ว กรมวิทย พ 2564; 63 (3): 721-731

การทวนสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ด้วยวิธี Chromogenic Assay

โสมมริสา พวงพรศรี ฐิตาภรณ์ ภูติภิญโยวัฒน์ และไพศาล พังจุนันท์
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ Factor VIII เป็นไกลโคโปรตีนที่สำคัญในกลไกการแข็งตัวของเลือด ทำหน้าที่เป็น cofactor กระตุ้น Factor IX ให้เป็นรูปแอคทีฟซึ่งสามารถกระตุ้นให้ Factor X อยู่ในรูปแอคทีฟแล้วทำให้เริ่มเกิดปฏิกริยาการแข็งตัวของเลือด ผู้วิจัยได้ทำการทวนสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ด้วยวิธี Chromogenic assay ซึ่งเป็นวิธีตามมาตรฐานของตำรายา European Pharmacopeia 10.0 กำหนด ผลทดสอบความเป็นเส้นตรงได้ช่วงการวิเคราะห์ที่เหมาะสมของวิธี คือ 0.000625 - 0.005 IU/มิลลิลิตร การทดสอบความแม่น มีค่า %recovery Geomean อยู่ระหว่าง 84.48-109.35% ผลวิเคราะห์ความเที่ยงทั้งการทดสอบซ้ำในวันเดียวและต่างวัน รวมทั้งผลการทดสอบโดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ให้ผลการทดสอบมีค่าร้อยละความแปรปรวน (%CV) เท่ากับ 11.57, 10.84 และ 7.74 ตามลำดับ และจากการศึกษาความจำเพาะของวิธีโดยทดสอบกับผลิตภัณฑ์พลาสมาชนิดอื่น พบว่าวิธีมีความจำเพาะต่อการทดสอบ Factor VIII นอกจากนี้ได้นำวิธีที่ผ่านการทวนสอบมาทดสอบกับตัวอย่างจริง จำนวน 2 ผลิตภัณฑ์ คือ ผลิตภัณฑ์ A จำนวน 11 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์ B จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่า 2 ผลิตภัณฑ์ มีค่าความแรงผ่านเกณฑ์มาตรฐานยุโรป โดยผลเปรียบเทียบค่าความแรงระหว่างวิธีที่ทวนสอบโดยผู้วิจัยและบริษัทผู้ผลิตพบว่ามีความแตกต่างจากผลิตภัณฑ์ A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเกิดจากบริษัทผู้ผลิตใช้วิธีทดสอบและสารอ้างอิงที่แตกต่างจากผู้วิจัย ซึ่งความต่างดังกล่าวไม่พบความแตกต่างกับค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ B จากผลการทวนสอบแสดงว่า วิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII โดยหลักการ Chromogenic assay ด้วยวิธี microplate มีความเหมาะสม ใช้ได้จริง สามารถนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของสถาบันชีววัตถุต่อไป

คำสำคัญ: Factor VIII, วิธีโครโมเจนิก, การทวนสอบวิธี

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

Received: 25 March 2021 *Revised: 18 June 2021* *Accepted: 14 July 2021*

บทนำ

โรคฮีโมฟีเลีย คือ โรคเลือดออกไหลไม่หยุดหรือเลือดออกง่ายหยุดยาก เป็นโรคทางพันธุกรรมจากความผิดปกติบนโครโมโซมเอกซ์ โรคฮีโมฟีเลีย เอ เกิดจากขาดปัจจัยการแข็งตัวของเลือด Factor VIII อุบัติการณ์ของโรคในประเทศไทยเท่ากับ 1 ต่อ 13,000 – 20,000 ของประชากร อาการของโรคจะมีเลือดออกง่าย โดยอาการจะเป็น ๆ หาย ๆ มาตั้งแต่เด็ก รวมถึง อาการฟกช้ำ เลือดออกในกล้ามเนื้อและข้อต่อ อาการเลือดออกที่คงอยู่นานหลังจากการบาดเจ็บเล็กน้อยหรือการผ่าตัด และอาจรุนแรงหากมีเลือดออกในอวัยวะที่สำคัญ เช่น ที่สมอง การวินิจฉัยโดยสังเกตจากอาการ การเจาะเลือดตรวจระดับ Factor VIII และการตรวจชิ้นเนื้อรกหรือการเจาะน้ำคร่ำในระหว่างตั้งครรภ์ โรคฮีโมฟีเลียไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่การดูแลตนเองอย่างดี ทำให้ผู้ป่วยมีสุขภาพดีและมีอายุที่ยืนยาวขึ้น การรักษาผู้ป่วยทำได้โดยให้ Factor VIII ร่วมกับการรักษาตามอาการ ปริมาณยาที่ให้ผู้ป่วยกำหนดตามความรุนแรงของโรคฮีโมฟีเลีย ซึ่งคำนวณจากปริมาณ Factor VIII ที่ระบุบนขวดยา[1, 2]

