

การประเมินคุณภาพและตรวจติดตามสายพันธุ์ย่อยของ วัคซีนบีซีจีสายพันธุ์ Tokyo 172-1 ที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564

ชลดา เพ็ชรไทย¹ สุภาภรณ์ ชุมพล¹ สุกัลยาณี ไชยมี¹ อภิชัย ศุภสารสาทร¹ และ สุภาพร ภูมิอมร²

¹ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

² สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ประเทศไทยกำหนดให้วัคซีนบีซีจีเป็นวัคซีนพื้นฐานสำหรับเด็กแรกเกิดทุกราย จึงต้องมีการตรวจคุณภาพวัคซีนในทุกกระบวนการผลิตเพื่อให้มั่นใจในคุณภาพและประสิทธิภาพของวัคซีน ผู้วิจัยได้ทำการประเมินความเสี่ยงคุณภาพและความปลอดภัยของวัคซีนบีซีจีสายพันธุ์ Tokyo 172-1 ที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำนวน 133 รุ่นการผลิต ผลการวิเคราะห์พบว่าทุกกระบวนการผลิตมีคุณลักษณะทางกายภาพ เอกลักษณะ ปริมาณความชื้น ความแรง และความคงตัว เป็นไปตามข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์และข้อกำหนดมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก ผลการตรวจติดตามสายพันธุ์ย่อย subtype II ในวัคซีนบีซีจีสายพันธุ์ Tokyo 172-1 จำนวน 109 รุ่นการผลิต พบว่าส่วนใหญ่มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II น้อยกว่า 10% จำนวน 65 รุ่นการผลิต (59.63%) ในขณะที่ 44 รุ่นการผลิต (40.37%) มีมากกว่า 10% เปรียบเทียบกับวัคซีนบีซีจีที่ผลิตจากประเทศญี่ปุ่นที่มีค่าไม่เกิน 5% และประเทศไต้หวันมีค่าประมาณ 40% เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II กับค่าความแรง พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีค่า r เท่ากับ -0.287 ซึ่งมีค่าต่ำมาก แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กันแต่มีแนวโน้มเป็นความสัมพันธ์แบบแปรผกผัน ทั้งนี้ไม่มีผลต่อคุณภาพของวัคซีนเนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนด ข้อมูลจากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาคุณภาพการผลิตของวัคซีนบีซีจีที่ใช้ในประเทศต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีนบีซีจี, คุณภาพวัคซีน, บีซีจีสายพันธุ์ Tokyo 172-1

Corresponding author E-mail: chonlada.p@dmsc.mail.go.th

Received: 23 August 2023

Revised: 5 February 2024

Accepted: 27 March 2024

บทนำ

วัคซีนเป็นชีววัตถุที่ใช้เพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกัน คุณภาพและความปลอดภัยของวัคซีนจึงมีความสำคัญ เนื่องจากวัคซีนมีโอกาสเกิดการเบี่ยงเบนในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในแต่ละครั้งได้สูง เมื่อเปรียบเทียบกับยาสังเคราะห์หรือยาเคมีทั่วไปและการตรวจพิสูจน์ในประสิทธิภาพทำได้ยาก องค์การอนามัยโลกจึงกำหนดให้มีการรับรองรุ่นการผลิตวัคซีนทุกรุ่นโดยหน่วยงานภาครัฐก่อนนำไปสู่ผู้บริโภค สำหรับประเทศไทยกำหนดให้การผลิต นำหรือส่งเข้าในราชอาณาจักร ซึ่งยาแผนปัจจุบันที่เป็นยาชีววัตถุต้องได้รับหนังสือรับรองรุ่นการผลิตยาชีววัตถุก่อนนำออกจำหน่ายหรือส่งมอบให้ผู้ซื้อ⁽¹⁾ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ระบุให้มีกระบวนการตรวจสอบรับรองรุ่นการผลิตวัคซีนก่อนจำหน่ายทุกกระบวนการผลิต โดยพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิต (summary production protocol) ซึ่งมีข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับกระบวนการผลิตและการตรวจสอบคุณภาพตั้งแต่เริ่มต้นการผลิตจนถึงผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ข้อมูลการเก็บรักษาและขนส่งผลิตภัณฑ์ในระบบลูกโซ่ความเย็น และผลการวิเคราะห์คุณภาพตัวอย่างที่ตรวจโดยสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽²⁾ โดยในแต่ละรายการวิเคราะห์ต้องได้มาตรฐานตามเกณฑ์การยอมรับที่กำหนด หากพบการเบี่ยงเบน หรือเปลี่ยนแปลงไป หรือมีข้อสงสัยที่อาจกระทบต่อคุณภาพ ต้องทำการตรวจสอบก่อนรับรองรุ่นการผลิต

วัคซีนบีซีจี (Bacillus Calmette-Guérin vaccine; BCG vaccine) หรือวัคซีนป้องกันวัณโรค เป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ ถูกบรรจุในแผนงานการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันแห่งชาติตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520⁽³⁾ ใช้ฉีดเข้าชั้นผิวหนังเด็กแรกเกิดทุกรายเพื่อป้องกันวัณโรค วัคซีนนี้ผลิตจากเชื้อ *Mycobacterium bovis* BCG ซึ่งปัจจุบันมีหลายสายพันธุ์แตกต่างกันไปตามแต่ละประเทศและห้องปฏิบัติการ วัคซีนบีซีจีที่ผลิตในประเทศไทยโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ซึ่งเป็นผู้ผลิตรายเดียว ผลิตจาก *Mycobacterium bovis* BCG สายพันธุ์ Tokyo 172-1 เช่นเดียวกับวัคซีนบีซีจีที่ผลิตในประเทศไต้หวันและประเทศญี่ปุ่น⁽⁴⁾ โดยเชื่อที่

