บทความฟื้นวิชา

การทดสอบสารไพโรเจนในผลิตภัณฑ์ยาฉีดปราศจากเชื้อ

ฐิติพร ภาคภูมิพงศ์
ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ตามมาตรฐานการผลิตผลิตภัณฑ์ยาฉีดปราศจากเชื้อ เช่น น้ำยาป้องกันโลหิตแข็งตัวชนิด CPD, CPDA-1 ในถุงบรรจุโลหิต ยาชีววัตถุ เช่น Hepatitis B Immunoglobulin, Human Rabies Immunoglobulin, Human Albumin และอุปกรณ์ทางการแพทย์จะต้องปราศจากสารไพโรเจน เพราะหากร่างกายได้รับสารไพโรเจนจะก่อให้เกิดอาการไข้ หนาวสั่น ช็อก หรือเสียชีวิตได้ โดยระดับความรุนแรงขึ้นกับปริมาณและความเข้มข้นที่ได้รับและการตอบสนองต่อสารไพโรเจน

สารไพโรเจน (pyrogen) คือสารก่อไข้ แบ่งเป็น

1) สารไพโรเจนที่ร่างกายสร้างขึ้น (endogenous pyrogen) ซึ่งสารนั้นเรียกว่า cytokines ได้แก่ interleukin 1 (IL 1), interleukin 6 (IL 6) และ tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) เมื่อร่างกายเกิดการอักเสบหรือติดเชื้อจะหลั่งสาร cytokines สู่กระแสเลือดผ่านไปยังสมองส่วน hypothalamus ซึ่งจะส่งสัญญาณผ่านกลไก arachidonic acid pathway เกิดกระบวนการที่ก่อให้เกิดไข้

2) สารไพโรเจนได้จากภายนอกร่างกาย (exogenous pyrogen) ได้แก่ แบคทีเรีย ไวรัส ยีสต์ โมลด์ รวมถึงฝุ่นผงปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ สารไพโรเจนจากแบคทีเรียยังแบ่งออกเป็น 1) สารไพโรเจนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (exotoxin pyrogen) ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ซึ่งเป็นสารโปรตีนไม่ทนความร้อน และ 2) สารไพโรเจนที่เป็นชิ้นส่วนของผนังเซลล์แบคทีเรีย (endotoxin pyrogen) ได้แก่ lipoteichoic acids และ peptidoglycans จากแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) และ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) สาร LPS เป็นสารไพโรเจนที่มีฤทธิ์ร้ายแรงที่สุด ทนความร้อนสูง ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนชื้น (steam sterilization) แต่ถูกทำลายด้วยความร้อนแห้ง (dry heat sterilization) เมื่อ LPS ปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกายจะไปจับกับ lipopolysaccharide-binding protein (LBP) เป็น สารประกอบเชิงซ้อน LBP-LPS จากนั้นจะไปจับกับ CD14 receptor และนำไปสู่การกระตุ้นให้ร่างกายหลั่งสาร cytokines ต่างๆ ออกมา ซึ่งสามารถกล่าวในอีกแง่หนึ่งว่า exogenous pyrogen เป็นปัจจัยที่ไปกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง endogenous factors ซึ่งนำไปสู่การเกิดไข้นั่นเอง

ในปี 1999 - 2000 ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ศึกษาภาวะการณ์ติดเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากการให้โลหิต พบว่า 9 จาก 34 รายเสียชีวิตจากภาวะติดเชื้อแบคทีเรีย โดย 7 ใน 9 รายเสียชีวิตเนื่องจากติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ จากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ พบว่า ในถุงโลหิตที่ให้ผู้ป่วยทั้ง 9 ราย พบการปนเปื้อนสาร endotoxin ในปี 1993 ประเทศเดนมาร์กและสวีเดนได้มีรายงานพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย Serratia marcescens ในส่วนประกอบโลหิตประเภทเม็ดโลหิตแดง ซึ่งมีสาเหตุจากกระบวนการผลิตถุงบรรจุโลหิตโดยภายหลังทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนชื้น ถุงบรรจุโลหิตจะถูกห่อหุ้มด้วยถุงหุ้มชั้นนอกที่สะอาดแต่ไม่ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ โดยสาเหตุการปนเปื้อนอาจเกิดมาจากเชื้อแบคทีเรียที่ปะปนอยู่ในฝุ่นผงในโรงงานผลิตเมื่อแบคทีเรียสัมผัสกับถุงหุ้มชั้นนอกและได้รับความชื้นและสารอาหารที่เหมาะสมคือ diethylhexyl phthalate ซึ่งเป็นส่วนผสมของพลาสติกที่นำมาผลิตถุงเก็บโลหิต แบคทีเรียจึงแบ่งตัวและแทรกซึมเข้าภายในถุงเก็บโลหิตและทำให้เกิดภาวะติดเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วย เห็นได้ว่า นอกเหนือจากการปนเปื้อนแบคทีเรียโดยตรงแล้วการปนเปื้อนสารไพโรเจนในผลิตภัณฑ์ก็ส่งผลร้ายแรงถึงชีวิตเช่นกัน จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการควบคุมและทดสอบหาสารปนเปื้อนไพโรเจนในผลิตภัณฑ์