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ Factor VIII ที่ใช้ในประเทศมีทั้งชนิดนำเข้าและผลิตในประเทศ เป็นทั้งชนิดที่ผลิตจากพลาสมามนุษย์และที่ผลิตด้วยเทคโนโลยีรีคอมบีแนนท์ ในกระบวนการควบคุมกำกับชีววัตถุของประเทศ ผลิตภัณฑ์ชีววัตถุทุกชนิดต้องผ่านการทดสอบคุณภาพทางกายภาพ เคมี และความแรง เพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนและการขอการรับรองรุ่นการผลิต เพื่อความปลอดภัยของประชาชนในประเทศ

วิธีตรวจความแรง Factor VIII แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ 1) one-stage assay มีหลักการคือ Factor VIII กระตุ้นปฏิกิริยาทำให้เกิด Factor IX, X ในรูป active form ซึ่งในสภาวะที่มี calcium ions และ phospholipid จะไปทำให้ prothrombin เปลี่ยนเป็น thrombin การหาปริมาณ Factor VIII จะบันทึกเวลาที่เกิดตะกอน (ปฏิกิริยา APTT หรือ activated partial thromboplastin time) เทียบกับค่ามาตรฐาน 2) Chromogenic assay มีหลักการคือ Factor VIII ที่ทำหน้าที่เป็น co-factor และทำให้เกิด Factor X ในรูป active form เช่นเดียวกันหลักการ one-stage assay โดย Factor X นี้สามารถนิวทรัลไลซ์ substrate เปลี่ยนเป็นสารมีสีชื่อ p-nitroaniline ซึ่งสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ที่ 405-490 นาโนเมตร โดยปริมาณ Factor VIII จะแปรผันตรงกับค่าดูดกลืนแสง[3] ซึ่งจากผลการศึกษาของ Moser KA และ Adcock Funk DM ในปี 2014 แสดงให้เห็นว่า วิธี Chromogenic assay มีความแม่นและมีความแปรปรวนน้อยกว่า และระบุว่าเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับใช้ตรวจหาปริมาณ Factor VIII ทั้งในตัวอย่างผู้ป่วยและในผลิตภัณฑ์ Factor VIII ด้วย[3] นอกจากนี้ตามข้อกำหนดมาตรฐานตำรายาสากล European Pharmacopeia 10.0 ได้แนะนำ วิธี Chromogenic assay สำหรับทดสอบเพื่อระบุค่าความแรงที่มีหน่วยเป็น IU (International Unit)[4] ของผลิตภัณฑ์

ชุดน้ำยาทดสอบ Chromogenic assay ที่มีจำหน่ายทั่วโลกเป็นชนิดที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยเท่านั้น[5] และสถาบันฯ ยังไม่มีวิธีทดสอบความแรง Factor VIII ดังนั้นการนำวิธีมาใช้ในห้องปฏิบัติการจึงต้องมีการทวนสอบก่อน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อทวนสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII โดยหลักการ Chromogenic assay ด้วยวิธี microplate เพื่อใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล

วัสดุและวิธีการ

สารอ้างอิง ตัวอย่าง Factor VIII และชุดน้ำยาทดสอบ

สารอ้างอิง Factor VIII STANDARD 13th BRITISH STANDARD FOR BLOOD COAGULATION FACTOR VIII CONCENTRATE, HUMAN NIBSC CODE; 10/188 ความแรง 9.4 IU/ampoule ตัวอย่าง

