

การประเมินความคงตัวของวัคซีนบีซีจีชนิดผงแห้ง สำหรับใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในประเทศ

สุภาพร ภูมิอมร วท.บ., วท.ม., วท.ด.

อัศจรรย์ อาเมน วท.บ.

จิรเดช ปัจฉิม วท.บ.

สิรินัดดา ร่วมพร วท.บ.

สุกัลยาณี ไชยมี วท.บ., วท.ม.

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ หน่วยงานควบคุมกำกับของรัฐในประเทศจำเป็นต้องจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเพื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพค่าความแรงของวัคซีนที่ใช้ในประเทศ ดังนั้นจึงได้มีการจัดเตรียมวัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานเพื่อให้มีระยะเวลาการใช้ได้ในระยะยาว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมร่นการผลิตอย่างต่อเนื่องของวัคซีนบีซีจีที่ผลิตในประเทศ ดำเนินการศึกษาโดยนำวัคซีนบีซีจีชนิดน้ำที่ได้รับจากผู้ผลิตมาแบ่งบรรจุขวดและทำแห้งแบบเยือกแข็งในห้องปฏิบัติการ และควบคุมคุณภาพในพารามิเตอร์ที่สำคัญพร้อมทั้งประเมินความคงตัวของวัคซีน ผลการศึกษาพบว่าวัคซีนบีซีจีผงแห้งมีลักษณะทางกายภาพที่ดี มีความชื้นร้อยละ 0.86 มีค่าความแรงที่ได้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานระหว่าง $2 - 26 \times 10^6$ cfu/มิลลิลิตร มีความสามารถในการละลายประมาณ 100 วินาทีโดยปราศจากความแตกต่างของค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างก่อนและหลังการทำแห้ง (pH 6.93 และ pH 6.97) และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา แบคทีเรียและมัยโคพลาสมา เมื่อนำมาประเมินความคงตัวที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสในระยะยาว วัคซีนบีซีจียังคงให้ค่าความแรงได้นานกว่า 2 ปี ที่ทำการศึกษา แสดงให้เห็นว่า วัคซีนมีความคงตัวที่ยังไม่เสื่อมสลายที่ -70 องศาเซลเซียส และเมื่อเก็บวัคซีนในสภาวะเร่ง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า วัคซีนมีความคงตัวที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส นานกว่า 16 สัปดาห์ และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นานกว่า 8 สัปดาห์ ในขณะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บได้นานเพียง 4 สัปดาห์ วัคซีนที่เก็บที่อุณหภูมิสูง (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์) นำไปสู่ค่าความแรงที่ลดลง เนื่องจากจำนวนเชื้อที่นับได้ต่ำกว่าร้อยละ 20 แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ สามารถยืนยันว่าวัคซีนยังคงให้ค่าความแรงนาน 2 ปี ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นวัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐาน

คำสำคัญ: วัคซีนบีซีจี, บีซีจีอ้างอิงมาตรฐาน, วัคซีนผงแห้ง, ความคงตัว

บทนำ

การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) เป็นวิธีการทำแห้งที่สามารถคงคุณลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ได้ดี⁽¹⁾ จึงมีการนำวิธีการทำแห้งมาใช้กับงานหลายประเภท ไม่ว่าจะเป็น

ด้านการเกษตร อาหาร เครื่องสำอาง เภสัชกรรม และการแพทย์⁽²⁻⁶⁾ วัคซีนจัดเป็นยาชีววัตถุที่ได้จากสิ่งมีชีวิตมีขั้นตอนการผลิตมีความแปรปรวนสูง รวมทั้งการตรวจวิเคราะห์คุณภาพไม่สามารถวิเคราะห์ได้โดยวิธีทางเคมีเพียงอย่างเดียว ต้องอาศัยการตรวจทางชีววิธี (bioassay)

ในการกำหนดค่าความแรง⁽⁷⁻¹⁰⁾ และทั่วไปโครงสร้างระดับโมเลกุลของวัคซีนส่วนใหญ่เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนแอนติเจน ซึ่งค่อนข้างไวต่อการเสื่อมสลายจากความร้อน ดังนั้น การทำแห้งแบบเยือกแข็ง นอกจากจะรักษาคุณลักษณะของไกลโคโปรตีนแอนติเจนไม่ให้เสื่อมสลายง่ายแล้ว ยังมีประโยชน์ในแง่การเก็บรักษาง่าย สะดวกต่อการขนส่ง และมีความคงตัว สามารถเก็บได้นาน⁽¹⁾ ปัญหาที่พบคือบางครั้งวัคซีนบีซีจีผงแห้งจากผู้ผลิตมีอายุการใช้งานสั้น ทำให้ต้องมีการสอบเทียบค่าใหม่ ซึ่งส่งผลให้การรับรองรุ่นการผลิตต้องหยุดชะงักเพื่อรอการเตรียมวัคซีนมาตรฐานใหม่ ซึ่งใช้เวลาอย่างน้อย 2-3 เดือน และโดยปกติวัคซีนสำเร็จรูปชนิดผงแห้งโดยทั่วไปสามารถเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 2-3 ปี^(11,12) แต่การจัดเตรียมวัคซีนที่นำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน จำเป็นต้องมีการจัดเก็บที่นานและมีปริมาณที่มากพอที่จะใช้ในระยะเวลาหลายปีโดยที่วัคซีนยังคงมีความคงตัวสูงกว่าวัคซีนทั่วไป^(1,6) องค์การอนามัยโลกได้เห็นความสำคัญของการจัดเตรียมวัคซีนมาตรฐานสากลชนิดผงแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีน จึงได้กำหนดให้ห้องปฏิบัติการสากลขององค์การอนามัยโลก ซึ่งได้แก่ National Institute of Biological Standardization for Control (NIBSC), CLB/Sequins Foundation, Netherlands และ Staten, Denmark เป็นแหล่งผลิตวัคซีนมาตรฐานสากลเพื่อแจกจ่ายให้กับห้องปฏิบัติการของหน่วยงานภาครัฐทั่วโลก ปัญหาคือ องค์การอนามัยโลกสามารถให้วัคซีนมาตรฐานสากลได้ในปริมาณที่จำกัด ซึ่งไม่เพียงพอต่อการใช้งาน ด้วยเหตุผลดังกล่าว องค์การอนามัยโลกจึงแนะนำให้หน่วยงานที่เป็นผู้กำกับคุณภาพวัคซีนของรัฐจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานขึ้นเองในห้องปฏิบัติการเป็น working reference standard preparation หรือ in-house reference standard สำหรับการควบคุมคุณภาพวัคซีนของแต่ละประเทศ⁽¹¹⁾ ทำให้ผู้ผลิตของประเทศและหน่วยงานควบคุมกำกับของรัฐใช้วัคซีนอ้างอิงชนิดเดียวกัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการลดความขัดแย้งของผลการทดสอบระหว่างสองห้องปฏิบัติการ ต่างจากในอดีตที่หน่วยงานผู้ผลิตและหน่วย

งานควบคุมกำกับภาครัฐใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่แตกต่างกัน ทำให้ไม่มีเกณฑ์มาตรฐานในการตัดสินผลการผลการทดสอบให้ค่าความแรงแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดของสองห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นสำหรับหน่วยงานควบคุมคุณภาพวัคซีนของประเทศในภาครัฐต้องจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเพื่อใช้ร่วมกันกับผู้ผลิต

วัคซีนป้องกันโรควัณโรคหรือวัคซีนบีซีจีเป็นวัคซีนหนึ่งที่ประเทศไทยผลิตและใช้ในประเทศเป็นเวลานาน การควบคุมคุณภาพวัคซีนก่อนจำหน่ายในแต่ละรุ่นการผลิต (lot release) จำเป็นต้องใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานทุกครั้งที่มีการทดสอบความแรงของวัคซีนบีซีจี การจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเพื่อใช้เป็น working reference standard preparation หรือ national reference standard ร่วมกับผู้ผลิตในประเทศในการควบคุมคุณภาพวัคซีนบีซีจี ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความคงตัวทั้งในสภาวะปกติและสภาวะเร่ง เพื่อประเมินว่าวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่จัดเตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการมีความคงตัวที่ดี เหมาะสำหรับนำมาใช้ในประเทศในอนาคต

วิธีการศึกษา

วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเดิมที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

วัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการรุ่นการผลิต บีซีจี 130110 เป็นวัคซีนเชื้อเป็น จัดเตรียมโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย และใช้งานร่วมกันระหว่างหน่วยควบคุมกำกับของรัฐและผู้ผลิต ผ่านการทดสอบค่าความแรงร่วมกับวัคซีนบีซีจีมาตรฐานสากลขององค์การอนามัยโลก รุ่นการผลิต บีซีจี 07/272 ซึ่งกำหนดค่าความแรง 125×10^6 colony forming unit (cfu)/หลอด เตรียมขึ้นโดย National Institute of Biological Standards and Control (NIBSC) ประเทศสหราชอาณาจักร โดยความแรงที่ประกาศค่าร่วมกันอยู่ระหว่าง $2 - 26 \times 10^6$ cfu/มิลลิลิตร

วัคซีนบีซีจีจากผู้ผลิต

วัคซีนบีซีจีชนิดน้ำ เตรียมโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

วัสดุอุปกรณ์

- เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง รุ่น Lyolab, LT ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่อง Karl Fischer สำหรับวัดปริมาณความชื้นในวัคซีน
- ไซโกสแต เบอร์ 0
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein Jensen medium (DIFCO, Cat. No. 244420)
- สารทำลายวัคซีน Sauton solution

การบรรจุ

บรรจุวัคซีนบีซีจีตามสูตรตำรับจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย โดยบรรจุปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในขวดแก้วใส (Borosilicate glass type I) ขนาด 3 มิลลิลิตรด้วย automatic dispenser ใช้ tip ขนาด 10 มิลลิลิตร และปิดขวดด้วยจุกยางในระดับครึ่งจุกยาง ภายใต้อากาศปลอดเชื้อ

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ทำการศึกษากระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยใช้เครื่องทำแห้งรุ่น Lyolab, LT ซึ่งได้ปรับสภาวะการทำแห้งมาจากการทำแห้งวัคซีนเจือมาตรฐาน⁽¹³⁾ เพื่อหาสภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมสำหรับวัคซีนบีซีจี โดยตั้งโปรแกรมกำหนดให้อุณหภูมิเยือกแข็งเท่ากับ -60 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง จากนั้นในขั้นปฐมภูมิของกระบวนการทำแห้งก็เพิ่มอุณหภูมิเป็น 0 องศาเซลเซียส ปรับความดันเท่ากับ 300 mTorr นาน 36 ชั่วโมง และในขั้นทุติยภูมิของกระบวนการทำแห้ง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปรับความดันเท่ากับ 0 mTorr (ตารางที่

ตารางที่ 1 การกำหนดสถานะการทำแห้ง

ตัวแปร	Freezing step		Primary drying process		Secondary drying process	
อุณหภูมิของการทำแห้ง (องศาเซลเซียส)	-60 (slope)	-60	0 (slope)	0	35 (slope)	35
ระยะเวลา (นาที)	10	480	60	2160	60	300
ความดัน (mtorr)	-	-	300	300	0	0

1)

การประเมินประสิทธิภาพการทำแห้ง

ก่อนการทำแห้ง

สุ่มชั่งน้ำหนักขวดก่อนและหลังบรรจุตัวอย่าง จำนวนอย่างละ 6 ขวดเพื่อหาน้ำหนักก่อนการทำแห้ง วัคซีนบีซีจีที่บรรจุ เพื่อพิจารณาค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% Coefficient of Variation - %CV) ของการแบ่งบรรจุ

