

ประสิทธิภาพของการทำแห้งและ ความคงตัวที่สภาวะแรงของวัคซีนหัดอ้างอิงมาตรฐาน

ธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์ วท.บ.

จิรเดช ปัจฉิม วท.บ.

อัศจรรย์ อาเมน วท.บ.

ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์ วท.บ.

สุภาพร ภูมิอมร วท.บ., วท.ม., วท.ด.

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ หน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่ผ่านการสอบเทียบกับวัคซีนมาตรฐานสากลในการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการของผลิตภัณฑ์วัคซีนในอุตสาหกรรม โดยการทดสอบตัวอย่างวัคซีนต้องทำควบคู่ไปกับวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเสมอ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการทำแห้งและความคงตัวที่สภาวะแรงของวัคซีนไวรัสหัดที่จัดเตรียมในห้องปฏิบัติการโดยการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ Vero และนำไวรัสที่ทราบค่าปริมาณไวรัสมาจัดเตรียมด้วยสูตรตำรับที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งเพื่อเก็บวัคซีนเป็นเวลานาน หลังการทำแห้ง จะตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ ความชื้น ความแรงและตัวแปรอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อประเมินประสิทธิภาพของการทำแห้ง ก่อนนำมาประเมินความคงตัวของวัคซีนไวรัสหัดในสภาวะแรงจากผลการทดสอบวัคซีนไวรัสหัดผงแห้งแสดงลักษณะทางกายภาพที่ดี มีความชื้นต่ำร้อยละ 1.50 ค่าความแรง $5.29 \log CCID_{50}$ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งถือว่ายังมีค่าความแรงที่สูง แม้จะผ่านกระบวนการทำแห้ง และจากการทดสอบในตัวแปรอื่น ๆ พบว่ามีความแปรปรวนของการบรรจุอยู่ที่ร้อยละ 0.35 ระยะเวลาในการละลายประมาณ 1.38 นาที และค่า pH 7.32 รวมถึงไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ แบคทีเรีย รา และมัยโคพลาสมา เมื่อศึกษาความคงตัวในสภาวะแรงที่อุณหภูมิสูงขึ้น (4, 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส) ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน (1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์) โดยเก็บวัคซีนที่ -70 และ -20 องศาเซลเซียส พบว่าวัคซีนไวรัสหัดนี้สามารถจัดเก็บได้ที่ -70 หรือ -20 องศาเซลเซียส เนื่องจากไม่มีความแตกต่างของค่าความแรงทั้งในสภาวะแรงและสภาวะปกติ อย่างไรก็ตามการจัดเก็บวัคซีนที่ -70 หรือ -20 องศาเซลเซียส จะสูญเสียค่าความแรงมากขึ้นกับอุณหภูมิที่สูงขึ้นและช่วงระยะเวลาที่นาน โดยวัคซีนไวรัสหัดที่จัดเตรียมขึ้นมีความคงตัวที่ดีที่อุณหภูมิ -70, -20 และ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 12 สัปดาห์ชี้ให้เห็นว่ามีการสูญเสียค่าไวรัสไตเตอร์ไม่เกิน $1 \log CCID_{50}$ ของค่าความแรงปกติที่ $5.29 \log CCID_{50}$ ต่อ 0.5 มิลลิลิตรจากการศึกษาประสิทธิภาพหลังการทำแห้งและประเมินความคงตัวที่สภาวะแรงของวัคซีนนี้สามารถยืนยันได้ว่าวัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการสามารถนำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพค่าความแรงของวัคซีนหัดได้ ในขณะที่สภาวะการจัดเก็บจริง ควรต้องติดตามค่าความแรงอย่างสม่ำเสมอเพื่อประเมินความคงตัวในระยะยาวของวัคซีนไวรัสหัดต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีนไวรัสหัด, วัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน, ความแรง, ความคงตัว

บทนำ

ในการควบคุมกำกับคุณภาพทางห้องปฏิบัติการของวัคซีนทุกชนิด โดยหน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐจำเป็นต้องมีการควบคุมด้านการทดสอบค่าความแรงทางห้องปฏิบัติการ โดยใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่ทราบค่าแน่นอนในการหาค่าความแรงของตัวอย่างวัคซีน โดยต้องทดสอบคู่ขนานไปกับวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเสมอ เพื่อให้ผลการทดสอบน่าเชื่อถือ สามารถเทียบผลกับห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ได้⁽¹⁾ แต่เนื่องจากวัคซีนมาตรฐานสากลที่จัดเตรียมโดยหน่วยงาน National Institute of Biological Standardization for Control (NIBSC) ประเทศสหราชอาณาจักร ซึ่งถือเป็นห้องปฏิบัติการขององค์การอนามัยโลกมีจำนวนจำกัดไม่สามารถแจกจ่ายให้แก่หน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐได้ทั้งหมด องค์การอนามัยโลกจึงแนะนำให้หน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐในแต่ละประเทศจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานขึ้นเองในประเทศโดยสามารถจัดเตรียมได้ทั้งในรูปแบบของเหลวแช่แข็งหรือผงแห้ง ขึ้นกับคุณลักษณะของวัคซีนนั้น ๆ ซึ่งการจัดเตรียมโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) เป็นวิธีการทำแห้งที่สามารถคงคุณลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ได้ดี^(2,3) ประกอบกับวัคซีนมีโครงสร้างระดับโมเลกุลเป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนแอนติเจน ซึ่งค่อนข้างไวต่อการเสื่อมสลายจากความร้อน ดังนั้นการทำแห้งแบบเยือกแข็ง นอกจากการรักษาคุณลักษณะของไกลโคโปรตีนแอนติเจนไม่ให้เสื่อมสลายง่ายแล้วยังมีประโยชน์ในแง่การเก็บรักษาง่าย สะดวกต่อการขนส่ง และมีความคงตัว (stable) สามารถเก็บได้นานด้วย⁽¹⁾ โดยทั่วไปวัคซีนสำเร็จรูปชนิดผงแห้งที่ใช้ฉีดเข้าสู่ร่างกายสามารถเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นานอย่างน้อย 2-3 ปี⁽¹⁾ แต่การจัดเตรียมวัคซีนที่นำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานจำเป็นต้องมีการจัดเก็บที่นานกว่าและมีปริมาณที่มากพอที่จะใช้ในเวลาหลายปีโดยที่ยังคงความคงตัวสูงกว่าวัคซีนทั่วไป^(2,3) การศึกษานี้ได้จัดเตรียมวัคซีนไวรัสหัดในรูปแบบผงแห้งตามสูตรตำรับที่เหมาะสมกับเครื่องทำแห้งใน