ใช้ในการผลิตวัคซีนบีซีจีในประเทศไทยได้รับจากประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2531⁽⁵⁾ มีการผลิตในรูปแบบผงแห้ง (lyophilized) ขนาด 10 โดส (dose) มีปริมาณเชื้อ 0.05 มิลลิกรัม และมีอายุยานาน 4 ปี การรับรองรุ่นการผลิตพิจารณาจากเอกสารสรุปกระบวนการผลิตของผู้ผลิตและตรวจวิเคราะห์คุณภาพตัวอย่างวัคซีนบีซีจี โดยรายการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ตรวจโดยสถาบันชีววัตถุ ประกอบด้วย การตรวจวิเคราะห์ความปลอดภัย ความแรง ความคงตัว ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณความชื้น และเอกลักษณ์ของวัคซีน⁽⁶⁻⁸⁾

ปี พ.ศ. 2550-2559 คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ได้ติดตามอาการไม่พึงประสงค์ภายหลังจากการได้รับวัคซีนบีซีจี อาการที่พบส่วนใหญ่ คือ ต่อมท่อน้ำเหลืองอักเสบ (lymphadenitis), BCG osteitis และ disseminated BCG disease ทำให้ผู้ผลิตและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องร่วมกันตรวจสอบเพื่อหาสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการดังกล่าว ปัจจัยที่คาดว่าเป็นสาเหตุอาการไม่พึงประสงค์ได้แก่ เทคนิคการฉีด ปริมาณการฉีด ภาวะสุขภาพของผู้ได้รับวัคซีน หรือคุณภาพวัคซีนที่อาจเปลี่ยนแปลงไป โดยเรื่องคุณภาพวัคซีนมีการตรวจสอบและยืนยันว่ายังคงมีคุณภาพคงเดิม ในปี พ.ศ. 2558 มีรายงานการศึกษาปริมาณ subtype I และ subtype II ซึ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยในวัคซีนบีซีจี พบว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตในประเทศไทยตรวจพบเป็น subtype II ทั้งหมด และไม่พบ subtype I⁽⁹⁾ ซึ่งต่างจากวัคซีนบีซีจีที่ผลิตจากประเทศไต้หวันและญี่ปุ่นที่พบทั้ง 2 สายพันธุ์ย่อย⁽¹⁰⁾ ทำให้เกิดข้อสงสัยในคุณภาพวัคซีนเกี่ยวกับปริมาณสายพันธุ์ย่อยในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตในประเทศไทย มีสัดส่วนของ subtype II ต่างจากวัคซีนบีซีจีที่ผลิตจากประเทศอื่นหรือไม่ และเป็นสาเหตุของอาการไม่พึงประสงค์ดังกล่าวหรือไม่ ในปี พ.ศ. 2562 มีการตรวจสอบและยืนยันว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย มีสายพันธุ์ย่อยทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ subtype I และ subtype II เช่นเดียวกับวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยประเทศอื่น และพบว่ารุ่นการผลิตส่วนใหญ่มีปริมาณ subtype II น้อยกว่า 10%⁽¹¹⁾ แสดงว่าสัดส่วน subtype II ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์หลังการได้รับวัคซีน ทั้งนี้เพื่อ

ให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพของวัคซีนบีซีจี สถาบันชีววัตถุ จึงทำการตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real-time polymerase chain reaction (real time-PCR)⁽⁹⁾ เพื่อติดตามปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย และใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยต่างประเทศ ถึงแม้ว่าการตรวจสอบคุณภาพของวัคซีนบีซีจีตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกไม่ได้กำหนดให้ตรวจหาปริมาณสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG⁽¹²⁾ ก็ตาม

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเสี่ยงคุณภาพและความปลอดภัยของวัคซีนบีซีจีสายพันธุ์ Tokyo 172-1 ที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 ที่ตรวจโดยสถาบันชีววัตถุ เพื่อนำไปเป็นข้อมูลให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและผู้บริโภคใช้ประโยชน์ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างวัคซีน

วัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ซึ่งเป็นผู้ผลิตรายเดียวในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำนวน 133 รุ่นการผลิต เป็นวัคซีนที่ผลิตปี พ.ศ. 2558 จำนวน 21 รุ่นการผลิต พ.ศ. 2559 จำนวน 22 รุ่นการผลิต พ.ศ. 2560 จำนวน 18 รุ่นการผลิต พ.ศ. 2561 จำนวน 3 รุ่นการผลิต พ.ศ. 2562 จำนวน 33 รุ่นการผลิต พ.ศ. 2563 จำนวน 14 รุ่นการผลิต และ พ.ศ. 2564 จำนวน 22 รุ่นการผลิต

การตรวจสอบคุณภาพวัคซีนบีซีจี

รวบรวมข้อมูลผลการตรวจสอบคุณภาพวัคซีนบีซีจี โดยการประเมินความเสี่ยงคุณภาพและความปลอดภัย แบ่งเป็น การพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิต (summary production protocol) ของผู้ผลิต และผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการโดยสถาบันชีววัตถุ ซึ่งรายการทดสอบประกอบด้วย

การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ (appearance) ด้วยวิธีการมองด้วยตาเปล่า (visual inspection) ภายใต้ viewing station ที่มีความเข้มแสงอยู่ในช่วง 2,000–3,750 ลักซ์

