Pharmacopoeia ในหัวข้อ Appendix XV D. Free formaldehyde

การทดสอบหัวข้อ free formaldehyde เป็นหัวข้อทดสอบในวัคซีนทุกชนิดที่ใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ โดยมีเกณฑ์การยอมรับระบุว่าปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ตกค้างในวัคซีนต้องไม่เกิน 0.02% หรือเทียบเท่า 0.1 มิลลิกรัมต่อปริมาณวัคซีน 0.5 มิลลิลิตร[20,23] การทดสอบโดยทั่วไปจะใช้ Method A เว้นแต่จะมีการระบุให้ใช้ Method B เช่น ในกรณีที่มีการใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์เพื่อลดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์

ส่วนเกิน[21] การทดสอบอาศัยหลักการของปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์กับอะซีทิลอะซีโตน (acetylacetone) ภายใต้สภาวะที่มีความร้อนและมีแอมโมเนียมอะซิเตต (ammonium acetate) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ก่อให้เกิดสารประกอบ heterocyclic สีเหลืองที่เรียกว่า 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine (DDL) แสดงดังรูปที่ 8 โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบความเข้มสีด้วยสายตาระหว่างสีของสารละลายตัวอย่างกับสีของสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์มาตรฐานที่ความเข้มข้นที่กำหนด



รูปที่ 8 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์กับอะเซทิลอะซีโตนโดยมีแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดสาร 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine (DDL)[22]

สำหรับ β-propiolactone โดยทั่วไปสามารถสลายตัวเองได้ที่อุณหภูมิ 37°C แต่ในบางกรณีสามารถเติมไทโอซัลเฟต (thiosulfate) เพื่อเร่งการทำให้หมดฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การใช้ไทโอซัลเฟต ยังช่วยหลีกเลี่ยงความเสี่ยงจากการใช้ความร้อนสูงซึ่งอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้างของอนุภาคไวรัส[9] 1,5-iodonaphthylazide (INA) สามารถทำให้หมดฤทธิ์ได้โดยการเติมกลูตาไธโอน (glutathione) ที่ความเข้มข้น 20 mM[16] ซึ่งการเลือกใช้วิธีการกำจัดสารตกค้างอย่างเหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยเสริมประสิทธิภาพของวัคซีน ลดอาการไม่พึงประสงค์ และรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์วัคซีนให้อยู่ในมาตรฐานที่ปลอดภัยและมีประสิทธิผลสูงสุด

การทดสอบประสิทธิภาพหลังการทำให้หมดฤทธิ์ (Inactivation test)

เพื่อยืนยันและรับรองความปลอดภัยว่าไวรัสหรือแบคทีเรียที่นำมาใช้ทำให้หมดฤทธิ์ในการผลิตวัคซีนชนิดเชื้อตายนั้น ไม่มีเชื้อที่ยังมีชีวิตหรือสามารถก่อโรคได้หลงเหลืออยู่ จึงต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการ (Procedure Validation) ในการทำลายหรือกำจัดเชื้อให้หมดฤทธิ์ โดยสามารถดำเนินการได้ผ่านการทดสอบ 3 ประเภท คือ การทดสอบความมีชีวิต (viability testing), ความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity testing) หรือความเป็นพิษ (toxicity testing)[24]

1. Viability Testing of Inactivation or Removal Procedures

การทดสอบความมีชีวิต (viability testing) ขึ้นอยู่กับประเภทของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ โดยส่วนมากเชื้อที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์แล้ว อาจจะใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือใน

สัตว์ทดลอง โดยบทความนี้จะยกตัวอย่างการเพาะเลี้ยงไวรัส (Virus Cultivation) เพื่อพิสูจน์ความสมบูรณ์ของกระบวนการทำให้เชื้อตาย (Inactivation) ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้หลายวิธี[25]

1.1 การฉีดเชื้อเข้าในสัตว์ทดลอง (Animal Inoculation)

