วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 27 ฉบับที่ 4 กรกฎาคม - สิงหาคม 2561

Journal of Health Science
Vol. 27 No. 4, July - August 2018

*นิพนธ์ต้นฉบับ* *Original Article*

# การจัดทำวิธีวิเคราะห์เพื่อการควบคุมคุณภาพวัคซีนไข้เลือดออกชนิดเชื้อเป็นลูกผสม

**วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม วท.ม. (ชีวเคมี)**
**พยอม เอกศิริ วท.ม. (ภูมิคุ้มกันวิทยา)**
**ชลดา เพชรไทย วท.บ. (จุลชีววิทยา)**
**กรพงศ์ ภิญโญสุขี สพ.บ.**
**นงเยาว์ สมเดช วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)**
*สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข*

**บทคัดย่อ** การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจัดทำวิธีตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัคซีนไข้เลือดออก ชนิดเชื้อเป็นลูกผสมสี่สายพันธุ์ ซึ่งเป็นวัคซีนไข้เลือดออกตัวแรกของโลกที่มีการขึ้นทะเบียนจำหน่าย ให้ครบรายการทดสอบตามข้อกำหนดของผู้ผลิตและแนวทางขององค์การอนามัยโลก ขั้นตอนประกอบด้วย วิเคราะห์ช่องว่างเพื่อระบุวิธีที่ต้องพัฒนาและจัดเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีและจัดทำมาตรฐานวิธีวิเคราะห์ ผลการศึกษาพบว่ามีรายการทดสอบที่ต้องจัดทำวิธีวิเคราะห์ขึ้นในห้องปฏิบัติการได้แก่ การตรวจเอกลักษณ์ ความแรง และความคงตัวของวัคซีนไข้เลือดออกในเซลล์วีโร และการตรวจปริมาณน้ำโดยวิธี Coulometric ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจเอกลักษณ์ ความแรง และความคงตัวของวัคซีนในเซลล์วีโรพบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะต่อเชื้อเดงกี่ ซีโรทัยป์ 1, 2, 3 และ 4 วิธีมีความเป็นเส้นตรง สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ($r^2$) >0.996 ความเที่ยงมีค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) น้อยกว่า 5 และความแม่นมีค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ใกล้เคียง 100 ทุกซีโรทัยป์ ผลการทวนสอบวิธี Coulometric ในการตรวจความชื้น พบมีความแม่น และความเที่ยง โดยร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่า 1 และ 10 ตามลำดับ ขณะที่ผลทวนสอบวิธีตรวจความปราศจากเชื้อโดยวิธี Membrane filtration และเอนโดทอกซินโดยวิธี LAL kinetic chromogenic พบว่า วิธีมีความเหมาะสมนำมาตรวจวัคซีนไข้เลือดออกได้ มีความแม่นในการตรวจเอนโดทอกซินได้ค่าร้อยละการคืนกลับ 89.0 ความเที่ยงมีค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่า 3 ที่ระดับเจือจาง 1:100 สรุปได้ว่าจากการศึกษานี้สามารถจัดทำวิธีตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัคซีนไข้เลือดออกชนิดเชื้อเป็นลูกผสมสี่สายพันธุ์ได้ครบทุกรายการตามเกณฑ์ข้อกำหนดของผู้ผลิตซึ่งสอดคล้องกับแนวทางของสากล เพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคให้สามารถเข้าถึงและได้รับวัคซีนที่มีคุณภาพความปลอดภัยตามมาตรฐาน

*คำสำคัญ:* **วิธีวิเคราะห์, คุณภาพ, วัคซีนไข้เลือดออก**

## บทนำ

โรคไข้เลือดออกเป็นโรคติดต่อที่มียุงลายเป็นพาหะ เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (dengue virus) ซึ่งเป็น single - strand RNA virus จัดอยู่ในสกุล Flavivirus และวงศ์ Flaviviridae มี 4 ซีโรทัยป์ คือ DEN-1, DEN-2, DEN-3 และ DEN-4 ทั้ง 4 ซีโรทัยป์ มีแอนติเจนร่วมบางชนิด จึงทำให้มี cross reaction และ cross protection บางส่วน โรคนี้ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของ

ประเทศไทย ปัจจุบันพบการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวาง มีการติดเชื้อและกลายเป็นโรคประจำถิ่นมากกว่า 100 ประเทศทั่วโลก ทั้งในประเทศเขตร้อนและเขตอบอุ่น (subtropical) ในทวีปอาฟริกา ทวีปอเมริกา ประเทศในแถบเมดิเตอร์เรเนียนตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแปซิฟิกตะวันตก[1,2] เนื่องจากยังไม่มียารักษาโรค ผู้ติดเชื้อบางรายอาจมีอาการรุนแรงถึงเสียชีวิต ดังนั้น มาตรการการป้องกันไม่ให้เกิดโรคจึงมีความสำคัญ มีการรณรงค์กำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายและให้ความรู้กับประชาชนและเจ้าหน้าที่ แต่ก็ยังมีรายงานผู้ติดเชื้ออย่างต่อเนื่อง วัคซีนจึงเป็นความหวังที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพอีกทางหนึ่ง

มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาวัคซีนไข้เลือดออกมาอย่างต่อเนื่องยาวนาน วัคซีนตัวแรกชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ของซีโรทัยป์ DEN-1 มีการรายงานการศึกษาทางคลินิคตั้งแต่ปี พ.ศ. 2497[3] แต่ไม่ได้มีการผลิตเพื่อจำหน่าย จนกระทั่งปีพ.ศ. 2559 จึงมีวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกที่ผลิตจากประเทศฝรั่งเศสที่ผ่านขั้นตอนการศึกษาในมนุษย์และพร้อมนำมาขึ้นทะเบียนใช้ ในหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย จึงถือว่าเป็นวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกตัวใหม่ (novel vaccine) ชนิดแรกของโลกที่ผลิตเพื่อการจำหน่าย วัคซีนดังกล่าวเป็นวัคซีนเชื้อเป็นลูกผสม (live-chimeric vaccine) ที่ใช้เทคนิคการตัดต่อยีนของไวรัสเดงกี่ก่อโรคส่วน pre-membrane and envelope proteins ของแต่ละซีโรทัยป์ได้แก่ ซีโรทัยป์ DEN-1, DEN-2, DEN-3 และ DEN-4 เข้ากับยีนของไวรัสไข้เหลือง (yellow fever virus) พัฒนาเป็นไวรัสเดงกี่ลูกผสมสายพันธุ์วัคซีน 4 ซีโรทัยป์[4] ที่สามารถนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในเซลล์วีโรเพื่อให้ผลิตแอนติเจนของเชื้อไวรัสไข้เลือดออกที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันป้องกันโรคได้ครอบคลุมไวรัสทั้ง 4 ซีโรทัยป์ องค์การอนามัยโลกได้ออกแนวทางในการควบคุมคุณภาพความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัคซีนไข้เลือดออกชนิดเชื้อเป็น 4 สายพันธุ์ ในปี พ.ศ.2556 ซึ่งระบุรายการทดสอบวัคซีนไข้เลือดออกชนิดเชื้อเป็นในวัคซีนสำเร็จรูป (finished product) เพื่อการควบคุมคุณภาพ จำนวน 11 รายการ[5] และในการขึ้นทะเบียนวัคซีนของประเทศไทยจะต้องมีการตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัคซีนสำเร็จรูปโดยสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพวัคซีนภาครัฐแห่งเดียวของประเทศเพื่อยืนยันคุณภาพวัคซีนที่นำมาขึ้นทะเบียน

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจัดทำวิธีตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัคซีนไข้เลือดออกชนิดเชื้อเป็นลูกผสมให้ได้ครบตามรายการทดสอบและเกณฑ์ข้อกำหนดในวัคซีนสำเร็จรูปของผู้ผลิตและองค์การอนามัยโลก[5] เพื่อให้ผู้บริโภคได้เข้าถึงวัคซีนที่มีคุณภาพความปลอดภัยตามมาตรฐาน ผ่านการตรวจสอบโดยวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องเชื่อถือได้ ซึ่งวิธีวิเคราะห์ที่จัดทำขึ้นนี้ยังใช้สำหรับตรวจสอบคุณภาพวัคซีนเพื่อให้การรับรองรุ่นการผลิตก่อนการจำหน่าย รวมทั้งใช้ตรวจวัคซีนที่มีปัญหาหรือข้อสงสัยในคุณภาพหลังการใช้

## วิธีการศึกษา

ใช้ตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออกชนิดเชื้อเป็นลูกผสม 4 ซีโรทัยป์ ของบริษัทผู้ผลิตซาโนฟี่-ปาสเตอร์ ประเทศฝรั่งเศส ในการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ โดยขั้นตอนการจัดทำวิธีวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก ประกอบด้วย

1. วิเคราะห์ช่องว่างเพื่อระบุวิธีวิเคราะห์ที่ต้องพัฒนาตรวจสอบความเหมาะสมหรือทวนสอบ โดยศึกษาและวิเคราะห์จากเกณฑ์ข้อกำหนดการควบคุมคุณภาพวัคซีนไข้เลือดออกตามแนวทางขององค์การอนามัยโลก[5] ร่วมกับข้อกำหนดเฉพาะของวัคซีนจากผู้ผลิตและประเมินศักยภาพในการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุ

2. จัดเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการเพื่อพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ตามรายการที่ได้จากการวิเคราะห์ช่องว่าง ซึ่งได้แก่ วิธีวิเคราะห์ความเป็นเอกลักษณ์ ความแรง และความคงตัวของวัคซีนในเซลล์เพาะเลี้ยงวีโร วิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำ วิธีตรวจวิเคราะห์ความ

ปราศจากเชื้อ และวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอนโดทอกซิน

3. ทำการตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมและตรวจสอบความถูกต้อง หรือทวนสอบวิธีวิเคราะห์ กับตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออกชนิดเชื้อเป็นลูกผสม 4 ซีโรทัยป์ ของผู้ผลิต