Factor VIII เข้มข้น 2 บริษัท จากผู้ผลิตในประเทศ (A) และนำเข้า (B) จำนวน 11 และ 6 รุ่นการผลิต ชุดทดสอบ HemosIL® Electrochrome™ Factor VIII จากบริษัท Instrumentation Laboratory, USA

การเตรียม สารอ้างอิง Factor VIII ชุดน้ำยาทดสอบและตัวอย่าง Factor VIII

ละลายสารอ้างอิง Factor VIII ด้วยน้ำกลั่นและตัวอย่าง Factor VIII ด้วยตัวทำละลายของผลิตภัณฑ์ให้มีความแรงเริ่มต้น 1 IU/มิลลิลิตร สำหรับชุดทดสอบประกอบด้วย Factor reagent และ Chromogenic substrate ให้ละลายตามวิธีที่ระบุในคู่มือการใช้น้ำยา วางสารที่ละลายแล้วทุกตัวที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

วิธีวิเคราะห์

นำ Factor reagent และ Chromogenic substrate ที่เตรียมมาอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนเริ่มการทดสอบ เจือจางสารอ้างอิงและตัวอย่าง Factor VIII ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของชุดทดสอบ เป็น 4 ระดับความเข้มข้น คือ 0.000625, 0.00125, 0.0025 และ 0.005 IU/มิลลิลิตร แล้วเติมแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well cell culture plate จากนั้นบ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที แล้วเติม Factor reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม บ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เมื่อครบเวลาบ่มให้เติม Chromogenic substrate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 20% acetic acid เพื่อหยุดปฏิกิริยา อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร หักลบด้วยค่า 490 นาโนเมตร ตามที่ระบุไว้ในคู่มือชุดทดสอบ โดยกลุ่มควบคุมได้เติมสารละลายบัฟเฟอร์แทนการเติมสารละลายตัวอย่าง

การคำนวณ

คำนวณค่าการทดสอบ การทวนสอบความเป็นเส้นตรง ความแม่น ความจำเพาะโดยใช้โปรแกรม Excel คำนวณ กราฟความสัมพันธ์สมการเส้นตรง r^2 ไม่น้อยกว่า 0.95

คำนวณค่าความแรงของตัวอย่าง การทวนสอบความเที่ยง ด้วยวิธี parallel line analysis โดยนำค่าดูดกลืนแสงคำนวณโดยใช้โปรแกรม Gen5 โดยค่าความสัมพันธ์ระหว่างสารอ้างอิงและตัวอย่าง Factor VIII เป็นลักษณะ dose response ความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (linearity) และความสัมพันธ์แบบคู่ขนาน (parallelism) ผลการทดสอบจะนำมาหาค่าเฉลี่ยแบบถ่วงน้ำหนัก (weighted geometric mean: WGO-Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (percent coefficient of variation: %CV)

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ทดสอบตัวอย่าง 3 ชนิด คือ ตัวอย่าง Factor IX (Factor IX ทำหน้าที่ร่วมกับ Factor VIII ในปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด) ตัวอย่าง Normal human albumin และตัวอย่าง Factor VIII ของบริษัท A โดยการเตรียมตัวอย่าง duplicate และทำ 3 การทดสอบ โดยเตรียมและทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน นำค่าเฉลี่ยของผล เปรียบเทียบความแตกต่างกันทางสถิติ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

เจือจางสารอ้างอิง Factor VIII แบบ 2-fold เป็น 4 ระดับความเข้มข้น วิเคราะห์ 6 การทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน คำนวณค่าความแรง back calculation แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าจริงของสารอ้างอิง (expected concentration) และค่าที่ได้จากการทดสอบ (back calculation concentration) และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2)

การทดสอบความแม่น (Accuracy)

เตรียมสารอ้างอิง Factor VIII 2 ระดับความเข้มข้นคือ 0.25 และ 1 IU/มิลลิลิตร จากนั้นให้ spike แต่ละความเข้มข้นปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง A 0.00125 IU/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มล. เตรียมการทดสอบ duplicate และทำ 3 การทดสอบ นำผลทดสอบวิเคราะห์ค่าความถูกต้องสัมพัทธ์ %recovery Geomean