หลังการทำแห้ง

นำวัคซีนบีซีจีที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มาประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนบีซีจีหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยตรวจสอบลักษณะภายนอกของผงแห้งด้วยตาเปล่า⁽⁶⁾ และตรวจสอบหาปริมาณความชื้นโดยวิธี Karl Fischer⁽¹⁴⁾ พร้อมกับการศึกษาตัวแปรอื่นๆ ตามลำดับ ดังนี้ (1) ตรวจสอบค่าความแรงโดยวิธีการตรวจนับ จำนวนแบคทีเรียบีซีจีในอาหารเลี้ยงเชื้อ (total particle count)^(15,16) หลังการทำแห้ง (2) ตรวจสอบสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการแบ่งบรรจุโดยสุ่มชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบก่อนและหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (3) การตรวจสอบระยะเวลาการละลายตัวด้วยน้ำกลั่น (reconstitution time)⁽¹⁾ (4) ตรวจสอบความแปรต่างโดยเครื่อง pH meter ผลการตรวจสอบตัวแปรดังกล่าวนำมาหาค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean - GM) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าร้อยละ สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของการบรรจุเพื่อแสดงความเที่ยงของการประเมินประสิทธิภาพหลังการทำแห้ง พร้อมทั้งตรวจสอบการปราศจากการปนเปื้อน

ของเชื้อรา แบคทีเรีย (sterility test) ตามมาตรฐานสากล โดยใช้เชื้อมาตรฐานสากลเป็นตัวควบคุมผลบวก⁽¹⁷⁾ และตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อมัคโคพลาสมาโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction)⁽¹⁸⁾

วิธีการเตรียมองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

- การเตรียมอาหาร

ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein Jensen ปริมาณ 37.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร ที่มี glycerol (Sigma, Cat. No. G5150) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร นำไปต้มจนกระทั่ง Lowenstein Jensen medium ละลายก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นอุ่นที่อุณหภูมิ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อผสมรวมกับไข่ไก่สด

- การเตรียมไข่ไก่สด

นำไข่ไก่สดเบอร์ 0 (ประมาณ 18 ใบ) มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น และเช็ดด้วย 70% alcohol ก่อนใส่ในบีกเกอร์ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไข่ตอกลงไป ในบีกเกอร์ปราศจากเชื้ออีกใบหนึ่งปริมาตรประมาณ 1.1 ลิตร นำไปปั่นในเครื่องผสมสารที่ปราศจากเชื้อ ตวงใส่ กระจกบดวงให้มีปริมาตร 1 ลิตร

- การเตรียมส่วนผสมเพื่อใช้เลี้ยงเชื้อบิซีจี

นำอาหารที่เก็บที่อุณหภูมิ 45 - 60 องศาเซลเซียส นำมาผสมไข่ไก่สดที่ปั่นแล้ว ผสมให้เข้ากันโดยใช้แท่งแม่เหล็กกวนสาร แบ่งใส่หลอดทดลองฝาเกลียวปราศจากเชื้อหลอดละ 8 มิลลิลิตรโดยใช้เครื่องจ่ายสาร วางเอียงใน rack จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 45 - 50 นาที เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์เพื่อให้ผิวหน้าแห้งสนิท ก่อนนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียมสารทำลายวัคซีนในอาหารเลี้ยง

Sauton

ซึ่งและผสมสารเคมีต่าง ๆ ได้แก่ L-asparagine

monohydrate 1.125 กรัม Citric acid tri-sodium salt dehydrate 0.5 กรัม K_2HPO_4 anhydrate 0.125 กรัม $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.125 กรัม Ferric ammonium citrate 0.0125 กรัม glycerin 19 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน จากนั้นเจือจางสารละลายเป็น 1:4 ด้วยน้ำกลั่น และปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.3 - 7.4 โดยใช้ 1M NH_4OH หรือ 1M Citric acid จากนั้นแบ่งใส่ขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การศึกษาค่าความแรงของวัคซีนบิซีจี

ละลายวัคซีนบิซีจีผงแห้งที่เตรียมขึ้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่กำหนด ดังตารางที่ 2 จากนั้นนำวัคซีนที่เจือจางได้ในพลาสติก C, D และ E มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพลาสติก C และ D จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 5 หลอด และ พลาสติก E จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 10 หลอด ปริมาณของสารละลาย วัคซีนที่ใช้ต่อหลอดเท่ากับ 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตแก้วขนาด 1 มิลลิลิตรในการหยดสารละลายวัคซีน และเกลี่ยสารละลายในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อให้ซึมลงในผิวหน้าอาหารจนแห้ง ปิดฝาหลอดให้แน่น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดเวลานำออกมานับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วนำไปคำนวณผลโดยใช้โปรแกรมการคำนวณที่สร้างขึ้นในโปรแกรม Microsoft Excel การทดสอบค่าความแรงของวัคซีนจะทำการทดสอบควบคู่ไปกับวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเดิมที่ได้จากการสอบเทียบค่ามาแล้วรุ่นการผลิต บิซีจี 130110 โดยผลการทดสอบจะยอมรับได้เมื่อค่าความแรงของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานอยู่ในช่วงค่าที่กำหนด ($2 - 26 \times 10^6$ cfu/มิลลิลิตร) เท่านั้น

การประเมินความคงตัวที่อุณหภูมิปกติ -70 องศาเซลเซียส ในระยะยาว

วัคซีนบิซีจีที่เตรียมขึ้นได้ถูกนำมาจัดเก็บที่อุณหภูมิ

ตารางที่ 2 การเจือจางวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสากล และวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานระดับประเทศ

	ปริมาตรของวัคซีน (มิลลิลิตร)	อาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton (มิลลิลิตร)	พลาสติก	ความเจือจาง
วัคซีนก่อนการเจือจาง	1.0	99.0	A	$1 : 10^2$
พลาสติก A	1.0	99.0	B	$1 : 10^4$
พลาสติก B	2.0	2.0	C	$1 : 2 \times 10^4$
พลาสติก B	2.0	6.0	D	$1 : 4 \times 10^4$
พลาสติก B	1.0	7.0	E	$1 : 8 \times 10^4$