3.1 วิธีวิเคราะห์ความเป็นเอกลักษณ์ ความแรง และความคงตัวของวัคซีน: หลักการของวิธีคือตรวจหาปริมาณไวรัสไข้เลือดออกในเซลล์เพาะเลี้ยงวีโร (cell culture infectious dose assay) โดยเลี้ยงเซลล์วีโรในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม แล้วเติมตัวอย่างวัคซีนที่ต้องการทดสอบลงไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส แล้วตรึงเซลล์ด้วยอะซิโตน จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะของแต่ละซีโรไทยป์ (1, 2, 3 และ 4) แล้วใส่ anti-mouse alkaline phosphatase labeled antibody ลงไป จากนั้นเติมสารตั้งต้น BCIP/NBT จะเกิดปฏิกิริยาทำให้เห็นสีดำซึ่งแสดงว่ามีไวรัสไข้เลือดออกที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแต่ละซีโรทัยป์ นับจำนวนหลุมที่เกิดสีนำมาคำนวณหาความแรงของวัคซีนจากสูตรของ Spearman & Karber[6] เพื่อหาปริมาณไวรัสของแต่ละซีโรทัยป์ที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อร้อยละ 50 ต่อโด๊ส ($CCID_{50}$/dose) ทำการศึกษาความถูกต้องเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ในรายการ

- ความจำเพาะ (specificity): ทดสอบความสามารถของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับไวรัสไข้เลือดออกซีโรทัยป์เดียวกันและการจับข้ามกับต่างซีโรทัยป์โดยทำการทดสอบซ้ำของแต่ละคู่การทดสอบจำนวน 2 ซ้ำต่อความเข้มข้นไวรัส ทำการทดสอบ 3 ครั้งต่างวัน

- ความเป็นเส้นตรงและช่วงค่าการวิเคราะห์ (linearity and range): ทดสอบความเป็นเส้นตรงระหว่างค่าปริมาณไวรัส และค่าความเจือจางของวัคซีนควบคุม (CYD tetravalent validity control) ซึ่งมีไวรัสไข้เลือดออกทั้ง 4 ซีโรทัยป์ โดยเจือจางวัคซีนแบบ 4 เท่า (4-fold dilution) ที่ระดับความเจือจางตั้งแต่ $10^{-1.0}$-$10^{-7.0}$ แต่ละครั้งทดสอบ 8 ซ้ำต่อความเข้มข้นไวรัส ทำการทดสอบ 6 ครั้งในต่างวัน คำนวณสมการถดถอย (linear regression) สัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (coefficient of correlation, r) และสัมประสิทธ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, $r^2$) จากค่าปริมาณไวรัสที่ตรวจวัดได้ (measured infectious titer) และปริมาณไวรัสที่กำหนดไว้ (theoretical infectious titer) ของแต่ละซีโรทัยป์ในวัคซีนควบคุมที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ

- ความแม่น (accuracy): ทดสอบกับวัคซีนควบคุม (CYD tetravalent validity control) ที่ทราบค่าปริมาณไวรัสไข้เลือดออกทั้ง 4 ซีโรทัยป์ โดยเจือจางวัคซีนแบบ 4-fold dilution แต่ละครั้งทดสอบ 10 ซ้ำต่อความเข้มข้นไวรัส ทำการทดสอบ 6 ครั้งที่ทำในต่างวัน คำนวณค่าที่วิเคราะห์ได้เทียบกับค่าที่กำหนดไว้ของแต่ละซีโรทัยป์ รายงานร้อยละการคืนกลับ (% recovery)

- ความเที่ยง (precision): ตรวจสอบ 3 หัวข้อได้แก่ (1) การทำซ้ำในวันเดียว (repeatability): วิเคราะห์ตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออกซ้ำ 6 ครั้งโดยทำภายในวันเดียวกัน คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของปริมาณไวรัสแต่ละซีโรทัยป์ (2) การทำซ้ำต่างวัน (intermediate precision): วิเคราะห์ตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออกจำนวน 6 การทดสอบที่ทำต่างวัน คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของปริมาณไวรัสแต่ละซีโรทัยป์ (3) การทำซ้ำต่างห้องปฏิบัติการ (reproducibility): วิเคราะห์ตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออก 6 รุ่นการผลิตโดยห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุและผู้ผลิต ใช้สถิติวิเคราะห์ paired-t test ประเมินความต่างของผลวิเคราะห์แต่ละซีโรทัยป์ระหว่างห้องปฏิบัติการ

3.2 วิธีตรวจวิเคราะห์ความปราศจากเชื้อ: ใช้เทคนิคการกรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรอง (membrane filtration) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ระบุในตำรายาสากล[7] ทวนสอบในรายการ 1) การทำซ้ำต่างวัน: ทดสอบกับตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออก รุ่นการผลิตเดียวกันทำการทดสอบ 2 ครั้งต่างวัน จำนวน 2 รุ่นการผลิต 2) ศึกษาการเจริญของเชื้อจุลชีพ (growth effect) ในการทดสอบกับตัวอย่าง โดยแยกเติมเชื้อ *Candida albicans* และ *Staphylococcus aurues* ความเข้มข้น 10-100 CFU/ml ปริมาตร 0.1

ml ลงในหลอดทดสอบที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด tryptic soy broth (TSB) และ fluid thioglycolate medium (FTM) ตามลำดับ ซึ่งแต่ละหลอดมีตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบความปราศจากเชื้อมาแล้ว นำไปบ่มต่อที่ 30-35 °C อีก 3 วันและ 5 วันตามลำดับ

