การทำแห้งและกำหนดค่าความแรงวัคซีนไอกรนไร้เซลล์เพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ

วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม1[1] อภิชัย ศุภสารสาทร1 อัศจรรย์ อาเมน[1] ดวงพร อังศุประเวศ[2]

พรรณิภา เอกไทยเจริญ[2] และ สุภาพร ภูมิอมร[1]

บทคัดย่อ

วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเป็นสารสำคัญในการทดสอบความแรงของวัคซีน ซึ่งต้องใช้ตรวจวิเคราะห์ไปพร้อมกับตัวอย่าง ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสำหรับใช้กับวัคซีนไอกรนไร้เซลล์ (aP) ที่ผลิตในประเทศ ห้องปฏิบัติการภาครัฐและผู้ผลิตจึงร่วมมือกันที่จะจัดเตรียมวัคซีน aP มาตรฐานอ้างอิงของประเทศ วัตถุประสงค์การศึกษานี้คือการทำแห้งวัคซีน aP ที่มีส่วนประกอบของ Pertussis toxin (PT) และ Filamentous Hemagglutinin (FHA) และกำหนดค่าความแรงเพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ ขั้นตอนประกอบด้วยการเตรียมสูตรผสมวัคซีนเหลว aP การทำแห้งวัคซีนแบบเยือกแข็ง การประเมินประสิทธิภาพการทำแห้งโดยตรวจสอบคุณภาพวัคซีนเบื้องต้น และการกำหนดค่าความแรง aP ผลการศึกษาได้วัคซีน aP ผงแห้งบรรจุในขวดแก้วปิดผนึกที่มีคุณภาพผ่านการทดสอบเบื้องต้นของลักษณะกายภาพ ความแรง ปริมาณแอนติเจน ระดับการดูดซับของแอนติเจน ความชื้น การละลาย กรด-ด่าง ปริมาณเอ็นโดทอกซิน และความปราศจากเชื้อ ผลการสอบเทียบค่าความแรงด้วยวิธี mouse immunogenicity โดยห้องปฏิบัติการภาครัฐและผู้ผลิตแห่งละ 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 ขณะที่มีช่วงค่าความแรงสัมพัทธ์ระดับภูมิคุ้มกันต่อ 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

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

Wereyarmarst Jaroenkunathum[1], Apichai Supasarnsathon[1], Assajun Amen[1], Duangporn Ungsupravate[2], Pannipa Ekthaicharern[2] and Supaporn Phumiamorn[1]

[1]Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences,

[2]Bionet-Asia Co., Ltd.,

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

บทนำ

วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเป็นสารสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ความแรงของวัคซีนซึ่งต้องใช้ทดสอบควบคู่ไปกับวัคซีนตัวอย่างทุกครั้ง เป็นตัวบ่งบอกถึงความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ และเนื่องจากการกำหนดค่าความแรงของวัคซีนบางชนิดไม่สามารถกำหนดเป็นค่าที่แน่นอนได้สาเหตุจากองค์ประกอบของวัคซีนผลิตจากสิ่งมีชีวิต การทดสอบความแรงต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตเช่นกัน ทำให้ผลการทดสอบมีความแปรปรวนสูง จึงต้องกำหนดค่าความแรงเป็นค่าความแรงสัมพัทธ์ที่สามารถสอบกลับไปยังวัคซีนมาตรฐานที่ใช้ทดสอบในมนุษย์แล้วให้ผลในการป้องกันโรคได้ดี สำหรับวัคซีนไอกรนใช้ป้องกันโรคไอกรนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Bordetella pertussis* ปัจจุบันมีวัคซีนไอกรนอยู่สองชนิด ได้แก่ วัคซีนไอกรนที่ผลิตโดยใช้เชื้อทั้งตัว (whole cell pertussis (wP) vaccine) และวัคซีนที่ผลิตโดยใช้ส่วนสกัดของตัวเชื้อที่เรียกว่าวัคซีนไอกรนไร้เซลล์ (acellular pertussis (aP) vaccine) โดยส่วนสกัดของเชื้อที่นำมาผลิตวัคซีน aP ปัจจุบันประกอบด้วยส่วนหนึ่งหรือหลายส่วนของ pertussis toxin (PT) ที่ทำให้หมดความเป็นพิษ 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 ทำให้ผู้ผลิตต้องจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานขึ้นใช้เอง เนื่องจากไม่มีวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่จะนำมาใช้ควบคุมคุมคุณภาพความแรงที่เป็นมาตรฐานสากลสำหรับวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ ดังนั้นความแรงของวัคซีนในแต่ละผู้ผลิตจึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ การตรวจวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีน aP อาจใช้วิธีตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง เช่น mouse immunogenicity test (MIT), modified intracerebral challenge assay (MICA) หรือวิธีวิเคราะห์อื่นที่ได้รับการอนุมัติจากหน่วยงานควบคุมกำกับของประเทศ[3] ซึ่งมีความต่างจากวัคซีนไอกรนชนิดทั้งตัวที่มีวิธีการตรวจวิเคราะห์ และวัคซีนมาตรฐานสากลสามารถกำหนดเกณฑ์มาตรฐานสำหรับการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนไอกรนได้เหมือนกันทุกบริษัทตามที่องค์การอนามัยโลกกำหนดค่าความแรงไว้ให้ไม่น้อยกว่า 4 หน่วยสากลต่อโด๊ส[4] การตรวจสอบความแรง