วิธีการทดสอบการปนเปื้อนสารไพโรเจนในผลิตภัณฑ์ยาฉีดตามมาตรฐานเภสัชตำรับ มี 2 วิธี คือ

1. Rabbit pyrogen test เป็นวิธีการทดสอบด้วยกระต่าย ซึ่งใช้ทดสอบสารไพโรเจนส่วนใหญ่รวมทั้ง endotoxin ด้วย เป็นวิธีที่ใช้กันมานานกว่า 50 ปี โดยฉีดสารที่ต้องการทดสอบเข้าเส้นเลือดดำริมใบหูของกระต่าย แล้วบันทึกอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง
2. Bacterial endotoxin test เป็นวิธีการทดสอบในหลอด

ได้รับต้นฉบับ 16 กุมภาพันธ์ 2554 ให้ลงตีพิมพ์ 1 มีนาคม 2554
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ เภสัชกรหญิง ฐิติพร ภาคภูมิพงศ์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
e-mail : thitiphorn_b@hotmail.com

ทดลอง (*in vitro*) โดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดจากเลือดแมงดาทะเลกับสาร bacterial endotoxins ซึ่งเฉพาะเจาะจงสำหรับการหาปริมาณ endotoxins จากแบคทีเรียแกรมลบ

มาตรฐานเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกา (The United State Pharmacopeia, USP 30) กำหนดให้ทดสอบหาสารไพโรเจนปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์น้ำยาป้องกันโลหิตแข็งตัวในถุงบรรจุโลหิตด้วยวิธีวิเคราะห์ bacterial endotoxin test โดยยอมให้มีสารไพโรเจนปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ได้ไม่เกิน 5.56 EU/mL (endotoxin unit per mL) ในขณะที่เภสัชตำรับยุโรป (European Pharmacopoeia, EP 6.0) กำหนดให้ใช้วิธี rabbit pyrogen test ทั้งผลิตภัณฑ์น้ำยาป้องกันโลหิตแข็งตัว และผลิตภัณฑ์ยาชีววัตถุ

Rabbit pyrogen test (วิธีการทดสอบด้วยกระต่าย)

การคัดเลือกกระต่าย

- ใช้กระต่ายสายพันธุ์ดีมีความต้านทานโรค มีหูใหญ่ ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ Albino strains, โดยเฉพาะ New Zealand Whites และ Belgium Whites (น้ำหนัก 2-4 กก.)
- ผ่านการกักกันเฝ้าดูอาการไว้อย่างน้อย 7 วัน ภายหลังรับมาจากหน่วยงานเพาะเลี้ยงและมีสุขภาพดี ไม่เจ็บป่วย
- น้ำหนัก ≥ 1.5 กก. น้ำหนักไม่ลดลงในช่วง 1 สัปดาห์ก่อนการทดสอบ
- เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มียา antibiotics