ปริมาณความชื้น (moisture content) ด้วยวิธี volumetric Karl Fischer titration เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารไทแทรนต์ (titrant solution) กับน้ำที่อยู่ในตัวอย่าง

การตรวจเอกลักษณ์ (identity) โดยดูลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง Lowenstein Jensen media (LJ media) และลักษณะของเชื้อแบบ bacilli บน stained smear ด้วยวิธีการย้อมสีทนกรด (acid fast staining) ที่ปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, model CK2, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

ความแรงและความคงตัว (potency and stability) ด้วยการตรวจนับ number of culturable particles ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ

การตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real time-PCR⁽¹¹⁾ ใช้ความต่างของลำดับดีเอ็นเอระหว่าง 2 subtypes ใน RD16 region โดยใช้ primer และ probe 2 ชุด คือ ชุดที่ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของ subtype II ตรวจวัดโดย RD 16-probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FAM และชุดที่ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ BCG ทั้งหมดประกอบด้วย subtype I และ subtype II โดยใช้ murB-probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง NED

การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ BCG subtype II ทำโดยเจือจางดีเอ็นเอของ BCG subtype II ด้วย TE buffer pH 8.0 ให้มีความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร และเจือจางดีเอ็นเอของ BCG subtype I และ subtype II ให้มีสัดส่วน % ดีเอ็นเอของ BCG subtype I : BCG subtype II เป็น 95:5 (5% BCG subtype II) เพื่อเป็น positive control จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวมแต่ละหลอด 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA template ของสารมาตรฐาน (DNA subtype II) หรือ DNA ที่สกัดจากวัคซีนตัวอย่าง หลอดละ 2 ไมโครลิตร โดยในแต่ละหลอด (reaction) ประกอบด้วยไพรเมอร์ BCG I/II-Fw และ BCG II-Rv (อย่างละ 12 pM) murB-Fw และ murB-Rv (อย่างละ 6 pM) RD16-probe (3 pM) murB-probe (1.5 pM) 2×qPCR master mix 7.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น

จนครบปริมาตร 15 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยตั้งค่าที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 40 รอบ

ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที คำนวณปริมาณดีเอ็นเอ ของ BCG subtype II และปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของตัวอย่าง BCG โดยเปรียบเทียบค่า cycle threshold (Ct) กับกราฟมาตรฐาน และคำนวณ %BCG subtype II ดังสมการ

$$\%BCG \text{ subtype II} = \frac{\text{ปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II (พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)}}{\text{ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของ BCG (พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลผลการตรวจสอบคุณภาพวัคซีน บีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 นำผลการตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเกณฑ์ข้อกำหนด จัดทำแนวโน้ม (trend) ของแต่ละรายการทดสอบ และใช้สถิติสหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของสายพันธุ์ย่อย subtype II กับความแรงของวัคซีนบีซีจีที่ตรวจโดยสถาบันชีววัตถุ

ผล

จากการพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิตของผู้ผลิตร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ สถาบันชีววัตถุ ประกอบด้วย การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณความชื้น การตรวจเอกลักษณ์

ความแรง และความคงตัวของวัคซีนตัวอย่าง ที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำนวน 133 รุ่นการผลิต รายละเอียดจำนวนรุ่นการผลิตในแต่ละรายการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 1

การตรวจสอบคุณภาพวัคซีนแต่ละรายการทดสอบของการตรวจวิเคราะห์

ลักษณะทางกายภาพ ก่อนการละลายมีลักษณะเป็นของแข็งจับตัวเป็นก้อนสีขาว เมื่อละลายมีลักษณะเป็นสารละลายสีขาวขุ่น การตรวจเอกลักษณ์ พบว่าโคโลนีที่ปรากฏบน LJ มีสีเหลืองอ่อนหรือสีเนื้อ รูปร่างกลมหรือไร้รูปแบบ ขอบหยักค่อนข้างแบน ขนาดประมาณ 2–5 มิลลิเมตร และมีลักษณะเป็นแบคทีเรียรูปแท่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เมื่อย้อมสีทึบกรด ดังแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนรุ่นการผลิตของตัวอย่างวัคซีนที่ใช้ในการทดสอบในแต่ละปีที่ผลิต

รายการทดสอบ	ปีที่ผลิต (จำนวนตัวอย่างวัคซีน)							รวม (รุ่นการผลิต)
	2558	2559	2560	2561	2562	2563	2564	
การตรวจลักษณะทางกายภาพ	21	22	18	3	33	14	22	133
ปริมาณความชื้น	21	22	18	3	33	14	ND	111
การตรวจเอกลักษณ์	21	22	18	3	33	14	22	133
ความแรง*	21	22	18	3	15*	3*	3*	85
ความคงตัว*	21	22	18	3	15*	3*	3*	85
การตรวจหาสายพันธุ์ย่อย**	6**	14**	18	3	33	14	21**	109

หมายเหตุ: ND = ไม่มีการตรวจปริมาณความชื้นจากสถานการณ์โควิด 19

* = ตั้งแต่กลางปี พ.ศ. 2562 มีการปรับความถี่การตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างส่งตรวจเพื่อรองรับรองรับรุ่นการผลิต