วัคซีนโดยห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพภาครัฐกรณีที่ไม่มีวัคซีนมาตรฐานสากลต้องใช้วัคซีนอ้างอิงของผู้ผลิตนั้นๆ และใช้วิธีตรวจวิเคราะห์เดียวกันในการตัดสินผล ดังนั้นการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานร่วมกับผู้ผลิตจะช่วยลดความขัดแย้งของผลการทดสอบที่แตกต่างกันได้ และหากสามารถจัดเตรียมให้อยู่ในรูปวัคซีนผงแห้งได้จะทำให้วัคซีนมีความคงสภาพสูงเนื่องจากความชื้นต่ำ เก็บไว้ใช้ได้นาน มีความสะดวกในการขนส่งเก็บรักษา ทั้งนี้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานต้องมีค่าความแรงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แต่เนื่องจากแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบในวัคซีนเป็นสารจำพวกโปรตีนมีความเสื่อมสลายได้ง่าย การพัฒนาสูตรตำรับและกระบวนการทำแห้งจึงมีความสำคัญ การทำแห้งที่นิยมใช้สำหรับวัคซีนหรือยาชีววัตถุวิธีหนึ่งคือการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying)[5,6] ซึ่งสูตรตำรับและรูปแบบสภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมนั้นต้องทำการศึกษาเฉพาะของแต่ละรายเพื่อให้ได้วัคซีนมาตรฐานตรงตามคุณสมบัติข้างต้น

สำหรับวัคซีน aP ที่ผลิตในประเทศไทยเป็นวัคซีนที่ผลิตโดยใช้เทคนิคการตัดต่อยีนของเชื้อ *B. pertussis* ให้สามารถผลิต recombinant PT ที่ไม่เป็นพิษ และสามารถผลิต FHA โดยมีส่วนประกอบ PT และ FHA ชนิดละ 5 ไมโครกรัมต่อโด๊ส ดูดซับบน aluminium hydroxide ที่เป็นสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) ใช้สำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 11 ขึ้นไป[7] การตรวจวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนใช้วิธี MIT ซึ่งต้องใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบค่าระดับภูมิคุ้มกันของวัคซีนรุ่นที่ตรวจ โดยแสดงค่าเป็นความแรงสัมพัทธ์ (relative potency) ของระดับภูมิคุ้มกันต่อ PT และ FHA ในสัตว์ทดลอง เนื่องจากยังไม่มีวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศที่จะนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ค่าความแรงของวัคซีนจึงได้มีความร่วมมือกันระหว่างผู้ผลิตและสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพวัคซีนภาครัฐของประเทศ ที่จะจัดเตรียมวัคซีน aP อ้างอิงมาตรฐานของประเทศ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หลักคือ การทำแห้งวัคซีน aP ที่มีส่วนประกอบของ Pertussis toxin (PT) และ Filamentous Hemagglutinin (FHA) และกำหนดค่าความแรงเพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศในการควบคุมคุณภาพวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ที่ผลิตในประเทศต่อไป โดยมีขั้นตอนการศึกษาประกอบด้วยการเตรียมสูตรผสมวัคซีนเหลว aP การทำแห้งวัคซีนแบบเยือกแข็ง การประเมินประสิทธิภาพการทำแห้งโดยตรวจสอบคุณภาพวัคซีนเบื้องต้น และการกำหนดค่าความแรงโดยวิธี MIT