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การทดสอบซ้ำ (Repeatability) ในวันและเวลาเดียวกัน (within run precision) โดยการทดสอบตัวอย่าง A จำนวน 6 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน นำผลทดสอบคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งต้องมีค่า ≤15% การทดสอบซ้ำต่างวัน โดยการทดสอบตัวอย่าง A จำนวน 2 ซ้ำ จากการทดสอบ 3 วัน (between run precision) นำผลทดสอบคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งต้องมีค่า ≤15% ทดสอบตัวอย่าง A จากผู้วิเคราะห์ 2 คน ๆ ละ 4 ซ้ำ (Reproducibility) นำผลทดสอบคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งต้องมีค่า ≤15% และเปรียบเทียบทางสถิติ Independent sample T-test

การทดสอบตัวอย่างแฟคเตอร์ VIII

ทดสอบตัวอย่าง Factor VIII จำนวน 2 ผลิตภัณฑ์ คือ ผลิตภัณฑ์ A จำนวน 11 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์ B จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่ส่งวิเคราะห์ ปี 2562-2563 โดยทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง เป็นอิสระต่อกันแล้วหาค่าเฉลี่ย

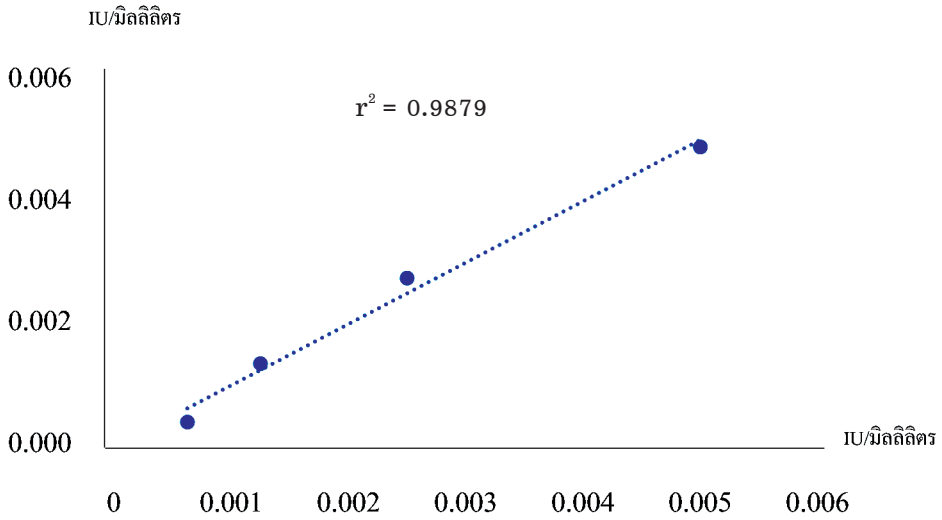
ผล

การทดสอบความจำเพาะของวิธี

ทดสอบตัวอย่าง 3 ชนิด คือ ตัวอย่าง Factor IX ตัวอย่าง Normal human albumin และตัวอย่าง Factor VIII พบว่า ตัวอย่าง Factor IX มีค่า WGO-Mean เท่ากับ 0.00038 ตัวอย่าง Normal human albumin มีค่า WGO-Mean เท่ากับ-0.00052 และตัวอย่าง Factor VIII มีค่า WGO-Mean เท่ากับ 1.165 IU/มิลลิลิตร ผลเปรียบเทียบความแตกต่างกันทางสถิติ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตัวอย่าง Factor IX ตัวอย่าง Normal human albumin และค่า blank ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบมีความจำเพาะต่อการนำมาวิเคราะห์ Factor VIII

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

การทดสอบสารอ้างอิง Factor VIII ที่ระดับความเข้มข้น 0.000625, 0.00125, 0.0025, 0.005 IU/มิลลิลิตร ได้ค่า ความแรง±SD เท่ากับ 0.00036±0.00023, 0.00131±0.00026, 0.00273±0.00023 และ 0.00487±0.00039 IU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้ค่าจริงของสารอ้างอิง (expected concentration) และจากการทดสอบ (back calculation concentration) พบว่า ทั้ง 2 ตัวแปร มีความสัมพันธ์แนวโน้มไปในแนวทางเดียวกัน โดยมีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้น คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2) เท่ากับ 0.9879 ดังแสดงในภาพที่ 1 ผลทดสอบความเป็นเส้นตรงได้ช่วงการวิเคราะห์ที่เหมาะสมของวิธีคือ 0.000625 - 0.005 IU/มิลลิลิตร