-70 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าที่อุณหภูมิทั่วไปที่เก็บวัคซีนตัวอย่างสำหรับฉีดในคน เพื่อประเมินความคงตัวในระยะยาวที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส โดยการตรวจสอบค่าความแรงที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้ 1 ปี 1 ปี 5 เดือน 1 ปี 7 เดือน 1 ปี 10 เดือน และ 2 ปี

การประเมินความคงตัวของอุณหภูมิต่าง ๆ

ในการประเมินความคงตัวของวัคซีนบีซีจีที่จะนำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในประเทศนั้น วัคซีนบีซีจีผงแห้งได้ถูกจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และตรวจสอบความคงตัวที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ -20, 4, 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 16 สัปดาห์ โดยเก็บวัคซีนบีซีจีอ้างอิงมาตรฐานจำนวน 3 หลอดในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กันและนำมา 1 หลอด เพื่อตรวจสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง เทียบกับค่าความแรงที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสไปพร้อมกัน โดยทำการเจือจางวัคซีนตาม ตารางที่ 2 และนำวัคซีนที่เจือจางได้ในพลาสติก C, D และ E มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพลาสติก C และ D จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 5 หลอด และ พลาสติก E จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 10 หลอด ปริมาณของสารละลายวัคซีนที่ใช้ต่อหลอดเท่ากับ 0.1 มิลลิลิตร สำหรับที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 45 องศาเซลเซียส เนื่องจากปริมาณ

เชื้อบีซีจีรอดชีวิตจะมีน้อยกว่าที่อุณหภูมิต่ำมาก จะนำวัคซีนที่เจือจางได้ในพลาสติก B, C และ D มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อแทน โดยในพลาสติก B และ C จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 5 หลอด และ พลาสติก E จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 10 หลอดโดยใช้ปิเปตแก้วขนาด 1 มิลลิลิตรในการหยดสารละลายวัคซีน และเกลี่ยสารละลายในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อให้ซึมลงในผิวหน้าอาหารจนแห้ง ปิดฝาหลอดให้แน่น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดเวลานำออกมานับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วนำไปคำนวณผลโดยใช้โปรแกรมการคำนวณที่สร้างขึ้นในโปรแกรม Microsoft Excel การทดสอบค่าความแรงของวัคซีนจะทำการทดสอบควบคู่ไปกับวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานระดับประเทศ รุ่นการผลิต BCG 130110 โดยผลการทดสอบจะยอมรับได้เมื่อค่าความแรงของวัคซีนมาตรฐานที่ใช้ควบคุมอยู่ในช่วงค่าที่กำหนด ($2 - 26 \times 10^6$ cfu/มิลลิลิตร) เท่านั้น และค่าความคงตัวของวัคซีนบีซีจีจะผ่านเกณฑ์มาตรฐานสากลได้ เชื้อที่รอดชีวิตต้องมากกว่าร้อยละ 20⁽¹⁶⁾

การคำนวณ

การคำนวณค่าความแรงของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสามารถคำนวณได้จากสูตรขององค์การอนามัยโลก⁽¹⁹⁾

ผลการศึกษา

1. การประเมินประสิทธิภาพการทำแห้ง

1.1 ลักษณะทางกายภาพหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

จากการทำแห้งวัคซีนบีซีจี พบลักษณะทางกายภาพของผงแห้ง (ภาพที่ 1) มีลักษณะเป็นก้อนสีขาวแห้งอัดแน่นเมื่อเคาะไม่เกิดการยุบตัวและไม่แตกเป็นชั้นๆ

1.2 ผลการตรวจหาปริมาณความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้ง

ผลการตรวจหาปริมาณความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้งของวัคซีนบีซีจีผงแห้ง พบว่าจากการสุ่มตรวจจำนวน 4 หลอด พบมีปริมาณความชื้นเฉลี่ยร้อยละ 0.87 ซึ่งต่ำกว่าค่าความชื้นของวัคซีนทั่วไป (ตารางที่ 3)

1.3. ผลการทดสอบตัวแปรอื่นๆ

ผลการทดสอบสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการแบ่งบรรจุโดยสุ่มตรวจจำนวน 6 หลอด พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 0.57 ส่วนตัวแปรอื่นๆได้สุ่มตรวจจำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่าความสามารถในการละลายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100 วินาที (%CV=11.53) ค่า pH ก่อนและหลังทำแห้งไม่แตกต่างกันมีค่าเท่ากับ 6.93 (%CV=0.55) และ 6.97 (%CV=0.74) และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา แบคทีเรียและมัยโคพลาสมาในวัคซีนบีซีจีผงแห้ง (ตารางที่ 4)

1.4. การทดสอบค่าความแรงหลังการทำแห้ง

การตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีผงแห้งเป็นตัวแปรที่สำคัญต่อการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการและเป็นตัวบ่งบอกประสิทธิภาพของการทำแห้ง ตารางที่ 5 แสดงค่าความแรงเฉลี่ยของวัคซีนบีซีจีที่เก็บที่อุณหภูมิปกติ -70 องศาเซลเซียส จากการทดสอบจำนวน 3 ครั้งที่เป็นอิสระแก่กัน ได้ค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 22.52×10^6 cfu/มิลลิลิตร

2. การทดสอบค่าความแรงที่อุณหภูมิปกติ -70 องศาเซลเซียส ในระยะยาว

วัคซีนผงแห้งจะถูกจัดเก็บที่อุณหภูมิปกติ -70 องศาเซลเซียสในระยะยาวเพื่อดูวันหมดอายุของวัคซีนบีซีจี