ระยะเวลาดำเนินการ ระหว่างปีงบประมาณ 2560-2561

วิธีการศึกษา

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: AR grade, $NaHCO_3$, Na_2CO_3, NaOH, HCl, NaCl, KCl, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 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) เพื่อใช้สอบเทียบค่าความแรงกับวัคซีนตัวอย่าง In-house PT standard in 40% glycerol ที่ได้สอบเทียบกับ 1st international reference standard PT (Code: JNIH-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) จากบริษัทไบโอเนท-เอเชีย ที่มีความเข้มข้นของสารเป็น 10 เท่าของวัคซีนสำเร็จรูป ประกอบด้วย PT และ FHA ความเข้มข้นชนิดละ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $Al(OH)_3$ 4.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NaCl 150 มิลลิโมลาร์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอ่านอีไลซ่าแบบไมโครเพลท เครื่องชั่งสาร กระบอกและเข็มฉีดยาสำหรับฉีดสัตว์ทดลอง ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 °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 ที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 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 °C ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในตู้ชีวนิรภัย 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 (°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 แล้วนำออกจากเครื่องปิดครอบทับด้วยฝาอลูมิเนียม ติดฉลาก นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

การประเมินประสิทธิภาพการทำแห้ง

ก่อนการทำแห้ง: สุ่มขวดที่บรรจุวัคซีนเหลวก่อนการทำแห้งมาชั่งน้ำหนัก เพื่อตรวจความสม่ำเสมอของการแบ่งบรรจุ (%CV of aliquot) โดยชั่งน้ำหนักของขวดบรรจุวัคซีนเหลวพร้อมจุกยางปิดฝาของแต่ละขวด ด้วยเครื่องชั่งความละเอียด 0.0001 กรัม แล้วหักค่าด้วยน้ำหนักของขวดเปล่าและจุกยาง 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 ที่ความเข้มข้นต่างๆลงไป 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

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

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 ปริมาณความชื้นวัคซีนผงแห้งส่วนมากกำหนดการยอมรับที่ไม่เกิน 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, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 14.4 กรัม KH_2PO_4 2.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.4 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl 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 สัปดาห์แบ่งหนูทดลองออกเป็น 3 กลุ่มด้วยวิธีการสุ่ม กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม จำนวน 10 ตัว กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานจำนวน 16 ตัวต่อความเจือจาง และกลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนทดสอบจำนวน 16 ตัวต่อความเจือจาง (โครงการได้รับการอนุมัติใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัยโดยคณะกรรมการดูแลการเลี้ยง

และใช้สัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขโครงการ 61-023)

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างสำหรับสอบเทียบและกำหนดค่าความแรงด้วยวิธี MIT

ตัวอย่าง: วัคซีน aP ชนิดผงแห้ง รุ่นการผลิตที่ aP110817 ที่ได้จากการเตรียมตามวิธีการข้างต้น

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการเตรียมซีรั่มจากสัตว์ทดลอง

ละลายวัคซีนผงแห้ง 2 ขวด ด้วย PBS buffer 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียว และนำวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน10 มิลลิลิตร มาเจือจางแต่ละชุดต่อด้วย PBS buffer ให้เป็น 3ระดับความเจือจางในอัตราส่วนตัวอย่างวัคซีน: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 ทำการสลบหนูด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ก่อนเจาะเลือดแยกแต่ละตัวใส่ในหลอด ปั่นแยกซีรั่มด้วยเครื่องปั่นความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ในหลอด เก็บที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$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 $^{\circ}$C ทิ้งไว้หนึ่งคืน ล้างเพลทด้วย PBST จากนั้นเติม blocking buffer นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37$\pm$2 $^{\circ}$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