ภาพที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าจริงของสารอ้างอิง (x) และ ค่าที่ได้จากการทดสอบ (y) ของสารอ้างอิง Factor VIII

การทดสอบความแม่น

ผลทดสอบโดย spike สารอ้างอิง Factor VIII ความเข้มข้น 0.25 และ 1 IU/มิลลิลิตร มีค่า %recovery Geomean เท่ากับ 109.35% ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 84.48% ดังแสดงในตารางที่ 2 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบโดยมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 70–130

ตารางที่ 1 การทดสอบความแม่น spike สารอ้างอิง 0.25 IU/มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง Factor VIII

การทดสอบ	ตัวอย่าง	spike + buffer	spike + ตัวอย่าง	%recovery	%recovery Geomean
1	0.001662	0.001297	0.002927	97.58	
2	0.001407	0.000949	0.002618	127.53	109.35
3	0.001288	0.000987	0.002325	105.06	

ตารางที่ 2 การทดสอบความแม่น spike สารอ้างอิง 1 IU/มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง Factor VIII

การทดสอบ	ตัวอย่าง	spike + buffer	spike + ตัวอย่าง	%recovery	%recovery Geomean
1	0.001662	0.004860	0.005435	77.63	
2	0.001407	0.004214	0.005243	91.02	84.48
3	0.001288	0.004366	0.005015	85.34	

การทดสอบความเที่ยง

การทดสอบซ้ำในวันและเวลาเดียวกัน ผลการทดสอบมีค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 30.96 IU/มิลลิลิตร โดยพบว่ามีค่า %CV เท่ากับ 11.57 % ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งมีค่า %CV น้อยกว่า 15 เป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบ

ตารางที่ 3 ผลทดสอบความเที่ยงโดยการทดสอบซ้ำในวันเดียว

ครั้งที่	ค่าความแรง (IU/มิลลิลิตร)
1	32.00
2	31.75
3	31.25
4	37.00
5	27.75
6	27.00
WGO-Mean	30.96
SD	3.58
%CV	11.57

หมายเหตุ: WGO-Mean: weighted geometric mean, SD: standard deviation, %CV: percent coefficient of variation

การทดสอบซ้ำต่างวันและเวลากัน ผลการทดสอบทั้ง 3 วัน มีค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 25.43 IU/มิลลิลิตร ค่า SD เท่ากับ 2.76 ค่า %CV เท่ากับ 10.84 ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งมีค่า %CV น้อยกว่า 15 เป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบ

ตารางที่ 4 ผลทดสอบความเที่ยงโดยการทดสอบซ้ำต่างวัน

วันที่	ครั้งที่	ค่าความแรง (IU/มิลลิลิตร)
1	1	27.75
	2	20.30
2	1	26.50
	2	24.85
3	1	27.00
	2	27.00
WGO-Mean		25.42
SD		2.76
%CV		10.84

หมายเหตุ : WGO-Mean: weighted geometric mean, SD: standard deviation, %CV: percent coefficient of variation

การทดสอบ Reproducibility โดยวิเคราะห์ 2 คน ผลทดสอบมีค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 27.91 IU/มิลลิลิตร ค่า %CV เท่ากับ 7.74 ดังแสดงในตารางที่ 5 และเมื่อนำค่าความแรงเปรียบเทียบความแตกต่างกันทางสถิติโดยใช้ Independent-samples T-Test แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

ตารางที่ 5 การทดสอบ Reproducibility

ผู้ทดสอบ	ครั้งที่	ค่าความแรง (IU/มิลลิลิตร)
รายที่ 1	1	30.50
	2	28.75
	3	28.00
	4	26.25
รายที่ 2	1	26.50
	2	24.85
	3	27.75
	4	31.25
WGO-Mean		27.91
SD		2.16
%CV		7.74

หมายเหตุ: WGO-Mean: weighted geometric mean, SD: standard deviation, %CV: percent coefficient of variation