ห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาประสิทธิภาพหลังการทำแห้ง รวมทั้งความคงตัวในสภาวะเร่ง เพื่อเป็นข้อมูลยืนยันได้ว่าวัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมขึ้นมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศต่อไป

วิธีการศึกษา

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องทำแห้งรุ่น Lyolab (LT, India) ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan) ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (EVERmed, Italy) ตู้อบเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 37 องศาเซลเซียส (NuAire, USA) กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ส (Olympus, Japan) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Tommy, Japan) pH meter (Orion, USA) เครื่องชั่ง 6 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany) Automatic dispenser (Eppendorf, Germany) เครื่องเพิ่มปริมาตรสารพันธุกรรม (Bio-Rad, USA) เครื่องวิเคราะห์หาปริมาณน้ำ (Metrohm, Switzerland) และ ตู้ปราศจากเชื้อแบบคลาส II (NuAire, USA)

สารละลายและสารเคมี

Trypan blue (Sigma, USA), Dulbecco's Phosphate Buffer Saline ที่ไม่มี Ca^{++} และ Mg^{++} (PBS⁻) (Sigma, USA), Trypsin-EDTA (Gibco, USA), Dextran (Sigma, USA), Lactose (Fluka, Netherlands), Sucrose (Sigma, USA), Arginine monohydrochloride (Sigma, USA), Glutamic acid (Sigma, USA), Potassium phosphate dibasic (Sigma, USA), Potassium phosphate monobasic (Sigma, USA) และ Mycoplasma detection kit (Minerva Biolabs, Germany)

วัคซีนไวรัสหัดมาตรฐานสากล

วัคซีนไวรัสหัดมาตรฐานสากลเป็นวัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (Code No. 92/648) ได้รับจากหน่วยงาน National Institute of Biological Standardization for

Control (NIBSC) ประเทศสหราชอาณาจักร กำหนดค่าความแรงของวัคซีนมาตรฐานสากลเท่ากับ $4.30 \log \text{CCID}_{50}$ ต่อมิลลิลิตร ได้นำมาใช้จัดเตรียมเป็นวัคซีนหัดอ้างอิงมาตรฐานในเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยง Vero (African Green Monkey Kidney cell; ATCC CCL-81, USA) ได้รับจากบริษัทองค์การเภสัชกรรม-เมอร์ริเออร์ชีววัตถุ จำกัด นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Cat. No. 31600-026, Gibco USA) ที่มีซีรัม (inactivated fetal bovine serum (FBS), Cat. No. 26140-079, Gibco USA) 5% และ 7.5% NaHCO_3 (Cat. No. S-5716, Sigma) 1.8% โดยเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มี 5% CO_2

การย่อยเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์ Vero ที่แผ่เป็นแผ่นที่เรียกว่า monolayer cells ที่เพาะเลี้ยงในขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์มาล้าง 2 ครั้ง ด้วยบัฟเฟอร์ Dulbecco's phosphate buffer saline ที่ไม่มี Ca^{++} และ Mg^{++} เป็นองค์ประกอบ (PBS^-) จากนั้นเซลล์จะถูกย่อยด้วย trypsin-EDTA ความเข้มข้นของ trypsin-EDTA 0.025% นาน 1-3 นาที โดยสังเกตเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเซลล์มีลักษณะเริ่มหดตัวกลม จึงเท trypsin-EDTA ทิ้ง และเคาะขวดเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เซลล์หลุดจากพื้นผิว จากนั้นดูดเป่าเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงโดยใช้ไปเปิด เพื่อให้เซลล์หลุดเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer ด้วยสีย้อม trypan blue ความเข้มข้น 0.2% ใน PBS^- เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี เนื่องจาก เซลล์สามารถขับสีออกจากเซลล์ได้ (trypan blue exclusion) ในขณะที่เซลล์ตายจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue

การเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อเตรียมวัคซีนไวรัสหัด

เซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่แผ่เป็นแผ่นจะถูกทำให้ติดเชื้อด้วยไวรัสจากวัคซีนไวรัสหัดอ้างอิงมาตรฐานสากลที่อัตราส่วนระหว่างไวรัสต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (multiplicity of infection, MOI) ระหว่าง 0.01-0.05 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 2% FBS นาน 4-5 วัน จะเห็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลังจากการติดเชืด้วยไวรัส ที่เรียกว่า cytopathic effect (CPE) เกิดขึ้น เก็บเซลล์เพาะเลี้ยงเมื่อมีจำนวน CPE ประมาณร้อยละ 80-90 ในตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงแตกโดยการละลายและแช่แข็ง (freeze and thaw) 3 ครั้ง ทำการปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส ซึ่งมีไวรัสโดยการแบ่งบรรจุไวรัสเป็นหลอดหลอดละ 20-30 มิลลิลิตร เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้เตรียมวัคซีนไวรัสหัดเชื้อเป็นชนิดผงแห้ง และทำการตรวจปริมาณไวรัสเบื้องต้น ถ้าปริมาณไวรัสที่ได้ต่ำกว่าวัคซีนมาตรฐานสากล จะเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อโดยนำไวรัสหัด ที่เตรียมได้ไปเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ต่ออีกครั้งตามวิธีการข้างต้น

การเตรียมสูตรตำรับสำหรับการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ศึกษาการทำแห้งแบบเยือกแข็งในหลายสูตรตำรับเพื่อหาองค์ประกอบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำแห้ง โดยปรับใช้ส่วนประกอบจากสูตรตำรับวัคซีนไวรัส คางทูม เชื้อเป็น⁽⁴⁾ และนำมาปรับเปลี่ยนองค์ประกอบบางส่วนเพื่อหาสูตรตำรับที่เหมาะสม ซึ่งจะพิจารณาปัจจัยดังนี้มีค่าความแรงที่ดี มีอัตราการสูญเสียค่าความแรงจากการทำแห้งน้อย มีลักษณะของเนื้อวัคซีนที่ดี มีปริมาณความชื้นน้อย เป็นต้น ซึ่งสูตรตำรับที่เหมาะสม ประกอบด้วย dextran 4.5% (w/v), lactose 9% (w/v), sucrose 9% (w/v), arginine monohydrochloride 1.815%

(w/v), glutamic acid 0.94% (w/v), gelatin 1.5% (w/v), potassium phosphate dibasic 1.13% (w/v), และ potassium phosphate monobasic 0.48% (w/v) ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยองค์ประกอบทั้งหมด จะเตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า เพื่อผสมกับวัคซีน ไวรัสหัดที่เตรียมขึ้นในอัตราส่วน 1:1