เจือจางซีรั่มของหนูแต่ละตัวในกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนและกลุ่มวัคซีนมาตรฐานรวมถึงกลุ่มควบคุม โดยเริ่มต้นเจือจางด้วย diluent buffer ในอัตราส่วนซีรั่ม:diluent buffer เท่ากับ 1:49 จากนั้นเจือจางซีรั่มของหนูในแต่ละกลุ่มต่อด้วย diluent buffer ให้มีระดับการเจือจางของซีรั่มเป็น 1/1,000, 1/2,000, 1/4,000 และ 1/8,000 สำหรับกลุ่ม high titer และ เจือจางเป็น 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 และซีรั่มของหนูที่เจือจางแล้วแต่ละตัวในแต่ละกลุ่ม รวมถึงซีรั่มที่เจือจางของกลุ่มควบคุม แยกใส่ลงในหลุมที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C นาน 60 นาที ล้างเพลทด้วย PBST แล้วเติมสารละลาย Rabbit anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C นาน 60 นาที ล้างเพลทด้วย PBST เติมสาร SureBlue Reserve™ ทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3-5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N HCl อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง 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 และค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดที่ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แล้วจึงกำหนดและประกาศค่าความแรงของระดับภูมิกันต่อ PT และ FHA วัคซีนที่ได้เพื่อนำมาใช้เป็นวัคซีน aPอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ

ผลการศึกษา

การจัดเตรียมครั้งนี้ได้วัคซีนไอกรนไร้เซลล์ ผงแห้งขนาดบรรจุขวดละ 0.5 มิลลิลิตร ประมาณ 800 ขวด โดยในขั้นตอนหลังแบ่งบรรจุวัคซีนเหลวลงขวดก่อนทำแห้งได้ตรวจสอบความสม่ำเสมอของการแบ่งบรรจุ พบมีค่าน้ำหนักเฉลี่ยของวัคซีนต่อขวดเท่ากับ 0.5161 กรัม %CV เท่ากับ 0.23 ผลวิเคราะห์คุณภาพเบื้องต้นของวัคซีนผงแห้งพบ ลักษณะทางกายภาพมีลักษณะเป็นผงแห้งจับตัวเป็นก้อนเค้กสีขาว (รูปที่1) มีค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.94 มีปริมาณความชื้นเฉลี่ย 0.85% มีค่าเฉลี่ยระยะวลาในการละลาย 36.09 วินาที มีปริมาณเฉลี่ยแอนติเจน PT และ FHA เท่ากับ 30.70 และ 14.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าเฉลี่ย degree of adsorption ของ PT เท่ากับ 94.3% ขณะที่มีค่าเฉลี่ย degree of adsorption ของ FHA มากกว่า 99% การทดสอบความแรงเบื้องต้นได้ค่า relative potency ของ PT เท่ากับ 0.6 และ FHA เท่ากับ 0.6 ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อรา แบคทีเรีย และมัยโคพลาสมาในวัคซีน ผลตรวจปริมาณเอนโดทอกซินมีค่าน้อยกว่า 1.5 EU ต่อโด๊ส รายละเอียดแสดงในตารางที่ 2

รูปที่ 1 ภาพถ่ายวัคซีนผงแห้ง aP ที่เตรียมได้ในขวดแก้วปิดผนึก

ผลวิเคราะห์ความแรงระดับภูมิกันต่อ PT และ FHA ของวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ผงแห้ง รุ่นการผลิตที่ 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 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลทดสอบคุณภาพเบื้องต้นของวัคซีนไอกรนไร้เซลล์ ผงแห้ง รุ่นการผลิตที่ aP110817

รายการทดสอบ	**ผลวิเคราะห์ (ค่าเฉลี่ย±SD), n=จำนวนขวดหรือจำนวนครั้งการทดสอบ**	**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 และมัยโคพลาสมา	ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อรา แบคทีเรียและมัยโคพลาสมา
antigen content		รายงานเป็นข้อมูล