3.3 วิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอนโดทอกซินด้วย LAL kinetic chromogenic เป็นวิธีมาตรฐานที่ระบุในตำรายายุโรป[8] ทำการทวนสอบในรายการ (1) ความแม่น: เติมเอนโดทอกซินที่ทราบปริมาณลงในตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออก แล้วตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินทดสอบ 3 ครั้ง คำนวณค่าร้อยละการคืนกลับ (2) ความเที่ยง: ศึกษา 2 หัวข้อได้แก่ การทำซ้ำในวันเดียวโดยวิเคราะห์ปริมาณเอนโอทอกซินในตัวอย่างวัคซีนไข้-เลือดออกรุ่นการผลิตเดียว จำนวน 3 ครั้งในวันเดียวและการทำซ้ำต่างวัน โดยวิเคราะห์ปริมาณเอนโดทอกซินในตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออกรุ่นการผลิตเดียวกัน จำนวน 3 ครั้งต่างวัน คำนวณค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

3.4 วิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำ Coulometric Karl-Fischer titration เป็นวิธีมาตรฐานที่ระบุในตำรายา-สากล[9] ทำการทวนสอบในรายการ

1) ความแม่น: วิเคราะห์ปริมาณน้ำในสารมาตรฐาน Hydranal standard water ทดสอบ 6 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

2) ความเที่ยง: ทดสอบใน 2 หัวข้อได้แก่ การทำซ้ำในวันเดียว โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำในวัคซีนรุ่นการผลิตเดียวกัน จำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียว และการทำซ้ำต่างวันโดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำในวัคซีนรุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 6 ครั้ง ต่างวัน คำนวณค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปร-ปรวน

4. จัดทำมาตรฐานวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบ/ทวนสอบความถูกต้องเหมาะสมตามระบบคุณภาพเพื่อใช้เป็นมาตรฐานวิธีวิเคราะห์ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนป้องกันไข้เลือดออกชนิดเชื้อเป็นลูกผสมของประเทศ

## ผลการศึกษา

### การวิเคราะห์ช่องว่างเพื่อการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ผลวิเคราะห์ช่องว่างเพื่อระบุวิธีที่ต้องพัฒนาตรวจสอบความเหมาะสมหรือทวนสอบ พบว่า วิธีวิเคราะห์ที่ต้องจัดทำขึ้นในห้องปฏิบัติการคือ การตรวจวิเคราะห์ความเป็นเอกลักษณ์ ความแรง และความคงตัวของวัคซีนโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงวีโรตามวิธีของผู้ผลิตและวิธีตรวจปริมาณความชื้นด้วยวิธี Coulometric Karl Fisher titration และวิธีที่ต้องทำการทวนสอบกับตัวอย่าง คือ การตรวจความปราศจากเชื้อด้วยวิธี membrane filtration และการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินโดยวิธี LAL kinetic chromogenic

### การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ผลการศึกษาความถูกต้องเหมาะสมของวิธีการตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์และความแรงของวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกที่ทำการตรวจหาปริมาณไวรัส ($CCID_{50}$) โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงวีโร พบว่าผ่านเกณฑ์ยอมรับในทุกรายการที่ทดสอบ โดยในรายการความจำเพาะ พบว่าวิธีมีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสเดนกี่ทั้ง 4 ซีโรทัยป์ จากจำนวนหลุมที่เกิดสีที่แปรผันตามปริมาณของไวรัสแต่ละซีโรทัยป์ วิธีมีความเป็นเส้นตรงในช่วงค่าของการวิเคราะห์โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่น้อยกว่า 0.999 และ ค่าสัมประสิทธ์การตัดสินใจไม่น้อยกว่า 0.998 ของทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ผลการทดสอบความแม่นพบว่า มีค่าการคืนกลับของปริมาณไวรัสที่ตรวจวัดได้ของซีโรทัยป์ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 102, 101, 104 และ 101 ตามลำดับ ผลการศึกษาความเที่ยงเมื่อทำซ้ำวันเดียวกัน มีค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของซีโรทัยป์ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 2.81, 2.44, 3.19 และ 3.59 ตามลำดับ เมื่อทำซ้ำต่างวัน พบมีค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของซีโรทัยป์ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 3.27, 2.41, 3.68 และ 2.93 ตามลำดับ และเมื่อนำผลวิเคราะห์ค่าความแรงวัคซีนของแต่ละซีโรทัยป์ที่ตรวจจากห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุและห้องปฏิบัติการผู้ผลิตมาวิเคราะห์ทางสถิติ Paired-t-test พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 (ตารางที่ 1)

ผลการทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณ bacterial endotoxin ในตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกที่ระดับความเจือจาง 1:100 โดยวิธี LAL kinetic chromogenic ในรายการความแม่น พบว่า วิธีมีความแม่น ได้ค่าร้อยละการคืนกลับ 88.64 และมีความเที่ยงในการทำซ้ำในวันเดียวกันและต่างวัน ได้ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 2.05 และ 1.27 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์ยอมรับที่กำหนดไว้ว่าต้องไม่เกิน 10 (ตารางที่ 2)

ผลการทวนสอบวิธีตรวจวิเคราะห์ความปลอดเชื้อในการทำซ้ำต่างวันกันของวัคซีน 2 รุ่นการผลิต ที่ทำการทดสอบรุ่นการผลิตละ 2 ครั้ง ไม่พบการเจริญของเชื้อในหลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ FTM เมื่อทำการบ่มวัคซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อครบทั้ง 14 วัน และ เมื่อเติมเชื้อมาตรฐาน *Candida albicans* และ *Staphylococcus aurues* แยกลงในหลอดของ TSB และ FTM ที่ผ่านการเพาะบ่มกับวัคซีนมาแล้ว 14 วัน ตามลำดับ พบว่าเชื้อทั้งสองสามารถเจริญในอาหารได้ (ตารางที่ 3)

ผลการทวนสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำในวัคซีนไข้เลือดออกโดยวิธี Coulometric Karl-Fischer titration ในรายการความแม่นเมื่อตรวจวิเคราะห์กับสารมาตรฐาน Hydranal standard water ได้ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 5.04±0.00% และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 0.8 ผ่านเกณฑ์ยอมรับค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ตั้งไว้ ความเที่ยงเมื่อวิเคราะห์ซ้ำวันเดียวกัน และต่างวันได้ค่า

**ตารางที่ 1 รายการและผลการศึกษาความถูกต้องเหมาะสมของวิธีการตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์ และปริมาณไวรัส ($CCID_{50}$) ในวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงวีโร**

| รายการ | ผล | | | | เกณฑ์ยอมรับ | สรุปผล |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ซีโรทัยป์ 1 | ซีโรทัยป์ 2 | ซีโรทัยป์ 3 | ซีโรทัยป์ 4 | | |
| Specificity | ตามเกณฑ์ | ตามเกณฑ์ | ตามเกณฑ์ | ตามเกณฑ์ | จำนวนหลุมที่เกิดสีลดลงตามความเข้มข้มของไวรัสที่ลดลง | ผ่าน |
| Linearity and range | 1.000 | 0.999 | 0.999 | 0.999 | coefficient of correlation, r ≥0.998 | ผ่าน |
| | 1.000 | 0.998 | 0.999 | 0.998 | coefficient of determination, $r^2$≥0.996 | ผ่าน |
| Accuracy | 102 | 101 | 104 | 101 | % recovery: 80-120 | ผ่าน |
| Precision | | | | | | |
| Repeatability | 2.81 | 2.44 | 3.19 | 3.59 | %CV≤20 | ผ่าน |
| Intermediate precision | 3.27 | 2.41 | 3.68 | 2.93 | %CV≤20 | ผ่าน |
| Reproducibility | 0.848 | 0.480 | 0.175 | 0.114 | Paired-t test for equality of mean (sig-2 tailed, p-value=0.05) | ผ่าน |

**ตารางที่ 2 รายการและผลการทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณ bacterial endotoxin โดยวิธี LAL Kinetic chromogenic ในวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก ที่ระดับความเจือจาง 1:100**

| รายการ | ผล | เกณฑ์ยอมรับ | สรุปผล |
|---|---|---|---|
| Accuracy | 88.64 | % recovery: 50-200 | ผ่าน |
| Precision | | | |
| Repeatability | 2.05 | %CV≤10 | ผ่าน |
| Intermediate precision | 1.27 | %CV≤10 | ผ่าน |

ร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต่ำกว่า 10 ผ่านเกณฑ์ยอมรับ (ตารางที่ 4)

## วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของวัคซีนโดยห้องปฏิบัติการภาครัฐเป็นการตรวจยืนยันคุณภาพวัคซีนที่เป็นอิสระจากผู้ผลิตอีกครั้ง ให้มั่นใจว่าวัคซีนที่จะนำมาจดทะเบียนในประเทศนั้นมีคุณภาพตามที่ผู้ผลิตได้แสดงผลไว้ และมีมาตรฐานที่สอดคล้องกับมาตรฐานสากล การกำหนดรายการตรวจวิเคราะห์คุณภาพประกอบการขึ้นทะเบียนในแต่ละประเทศมีการปฏิบัติที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับบริบทและกฎหมายของแต่ละประเทศ สำหรับประเทศไทยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนดให้มีผลตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัคซีนสำเร็จรูป (finished product) จากสถาบันชีววัตถุเพื่อใช้ยื่นประกอบการขึ้นทะเบียน[10] ซึ่งรายการทดสอบและเกณฑ์ยอมรับที่สถาบันฯ ใช้พิจารณานั้นอ้างอิงมาจากรายการทดสอบของผู้ผลิตซึ่งต้องไม่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานหรือแนวทางที่องค์การอนามัยโลกกำหนดไว้ในวัคซีนแต่ละชนิด โดยภาพรวมรายการตรวจวิเคราะห์วัคซีนสำเร็จรูปนั้นจะมีความครอบคลุมในด้านเอกลักษณ์ ความแรงและความคงตัว ความปลอดภัย และการตรวจทางเคมี-ฟิสิกส์ของวัคซีน แต่เนื่องจากวัคซีนไข้เลือดออกชนิดนี้เป็นวัคซีนตัวแรกของโลกที่มีผลการศึกษาทางคลินิกสามารถนำมายื่นขึ้นทะเบียนได้โดยวัคซีนไม่ได้ผ่านการจดขึ้นทะเบียนในประเทศผู้ผลิตเนื่องจากไม่ใช่โรคระบาดในเขตยุโรป จึงไม่มีเกณฑ์กำหนดคุณภาพในตำรายาของประเทศแถบยุโรป รวมทั้งยังไม่วิธีวิเคราะห์ที่เป็นวิธีมาตรฐานสากลที่จำเพาะสำหรับวัคซีนไข้เลือดออก วิธีวิเคราะห์ที่สำคัญและจำเพาะได้แก่ การวิเคราะห์ความเป็นเอกลักษณ์ ความแรงและความคงตัวในอุณหภูมิสูงของวัคซีนจึงต้องใช้วิธีเช่นเดียวกับที่ผู้ผลิตใช้ทดสอบวัคซีน คือการทดสอบหาปริมาณไวรัสเดงกี่แต่ละซีโรทัยป์ในเซลล์เพาะเลี้ยงวีโร ทั้งนี้จะต้องนำมาพัฒนาปรับสภาวะและตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีในห้องปฏิบัติการ จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าวิธีตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์ความแรงที่จัดทำขึ้นนั้นผ่านเกณฑ์ยอมรับทุกพารามิเตอร์ อีกทั้งผลวิเคราะห์ความแรงในตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันระหว่างห้อง-