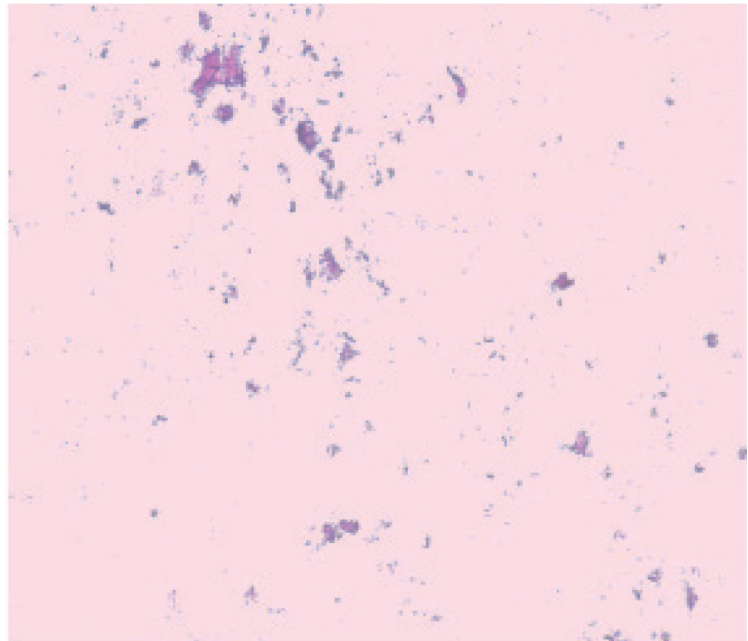
** = จำนวนตัวอย่างคงเหลือจากการตรวจวิเคราะห์เพื่อรับรองรุ่นการผลิต

ปริมาณความชื้นของตัวอย่างวัคซีนที่ผลิต
ระหว่างปี พ.ศ. 2558-2563 พบว่าทุกรุ่นการผลิตมีค่า

อยู่ในเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 3% โดย
มีความชื้นอยู่ระหว่าง 0.28-2.47% ดังแสดงในภาพที่ 2

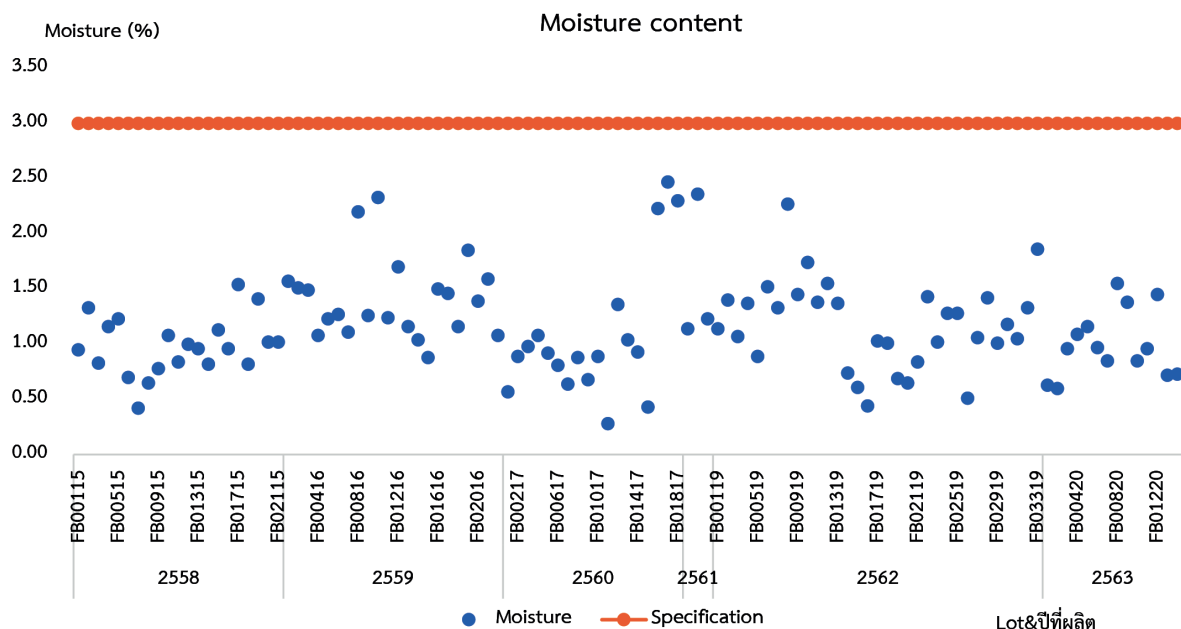


(1A)



(1B)

ภาพที่ 1 การตรวจเอกลักษณ์ของตัวอย่างวัคซีนที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558-2564 1A คือ โคโลนีที่ปรากฏบน
มีเดีย LJ และ 1B คือ ลักษณะแบคทีเรียรูปแท่งหลังจากการย้อมสีทึบกรด (acid fast staining)
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