การบรรจุ

บรรจุวัคซีนไวรัสหัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในขวดแก้ว (Borosilicate glass type I) ขนาด 3 มิลลิลิตร ด้วย automatic dispenser โดยเลือก tip ขนาด 10 มิลลิลิตร ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ ปิดขวดด้วยจุกยางในระดับครึ่งจุกยาง (half stoppering) ขนย้ายขวดเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งภายในห้องปลอดเชื้อ

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ทำการศึกษากระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยใช้เครื่องทำแห้งรุ่น Lyolab, LT ซึ่งได้ปรับสภาพการทำแห้งมาจากการทำแห้งวัคซีนไวรัสคางทูม⁽⁴⁾ เพื่อหาสภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมสำหรับวัคซีนไวรัสหัด โดยตั้งโปรแกรมกำหนดให้อุณหภูมิแช่แข็งเท่ากับ -60 องศาเซลเซียส นาน 9 ชั่วโมง จากนั้นในขั้นปฐมภูมิของกระบวนการทำแห้ง (primary drying process) เพิ่มอุณหภูมิเป็น -30 องศาเซลเซียส ปรับความดันเท่ากับ 200 mTorr นาน 59 ชั่วโมง และในขั้นทุติยภูมิของกระบวนการทำแห้ง (secondary drying process) ปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 35 องศาเซลเซียส ปรับความดัน

เท่ากับ 0 mTorr นาน 15 ชั่วโมง ดังตารางที่ 1

การประเมินประสิทธิภาพการทำแห้ง

ก่อนการทำแห้ง

สุ่มชั่งน้ำหนักขวดแก้วก่อนการบรรจุ จำนวน 10 ขวด แล้วนำมาบรรจุวัคซีนไวรัสหัด ทำการชั่งน้ำหนัก เพื่อหา น้ำหนักของวัคซีนไวรัสหัดที่บรรจุ พิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ ความแปรปรวน (%CV) ของการแบ่งบรรจุ

หลังการทำแห้ง

นำวัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมขึ้นมาประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนหลังการทำแห้งโดยตรวจสอบลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่า⁽³⁾ ตรวจสอบหาปริมาณ ความชื้น ที่หลงเหลือโดยวิธี Karl Fischer⁽⁵⁾ กล่าวคือ วัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมขึ้นต้องมีลักษณะทางกายภาพที่ดี ได้มาตรฐานสากล และค่าความชื้นที่เหลือต้องต่ำกว่า ร้อยละ 3 จึงนำมาศึกษาตัวแปรอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ตามลำดับดังนี้ (1) ตรวจสอบค่าความแรงโดยวิธี Cell Culture Infective Dose ที่ 50% (CCID₅₀)⁽⁶⁾ และ ดูอัตราการลดลงของค่าความแรงภายหลังการทำแห้ง (2) ตรวจสอบคุณสมบัติความแปรปรวนของการแบ่งบรรจุโดยสุ่มชั่งน้ำหนัก (3) การตรวจสอบระยะเวลาการ ละลายตัวด้วยน้ำกลั่น (reconstitution time)⁽²⁾ (4) ตรวจสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยเครื่อง pH meter ผลการตรวจสอบตัวแปรดังกล่าว นำมาหาค่าเฉลี่ย เลขคณิต (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของการ

ตารางที่ 1 กระบวนการการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

Parameters	Freezing		Primary Drying			Secondary Drying		
Shelf Temperature (°C)	-60	-60	-60	-30	-30	35	35	35
	(slope)		(slope)			(slope)		
Time (minutes)	60	480	60	60	3540	60	900	-
Vacuum (mtorr)	-	-	1000	1000	200	0	0	0

บรรจุเพื่อแสดงความเที่ยงของการประเมินประสิทธิภาพ หลังการทำแห้ง พร้อมกับตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา แบคทีเรียอื่นๆ ตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก โดยใช้เชื้อมาตรฐานสากลเป็น positive control และตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อมัคโคพลาสมาโดยใช้เทคนิค PCR^(7,8)

การตรวจหาความแรงของวัคซีนไวรัสหัดในเซลล์เพาะเลี้ยง

วัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมขึ้นในสูตรตำรับที่เหมาะสมจะถูกนำมาตรวจสอบความแรงเพื่อหาปริมาณไวรัสตามวิธีมาตรฐานสากลขององค์การอนามัยโลกซึ่งกำหนดขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจสอบความแรงของตัวอย่างวัคซีนไวรัสหัด^(6,9,10) โดยนำวัคซีนไวรัสหัดมาเจือจางในแต่ละชั้นเป็น $1:10^{0.5}$ โดยเริ่มที่ระดับความเจือจาง $10^{-2.0}$ จนถึง $10^{-7.0}$ จากนั้นนำแต่ละความเจือจางหยอดลงไป ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุมปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรต่อ

หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร จำนวนความเจือจางละ 8 หลุม โดยมีหลุมที่ไม่ใส่ไวรัสเป็นหลุมควบคุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นเติมเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จำนวน 2.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน ในสภาวะที่มี 5% CO₂ ตรวจนับจำนวน CPE ที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุม และนำมาคำนวณหาค่าความแรงเฉลี่ยเลขคณิต (Mean) ในหน่วย logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งในการจัดเตรียมเป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน ค่าความแรงเฉลี่ยที่ได้กำหนดว่าจะต้องมีค่าสูงกว่าวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสากลอย่างน้อย 1 logCCID₅₀ จึงจะนำมาใช้ในการทำแห้ง

การคำนวณค่าความแรงโดยวิธี CCID₅₀

การคำนวณค่าความแรงของวัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการใช้สูตรที่ดัดแปลงมาจาก Spearman & Kaber⁽⁶⁾ ดังนี้

$$\log\text{CCID}_{50} = - \text{ส่วนกลับของความเจือจางต่ำสุดที่ใช้} + \frac{[(\Sigma \text{จำนวนหลุมที่พบ CPE ทั้งหมด} - 0.5) \times 0.5]}{\text{จำนวนหลุมในแต่ละความเจือจาง}}$$

ค่าความแรงที่ได้เป็นหน่วย logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร

การตรวจสอบความคงตัวของวัคซีนไวรัสหัดในเซลล์เพาะเลี้ยง

การประเมินความคงตัวของวัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมขึ้น โดยวัดปริมาณไวรัสในรูปความแรงเพื่อดูการลดลงของค่าความแรงในสภาวะเร่ง เก็บวัคซีนไวรัสหัดผงแห้งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จะศึกษาที่อุณหภูมิ -20, 4, 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยเทียบกับการเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ส่วนวัคซีนไวรัสหัดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จะศึกษาที่อุณหภูมิ 4, 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส

โดยเทียบกับการเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทั้งสองสภาวะจะทดสอบสภาวะเร่งที่ระยะ เวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์

ผลการศึกษา

ลักษณะทางกายภาพและปริมาณความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้ง

ลักษณะของวัคซีนไวรัสหัดหลังการทำแห้งพบว่า มีลักษณะเป็นก้อนสีขาวเหลืองอมส้ม เนื้ออัดแน่น ไม่มีรูพรุน เมื่อเคาะไม่เกิดการยุบตัวและไม่แตกเป็นชิ้น และจากการสุ่มตรวจจำนวน 10 ขวดพบว่า ปริมาณ

ความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้งเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 1.50 โดยมี %CV เท่ากับ 24.14 (ตารางที่ 2)

ค่าความแรงหลังการทำแห้ง

การตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนไวรัสหัดเป็นตัวแปรที่สำคัญที่สุดสำหรับการนำวัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการมาใช้เป็นวัคซีนหัดอ้างอิงมาตรฐาน ดังนั้นการตรวจสอบค่าความแรงจะเป็นตัวบ่งบอกประสิทธิภาพของการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่สำคัญ ตารางที่ 3 แสดงค่าความแรงเฉลี่ยจำนวน 3 ค่าที่ทำการทดสอบที่เป็นอิสระแก่กัน พบว่าก่อนทำแห้งมีค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ $5.67 \log \text{CCID}_{50}$ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร หลังทำแห้งมีค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ $5.29 \log \text{CCID}_{50}$ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสูญเสียค่าความแรงเฉลี่ยหลังการทำแห้งเท่ากับร้อยละ 6.62

การทดสอบในตัวแปรอื่นๆ หลังการทำแห้ง

ผลการศึกษาตัวแปรอื่นๆ โดยการสุ่มตรวจจำนวน 10 ขวด พบว่าค่าน้ำหนักของวัคซีนในรูปของเหลวของการแบ่งบรรจุคิดเป็น %CV เท่ากับ 0.35 นั่นคือ ในการบรรจุแต่ละขวดมีน้ำหนักของการแบ่งบรรจุแตกต่างกัน คิดเป็นร้อยละ 0.35 ส่วนระยะเวลาการละลายด้วย

ตารางที่ 2 การตรวจสอบทางกายภาพและปริมาณความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้ง*

ลักษณะทางกายภาพ	ขวดที่	ปริมาณความชื้น (%)
	1	1.14
	2	1.97
	3	1.24
	4	1.25
	5	1.13
	6	1.91
	7	1.09
	8	1.75
	9	1.64
	10	1.88
	Mean	1.50
	SD	0.36
	%CV	24.14

* การวัดปริมาณความชื้นได้จากการสุ่มตัวอย่างจำนวน 10 ขวด โดยระบุค่าปริมาณความชื้นเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) และร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% Coefficient of Variation, %CV)

ตารางที่ 3 การทดสอบค่าความแรงก่อนและหลังการทำแห้ง

ค่าความแรง ($\log \text{CCID}_{50}$ / 0.5 มิลลิลิตร) (n=3)		
ก่อนทำแห้งแบบเยือกแข็ง ^a	หลังทำแห้งแบบเยือกแข็ง ^b	อัตราการสูญเสียค่าความแรง ^c (ร้อยละ)
5.88	5.44	6.62
5.69	5.25	
5.44	5.19	
Mean = 5.67	Mean = 5.29	
SD = 0.22	SD = 0.13	
%CV = 3.87%	%CV = 2.46%	

a หมายถึงค่าความแรงของวัคซีนไวรัสหัด ก่อนการทำแห้ง b หมายถึงค่าความแรงของวัคซีนไวรัสหัดหลังการทำแห้ง

c หมายถึงเปอร์เซ็นต์การสูญเสียค่าความแรงหลังการทำแห้งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าความแรงก่อนทำแห้งซึ่งถือเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ทำการทดลอง 3 ซ้ำที่เป็นอิสระแก่กัน

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแปรปรวนของการแบ่งบรรจุ ระยะเวลาในการละลาย pH และการทดสอบความปราศจากเชื้อ*

สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ของการแบ่งบรรจุ (%CV) (n = 10)	ระยะเวลาในการละลาย ด้วยน้ำกลั่น (นาที) (n = 10)	pH ^a (n = 10)	การทดสอบความปราศจากเชื้อ		
			แบคทีเรีย	รา	มัยโคพลาสมา
0.55942	1.38	7.30	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
0.55528	1.38	7.31			
0.55573	1.35	7.33			
0.55923	1.37	7.34			
0.55815	1.40	7.34			
0.55629	1.39	7.32			
0.56050	1.38	7.33			
0.55560	1.38	7.33			
0.55720	1.30	7.32			
0.55968	1.43	7.32			
Mean = 0.55771	Mean = 1.38	Mean = 7.32			
SD = 0.00193	SD = 0.03	SD = 0.01			
%CV = 0.34669	%CV = 2.45	%CV = 0.17			

* ได้แสดงผลการทดสอบตัวแปรต่างๆ ของสูตรตำรับ นำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบเพื่อยืนยันว่าวัคซีนไวรัสหัดนี้เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในห้องปฏิบัติการต่อไป ทำการสุ่มตรวจจำนวน 10 ขวด (n = 10), a เป็นค่า pH หลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งก่อนทำแห้งแบบเยือกแข็งวัคซีนไวรัสหัดมี pH เฉลี่ยเท่ากับ 7.22

น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่าวัคซีนไวรัสหัดสามารถละลายจนได้สารละลายที่ใสใน ระยะเวลาเฉลี่ยประมาณ 1.38 นาที ส่วนค่า pH หลังการทำแห้ง เท่ากับ 7.32 ไม่แตกต่างจากก่อนทำแห้ง (pH = 7.22) และเมื่อนำมาทดสอบการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆ ไม่พบว่า วัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมขึ้นมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและเชื้อมัยโคพลาสมา (ตารางที่ 4)

การประเมินความคงตัวในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิต่างๆ หลังเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

ในการประเมินความคงตัวของวัคซีนไวรัสหัดโดยตรวจสอบค่าความแรง เพื่อดูว่าวัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมขึ้นเหมาะสำหรับการนำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในประเทศหรือไม่ วัคซีนไวรัสหัดผงแห้งได้ถูกเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส

ในภาพที่ 1 แสดงการจัดเก็บวัคซีนในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ -20, 4, 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน คือ 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ เทียบกับการเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส โดยเก็บวัคซีนไวรัสหัดจำนวน 10 ขวดในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ กันและนำมา 1 ขวด เพื่อตรวจสอบความคงตัวโดยทำการทดสอบขวดละ 2 ขั้ว ผลการทดสอบหาค่าความแรงในสภาวะเร่งเพื่อดูความคงตัวของวัคซีน (ภาพที่ 1) พบว่าการจัดเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาต่างๆ ที่ 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ ค่าความแรงที่ได้ไม่แตกต่างกันอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ 5.34, 5.34, 5.09, 5.47, 4.88, 5.03 และ 5.34 logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่าความแรงเฉลี่ยก่อนการจัดเก็บที่ 5.29 logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร (ตาราง 3) ซึ่งค่าความแรง

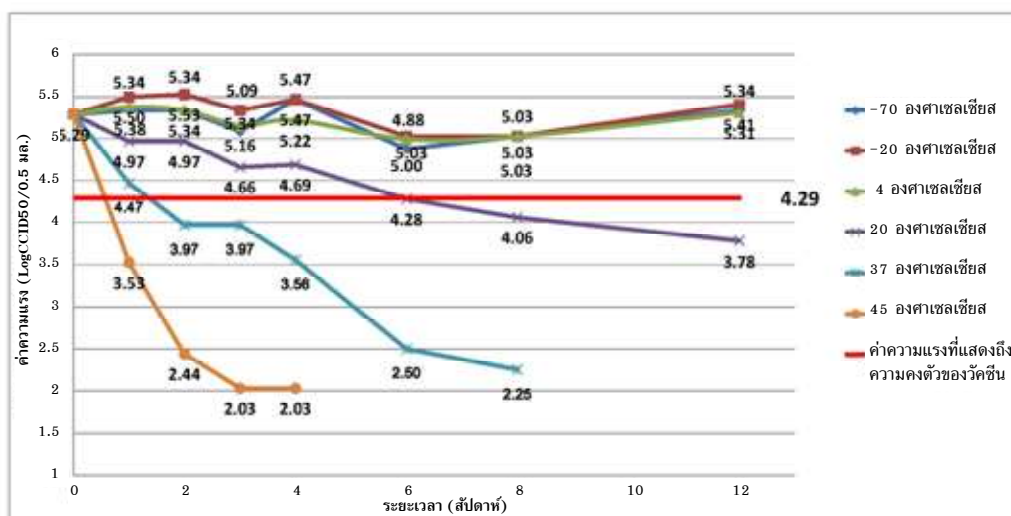
ลดลงไม่เกิน 1 logCCID₅₀ คือที่ 4.29 logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิตร ซึ่งคิดจากค่าความแรงเริ่มต้นที่ 5.29 logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิตร (ภาพที่ 1) และผลการเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ค่าความแรงที่ได้ไม่แตกต่างกับที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์และ 20 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัคซีนไวรัสหัดมีความคงตัวที่ 1 สัปดาห์เท่านั้น ส่วนที่ระยะเวลา 6, 8 และ 12 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ค่าความแรงลดลงมากกว่า 1 logCCID₅₀ และไม่มี ความคงตัวในสภาวะดังกล่าวเช่นเดียวกับการเก็บที่สภาวะเร่ง 37 องศาเซลเซียส นาน 2-12 สัปดาห์และ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เป็นต้นไป (ภาพที่ 1)

การประเมินความคงตัวในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิต่าง ๆ หลังเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

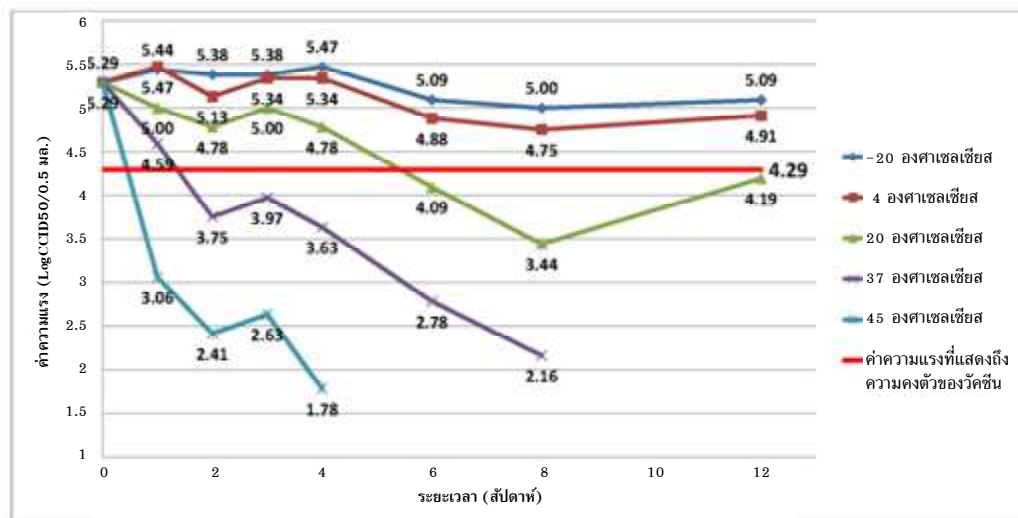
ในการประเมินความคงตัวโดยตรวจสอบค่าความแรงของ วัคซีนไวรัสหัดที่ถูกแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และตรวจสอบความคงตัวที่ สภาวะเร่งที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ

4, 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ เทียบกับการจัดเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส โดยเก็บวัคซีนไวรัสหัดจำนวน 10 ขวด ในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน และนำมา 1 ขวดเพื่อตรวจสอบความคงตัวในสภาวะเร่งโดยทำการทดสอบขวดละ 2 ขั้ว ผลการทดสอบหาค่าความแรง (ภาพที่ 2) พบว่า ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ ค่าความแรงเฉลี่ยที่ได้คือ 5.44, 5.38, 5.38, 5.47, 5.09, 5.00 และ 5.09 logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิตร และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่าความแรงที่ได้ไม่แตกต่างจากค่าความแรงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 1-12 สัปดาห์ ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส วัคซีนไวรัสหัด มีความคงตัวที่ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์และ 1 สัปดาห์ที่ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 2) โดยที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 6 สัปดาห์ขึ้นไป ค่าความแรงลดลงมากกว่า 1 logCCID₅₀ เช่นเดียวกับการทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 - 12 สัปดาห์และ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เป็นต้นไป (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 1 การประเมินค่าความคงตัวในสภาวะเร่ง ที่อุณหภูมิต่าง ๆ หลังเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2 การประเมินค่าความคงตัวในสภาวะเร่ง ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