**ตารางที่ 3 ผลการทวนสอบวิธีวิเคราะห์ความปลอดเชื้อของวัคซีนไข้เลือดออกโดยวิธี membrane filtration**

| รายการ | | ผล | เกณฑ์ยอมรับ | สรุปผล |
|---|---|---|---|---|
| Intermediate precision | Vaccine Lot. 1 | ไม่พบการเจริญของเชื้อรา | ไม่มีการเจริญของเชื้อรา | ผ่าน |
| | Vaccine Lot. 2 | และแบคทีเรีย | และแบคทีเรีย | |
| Growth effect | Vaccine Lot. 1 | พบการเจริญ ของเชื้อ | มีการเจริญ ของเชื้อ | ผ่าน |
| | Vaccine Lot. 2 | *C.albicans* และเชื้อ *S. aurues* | *C. albicans* และเชื้อ *S. aurues* | |

**ตารางที่ 4 รายการและผลการทวนสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำในวัคซีนไข้เลือดออกโดยวิธี Coulometric Karl-Fischer titration**

| รายการ | ผล | เกณฑ์ยอมรับ | สรุปผล |
|---|---|---|---|
| Accuracy | 0.08 | %CV≤3% | ผ่าน |
| Precision | | | |
| Repeatability | 9.22 | %CV≤10 | ผ่าน |
| Intermediate precision | 6.95 | %CV≤10 | ผ่าน |

ปฏิบัติการของสถาบันฯและผู้ผลิตเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมของวิธีที่จะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์ ความแรงรวมถึงการตรวจวิเคราะห์ความคงตัวในอุณหภูมิสูง (thermal stability) ของวัคซีนไข้เลือดออกชนิดนี้ เนื่องจากการทดสอบความคงตัวนั้นมีขั้นตอนวิธีตรวจแบบเดียวกับค่าความแรง ยกเว้นการนำตัวอย่างไปเก็บในที่อุณหภูมิสูง 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำมาวิเคราะห์จึงสามารถใช้วิธีเดียวกันนี้ได้ ทั้งนี้ ยังมีข้อจำกัดที่ใช้ได้จำเพาะกับวัคซีนของผู้ผลิตรายเดียว เนื่องจากวิธีต้องใช้สารแอนติเจน แอนติบอดี รวมทั้งวัคซีนมาตรฐานที่จำเพาะกับผลิตภัณฑ์ในการวิเคราะห์ ซึ่งหากมีวัคซีนใหม่เข้ามา จะต้องทำการปรับสภาวะและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีให้เหมาะสมกับตัวอย่างก่อนนำไปใช้

การตรวจด้านความปลอดภัย และการตรวจทางเคมีฟิสิกส์ วิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในรายการเหล่านี้โดยส่วนใหญ่อ้างอิงวิธีในตำรายาหรือวิธีที่องค์การอนามัยโลกกำหนดเป็นวิธีมาตรฐานไว้ ซึ่งหน่วยงานมีวิธีการทดสอบที่สามารถดำเนินการได้ แต่จะต้องทำการทวนสอบในบางรายการเพื่อแสดงว่าวิธีที่ใช้นั้นมีความเหมาะสมกับตัวอย่างซึ่งได้แก่ วิธีวิเคราะห์ความปราศจากเชื้อ[11] ปริมาณเอนโดทอกซิน[12] และความชื้น โดยวิธีวิเคราะห์ความปราศจากเชื้อของวัคซีนที่เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการศึกษา ในตัวอย่างนี้ใช้วิธี membrane filtration มีข้อดีในเรื่องลดการรบกวนผลจากส่วนผสมอื่นในวัคซีนที่ถูกกรองออกไปแต่ราคาค่อนข้างสูง จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า วิธีตรวจวิเคราะห์ความปราศจากเชื้อแบบ membrane filtration ที่หน่วยงานใช้มีความเหมาะสมกับตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออกนี้ สามารถตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียได้

เอนโดทอกซินเป็นสารจำพวกไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่พบในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของการเกิดไข้ การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในหลอดทดลองเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ทดสอบกับวัคซีนแทนการทดสอบที่ใช้กระต่าย สามารถบ่งบอกถึงปริมาณการปนเปื้อนสารก่อไข้ในวัคซีน ผลการทวนสอบวิธี kinetic chromogenic ในการหาปริมาณเอนโดทอกซินแสดงให้เห็นว่าวิธีมีความถูกต้องแม่นยำสูงเมื่อใช้ตรวจวัคซีนนี้ที่ระดับความเจือจาง 1:100