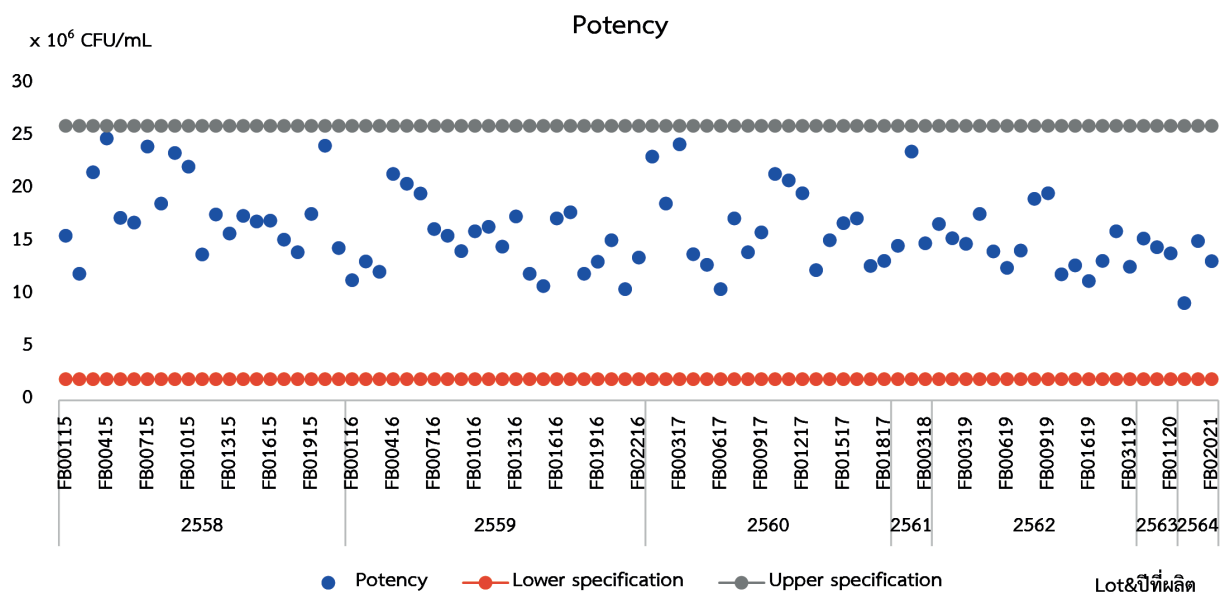


หมายเหตุ: พ.ศ. 2564 ไม่มีการตรวจปริมาณความชื้นเนื่องจากสถานการณ์โควิด 19

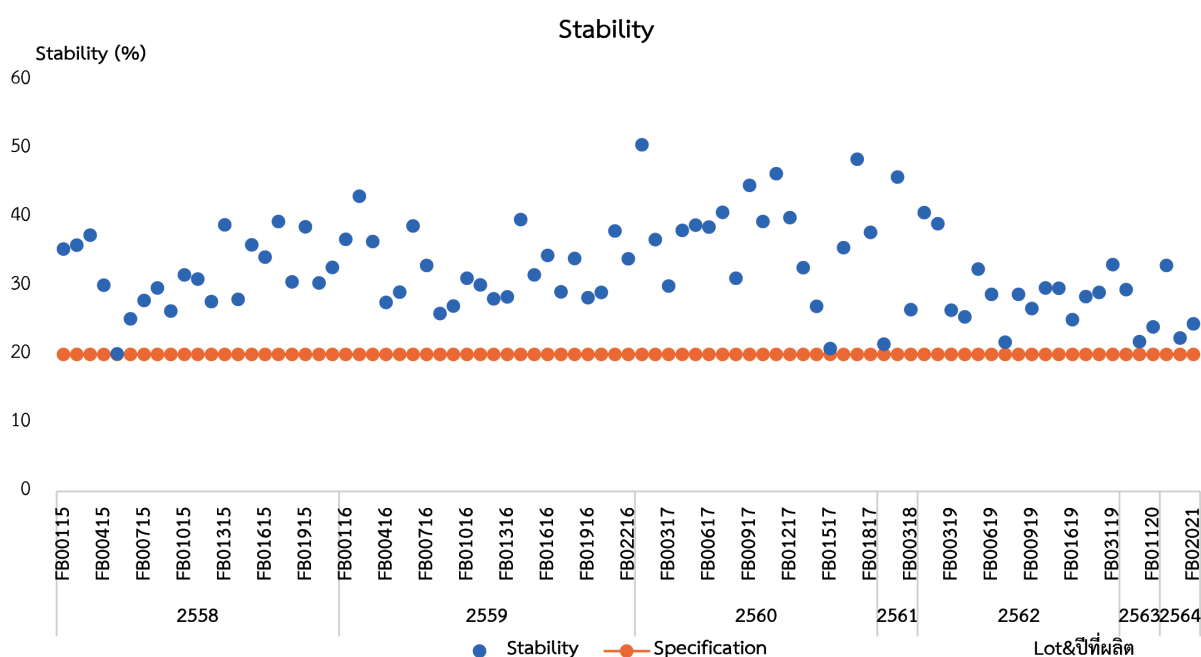
ภาพที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วยวิธี Karl Fischer titration ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตระหว่างปี
พ.ศ. 2558-2563 เกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 3%

ค่าความแรงของตัวอย่างวัคซีนที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 พบว่าทุกกระบวนการผลิตมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ คือ $2-26 \times 10^6$ CFU/mL โดยมีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง $9.22-24.83 \times 10^6$ CFU/mL ดังแสดงในภาพที่ 3

ค่าความคงตัวของตัวอย่างวัคซีนที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 พบว่าทุกกระบวนการผลิตมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ คือ $\geq 20\%$ ของเชื้อที่รอดชีวิต ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 การตรวจวิเคราะห์ความแรง (potency) ด้วยการตรวจนับ number of culturable particles ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 ช่วงค่ายอมรับได้ $2-26 \times 10^6$ CFU/mL