- PT	- 30.70±0.46 µg/ml, n=3 การทดสอบ	
- FHA	- 14.8±0.85 µg/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/โด๊ส(0.5ml)	รายงานเป็นข้อมูล

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 ดังแสดงในตารางที่ 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 การทดสอบ ด้วย 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 โดยในระหว่างการศึกษาคณะผู้วิจัยได้มีการทดลองสูตรส่วนผสมสารเหลวที่จะนำมารวมกับแอนติเจน PT และ FHA ของวัคซีนแล้วให้ได้รูปร่างของเนื้อผงแห้งที่มีลักษณะเป็นแผ่นเค้กสีขาว ความชื้นต่ำและละลายได้ดี จนเมื่อได้สภาวะเหมาะสมแล้วจึงนำมาผสมรวมกับแอนติเจน ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นการประยุกต์ใช้ความรู้และประสบการณ์จากการเตรียมวัคซีนผงแห้งที่ผ่านมาของหน่วยงาน จะเห็นได้ว่ามีการเติมสารที่ไม่ได้เป็นส่วนผสมในสูตรตำรับวัคซีน aP ที่ผลิตใช้ในคน เช่น Dextran และ polygeline เพื่อทำให้แอนติเจนมีความคงสภาพ และทำให้รูปร่างของผงแห้งมีความสวยงาม ละลายง่าย และในการเตรียมสูตรวัคซีน aP เหลวที่จะเข้าสู่กระบวนการทำแห้งจะต้องใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนที่สูงมากกว่าสูตรที่ใช้ในวัคซีนปกติ เพราะเมื่อผ่านขั้นตอนของการทำแห้งแล้วความแรงของแอนติเจนนั้นจะลดลงไปจากเดิม ประเด็นสำคัญส่วนนี้คือให้สามารถเตรียมวัคซีนผงแห้งที่มีค่าความแรงของวัคซีนระดับสูง เพื่อจะเก็บไว้ใช้ได้เป็นระยะเวลานาน ในการศึกษานี้ใช้วัคซีนเหลวที่มีความเข้มข้นของสารเป็น 10 เท่าของวัคซีนสำเร็จรูปซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้เนื่องจากข้อจำกัดของการละลาย กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยเครื่อง lyophilizer ที่หน่วยงานใช้นั้นกำหนดสภาวะ freezing process, primary drying phase และ secondary drying phase ตามที่ระบุในวิธีการเป็นสภาวะที่คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาทดสอบและปรับสภาวะให้เหมาะสมสำหรับการทำแห้งวัคซีน aP ซึ่งใช้เวลาในการทำแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer รวมกันประมาณ 4-5 วัน และตลอดกระบวนการในการเตรียมวัคซีนจะต้องทำโดยหลักเทคนิคการปราศจากเชื้อจนกว่าภาชนะที่บรรจุวัคซีนจะถูกปิดสนิท เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพ จะเห็นได้ว่าสูตรที่ใช้ในการเตรียมวัคซีนและสภาวะการทำแห้งครั้งนี้สามารถผลิตวัคซีน aP ผงแห้งที่ให้รูปร่างของเนื้อเค้กที่ดี มีความชื้นต่ำ สามารถละลายน้ำได้ดี มีคุณลักษณะตามที่ต้องการ จากผลการทดสอบค่าความแรงเบื้องต้น การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ความสามารถในการละลาย ความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น ความปราศจากเชื้อแบคทีเรียเชื้อราและมัยโคพลาสมา ปริมาณเอนโดทอกซิน ระดับการดูดซับของแอนติเจน พบว่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทุกพารามิเตอร์ โดยมีค่า relative potency เบื้องต้นของ PT และ FHA เท่ากับ 0.6 เมื่อเทียบกับวัคซีนมาตรฐานที่ใช้ศึกษา ซึ่งข้อมูลผลการทดสอบเบื้องต้นนี้มีความสำคัญที่ใช้ในการตัดสินใจเลือกวัคซีนสำหรับเข้าสู่ขั้นตอนของการสอบเทียบกำหนดค่าความแรงเพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานต่อไป