นิยมใช้หนูถีบจักร (mouse) โดยเฉพาะหนูแรกเกิดหรือหนูที่ยังไม่หย่านม เนื่องจากมีความไวต่อไวรัสสูง ไวรัสที่ใช้วิธีนี้ ได้แก่ Coxsackie virus และ Rabies virus นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มจำนวนไวรัสในสัตว์ทดลองได้อีกหลายชนิด เช่น กระต่าย, หนูแฮมสเตอร์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ หลังจากให้สัตว์ทดลองได้รับเชื้อจะต้องเฝ้าสังเกตอาการของโรคหรือการตาย หากสัตว์ทดลองมีสุขภาพดีจนครบกำหนดเวลาทดสอบ แสดงว่าไม่มีเชื้อที่สามารถก่อโรคหลงเหลืออยู่

1.2 การเพาะเลี้ยงในไข่ฟัก (Embryonated Eggs)

นิยมไข่ไก่ที่ฟักแล้วอายุ 8–11 วัน โดยไวรัสสามารถฉีดเข้าได้ในหลายส่วนของไข่ ได้แก่ ถุงไข่แดง, ช่องน้ำคร่ำ, ช่อง allantoic และเยื่อ chorion-allantoic ซึ่งแต่ละส่วนจะมีความเหมาะกับไวรัสที่แตกต่างกันเช่น ถุงไข่แดงใช้เพาะ Japanese encephalitis, Saint Louis encephalitis และ West Nile virus หรือ ช่องน้ำคร่ำใช้เพาะ influenza virus

1.3 การเพาะเลี้ยงในเนื้อเยื่อ (Tissue Culture)

เป็นวิธีที่ใช้กันแพร่หลาย และเป็นที่นิยมในปัจจุบัน โดยการตรวจการเจริญของไวรัสในเซลล์สามารถทำได้หลายวิธี ไม่ว่าจะเป็น การสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากการติดเชื้อไวรัส (Viral induced cytopathic effect; CPE) การใช้แอนติบอดีเรืองแสงในการตรวจไวรัสในเซลล์ หรือการตรวจดูไวรัสโดยตรงในเซลล์ที่ติดเชื้อด้วยกล้องอิเล็กตรอน เป็นต้น

2. Infectivity Testing of Inactivation Procedures

การทดสอบความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity testing) ใช้สำหรับตรวจสอบว่าสารพันธุกรรม เช่น positive-strand RNA ไม่มีความสามารถในการสร้างไวรัสที่ติดเชื้อได้อีกต่อไป โดยวิธีที่ใช้คือการนำ RNA เข้าสู่เซลล์ที่รองรับไวรัสได้ เช่นผ่านการ transfection หรือ electroporation แล้วตรวจสอบว่ามีการสร้างไวรัสหรือไม่ ต้องเลือกเซลล์ที่เหมาะกับไวรัสแต่ละชนิด และใช้ตัวอย่างควบคุมที่เหมาะสมในการยืนยันผล

3. Toxicity Testing of Inactivation Procedures

การทดสอบความเป็นพิษ (toxicity testing) ใช้ตรวจสอบว่าสารพิษจากสิ่งมีชีวิต เช่น neurotoxin ถูกทำให้หมดฤทธิ์แล้วจริง ตัวอย่างของวิธีที่ใช้ ได้แก่ การทดสอบหน้าที่ของสาร เช่น การย่อย SNAP-25 สำหรับ Botulinum neurotoxin หรือการทดลองในสัตว์ทดลอง โดยต้องมีการใช้ตัวอย่างควบคุมที่เหมาะสม