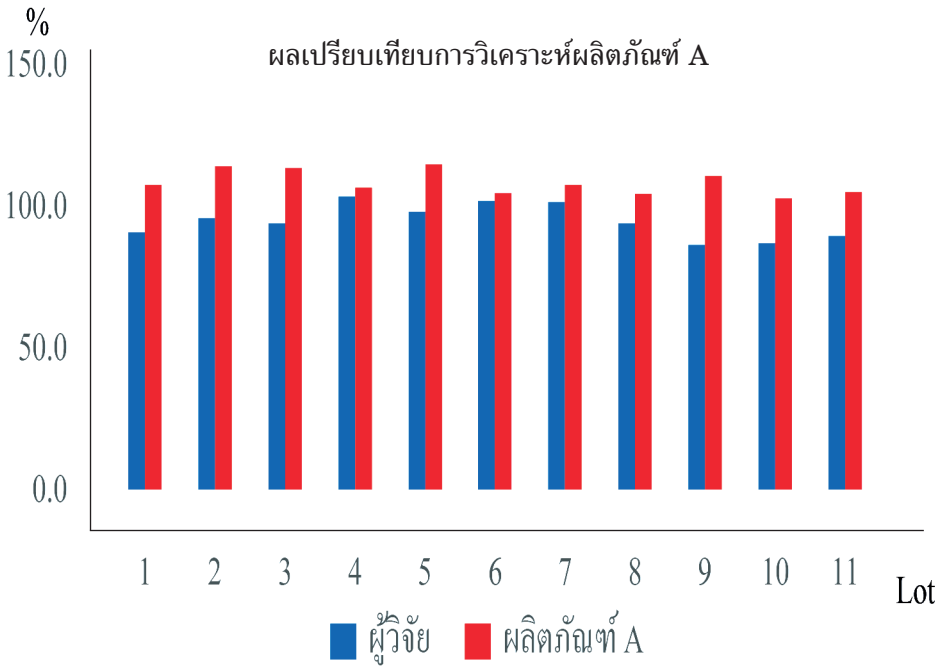
การทดสอบตัวอย่าง Factor VIII

ทดสอบตัวอย่าง Factor VIII จากผลิตภัณฑ์ A และ B โดยวิธีที่ทวนสอบนี้ มีค่าความแรงอยู่ในช่วง 86.8-102.1% และ 82.2-110.9% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ใช่วง 80-120% ของค่าความแรงที่ระบุบนฉลาก จึงแสดงให้เห็นว่าผลผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 6

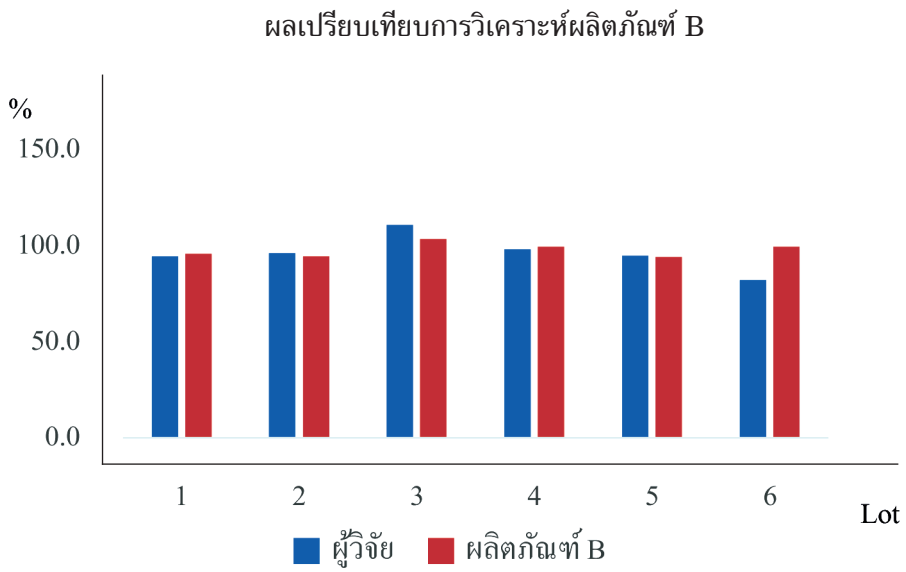
ตารางที่ 6 ผลทดสอบตัวอย่าง Factor VIII จากผลิตภัณฑ์ A และ B