สำหรับการกำหนดค่าวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานจะต้องทำการตรวจวิเคราะห์ในจำนวนที่ให้ผลวิเคราะห์เพียงพอเชื่อถือได้ตามข้อแนะนำขององค์การอนามัยโลก[15] ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีนและสารที่เป็นองค์ประกอบ วิธีการสอบเทียบที่ปฏิบัติโดยทั่วไปจะทำการทดสอบไม่น้อยกว่า 3 ครั้ง ในการศึกษานี้จึงได้กำหนดจำนวนการทดสอบของแต่ละห้องปฏิบัติการไว้ที่ 4 การทดสอบ หรือ 8 ค่าผลการทดสอบจากสองห้องปฏิบัติการซึ่งนับว่าเพียงพอต่อการนำมากำหนดค่าร่วมกัน ผลการสอบเทียบวัคซีน aP ที่เตรียมได้ร่วมกันระหว่างห้องปฏิบัติการมีค่าเฉลี่ยถ่วงน้ำหนักเรขาคณิตความแรงสัมพัทธ์ของ PT และ FHA เท่ากับ 0.51 และ 0.83 เมื่อเทียบค่าความแรงกับวัคซีนมาตรฐานรุ่นการผลิตที่ FB-PE25001 ซึ่งเป็นวัคซีนรุ่นที่ได้ผ่านการศึกษาในมนุษย์มาแล้ว หากพิจารณาผลจากแต่ละแห่งจะเห็นได้ว่าค่าความแรงของ PT และ FHA จากห้องปฏิบัติการเดียวกันจะมีค่าใกล้เคียงกัน ขณะที่ค่าความแรงจากต่างห้องปฏิบัติการจะมีค่าค่อนข้างต่างกัน ซึ่งเป็นค่าเบี่ยงเบนที่พบได้เสมอระหว่างห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะการทดสอบที่ใช้สัตว์ทดลองจะให้ค่าเบี่ยงเบนที่สูงกว่าการทดสอบในหลอดทดลอง และเป็นจุดสำคัญที่ทำให้เกิดความแตกต่างในการตัดสินผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการศึกษาค่าความแรงร่วมกันจะทำให้การกำหนดค่าความแรงนั้นรวมปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ที่ได้ในแต่ละห้องปฏิบัติการไว้แล้ว ลดความต่างของผลวิเคราะห์ ซึ่งค่าความแรงที่

สอบเทียบร่วมกันนี้ได้ถูกกำหนดและประกาศให้เป็นค่าความแรงของวัคซีน aP ผงแห้งอ้างอิงมาตรฐานของประเทศ ที่จะใช้ทดสอบค่าความแรงของห้องปฏิบัติการผู้ผลิตและหน่วยควบคุมคุณภาพภาครัฐเพื่อการควบคุมคุณภาพของวัคซีน aP ที่ผลิตในประเทศต่อไป ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการยังคงต้องติดตามตรวจสอบความคงตัวของวัคซีนนี้เป็นระยะ เพื่อใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในระยะเวลาอย่างน้อย 3-5 ปี

สรุปผล

การศึกษานี้สามารถทำแห้งวัคซีนไอกรนไร้เซลล์ซึ่งมีส่วนประกอบของแอนติเจน 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 และเทคนิคการทำแห้งที่ทันสมัย ที่สามารถผลิตสารมาตรฐานได้ครั้งละปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสุกัลยาณี ไชยมี ที่ช่วยประสานในการจัดทำข้อมูล เจ้าหน้าที่ของสถาบันชีววัตถุ และเจ้าหน้าที่ของผู้ผลิตที่มีส่วนเกี่ยวข้องในโครงการนี้ทุกท่าน 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, สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จดูรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพฯ: บริษัท Full Forse จำกัด; 2558. หน้า 38-40.

9. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำ. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จดูรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพฯ: บริษัท Full Forse จำกัด; 2558. หน้า 41-3.
10. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การวัดค่า pH. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จดูรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพฯ: บริษัท Full Forse 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.