สรุป

วัคซีนชนิดเชื้อตาย (Inactivated vaccine) เป็นวัคซีนที่ผลิตจากไวรัสหรือแบคทีเรียที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์ ไม่สามารถเพิ่มจำนวนหรือก่อโรคได้ แต่ยังสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้อย่างปลอดภัย การทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ (inactivation) มีทั้งวิธีทางเคมี เช่น การใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ β-propiolactone หรือ INA ฯ ซึ่งทำลายกรดนิวคลีอิกหรือโปรตีนโดยยังคงโครงสร้างแอนติเจนไว้ และวิธีทางกายภาพ เช่น การให้ความร้อน รังสี UV หรือรังสีแกมมา ฯ ซึ่งมุ่งเน้นการทำลายสารพันธุกรรมหรือโครงสร้างของไวรัสเพื่อป้องกันการเพิ่มจำนวน การใช้วิธีทางเคมีจะต้องมีวิธีในการกำจัดสารตกค้างที่เหมาะสม และหลังการทำลายเชื้อ และจำเป็นต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของกระบวนการ (inactivation test) เพื่อยืนยันว่าไม่มีเชื้อที่ยังมีชีวิตหรือสารพิษหลงเหลือ โดยวิธีการตรวจสอบ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเชื้อในสัตว์ ไข่ฟัก หรือเซลล์เพาะเลี้ยง (viability testing) การตรวจสอบว่าพันธุกรรมของไวรัสยังสามารถสร้างไวรัสใหม่ได้หรือไม่ (infectivity testing) และการทดสอบความเป็นพิษของสารพิษที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์ (toxicity testing) ทั้งนี้เพื่อให้มั่นใจว่าวัคซีนปลอดภัยและมีประสิทธิภาพก่อนนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. กระทรวงสาธารณสุข. พระราชบัญญัติความมั่นคงด้านวัคซีนแห่งชาติ พ.ศ. 2561 [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: ราชกิจจานุเบกษา; 2561 [เข้าถึงเมื่อ 15 พ.ค. 2568]. เข้าถึงได้จาก: https://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2561/A/097/T_0050.PDF
2. British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2024: volume V.London: TSO; 2024. Vaccines; p. IV-718
3. อุษา ทิสยากร. ประวัติความเป็นมาของวัคซีนโดยสังเขป. ใน: โอฬาร พรหมาลิขิต, อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์, บรรณาธิการ. วัคซีน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สมาคมโรคติดเชื้อในเด็กแห่งประเทศไทย; 2558. หน้า 8.
4. Guru Vaccine. ประเภทวัคซีนตามการผลิต [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: Guru Vaccine; [เข้าถึงเมื่อ 10 พ.ค. 2568]. เข้าถึงได้จาก: http://guruvaccine.com/ประเภทวัคซีนตามการผลิต/
5. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ประเภทของวัคซีน [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2560 [เข้าถึงเมื่อ 10 พ.ค. 2568]. เข้าถึงได้จาก: https://biology.dmsc.moph.go.th/post-view/81
6. Wodi AP, Morelli V. Chapter 1: Principles of vaccination [Internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2024 [cited 2025 May 10]. Available from: https://www.cdc.gov/pinkbook/hcp/table-of-contents/chapter-1-principles-of-vaccination.html
7. Pfizer Inc. Understanding six types of vaccine technologies [Internet]. New York: Pfizer Inc.; [cited 2025 May 10]. Available from: https://www.pfizer.com/news/articles/understanding_six_types_of_vaccine_technologies
8. Clausi A, Chouvenc P. Formulation approach for the development of a stable, lyophilized formaldehyde-containing vaccine. Eur J Pharm Biopharm. 2013;85(2):272–8. doi:10.1016/j.ejpb.2013.04.016.
9. Sanders B, Koldijk M, Schuitemaker H. Inactivated Viral Vaccines. Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control. 2014 Nov 28:45–80. doi: 10.1007/978-3-662-45024-6_2. PMCID: PMC7189890.
10. Delrue I, Verzele D, Madder A, Nauwynck HJ. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. Expert Rev Vaccines. 2012;11(6):695–719. doi:10.1586/erv.12.38.
11. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Common ingredients in U.S. licensed vaccines [Internet]. Silver Spring (MD): FDA; [updated 2024 Jan 25; cited 2025 Jun 1]. Available from: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/common-ingredients-fda-approved-vaccines