วิจารณ์

ลักษณะทางกายภาพและปริมาณความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้ง

สูตรตำรับที่นำมาใช้ในการเตรียมวัคซีนไวรัสหัดนี้เป็นสูตรตำรับที่มีองค์ประกอบ 3 ส่วนที่สำคัญสำหรับการทำแห้งแบบเยือกแข็งทั่วไปคือ (1) ส่วนที่เป็นสารสำคัญที่เรียกว่า active ingredient คือไวรัสหัดที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ (2) ส่วนที่เป็นสารเพิ่มปริมาณหรือส่วนผสมอื่นๆ ที่ผสมลงไป ที่เรียกว่า excipient เพื่อให้ได้ส่วนผสมที่เหมาะสมและ (3) ส่วนที่เป็นตัวทำละลายที่เรียกว่า solvent เพื่อเพิ่มการละลายของสารสำคัญให้ดีขึ้น⁽²⁾ โดยได้ทำการศึกษาในหลายสูตรตำรับเพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำแห้งวัคซีนไวรัสหัดโดยปรับส่วนประกอบจากสูตรตำรับของวัคซีนไวรัสคางทูมเชื่อเป็น⁽⁴⁾ ที่ได้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้แล้วทำการประเมินคุณลักษณะเบื้องต้นที่เหมาะสมของสูตรตำรับโดยพิจารณาจากลักษณะทางกายภาพ และชีวภาพพบว่าลักษณะทางกายภาพหลังการทำแห้งเป็นก้อนอัดกันแน่นเมื่อเคาะจะไม่แตกเป็นชั้นๆ ซึ่งเป็นลักษณะของเค้กที่ดี ที่เรียกว่า uniform distribution⁽³⁾ และ

เมื่อสุ่มตรวจหาปริมาณความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้งพบว่ามีความชื้นเหลือเฉลี่ยเพียงร้อยละ 1.50 ซึ่งต่ำกว่าปริมาณความชื้นของวัคซีนไวรัสคางทูมทั้งหมดที่กำหนดไม่เกินร้อยละ 3^(9,10) และเมื่อเทียบกับวัคซีนมาตรฐานสากลที่ผลิตโดยห้องปฏิบัติการขององค์การอนามัยโลกจะพบว่าค่าปริมาณความชื้นหลงเหลือโดยประมาณร้อยละ 0.1- 2.9 ขึ้นกับชนิดวัคซีนหรือชีววัตถุและ excipient ที่ใช้⁽²⁾ อย่างไรก็ตามถือว่าวัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมได้มีลักษณะทางกายภาพที่ดีและให้ปริมาณความชื้นที่ต่ำอยู่ในเกณฑ์ที่ดี

ค่าความแรงหลังการทำแห้ง

เนื่องจากการทำแห้งวัคซีน จะต้องมีการควบคุมการสูญเสีย น้ำ ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อไวรัสที่เป็น สารสำคัญ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบหาปริมาณไวรัสที่เหลืออยู่โดยการตรวจสอบค่าความแรง ผลการทดสอบพบว่าค่าความแรงเฉลี่ยก่อนการทำแห้งมีค่า 5.67 logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร และหลังการทำแห้งมีค่า 5.29 logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราการสูญเสียเท่ากับร้อยละ 6.62 จะเห็นว่าอัตราการสูญเสียค่าความ

แรงหลังการทำแห้งต่ำและไม่เกินร้อยละ 25.0 ตามคำแนะนำของหน่วยงาน NIBSC ซึ่งมีประสบการณ์การทำแห้งวัคซีนมาตรฐานสากล นอกจากนี้ค่าความแรงที่ได้สูงกว่าค่าความแรงของวัคซีนหัตถมาตรฐานสากล ซึ่งความแรงของวัคซีนมาตรฐานสากลเท่ากับ $4.30 \log \text{CCID}_{50}$ ต่อมิลลิลิตร

การทดสอบในตัวแปรอื่นๆ หลังการทำแห้ง

เมื่อนำวัคซีนไวรัสหัตถมาตรวจสอบประสิทธิภาพของการทำแห้งกับตัวแปรอื่นๆ เช่น น้ำหนักวัคซีนไวรัสที่บรรจุ pH ตรวจสอบระยะเวลาการละลายตัวด้วยน้ำกลั่น และความปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อมัยโคพลาสมา พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการบรรจุ คิดเป็นร้อยละ 0.35 ซึ่งต่ำกว่าร้อยละ 1.0 และต่ำกว่าที่เคยมีการศึกษามาก่อน^(4,11) นั่นคือการแบ่งบรรจุแต่ละขวดมีโอกาสเกิดการกระจายของน้ำหนักเกิดขึ้นเท่าๆ กัน ส่วนระยะเวลาในการละลายหลังจากเติมน้ำกลั่น พบว่าวัคซีนไวรัสหัตถละลายสมบูรณ์ใช้เวลา นานประมาณ 1.38 นาที (%CV เท่ากับ 2.45) มีค่า pH ก่อนและหลังทำแห้งไม่แตกต่างกันคือ 7.22 และ 7.32 (%CV เท่ากับ 0.17) นอกจากนี้ไม่พบการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆ เช่น แบคทีเรีย รา และมัยโคพลาสมา ซึ่งผลการศึกษาในตัวแปรอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าวัคซีนไวรัสหัตถมีคุณลักษณะที่ดี ที่เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นวัคซีนหัตถอ้างอิงมาตรฐาน แต่ต้องมีการประเมินความคงตัวในสภาวะเร่งซึ่งจะตัวแปรสำคัญในการประเมินประสิทธิภาพการจัดเตรียมวัคซีนหัตถอ้างอิงมาตรฐาน

การประเมินความคงตัวในระยะสั้นที่อุณหภูมิต่างๆ หลังจัดเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

โดยทั่วไปวัคซีนชนิดแห้งจะเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส แต่วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานชนิดผงแห้งมีข้อแนะนำให้เก็บในอุณหภูมิต่ำกว่าวัคซีนทั่วไป และนิยมเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งจะให้ค่าความคงตัวที่ดีและเก็บไว้ใช้ได้ยาวนานกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 2-8