การตรวจปริมาณความชื้นเป็นข้อกำหนดที่ต้องตรวจในวัคซีนผงแห้งทุกชนิดเนื่องจากมีผลต่อความคงสภาพและอายุของวัคซีนโดยส่วนใหญ่วัคซีนผงแห้งกำหนดเกณฑ์ยอมรับที่ปริมาณความชื้นไม่เกิน 3 เปอร์เซนต์ วิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจวัคซีนสามารถใช้วิธี Volumetric Karl-Fisher titration[13] หรือ Coulometric Karl-Fisher titration ซึ่งวิธีหลังนี้จะมีราคาสูง และใช้เวลาในการตรวจแต่ละตัวอย่างมากกว่าวิธีแรก แต่มีความไวในการตรวจน้ำปริมาณน้อย ๆ ได้ดี ผู้ผลิตบางรายก็เลือกใช้วิธีนี้ และเพื่อลดความต่างของผลวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ และเป็นการพัฒนาศักยภาพของหน่วยงานจึงได้ทำการทวนสอบวิธี Coulometric Karl-Fischer titration กับตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออกซึ่งเป็นวิธีเดียวกับผู้ผลิต ผลการทวนสอบวิธี แสดงให้เห็นความถูกต้องเหมาะสมของวิธีเมื่อตรวจกับสารมาตรฐานและตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออก

สำหรับรายการตรวจอื่น ๆ ที่ระบุอยู่ในข้อกำหนด การควบคุมคุณภาพวัคซีน ได้แก่ การตรวจลักษณะทางกายภาพ ออสโมลาลิตี้ ระยะเวลาการละลาย ความเป็นพิษทั่วไป ความเป็นกรด-ด่าง เป็นวิธีที่มีรายละเอียดระบุอยู่ในตำรายาสากล สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยใช้มาตรฐานวิธีตรวจวิเคราะห์ที่สถาบันฯ มีอยู่[14-18] ส่วนรายการตรวจการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะไม่ต้องทดสอบรายการนี้เนื่องจากไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะในขั้นตอนการผลิตวัคซีน จากการศึกษาครั้งนี้ได้จัดทำมาตรฐานวิธีวิเคราะห์ขึ้นใหม่ 2 ฉบับ ได้แก่ มาตรฐานวิธีวิเคราะห์เอกลักษณ์ความแรงและความคงตัวของวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก โดยวิธี $CCID_{50}$ และมาตรฐานวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำในวัคซีนไข้เลือดออก โดยวิธี Coulometric Karl-Fischer titration เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานของหน่วยงาน และได้ปรับรายละเอียดของมาตรฐานวิธี

วิเคราะห์ความปลอดเชื้อโดยวิธี membrane filtration และมาตรฐานวิธีวิเคราะห์ปริมาณ bacterial endotoxin ซึ่งมีอยู่เดิมให้ครอบคลุมถึงการตรวจวิเคราะห์วัคซีนไข้เลือดออกในการตรวจวิเคราะห์เพื่อการควบคุมคุณภาพวัคซีน ทำให้หน่วยงานมีศักยภาพ สามารถตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัคซีนไข้เลือดออกเชื้อเป็นลูกผสมได้ครบทุกรายการตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ซึ่งสอดคล้องกับแนวทางที่องค์การอนามัยโลกกำหนดไว้ สำหรับวัคซีนไข้เลือดออกชนิดเชื้อเป็นส่งผลให้ผู้บริโภคได้เข้าถึงวัคซีนที่มีคุณภาพความปลอดภัยตามมาตรฐานสากล และเป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานควบคุมคุณภาพวัคซีนของประเทศต่อไป

## สรุป

จากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพวัคซีนและยาชีววัตถุภาครัฐของประเทศไทย มีศักยภาพในการจัดทำและพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อการควบคุมคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกได้ครบถ้วนตามรายการที่กำหนดในเกณฑ์มาตรฐานวัคซีนของผู้ผลิต และสอดคล้องกับแนวทางข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก โดยวิธีวิเคราะห์เอกลักษณ์ ความแรง และความคงตัวของวัคซีนในเซลล์เพาะเลี้ยงวีโร และการตรวจปริมาณความชื้นโดยวิธี Coulometric Karl-Fischer titration ที่ได้จัดทำขึ้น รวมทั้งวิธีตรวจความปราศจากเชื้อด้วยวิธี membrane filtration และการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินโดยวิธี LAL kinetic chromogenic ที่ได้ทำการทวนสอบผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีกับตัวอย่างวัคซีนไข้เลือดออกตามระบบคุณภาพมีประโยชน์ได้นำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานเพื่อการควบคุมคุณภาพวัคซีนไข้เลือดออกชนิดเชื้อเป็นลูกผสมของประเทศต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

*ขอขอบคุณคุณอัจฉริยา ทรงธนนิตย์ คุณสุภาวดี สายเสนา คุณอิศราวุธ แสงภักดี เจ้าหน้าที่กลุ่มวัคซีน เจ้าหน้าที่สถาบันชีววัตถุทุกท่าน รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของบริษัทผู้ผลิตที่มีส่วนร่วมให้การดำเนินงานสำเร็จด้วยดี และขอบคุณ ดร. สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการ สถาบันชีววัตถุ และคุณธีรนารถ จิวะไพศาลพงศ์ ท่านที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำปรึกษา สนับสนุนการดำเนินงานจนบรรลุตามวัตถุประสงค์*