รุ่นการผลิต	ผลิตภัณฑ์ A (%)		ผลิตภัณฑ์ B (%)	
	ผลทดสอบ	ผู้ผลิต	ผลทดสอบ	ผู้ผลิต
1	91.1	108.0	94.3	95.8
2	96.1	114.5	96.0	94.6
3	94.3	114.0	110.9	103.6
4	103.9	107.0	98.0	99.6
5	98.6	115.0	94.8	94.0
6	102.1	105.0	82.2	99.6
7	102.0	108.0		
8	94.4	104.7		
9	86.8	111.0		
10	87.5	103.0		
11	90.0	105.5		
WGO-Mean	94.99	108.62	95.7	97.8
SD	5.97	4.28	9.2	3.7
%CV	6.29	3.94	9.60	3.79

ผลทดสอบผลิตภัณฑ์ A ทั้ง 11 รุ่นการผลิต ได้ค่าต่ำกว่าค่าความแรงที่ทดสอบโดยผู้ผลิต ดังแสดงในภาพที่ 2 ขณะที่ค่าความแรงผลิตภัณฑ์ B ได้ค่าใกล้เคียงกับผู้ผลิต โดยมี 3 รุ่นการผลิต ที่ได้ค่าน้อยกว่า และอีก 3 รุ่นการผลิตได้ค่ามากกว่า ดังแสดงในภาพที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างผู้วิจัยและผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ A พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างผู้วิจัยและผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ B พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ A



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ B

วิจารณ์

การทวนสอบวิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII Chromogenic assay ทุกพารามิเตอร์ ได้แก่ ความจำเพาะ ความแม่น ความเที่ยง ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานของตำรายา European Pharmacopeia 10.0 ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบการทดสอบ Chromogenic assay มีความแม่น ความเที่ยง สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ในห้องปฏิบัติสถาบันชีววัตถุ

การศึกษาครั้งนี้เลือกผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นที่มีแหล่งผลิตมาจากพลาสมาเหมือนกัน เพื่อยืนยันว่าองค์ประกอบอื่น ๆ ผลิตภัณฑ์ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ Factor VIII ผลทดสอบตัวอย่าง Normal human albumin และผลิตภัณฑ์ Factor IX ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการแข็งตัวของเลือด พบว่าค่าดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกับการทดสอบที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าของตัวอย่าง Factor VIII จากผลดังกล่าวจึงแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบมีความจำเพาะ

การทวนสอบครั้งนี้เลือกใช้ชุดทดสอบจากผู้ผลิตเดียวซึ่งเป็นบริษัทเดียวกับชุดทดสอบ ที่สถาบันชีววัตถุใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพ Factor IX อยู่แล้ว และจากรายงานผลการศึกษา Chromogenic assay โดย Pickering W พบว่าการศึกษาเปรียบเทียบชุดทดสอบชนิด Chromogenic assay จาก 6 บริษัทผู้ผลิต พบว่าทุกชุดทดสอบมีความแปรปรวนน้อย สอดคล้องกับผลการศึกษาของ V. Collazo และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 พบว่าชุดทดสอบ Chromogenic assay มีความแม่น (sig 0.6959) และความเที่ยง[6, 7] จึงเห็นได้ว่าผลการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องและเป็นไปในแนวทางเดียวกับการศึกษาดังกล่าว นอกจากนี้การศึกษาของ Pickering W และคณะ ระบุด้วยว่าการทดสอบผลิตภัณฑ์ Factor VIII โดยเปรียบเทียบค่ากับสารอ้างอิงสากล WHO International standard จะมีค่าความแรงต่ำกว่าเมื่อใช้สารอ้างอิงที่มากับชุดทดสอบ (plasma calibrator) ประมาณ 10 เปอร์เซนต์[6, 8] ดังนั้นจากที่ผู้ผลิต A ใช้วิธีทดสอบแบบ one stage assay และใช้สารมาตรฐานอ้างอิงที่มากับชุดทดสอบ อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ค่าความแรงแตกต่างจากค่าที่ได้การศึกษาครั้งนี้