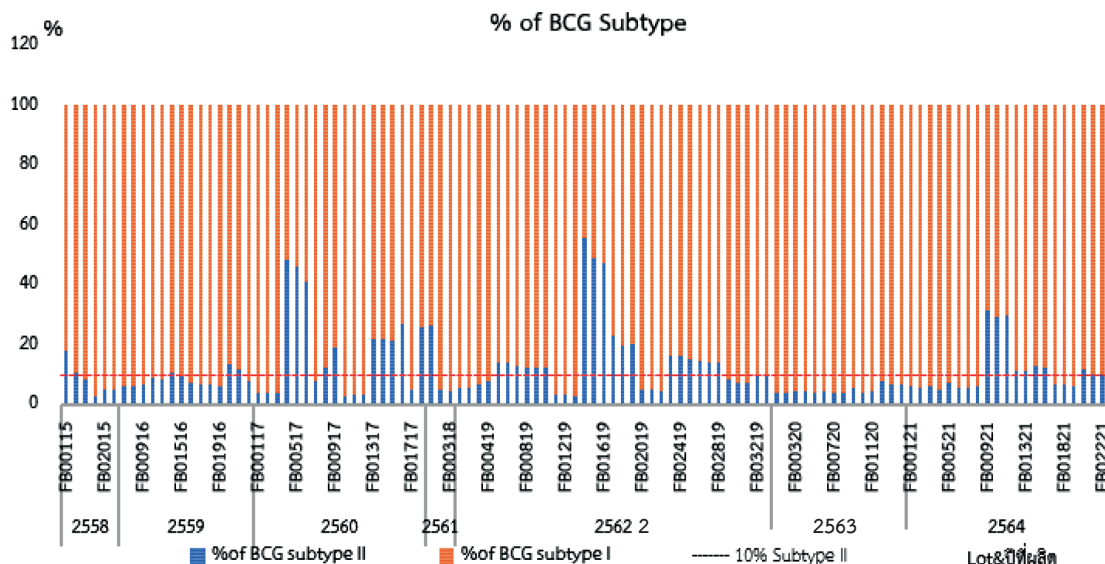


ภาพที่ 4 การตรวจวิเคราะห์ความคงตัว (stability) ด้วยการตรวจนับ number of culturable particles ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564

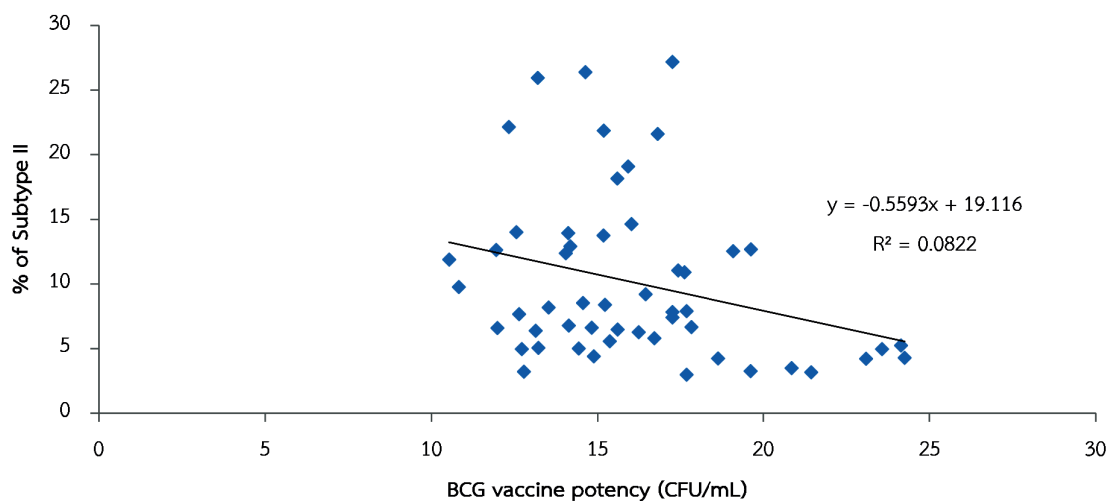
การตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1
ตรวจโดยวิธี real time-PCR เพื่อติดตามปริมาณ
สายพันธุ์ย่อย subtype II ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิต
โดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย รวม 109 รุ่นการผลิต
พบว่าจำนวน 65 รุ่นการผลิต (59.63%) มีปริมาณ
สายพันธุ์ย่อย subtype II ในวัคซีนไม่เกิน 10% และ
จำนวน 44 รุ่นการผลิต (40.37%) ที่ผลิตในปี พ.ศ. 2560,
2562 และ 2564 มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II
ในวัคซีนเกิน 10% ดังแสดงในภาพที่ 5

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสายพันธุ์ย่อย
subtype II กับความแรงของวัคซีนบีซีจี

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ จำนวน 62 รุ่น
การผลิต ที่ผ่านการตรวจสอบทั้งปริมาณสายพันธุ์ย่อย
subtype II และความแรง ด้วยสถิติสหสัมพันธ์เพียร์สัน
(Pearson's correlation) พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น
95% มีค่า r เท่ากับ -0.287 ซึ่งมีค่าต่ำมาก แสดงว่าไม่มี
ความสัมพันธ์กันแต่มีแนวโน้มแปรผกผันกัน ดังแสดงใน
ภาพที่ 6 กล่าวคือหากวัคซีนบีซีจีมีปริมาณสายพันธุ์ย่อย
subtype II สูงขึ้น จะมีแนวโน้มทำให้ค่าความแรงของ
วัคซีนลดต่ำลง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความ
เชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 5 การตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real time-PCR ในวัคซีนบีซีจี



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II กับความแรงของวัคซีนบีซีจี