รูปที่ 1 ลักษณะทางกายภาพหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง*



*ลักษณะผงแห้งของวัคซีนบีซีจีเป็นก้อนสีขาวเนื้อละเอียด

ตารางที่ 3 การตรวจหาปริมาณความชื้นที่หลงเหลือภายหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ครั้งที่	ปริมาณความชื้น (%) (n=4)
1	0.82
2	1.03
3	0.91
4	0.70
GM	0.86
SD	0.14
%CV	16.20

ผลการทดสอบในระยะเวลาพบว่าวัคซีนที่เก็บนานถึง 1 ปี 1 ปี 5 เดือน 1 ปี 7 เดือน 1 ปี 10 เดือน จนกระทั่ง 2 ปี ค่าความแรงที่ได้เป็น 15.39×10^6 cfu/ มิลลิลิตร, 16.52×10^6 cfu/มิลลิลิตร, 15.39×10^6 cfu/มิลลิลิตร, 22.52×10^6 cfu/มิลลิลิตรและ 17.96×10^6 cfu/มิลลิลิตร ซึ่งยังให้ค่าความแรงที่ได้อยู่ในช่วงค่าที่กำหนด (ตารางที่ 6)

3. การประเมินความคงตัวของวัคซีนบีซีจีผงแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ

เมื่อนำวัคซีนบีซีจีผงแห้งมาเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิต่ำกว่าปกติคือ -20, 4, 20, 37 และ 45

องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน เทียบกับการเก็บในสภาวะปกติที่ -70 องศาเซลเซียสเมื่อนำมาศึกษาค่าความคงตัวในสภาวะเร่งเทียบกับค่าความแรงที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อดูร้อยละของเชื้อที่รอดชีวิต ผลการทดลองพบว่า การเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 16 สัปดาห์ วัคซีนมีความแข็งแรง 16.47×10^6 cfu/มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละของเชื้อรอดชีวิตประมาณ 100 ใกล้เคียงกับการเก็บวัคซีนที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ ซึ่งค่าความแรงเกือบเท่าเดิมเท่ากับ 16.70×10^6 , 12.70×10^6 cfu/

มิลลิลิตร ร้อยละของเชื้อรอดชีวิต ประมาณ 80 ในขณะที่การเก็บวัคซีนที่ 20 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ค่าความแรงลดลงเล็กน้อยเท่ากับ 14.24×10^6 , 11.63×10^6 , 10.14×10^6 และ 11.61×10^6 cfu/มิลลิลิตรโดยมีร้อยละของการรอดชีวิตใกล้เคียงกัน ร้อยละ 80.68, 76.01, 66.27 และ 70.26 ตามลำดับ ซึ่งค่าความแรงไม่แตกต่างจากการเก็บที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 และ 2 สัปดาห์ (ค่าความแรงเป็น 12.07×10^6 cfu/มิลลิลิตรและ 10.57×10^6 cfu/มิลลิลิตร) มีร้อยละของการรอดชีวิตประมาณ 75 และ

ตารางที่ 4 การทดสอบตัวแปรอื่น ๆ *

สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการแบ่งบรรจุ (%CV) (n= 6)	ระยะเวลาในการละลายด้วยน้ำกลั่น (วินาที) (n= 6)	pH (n=3) ^a ก่อนทำแห้ง (n= 6)	pH (n= 3) ^b หลังทำแห้ง (n= 6)	การทดสอบความแรง ^c ($\times 10^6$ cfu/มิลลิลิตร) (n= 3)	การทดสอบความปราศจากเชื้อ ^d (n= 6)
0.57	GM 100.00 SD 11.53 % CV 11.53	GM 6.93 SD 0.04 % CV 0.55	GM 6.97 SD 0.05% CV 0.74	GM 22.52 SD 1.98 %CV 8.8	ไม่พบ

* ผลการทดสอบตัวแปรอื่น ๆ เพื่อนำมาใช้ยืนยันว่าวัคซีนบีซีจีนี้เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในห้องปฏิบัติการต่อไป โดยทำการสุ่มตรวจพารามิเตอร์ที่สำคัญดังนี้, a เป็นค่า pH ก่อนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งก่อนทำแห้งแบบเยือกแข็งวัคซีนบีซีจี มี pH อยู่ระหว่าง 6.89- 6.96 (n= 6), b เป็นค่า pH หลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งหลังทำแห้งแบบเยือกแข็งวัคซีนบีซีจี มี pH อยู่ระหว่าง 6.93-6.97 (n= 6), ส่วน c เป็นค่าความแรงเฉลี่ย ซึ่งค่าความแรงที่ได้ควรอยู่ระหว่าง $12.67- 24.18 \times 10^6$ cfu/มิลลิลิตร, d เป็นการทดสอบความปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งเชื้อรา แบคทีเรียและมัยโคพลาสมา

ตารางที่ 5 การทดสอบค่าความแรงหลังการทำแห้ง*

ครั้งที่	ค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีผงแห้ง ($\times 10^6$ cfu/มล.)
1	23.05
2	24.18
3	20.32
GM	22.52
SD	1.98
%CV	8.80

* หลังการทำแห้งวัคซีนบีซีจี จะถูกนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ก่อนการทดสอบค่าความแรง

ตารางที่ 6 การประเมินความคงตัวของอุณหภูมิปกติ -70 องศาเซลเซียสในระยะยาว*

ระยะเวลา	ค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีผงแห้ง ($\times 10^6$ cfu/มล.)
1 ปี	15.39
1 ปี 5 เดือน	16.52
1 ปี 7 เดือน	15.39
1 ปี 10 เดือน	22.52
2 ปี	17.96

* หลังการทำแห้ง วัคซีนบีซีจี จะถูกนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสในระยะยาวเพื่อประเมินความคงตัวของวัคซีน

64 แต่ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ ความแรงลดลงเหลือ 6.78×10^6 cfu/มิลลิลิตร ร้อยละของเชื้อรอดชีวิตเหลือเท่ากับ 39 อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ ร้อยละของเชื้อรอดชีวิตลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 5 เช่นเดียวกับการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ มีเชื้อรอดชีวิตเหลือเพียงประมาณร้อยละ 7 (ตารางที่ 7) ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ว่าค่าความคงตัวของวัคซีนบีซีจีตามมาตรฐานสากลจะต้องมีเชื้อที่รอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 20