ข้อจำกัดของการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเป็นการทวนสอบโดยใช้ตัวอย่าง Factor VIII ชนิดที่ผลิตจากพลาสมามนุษย์เท่านั้น และปัจจุบันผลิตภัณฑ์แฟคเตอร์ชนิดรีคอมบีแนนท์ที่มีการนำเข้ามีเพียง 2 บริษัท และไม่มีตัวอย่างนำเข้ามาในช่วงเวลาของการทวนสอบ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่างดังกล่าว นอกจากนี้เนื่องจากสารอ้างอิง Factor VIII มีความคงตัวต่ำ หลังการละลายแล้วไม่สามารถเก็บไว้ใช้สำหรับการทดสอบครั้งอื่น ๆ ได้อีก ดังนั้นเพื่อลดค่าใช้จ่ายของการวิเคราะห์และสนับสนุนให้ประเทศพึ่งพาตนเองได้ สถาบันฯ ควรศึกษาการเตรียมสารมาตรฐาน Factor VIII เพื่อใช้เป็น working reference standard ของประเทศในการวิจัยครั้งต่อไป

สรุป

วิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII โดยหลักการ Chromogenic assay ด้วยวิธี microplate เป็นวิธีที่มีความแม่นยำ ความเที่ยง ความจำเพาะ เชื่อถือได้ สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ในห้องปฏิบัติการของสถาบันชีววัตถุต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และขอบคุณ ดร.สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ ที่สนับสนุนการดำเนินงานวิจัย และขอบคุณ ดร.วิสุทธนา สมุทรศรี ที่ให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์, บรรณาธิการ. โรคเลือดออกง่ายและลิ่มเลือดอุดตัน: แนวทางการวินิจฉัยและการรักษา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล; 2559.
2. Bhardwaj R, Rath G, Goyal AK. Advancement in the treatment of haemophilia. Int J Biol Macromol 2018; 118(Pt A): 289-95.
3. Moser KA, Adcock Funk DM. Chromogenic factor VIII activity assay. Am J Hematol 2014; 89(7): 781-4.
4. 2.7.4 Assay of human coagulation factor VIII. In: European Pharmacopoeia 10.0. 10th ed. Strasbourg, France: Council of Europe; 2019. p. 268.
5. A Werfen Company. HemosIL electrochrome™ factor VIII - 49730503. Bedford, MA: Instrumentation Laboraty Company; 2021.
6. Pickering W, Hansen M, Kjalke M, Ezban M. Factor VIII chromogenic assays can be used for potency labeling and postadministration monitoring of N8-GP. J Thromb Haemost 2016; 14(8): 1579-87.
7. Collazo V, Alonso C, Frutos G. Validation of an automated chromogenic assay of potency of factor VIII in commercial concentrates. Int J Lab Hematol 2013; 35(1): 38-45.
8. Dodt J, Hubbard AR, Wicks SJ, Gray E, Neugebauer B, Charton E, et al. Potency determination of factor VIII and factor IX for new product labelling and postinfusion testing: challenges for caregivers and regulators. Haemophilia 2015; 21(4): 543-9

Method Verification of Factor VIII Potency Test by Chromogenic Assay

Soammarisa Paungpornsri Titaporn Pootipinyowat and Paisan Pangjunan

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Factor VIII is an essential blood-clotting glycoprotein which is a cofactor for activating factor IX to an active form and then reacts to factor X for initiating the blood coagulation system. The aim of this study was to verify the potency test of Factor VIII products by chromogenic assay according to the European Pharmacopoeia recommendation. The results of linearity suggested that the appropriate concentrations for this assay were in the range of 0.000625 - 0.005 IU/ml. The percentage recovery geomean of accuracy test was 84.48-109.35%. The coefficient of variation (CV) of precision; within run, between run and reproducibility were 11.57, 10.84 and 7.74, respectively. The analysis of other plasma products by the verified method showed the technique was specific to Factor VIII. In addition, the determination of potency of Factor VIII products (11 lots of product A and 6 lots of product B) by the verified method found that both products complied with the European Pharmacopoeia specifications. The comparable results to the manufacturer's test showed that the potency results were significantly different in product A but not in product B. However, the manufacturer for product A used the method and reference standard which were dissimilar from this study. In conclusion, the potency testing of Factor VIII by chromogenic microplate assay is suitable as a standard method at laboratory of the Institute of Biological Products.

Keywords: Factor VIII, Chromogenic assay, Method Verification