12. Study.com. What is the structure of the polymer produced by the treatment of beta-propiolactone with a small amount of hydroxide ion? [Internet]. [cited 2025 Jun 1]. Available from: https://homework.study.com/explanation/what-is-the-structure-of-the-polymer-produced-by-the-treatment-of-beta-propiolactone-with-a-small-amount-of-hydroxide-ion.html
13. Natesan K, Isloor S, Vinayagamurthy B, Ramakrishnaiah S, Doddamane R, Fooks AR. Developments in Rabies Vaccines: The Path Traversed from Pasteur to the Modern Era of Immunization. Vaccines (Basel). 2023 Mar 29;11(4):756. doi: 10.3390/vaccines11040756. PMID: 37112668; PMCID: PMC10147034.
14. Elveborg S, Monteil VM, Mirazimi A. Methods of Inactivation of Highly Pathogenic Viruses for Molecular, Serology or Vaccine Development Purposes. Pathogens. 2022 Feb 19;11(2):271. doi: 10.3390/pathogens11020271. PMID: 35215213; PMCID: PMC8879476.
15. Sundaram AK, Ewing D, Blevins M, Liang Z, Sink S, Lassan J, Raviprakash K, Defang G, Williams M, Porter KR, Sanders JW. Comparison of purified psoralen-inactivated and formalin-inactivated dengue vaccines in mice and nonhuman primates. Vaccine. 2020 Apr 9;38(17):3313-3320. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.03.008. Epub 2020 Mar 14. PMID: 32184032.
16. Delrue I, Verzele D, Madder A, Nauwynck HJ. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. Expert Review of Vaccines. 2012 Jun;11(6):695–719.
17. Bhatia SS, Pillai SD. Ionizing Radiation Technologies for Vaccine Development - A Mini Review. Frontiers in Immunology. 2022 Feb 11;13.
18. James ER, Matheny S, Overby J, Lee K, Eappen AG, Li T, et al. A First for Human Vaccinology: GMP Compliant Radiation Attenuation of Plasmodium falciparum Sporozoites for Production of a Vaccine Against Malaria. Frontiers in Immunology. 2022 Feb 15;13.
19. Turan RD, Cihan Tastan, Derya Dilek Kancagi, Bulut Yurtsever, Gozde Sir Karakus, Ozer S, et al. Gamma-irradiated SARS-CoV-2 vaccine candidate, OZG-38.61.3, confers protection from SARS-CoV-2 challenge in human ACEII-transgenic mice. Scientific Reports. 2021 Aug 4;11(1).
20. United States Pharmacopeial Convention. <1235> Vaccines for human use—general considerations. In: United States Pharmacopeia 2024. Rockville (MD): USP; 2024.
21. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). 2.4.19. Alkaline impurities in fatty oils [Internet]. In: European Pharmacopoeia 6.0. Strasbourg:

EDQM; [cited 2025 Jun 1]. Available from: http://www.uspbpep.com/ep60/2.4.19.%20alkaline%20impurities%20in%20fatty%20oils%2020419e.pdf

22. LCMS.cz. JPL220027 [Internet]. [cited 2025 Jun 1]. Available from: https://lcms.cz/labrulez-bucket-strapi-h3hsga3/jpl220027_a792808f66/jpl220027.pdf
23. British Pharmacopoeia Commission. Appendix XV D: Free formaldehyde (Ph. Eur. method 2.4.18). In: British Pharmacopoeia 2025. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA); 2025. Effective from 2025 Jul 1.
24. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance on the Inactivation or Removal of Select Agents and Toxins for Future Use [Internet]. 2021 [cited 2025 May 30]. Available from: https://www.selectagents.gov/compliance/guidance/inactivation/index.htm
25. Sagar Aryal. Virus Cultivation-Purposes and Methods [Internet]. 2022 [cited 2025 May 30]. Available from: https://microbenotes.com/virus-cultivation-purposes-and-methods/#cell-culture