วิจารณ์

การจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในประเทศมีจุดประสงค์เพื่อต้องการนำมาใช้เป็นชีววัตถุมาตรฐานในห้องปฏิบัติการของประเทศที่มีผู้ผลิตและหน่วยงานควบคุมกำกับของรัฐใช้ในการควบคุมคุณภาพค่าความแรงของวัคซีนในแต่ละรุ่นการผลิต เพื่อลดปัญหาการตัดสินผลกรณีที่ค่าความแรงของห้องปฏิบัติการของผู้ผลิตและของหน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐมีความแตกต่างกัน จากการนำวัคซีนจากผู้ผลิต

ตารางที่ 7 การประเมินความคงตัวของอุณหภูมิต่าง ๆ*

ระยะเวลา	ค่าความแรงของวัคซีนบีซีจีแห่งที่อุณหภูมิต่าง ๆ ($\times 10^6$ cfu/มล.)/(ร้อยละของเชื้อรอดชีวิต)*				
	-20°C	4°C	20 °C	37 °C	45 °C
1 สัปดาห์	ND	ND	ND	P = 16.52 S = 12.07 (73.09%)	P = 17.18 S = 1.13 (6.58%)
2 สัปดาห์	ND	P = 18.27 S = 16.70 (91.40%)	P = 18.24 S = 14.74 (80.68%)	P = 16.52 S = 10.52 (63.95%)	ND
4 สัปดาห์	ND	ND	P = 15.39 S = 11.63 (76.01%)	P = 17.18 S = 6.78 (39.48%)	ND
6 สัปดาห์	ND	ND	P = 15.39 S = 10.14 (66.27%)	P = 15.39 S = 0.86 (5.19%)	ND
8 สัปดาห์	ND	ND	P = 16.52 S = 11.61 (70.26%)	ND	ND
16 สัปดาห์	P = 15.39 S = 16.47 (107.02%)	P = 15.39 S = 12.70 (83.01%)	ND	ND	ND

* ความคงตัว (Stability, S) ของวัคซีนบีซีจี หาได้จากค่าความแรง (Potency, P) ของวัคซีนที่หลงเหลือหลังการเก็บวัคซีนในอุณหภูมิต่าง ๆ โดยตรวจสอบร้อยละของเชื้อรอดชีวิตเทียบกับค่าความแรงของวัคซีนที่เก็บอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ค่าความแรงของวัคซีนที่ได้ต้องอยู่ในช่วงค่าที่กำหนดระหว่าง $2 - 26 \times 10^6$ cfu/มล. และค่าความคงตัวจะผ่านเกณฑ์มาตรฐานสากล ค่าร้อยละของเชื้อที่รอดชีวิตต้องมากกว่าร้อยละ 20, P หมายถึงค่าความแรงของวัคซีนที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส S หมายถึงค่าความคงตัวที่ได้จากการเก็บในสภาวะเร่ง ND (Not Done) หมายถึงไม่ได้ทำการทดสอบ

มาทำแห้งในห้องปฏิบัติการ และตรวจสอบคุณสมบัติของวัคซีนหลังการทำแห้งพบว่า วัคซีนบีซีจีผงแห้งที่เตรียมขึ้นมีลักษณะทางกายภาพที่ดีเป็นผงแห้งอัดแน่นเมื่อเคาะไม่เกิดการยุบตัวและไม่แตกเป็นชิ้น เรียกลักษณะเป็น uniform distribution⁽⁶⁾ ส่วนการตรวจสอบปริมาณความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้ง ซึ่งเป็นตัวแปรหนึ่งที่สำคัญสำหรับการทำแห้งวัคซีนเพราะจะเป็นตัวบ่งบอกถึงความคงตัวของวัคซีน^(1,6,13) ดังนั้นการทำแห้งแบบเยือกแข็งจำเป็นต้องตรวจสอบปริมาณความชื้นหลังการทำแห้ง โดยทั่วไปวัคซีนสำเร็จรูปชนิดผงแห้ง (lyophilized products) จะต้องมีปริมาณความชื้นระหว่างร้อยละ 1- 5 ขึ้นกับชนิดของวัคซีนและผลิตภัณฑ์⁽¹⁷⁾ NIBSC ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ผลิตสารอ้างอิงมาตรฐานทางชีววัตถุให้กับองค์การอนามัยโลก สามารถเตรียมสารอ้างอิงมาตรฐานสากลที่มีปริมาณความชื้นต่ำประมาณร้อยละ 0.1- 2.9 และสามารถใช้ได้มากกว่า 10-20 ปี ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดวัคซีนหรือชีววัตถุและสารผสมที่ใช้⁽¹⁾ จากการทดสอบปริมาณความชื้นของวัคซีนบีซีจีแบบผงแห้งที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการพบว่าปริมาณความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 3 โดยอยู่ที่ร้อยละ 0.86 (ตารางที่ 3) จึงทำให้เชื่อได้ว่า วัคซีนน่าจะมียุการใช้งานนานหลายปี เมื่อตรวจสอบตัวแปรอื่น ๆ พบว่าวัคซีนที่แบ่งบรรจุลงในหลอดมีความเป็นเนื้อเดียวกันเนื่องจากให้สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของการแบ่งบรรจุเท่ากับร้อยละ 0.57 ความสามารถในการละลายเฉลี่ย 100 วินาที ค่าความเป็นกรด-ด่าง ก่อนและหลังการทำแห้งไม่แตกต่างกันเท่ากับ 6.93 (%CV เท่ากับ 0.55) และ 6.97 (%CV เท่ากับ 0.74) และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา แบคทีเรียและมัยโคพลาสมา (ตารางที่ 4) เมื่อตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนหลังการทำแห้งพบว่าวัคซีนผงแห้งให้ค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 22.52×10^6 cfu/มิลลิลิตรโดยตรวจสอบค่าความแรงหลังเก็บในอุณหภูมิปกติ -70 องศาเซลเซียส ค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 16.35×10^6 cfu/มิลลิลิตร (ตารางที่ 6) ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วงค่าของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเดิมที่ผลิตจากผู้ผลิตในประเทศระหว่าง