## เอกสารอ้างอิง

1. Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, MoPH, Thailand. ไข้เลือดออก [internet]. [cited 2018 Apr 16]. Available from: http://www.boe.moph.go.th/fact/Dengue_Haemorrhagic_Fever.htm
2. World Health Orgainzation. Dengue and severe dengue fact sheet [internet]. 2017 [cited 2018 Apr 16]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/
3. Edelman R. Dengue Vaccines Approach the Finish Line. Clinical Infectious Diseases [internet]. 2007 [cited 2018 Apr 16]; 45: S56-S60. Available from: https://academic.oup.com/cid/article/45/Supplement_1/S56/357828
4. World Health Organization. Dengue vaccine: WHO position paper-July 2016. Weekly epidemiology record [internet]. 2016 [cited 2017 Nov 12]; 91:349-64. Available from: http://www.who.int/wer/2016/wer9130.pdf?ua=1
5. WHO expert committee on biological standardization sixty-second report. Annex 2: Guidelines on the quality, safety and efficacy of dengue tetravalent vaccines (live, attenuated). WHO Technical Report Series No. 979 [internet]. 2013 [cited 2018 Apr16]. Available from : http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/TRS_979_Annex_2.pdf?ua=1
6. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. World J Virol [Internet] 2016 [cited 2018 Jul 25];5(2):85-6. Available from: https:/

/www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4861875/

7. The United states pharmacopeial convention. <71> Sterility test. In: USP 39-NF34 Vol.1. Baltimore: United book press, Inc; 2016. P 136-43.
8. The European directorate for the quality of medicines & healthcare of the council of Europe. 2.6.14. Bacterial endotoxins. In: European pharmacopoeia. 9th ed. Vol.1. Nördlingen: Druckerei C.H. Beck; 2017. p. 204-8.
9. The United states pharmacopeial convention. <921> Water determination. In: USP 39-NF34 Vol.1. Baltimore: United book press, Inc; 2016. P.750-4.
10. กลุ่มยาชีววัตถุ กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. คู่มือ/หลักเกณฑ์การ ขึ้นทะเบียนตำรับชีววัตถุ (biological products) แบบ ASEAN Harmonization [อินเทอร์เน็ต]. [สืบค้นเมื่อ 7 มิ.ย. 2560]. แหล่งข้อมูล: http://drug.fda.moph.go.th/zone_service/files/
11. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การตรวจวิเคราะห์ความปลอดเชื้อโดยวิธี membrane filtration. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จดูรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: Full Forse; 2558. หน้า 70-3.
12. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. SOP for determination of bacterial endotoxin by kinetic chromogenic method. Rev. No. 6. นนทบุรี: สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2559.
13. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำ. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จดูรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: Full Forse; 2558. หน้า 41-3.
14. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การตรวจวิเคราะห์คุณลักษณะทั่วไป. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จดูรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: Full Forse; 2558. หน้า 38-40.
15. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณออสโมแลลิตี. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จดูรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: Full Forse; 2558. หน้า 47-8.
16. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. SOP for determination of dissolving time. Rev. No. 2. นนทบุรี: สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2554.
17. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การตรวจวิเคราะห์ความเป็นพิษ. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จดูรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: Full Forse; 2558. หน้า 75-7.
18. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การวัดค่า pH. ใน: วิชชุดา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จดูรกิตตินันท์ และคณะ, บรรณาธิการ. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: Full Forse; 2558. หน้า 64-5.

**Abstract: Establishment of Analytical Methods for Quality Control of Live-Chimeric Dengue Vaccine**

**Wereyarmarst Jaroenkunathum, M.Sc. (Biochemistry); Payom Agsiri, M.Sc. (Immunology); Chonlada Pethai, B.Sc. (Microbiology); Koraphong Pinyosukee, (D.V.M. ); Nongyao Somdach, M.Sc.(Tropical Medicine)**

*Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand*

*Journal of Health Science 2018;27:719-28.*

The objective of this study was to establish the analytical methods for quality control of live-chimeric dengue tetravalent vaccine, the first novel dengue vaccine in the world which could be submitted for marketing authorization according to manufacturer's specification and WHO's guidelines. The study steps included gap analysis for identification of method needed, laboratory preparedness, method verification or validation and establishment of standard method operating procedures. It was found that the method for identity, potency, stability in vero cell as well as water content by coulometric method were needed to be developed and validated/verified in our lab. The method validation of identity, potency and stability testing revealed that there were specificity against dengue serotype 1, 2, 3 and 4. The linearity showed coefficient of determination value ($r^2$) >0.996 whereas precision presented percent of coefficient of variation (%CV) <5 and accuracies were close to 100% for all serotypes. The method verification of water content presented %CV <1 and <10 for accuracy and precision respectively. Sterility test by membrane filtration and endotoxin content by LAL kinetic chromogenic confirmed suitability of the method and vaccine. Endotoxin test presented accuracy of recovery 89% and precision of %CV <3 at sample dilution of 1:100. It can be concluded that from these studies, all analytical methods for quality control of live-chimeric dengue vaccine were established according to manufacturer and international standards for consumer protection to access and obtain a qualified and safe vaccine.

***Key words:*** **analytical method, quality, dengue vaccine**