วิจารณ์

วัคซีนบีซีจีมีการใช้งานมานานกว่า 80 ปี และบรรจุในแผนงานการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันแห่งชาติตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520⁽³⁾ เป็นวัคซีนทั้งแบบที่ผลิตภายในประเทศและแบบนำเข้าโดยหน่วยงานต่างๆ จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพเพื่อรับรองรุ่นการผลิตก่อนจำหน่ายทุกครั้ง สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ดำเนินการรับรองรุ่นการผลิตมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 โดยกระบวนการตรวจสอบคุณภาพเพื่อรับรองรุ่นการผลิตสำหรับวัคซีนนำเข้า โดยพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิตและการควบคุมคุณภาพของผู้ผลิตร่วมกับผลการตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพโดยสถาบันชีววัตถุ ส่วนวัคซีนที่ผลิตในประเทศพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิตและการควบคุมคุณภาพของผู้ผลิต ร่วมกับผลการตรวจวิเคราะห์โดยสถาบันชีววัตถุตามรายการทดสอบที่ระบุในข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ สำหรับวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย เป็นวัคซีนที่ผลิตในประเทศ จึงมีการตรวจสอบคุณภาพเพื่อรับรองรุ่นการผลิตตามเกณฑ์ที่ระบุข้างต้น การศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำนวน 133 รุ่นการผลิต ผลการพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิต พบว่าทุกรุ่นการผลิตมีการผลิตและการควบคุมคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐานตามที่ได้รับทราบขึ้นทะเบียนไว้ นอกจากนี้ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการโดยสถาบันชีววัตถุ ประกอบด้วย การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณความชื้น เอกสิทธิ์ ความแรง และความคงตัวของวัคซีน พบว่ามีคุณภาพและความปลอดภัยผ่านเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ทุกรุ่นการผลิต ในปี พ.ศ. 2564 ไม่มีการตรวจปริมาณความชื้นเนื่องจากสถานการณ์โควิด 19 และตั้งแต่มกราคม พ.ศ. 2562 มีการปรับความถี่การตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างส่งตรวจเพื่อขอรับรองรุ่นการผลิตในการตรวจวิเคราะห์ความแรงและความคงตัว เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์โดยสถาบันชีววัตถุที่ผ่านมาไม่มีความสม่ำเสมอและมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ เมื่อนำค่าของผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทั้งของสถาบันชีววัตถุและผู้ผลิตที่ระบุอยู่ในเอกสารสรุปกระบวนการผลิต

มาวิเคราะห์แนวโน้มของผลิตภัณฑ์ (trend analysis) พบว่าปริมาณความชื้น ความแรง และความคงตัวของวัคซีน ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงค่าเฉลี่ย $\pm 3SD$ สำหรับบางรุ่นการผลิตมีค่าอยู่นอกช่วงค่าเฉลี่ย $\pm 3SD$ แต่ยังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์และมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก⁽¹²⁾ คือ ปริมาณความชื้นมีค่าไม่เกิน 3% ความแรงมีค่าอยู่ระหว่าง $2-26 \times 10^6$ CFU/mL และความคงตัวมีค่า $\geq 20\%$ ของเชื้อที่รอดชีวิต จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย มีคุณภาพสม่ำเสมอ

การตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real time-PCR เพื่อติดตามปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ในวัคซีน พบว่าส่วนใหญ่มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ไม่เกิน 10% และบางรุ่นการผลิตมีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II มากกว่า 10% เช่นเดียวกับผลการตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ในปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558 โดยวิริยามัตย์ เจริญคุณธรรม และคณะ⁽¹¹⁾ ที่ตรวจปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ได้สูงสุดที่ประมาณ 15% อีกทั้งพบว่าบางรุ่นการผลิตของวัคซีนที่ผลิตในปี พ.ศ. 2560 และ 2562 มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II มากกว่า 10% เปรียบเทียบกับวัคซีนที่ผลิตจากต่างประเทศที่มีความแปรผันของสายพันธุ์ย่อย เช่น วัคซีนบีซีจีของประเทศญี่ปุ่นมีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ไม่เกิน 5% ขณะที่วัคซีนจากประเทศไต้หวันมีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ประมาณ 40%⁽¹⁰⁾ ซึ่งความแปรผันของปริมาณสายพันธุ์ย่อยในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย อาจเกิดจากขั้นตอนการเลือกลักษณะโคลนของเชื้อเพื่อนำไปใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในกระบวนการผลิตวัคซีน⁽¹¹⁾ ปัจจุบันไม่มีการรายงานอาการไม่พึงประสงค์ภายหลังได้รับวัคซีนบีซีจีในรุ่นการผลิตที่มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II มากกว่า 10% จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II กับความแรงของวัคซีนบีซีจีที่ตรวจโดยสถาบันชีววัตถุด้วยสถิติสหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation)

พบว่าความเชื่อมั่น 95% มีค่า r เท่ากับ -0.287 ซึ่งมีค่าต่ำมาก แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กันแต่มีแนวโน้มแปรผกผัน พบงานวิจัยที่รายงานว่าสายพันธุ์ย่อย subtype I มีความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในอวัยวะหนุทตลงได้ดีกว่าสายพันธุ์ย่อย subtype II^(13,14) แต่เนื่องจากปริมาณสายพันธุ์ย่อยในวัคซีนไม่ได้กำหนดให้ตรวจในการตรวจสอบคุณภาพของวัคซีนบีซีจีตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก และผลการตรวจสอบคุณภาพของวัคซีนบีซีจีตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกผ่านเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ทุกรุ่นการผลิต แสดงว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย มีคุณภาพและความปลอดภัย สามารถนำไปใช้ในการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคในเด็กแรกเกิดได้ ผลวิเคราะห์ที่พบความแปรผันของอัตราส่วนสายพันธุ์ย่อยดังกล่าวจึงเป็นข้อมูลให้ผู้ผลิตเพิ่มความเข้มงวดในการเลือกลักษณะโคโลนีของเชื้อเพื่อนำไปใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในกระบวนการผลิตวัคซีนต่อไป