$12.67 \times 10^6 - 24.18 \times 10^6$ cfu/มิลลิลิตร แสดงว่าวัคซีนบีซีจีที่เตรียมขึ้นมีค่าความแรงดี และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสในระยะยาวเพื่อดูวันหมดอายุ พบว่าวัคซีนบีซีจีผงแห้งยังคงให้ค่าความแรงที่ดีอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานมากกว่า 2 ปี (ตารางที่ 7) นั่นคือวัคซีนบีซีจีชนิดผงแห้งยังมีความคงตัวที่ดีและมีอายุการใช้งานได้อย่างน้อย 2 ปี ส่วนการประเมินความคงตัวในสภาวะเร่งที่จัดเก็บวัคซีนในอุณหภูมิสูงกว่าปกติทั้งในระยะสั้นและยาวเพื่อดูแนวโน้มของการเสื่อมคุณภาพรวดเร็วมากน้อยเพียงใด ผลการทดสอบพบว่าค่าความคงตัวของวัคซีนบีซีจีผงแห้งเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ และนำค่าความแรงที่ได้มาเทียบกับค่าความแรงที่เก็บในสภาวะปกติ เพื่อหาค่าร้อยละของเชื้อรอดชีวิต ผลการทดสอบพบว่าในสภาวะปกติคือที่ -70 องศาเซลเซียส ค่าความแรงที่ได้หลังการทำแห้งอยู่ในเกณฑ์ค่ามาตรฐานของวัคซีนบีซีจี คือระหว่าง $2 - 26 \times 10^6$ cfu/มิลลิลิตร เมื่อเทียบค่าความแรงที่เก็บในอุณหภูมิต่างๆ ในสภาวะเร่งคือ -20, 4, 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่ระยะเวลาต่างๆกัน ผลการทดลองพบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 สัปดาห์ วัคซีนยังคงมีค่าความคงตัวที่ดี เนื่องจากมีเชื้อรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 100 และ 80 กล่าวคือ วัคซีนสามารถทนต่อความร้อนได้ดีที่สภาวะดังกล่าวมานานมากกว่า 16 สัปดาห์ ในขณะที่การเก็บวัคซีนที่ 20 องศาเซลเซียส ค่าความคงตัวที่ระยะเวลา 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ลดลงเล็กน้อย และมีเชื้อรอดชีวิตใกล้เคียงกัน ร้อยละ 76, 66 และ 70 ตามลำดับ แสดงว่าวัคซีนทนต่ออุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสได้นานมากกว่า 8 สัปดาห์ และทนต่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ถึง 4 สัปดาห์ เนื่องจากร้อยละของเชื้อรอดชีวิตเหลือร้อยละ 39 ในขณะที่ 6 สัปดาห์ วัคซีนไม่สามารถทนต่อความร้อนที่ 37 องศาเซลเซียส (ร้อยละของเชื้อรอดชีวิตเท่ากับ 5.19) เช่นเดียวกับการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนาน 1 สัปดาห์ (ร้อยละของเชื้อรอดชีวิตเท่ากับ 6.58) จากผลการทดสอบความคงตัวของวัคซีนบีซีจีสามารถสรุปได้ว่า วัคซีนบีซีจีผงแห้งสามารถนำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิง

มาตรฐานได้ เนื่องจากให้ความคงตัวที่ดีในอุณหภูมิปกติ นานถึง 2 ปี อย่างไรก็ตามความคงตัวของวัคซีนบีซีจี จะต้องติดตามต่อไปเพื่อดูความคงตัวของวัคซีนบีซีจี ที่จะนำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานว่ามีความ คงตัวนานที่สุดกี่ปี ส่วนในสภาวะเร่งวัคซีนสามารถทนต่อ ความร้อนได้ดีที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียสได้ นานมากกว่า 16 สัปดาห์ และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ได้นานกว่า 8 สัปดาห์ แต่สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้นาน 4 สัปดาห์

สรุป

การเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสำหรับวัคซีนบีซีจี เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพรณรงค์การผลิตของ วัคซีนบีซีจีในประเทศ ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องเตรียม วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่มีความคงตัวที่ดีโดยการทำแห้ง แบบเยือกแข็งและศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆรวมถึงความแรง และการประเมินความคงตัว เพื่อเป็นการยืนยันว่า วัคซีน บีซีจีผงแห้งมีความเหมาะสมต่อการ นำมาใช้เป็นวัคซีน อ้างอิงมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่าวัคซีนบีซีจีผงแห้ง ที่จัดเตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการมีค่าความแรงที่ดี หลังการทำแห้งและสามารถเก็บที่อุณหภูมิปกติ -70 องศาเซลเซียสได้นานมากกว่า 2 ปี และในสภาวะเร่ง ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกความคงทนของวัคซีนในสภาวะที่ วัคซีนเก็บในสภาพที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ผลการ ศึกษาวัคซีนบีซีจี พบว่าสามารถทนต่อความร้อนได้ดี ที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียสนานมากกว่า 16 สัปดาห์ และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นานกว่า 8 สัปดาห์ แต่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเก็บได้นานเพียง 4 สัปดาห์และวัคซีนจะไม่ทนต่ออุณหภูมิ 45 องศา-เซลเซียส เนื่องจากปริมาณเชื้อรอดชีวิตต่ำกว่าร้อยละ 20 เมื่อเก็บไว้นาน 1 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม ค่าความแรง และความคงตัวที่ได้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ คือ ระหว่าง $2 - 26 \times 10^6$ cfu/มิลลิลิตร ดังนั้น จากการศึกษาทำให้สามารถยืนยันได้ว่า วัคซีนบีซีจีชนิดผงแห้ง ที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการสามารถนำมาใช้เป็นวัคซีน อ้างอิงมาตรฐานในประเทศที่ผู้ผลิตและหน่วยงานควบคุม