องศาเซลเซียส⁽¹⁾ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เก็บวัคซีนไวรัสหัตถที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาศึกษาสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูงขึ้นเพื่อประเมินความคงตัวของวัคซีนในระยะสั้นตั้งแต่ 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ ผลการทดสอบพบว่า การเก็บวัคซีนไวรัสหัตถที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ให้ค่าความแรงไม่แตกต่างจากการเก็บวัคซีนไวรัสหัตถ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยมีค่าความแรงที่ลดลงไม่แตกต่างกันทุกอุณหภูมิและระยะเวลาของการจัดเก็บในสภาวะเร่ง (ภาพที่ 1 และภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าวัคซีนไวรัสหัตถหลังการทำแห้งสามารถเก็บวัคซีนได้ทั้งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส โดยยังคงมีลักษณะทางกายภาพเหมือนเดิมในภาพที่ 1 แสดงการจัดเก็บวัคซีนในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ -20, 4, 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดสอบหาค่าความแรงในสภาวะเร่งเพื่อประเมินความคงตัวของวัคซีน พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ -70, -20 และ 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ ค่าความแรงที่ได้ไม่แตกต่างกัน เมื่อเทียบกับค่าความแรงเฉลี่ยก่อนการจัดเก็บที่ $5.29 \log \text{CCID}_{50}$ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร (ตาราง 3) โดยวัคซีนไวรัสหัตถยังคงให้ค่าความคงตัวดี เนื่องจากค่าความแรงลดลงไม่เกิน $1 \log \text{CCID}_{50}$ นั่นคือค่าความแรงที่ได้สูงกว่า $4.29 \log \text{CCID}_{50}$ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร แต่เมื่อระยะเวลาการทดสอบนานขึ้นที่ 6, 8 และ 12 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ค่าความแรงลดลงมากกว่า $1 \log \text{CCID}_{50}$ เช่นเดียวกับการเก็บที่สภาวะเร่ง 37 องศาเซลเซียส ตั้งแต่ 2 สัปดาห์และ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์เป็นต้นไป (ภาพที่ 1) แสดงให้เห็นว่าความแรงของวัคซีนไวรัสหัตถที่ลดลงมากกว่า $1 \log \text{CCID}_{50}$ มีผลกระทบต่อความคงตัวของวัคซีนไวรัสหัตถ ซึ่งสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเก็บ แสดงให้เห็นว่า ความแรงที่ลดลงทำให้ค่าความคงตัวของวัคซีนไวรัสหัตถลดลงตามระยะเวลาและอุณหภูมิที่สูงขึ้น

การประเมินความคงตัวในระยะสั้นที่อุณหภูมิต่าง ๆ หลังจัดเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

เมื่อเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และตรวจสอบความคงตัวที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4, 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ (ภาพที่ 2) พบว่าที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ วัคซีนไวรัสหัดยังคงให้ค่าความแรงที่ดีเมื่อเทียบกับค่าความแรงเฉลี่ยก่อนการจัดเก็บที่ 5.29 logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร (ตาราง 3) เช่นเดียวกับการทดสอบที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 1 สัปดาห์ เนื่องจากการลดลงของค่าความแรงไม่เกิน 1 logCCID₅₀ นั่นคือ 4.29 logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร จึงถือว่าวัคซีนไวรัสหัดยังคงมีค่าความคงตัวที่ดีที่อุณหภูมิดังกล่าว ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลการทดลองที่ได้ในภาพที่ 1 และภาพที่ 2 ให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกันในสภาวะเร่งทั้งอุณหภูมิและระยะเวลาที่ทำการทดสอบ แสดงว่าการประเมินความคงตัวของวัคซีนไวรัสหัดที่จัดเก็บที่อุณหภูมิ -70 และ -20 องศาเซลเซียส ให้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการจัดเก็บที่ใดที่หนึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพความคงตัวในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งข้อมูลงานวิจัยที่ได้นี้จะประโยชน์สนับสนุนการขนส่งในกรณีเกิดปัญหาในระบบห่วงโซ่ความเย็นว่าวัคซีนหัดอ้างอิงมาตรฐานจะมีความคงตัวสามารถใช้งานได้ แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในการขนส่ง โดยเปรียบเทียบระหว่างระยะและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามเนื่องจากวัคซีนมาตรฐานสากลมักไม่กำหนดวันหมดอายุ⁽¹⁾ แต่จะต้องมีการตรวจสอบค่าความแรงเพื่อประเมินความคงตัวในระยะยาว ร่วมกับการจัดทำแนวโน้มค่าความแรงของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเพื่อเป็นข้อมูลต่อการใช้งาน และการจัดเตรียมใหม่กรณีค่าความแรงต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้หลังการสอบเทียบ

สรุป

ในการควบคุมคุณภาพค่าความแรงของวัคซีนหัด จำเป็นต้องมีวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสำหรับวัคซีนหัดมาใช้ในการทดสอบทุกครั้ง เพื่อความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบที่สามารถเทียบได้กับห้องปฏิบัติการอื่นๆ ได้อย่างมีมาตรฐาน ดังนั้นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานควรมีคุณสมบัติเก็บไว้ใช้ได้นาน โดยยังคงให้ค่าความแรงที่ดีอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ วัคซีนไวรัสหัดได้จากการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero แล้วนำมาทำแห้งในสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพหลังการทำแห้งที่สำคัญคือ ลักษณะทางกายภาพ ความชื้นที่หลงเหลือ และค่าความแรงในสภาวะเร่ง นอกจากนี้ยังตรวจสอบตัวแปรอื่นๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบ เช่น ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการบรรจุ ระยะเวลาในการละลายด้วยน้ำกลั่น ค่า pH และการปราศจากเชื้ออื่นๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย รา และมัยโคพลาสมา ผลการทดสอบวัคซีนไวรัสหัดที่เตรียมได้ สามารถนำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานได้ เนื่องจากสูตรตำรับที่เตรียมขึ้นให้ลักษณะทางกายภาพที่ดี มีค่าความชื้นหลงเหลือต่ำร้อยละ 1.50 ค่าความแรงสูง 5.29 logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิลิตรโดยมีการสูญเสียค่าความแรงหลังการทำแห้งเพียงร้อยละ 6.62 เมื่อศึกษาตัวแปรอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง พบว่ามีความแปรปรวนของการบรรจุร้อยละ 0.35 ระยะเวลาในการละลายหลังจากเติมน้ำกลั่นใช้เวลาประมาณ 1.38 นาที ค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากหลังการทำแห้ง นอกจากนี้ไม่พบการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆ เช่น แบคทีเรีย รา และมัยโคพลาสมา เมื่อศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูงขึ้น ในระยะเวลาต่างๆ กัน โดยเก็บวัคซีนใน 2 สภาวะคือ -70 และ -20 องศาเซลเซียส พบว่าวัคซีนไวรัสหัดเมื่อเป็นผงแห้งสามารถจัดเก็บที่ -70 หรือ -20 องศาเซลเซียส ได้โดยให้ค่าความแรงที่ไม่แตกต่างกันในสภาวะเร่ง สำหรับการประเมินความคงตัว พบว่าการจัดเก็บวัคซีนไวรัสหัดที่ -70 หรือ -20 องศาเซลเซียส วัคซีนจะสูญเสียค่าความแรงมาก

ตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น และระยะเวลา ที่นานขึ้น ซึ่งเกณฑ์การยอมรับคือค่าความแรงต้องไม่ลดลงมากกว่า 1 logCCID₅₀ ของค่าความแรงปกติที่ 5.29 logCCID₅₀ ต่อ 0.5 มิลลิลิตร จึงจะถือว่าวัคซีนไวรัสหัดยังคงมีค่าความคงตัวที่ดี จากผลการจัดเตรียมวัคซีนไวรัสหัดเพื่อศึกษาประสิทธิภาพหลังการทำแห้งและประเมินความคงตัวในสภาวะเร่ง พบว่าวัคซีนไวรัสหัดนี้มีความคงตัวที่ดีในสภาวะการจัดเก็บที่ -70, -20 และ 4 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 12 สัปดาห์ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพค่าความแรงของวัคซีนหัดได้ แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องตรวจสอบค่าความแรงที่อุณหภูมิจัดเก็บจริงเป็นระยะๆ เพื่อศึกษาความคงตัวในระยะยาวและติดตามแนวโน้มค่าความแรงของวัคซีนหัดอ้างอิงมาตรฐานต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัทองค์การเภสัชกรรมเมอร์ริเออร์ชีววัตถุ จำกัด ที่ให้การสนับสนุนเซลล์เพาะเลี้ยง Vero (African Green Monkey Kidney cell) ทำให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้

เอกสารอ้างอิง

- World Health Organization. WHO expert committee on biological standardization. Fifty-fifth report. WHO technical report series 932. Geneva: World Health Organization; 2004.
- Rey L, May JC, editors. Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. Second edition, Revised and Expanded. New York: Marcel Dekker; 2004.
- Jennings TA. Lyophilization: Introduction and basic principles. New York: Informa Healthcare USA, Inc; 2008.
- อัครชัย อาเมน, จิรเดช ปัจฉิม, พรหมฉัตร เจริญพัฒน์, ณัฐกานต์ มั่งงามทรัพย์, สุภาพร ภูมิอมร. การศึกษาหาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการทำแห้งวัคซีนคางทูมอ้างอิงมาตรฐาน. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2553; 52:97-111.
- Zheng Y, Lai X, Bruun SW, Ipsen H, Larsen JN, Løwenstein H, et al. Determination of moisture content of lyophilized allergen vaccine by NIR spectroscopy. J Pharm Biomed Anal 2008;46;592-6.
- World Health Organization. Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO expanded programme on immunization. Geneva: World Health Organization; 1997.
- Phumiamorn S, Kullabutra K, Chaimee S, Jivapaisarnpong T. Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures: Comparison between DNA fluorochrom staining and PCR amplification methods. Thai Pharm Sci 2006;30;82-92.
- สุกัลยาณี เทพภูธร, สุภาพร ภูมิอมร. การประเมินความถูกต้องของวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ อมัยโคพลาสมาในเซลล์เพาะเลี้ยง. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2551;50;87-102.
- World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization: Annex 3; Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccines (live). Forty-third report. WHO technical report series 840. Geneva: World Health Organization; 1994.
- World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization: Annex 5; Requirements for measles vaccine (live). Thirty-eighth report. WHO technical report series 771. Geneva: World Health Organization; 1988.
- สุภาพร ภูมิอมร, อัครชัย อาเมน, จิรเดช ปัจฉิม, สิริรัตน์ ร่มพร, สุกัลยาณี ไชยมี. การประเมินความคงตัวของวัคซีน บีซีจีชนิดผงแห้งสำหรับใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในประเทศ. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2557;23:369-80.

Abstract: Efficiency of Freeze-Drying and Stability in Stress Conditions of Measles Vaccine Reference Standard

Teeranart Jivapaisarnpong, B.Sc.; Jiradej Patchim, B.Sc.; Assajun Amen, B.Sc.; Natthakarn Mingngamsup, B.Sc.; Supaporn Phumiamorn, B.Sc., M.Sc., Ph.D.

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Maeung District, Nonthaburi, 11000

Journal of Health Science 2015;24:161-73.

Vaccine reference standards are used by a national control laboratory for quality control of vaccine products. The purpose is to use vaccine reference standard calibrated against an international reference standard for being control of testing results in laboratory. Therefore, testing vaccine samples should always be tested in parallel with a vaccine reference standard. In this study, a measles virus vaccine was prepared in the laboratory by virus cultivation on monolayer of Vero cells and a known viral titer was formulated with a suitable formula of the freeze-drying process in order to store it for a long time. After freeze-drying, the efficiency of freeze-dried vaccine was performed on determination of physical characteristics, moisture content, and potency as well as other related parameters before evaluating the stability of the vaccine in stress conditions. The test results showed that the lyophilized measles vaccine had good physical characteristics, a low residual moisture content of 1.50% and a high potency value of 5.29 logCCID₅₀/0.5 milliliter. Tests on other parameters revealed that the variation of filling was 0.35%, reconstitution time was approximately 1.38 minutes and pH value was 7.32; and the vaccine was free from bacterial, fungal and mycoplasma contamination. The stability test of the vaccine in stress conditions at higher temperatures (4, 20, 37 and 45°C) after various time periods (1, 2, 3, 4, 6, 8 and 12 weeks) by storage the vaccine at -70°C and -20°C showed that the vaccine potency values were not different. Therefore, the vaccine can be stored at either -70°C or -20°C. However, the vaccine kept at -70°C or -20°C was found to lose potency at higher temperatures and longer storage time. Conversely, the vaccine showed good stability at -70°C, -20°C and 4°C for 12 weeks, indicating by the loss of the vaccine potency was not more than 1 logCCID₅₀ of the normal potency value at 5.29 logCCID₅₀/0.5 milliliter. The study confirmed that the measles virus vaccine prepared in the laboratory can be used as a vaccine reference standard for the control of potency values of measles vaccine, whereas in real storage conditions, the vaccine potency values should be continuously monitored to evaluate the long-term stability of the vaccine.

Key words: measles virus vaccine, vaccine reference standard, potency, stability