สรุป

คุณภาพของวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำนวน 133 รุ่นการผลิต จากการพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิตของผู้ผลิตและผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ สถาบันชีววัตถุ ประกอบด้วย การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณความชื้น เอกลักษณะความแรง และความคงตัวของวัคซีน มีคุณภาพตามเกณฑ์การทดสอบทุกรายการ ซึ่งแสดงว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย มีคุณภาพและความปลอดภัย สามารถนำไปใช้ในการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคในเด็กแรกเกิดได้ และการตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real time-PCR พบว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ส่วนใหญ่ไม่เกิน 10%

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นสพ.กรพงศ์ ภิญโญสุ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ สถาบันชีววัตถุ ที่ให้คำแนะนำการคำนวณทางสถิติ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันชีววัตถุที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบคุณภาพวัคซีนบีซีจี การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี และการตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real time-PCR จนสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กฎกระทรวงว่าด้วยการรับรองรุ่นการผลิตยาแผนปัจจุบันที่เป็นยาชีววัตถุ พ.ศ. 2553. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนที่ 66 ก (วันที่ 3 พฤศจิกายน 2553). หน้า 7.
2. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และวิธีการขอรับหนังสือรับรองรุ่นการผลิตยาชีววัตถุ และกำหนดแบบคำขอและแบบหนังสือรับรองรุ่นการผลิตยาชีววัตถุ. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 131 ตอนพิเศษ 216 ง (วันที่ 29 ตุลาคม 2557). หน้า 50.
3. กุลกัญญา โชคไพบูลย์กิจ, เกษวดี ลาภพระ, จุฑารัตน์ เมฆมัลลิกา, จิตติร นาคบุญนำ, อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์, บรรณาธิการ. การขยายการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค (Expanded Program on Immunization, EPI). ใน: ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคปี 2556. นนทบุรี: สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค; 2556. หน้า 15–16.
4. Cernuschi T, Malvoti S, Nickels E, Friede M. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine: a global assessment of demand and supply balance. Vaccine 2018; 36(4): 498–506.
5. คณะศึกษาดูงานศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการผลิตและควบคุมคุณภาพวัคซีนบีซีจี. เอกสารรายงานการหาสาเหตุและแก้ไขปัญหากการเกิดอาการข้างเคียงหลังได้รับวัคซีนบีซีจีของประเทศ. วันที่ 1–2 มิถุนายน 2560. กรุงเทพฯ: Japan BCG Laboratory; 2560.
6. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพฯ: FULL FORSE; 2558.

7. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 2. กรุงเทพฯ: FULL FORSE; 2558.
8. กระทรวงสาธารณสุข. ข้อกำหนดชีววัตถุ เล่ม 1. นนทบุรี: เอสอาร์พรีนติ้ง แมสโปรดักส์; 2541.
9. เอกสารรายงานการประชุมหรือโครงการวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับวัคซีนบีซีจี. วันที่ 3 พฤษภาคม 2559. นนทบุรี: สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข; 2559.
10. Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, et al. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette-Guérin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. *Sci Rep* 2015; 5: 17827. (9 pages).
11. วิริยามัตย์ เจริญคุณธรรม, สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์, นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา, สุภาพร ภูมิอมร. การตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 ในวัคซีนป้องกันวัณโรคที่ผลิตในประเทศไทย โดยวิธี Real-Time PCR. ว. กรมวิทย พ [วารสารออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 16 ก.พ. 2566]; 61(1): [17 หน้า]. เข้าถึงจาก: URL: <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/dmssc/article/view/240888/164170>.
12. World Health Organization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccine. WHO Technical report series 2013; 979: 137-85.
13. Honda I, Seki M, Ikeda N, Yamamoto S, Yano I, Koyama A, et al. Identification of two subpopulations of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo172 substrain with different RD16 regions. *Vaccine* 2006; 24(23): 4969-74.
14. Gheorghiu M, Lagrange PH. Viability, heat stability and immunogenicity of four BCG vaccines prepared from four different BCG strains. *Ann Immunol (Inst Pasteur)* 1983; 134(1): 125-47

Quality Assessment and Subtype Monitoring of BCG Tokyo 172-1 Vaccine Produced by Queen Saovabha Memorial Institute During 2015–2021

Chonlada Petthai¹, Supaporn Chumpol,¹ Sukanlayanee Chaimee,¹
Apichai Supasansatorn,¹ and Supaporn Phumiamorn²

¹ Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

² Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT BCG vaccine has been included in Thailand's Expanded Program on Immunization (EPI) for all Thai newborns. Therefore, quality control must be determined in every production batch to ensure the quality and efficacy of the vaccines. The quality assessment and safety of BCG Tokyo 172-1 vaccine were investigated on 133 lots of vaccines manufactured by Queen Saovabha Memorial Institute during 2015–2021. The testing results of appearance, identity, moisture content, potency and stability revealed that all lots of BCG vaccines met the product specifications and the standard requirements of the World Health Organization. In addition, the subpopulations monitoring of BCG Tokyo 172-1 vaccine were investigated on 109 lots and the results revealed that 65 lots (59.63%) contained less than 10% of BCG subtype II, whereas 44 lots (40.37%) contained more than 10% of BCG subtype II. These results compared with the BCG vaccine manufactured by Japan, which contained no more than 5% of BCG subtype II, and the vaccine manufactured by Taiwan, contained 40% of BCG subtype II. The correlation between the potency test and %BCG subtype II was analyzed, the results presented that the data has a very low value ($r = -0.287$) at 95% confidence level, revealing no correlation. Although, the trend varied inversely, there was no effect on the quality of the BCG vaccine because the testing results met the product specification. This study can be used as a guideline for further improving quality in the manufacturing of BCG vaccines used in the country.

Keywords: BCG vaccine, Quality control of vaccine, BCG Tokyo 172-1