กำกับของรัฐสามารถใช้ร่วมกันในการควบคุมรณรงค์ ผลิตวัคซีนบีซีจีของประเทศในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่ให้ความ อนุเคราะห์วัคซีนน้ำเพื่อนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง และขอบคุณนางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์ ผู้อำนวยการ สถาบันชีววัตถุที่ให้การสนับสนุนจนทำให้ผลงานวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Rey L, May JC. Freeze-drying/ lyophilization of pharmaceutical and biological products. Second edition, revised and expanded. New York: Marcel Dekker, Inc. 2004.
2. Singh SK, Upadhyay RC, Yadav MC, Tiwari M. Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures. Current Science 2004;87:568-70.
3. ปันณธร ภัทรสถาพรกุล. เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ตอนที่ 3). วารสารสมาคมเครื่องทำความเย็นไทย 2548;15:7-9.
4. Ohtomo T, Yamada T, Yoshida K. Outermost-cell-surface changes in an encapsulated strain of *Staphylococcus aureus* after preservation by freeze-drying. Applied and Environmental Microbiology 1988;54:2486-91.
5. Naddafi K, Moosavi GH, Mesdaghinia AR. Evaluation of lyophilization effects on operational parameters and characteristics of activated sludge. Iranian J Env Health SciEng 2004;1:20-5.
6. Jennings TA. Lyophilization: Introduction and basic principles. New York: Informa Healthcare USA, Inc; 2008.
7. กองชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ข้อกำหนดชีววัตถุ เล่มที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี: กราฟฟิคสเปซ; 2541.
8. กองชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ข้อกำหนดชีววัตถุ เล่มที่ 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี: กราฟฟิคสเปซ; 2545.

9. Metz B, Dobbelsteen G, Els C, Gun J, Levels L, Pol L, et al. Quality-control issues and approaches in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:227-38.
10. World Health Organization .Training manual: licensing, lot release, laboratory access. Geneva: World Health Organization; 2001.
11. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-fifth report. WHO Technical Report Series No. 932. Geneva: World Health Organization; 2005.
12. Zheng Y, Lai X, Bruun SW, Ipsen H, Larsen JN, Lowenstein H, et al. Determination of moisture content of lyophilized allergen vaccines by NIR spectroscopy. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008;46:592-6.
13. สกาลินไตรศิริวานิชณ์, กรณิกา กุลบุตร, อัจจรรย อามน, สุภาพร ภูมิอมร, อีรนารถ จิระไพศาลพงศ์. การเตรียมสารอ้างอิงมาตรฐานในรูปแบบผงแห้งสำหรับทดสอบวัคซีนป้องกันโรคไข้มองอักเสบเฉียบพลันเฉื่อย. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์* 2552;51:12-22.
14. Center for Biologics Evaluation and Research, Laboratory of Analytical Chemistry. Guideline for the determination of residual moisture in dried biological products. Bethesda, MD: Food and Drug Administration; 1990.
15. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-eighth report. WHO Technical Report Series No. 771. Geneva: World Health Organization; 1988.
16. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty second report. WHO Technical Report Series No. 979. Geneva: World Health Organization; 2013.
17. The co-operation of the drug committee and the food and drug administration of Thailand. Thai pharmacopoeia Vol I, Part 2. Bangkok: Text&Journal Publication; 1993.
18. สุกัลยาณี ไชยมี, สุภาพร ภูมิอมร. การประเมินความถูกต้องของวิธีปฏิบัติกริยาอุกโซ่โพลีเมอเรสในการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อมัยโคพลาสมาในเซลล์เพาะเลี้ยง. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์* 2551;50:87-102.
19. World Health Organization. *In vitro* assays of BCG products. WHO/TB/Technical Guide/77.9. Geneva: World Health Organization; 1977.

Abstract: Estimation of Stability of lyophilized BCG Vaccine for Use as an In-Country Reference Standard Vaccine

Supaporn Phumiamorn, B.Sc., M.Sc., Ph.D.; Assajun Amen, B.Sc.; Jiradej Patchim, B.Sc.; Sirinadda Rumporn, B.Sc.; Sukanlayanee Chaimee, B.Sc., M.Sc.

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences

Journal of Health Science 2014;23:369-80.

National control laboratory is necessary to prepare vaccine reference standard in order to quality control potency values in the country. Therefore, to prepare and use BCG vaccine for long that will be beneficial to continually lot-release control of BCG vaccine produced in the country. In the experiment, BCG vaccine in liquid form obtained from manufacturer was distributed into vials and prepared in a freeze-dried in laboratory and controlled the quality of necessary parameters, including estimation of stability of vaccine. It was found that lyophilized BCG vaccines showed good physical characteristics with moisture residue of 0.86%, potency values within an acceptable range ($2 - 26 \times 10^6$ cfu/ml) reconstitution time approximately 100 second without difference of pH values between before and after freeze dried (pH 6.93 and pH 6.97) as well as no contamination of fungi, bacteria and mycoplasma. When estimation of stability test at temperature -70°C for long term storage, lyophilized BCG vaccines were still potent till 2 years. It was shown that vaccines were stable, not deteriorated at -70°C during the study. When vaccine exposed at stress conditions, the result also indicated that BCG vaccines were stable at -20°C and 4°C for longer than 16 weeks and temperature at 20°C for longer than 8 weeks, while it was deteriorated at 37°C after 4 weeks. However, exposure at higher temperature (45°C for 1 week) led to deterioration of potency because of a percentage of culturable particles less than 20%. However, from this study it can be confirmed that estimation of stability for lyophilized BCG vaccines remain potent for 2 years, it indicates that it can be potent enough for being as an in-country reference standard vaccine.

Key words: BCG, BCG reference standard, freeze-dried, stability