วิธีการทดสอบ

- กระต่ายใหม่หรือกระต่ายที่ไม่เคยผ่านการทดสอบต้องทำ preliminary test เพื่อให้กระต่ายเกิดความคุ้นชิน โดยฉีดด้วย pyrogen-free 9 g/L solution of sodium chloride (pyrogen free normal saline solution) ซึ่งผ่านการอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 38.5˚C ในขนาด 10 mL/kg ของน้ำหนักกระต่าย
- กระต่ายที่ผ่านการทำ preliminary test เป็นเวลา 3 วัน สามารถนำไปใช้ทดสอบ pyrogen ได้
- กระต่ายที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลง > 0.6˚C ห้ามนำไปใช้ทดสอบ pyrogen ให้เว้น 1 เดือน และนำมาทดสอบ preliminary test อีกครั้ง
- กระต่ายที่ผ่านการทดสอบ preliminary test สามารถนำมาใช้ทดสอบได้ โดยใช้กระต่าย 3 ตัวต่อ 1 ตัวอย่างทดสอบ
- พักกระต่ายในห้องพักก่อนการทดสอบ 1 คืน หรืออย่างน้อย 18 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิห้องให้อยู่ระหว่าง 18-26˚C ความชื้นสัมพัทธ์ 45-65% งดให้อาหารในระหว่างการพักก่อนการทดสอบแต่ให้น้ำ แต่ในระหว่างการทดสอบ pyrogen ต้องงดทั้งน้ำและอาหาร
- ย้ายกระต่ายเข้าสู่ห้องทดสอบ pyrogen ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไม่ให้ต่างจากห้องพักกระต่ายเกิน 3˚C
- ล็อคคอกระต่ายให้หลวมพอเหมาะ เสียบตัววัดอุณหภูมิทางก้นกระต่ายลึกประมาณ 5 ซม. ภายหลัง 1 ชั่วโมงจึงเริ่มบันทึกอุณหภูมิ
- บันทึกอุณหภูมิก่อนฉีดทุกๆ 15 นาที เป็นเวลาอย่างน้อย 90 นาที และบันทึกอุณหภูมิหลัง ฉีดทุกๆ 30 นาที เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง
- อุ่นตัวอย่างทดสอบ ที่อุณหภูมิประมาณ 38.5˚C
- เช็ดใบหูกระต่ายด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ ฉีดตัวอย่างทดสอบเข้าเส้นเลือดดำที่ใบหูกระต่ายอย่างช้าๆ แต่ไม่เกิน 4 นาที
- กระต่ายที่แสดงอุณหภูมิก่อนฉีดโดยวัด 2 ครั้ง ติดต่อกัน มีค่าอุณหภูมิต่างกัน > 0.2˚C ให้คัดแยกออกจากการทดสอบครั้งนี้และเปลี่ยนใช้กระต่ายสำรอง กระต่ายที่มีอุณหภูมิก่อนฉีด > 39.8˚C หรือ < 38.0˚C ให้คัดแยกออกจากการทดสอบครั้งนี้ และเปลี่ยนใช้กระต่ายสำรองที่เตรียมไว้
- การแปลผลการทดสอบ (ตารางที่ 1)

  ค่าอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงของกระต่ายแต่ละตัว =

  อุณหภูมิสูงสุด – อุณหภูมิก่อนฉีด

  เมื่อ อุณหภูมิก่อนฉีด = อุณหภูมิเฉลี่ยของอุณหภูมิกระต่ายวัด 2 ครั้ง ก่อนฉีด

  อุณหภูมิสูงสุด = อุณหภูมิสูงสุดของกระต่ายหลังฉีด วัดทุก 30 นาที 3 ชั่วโมง

ข้อดีของ rabbit pyrogen test

1. การทดสอบและข้อปฏิบัติต่างๆ ได้มีการทำอย่างแพร่หลายไปทั่วโลกเป็นเวลามากกว่า 50 ปี
2. กระต่ายมีความไวต่อสารก่อไข้เช่นเดียวกับคนและไวต่อสารที่เป็น exogenous pyrogen ต่างๆ เช่น จากแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส ฝุ่นผง และสเตียรอยด์

ข้อด้อยของ rabbit pyrogen test

1. เสียค่าใช้จ่ายสูงสำหรับบุคลากรในห้องปฏิบัติการและการเตรียมสัตว์ทดลอง
2. ใช้เวลาในการทดสอบนาน
3. เป็นวิธีที่ต้องใช้สัตว์มาทดสอบ
4. มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อความไวของการทดสอบ ซึ่งอาจทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อน เช่น ฤดูกาล วัน เวลา ความเครียด การให้อาหาร และอุณหภูมิแวดล้อม เป็นต้น

5. กระต่ายแต่ละตัวมีอุณหภูมิต่างกัน และเป็นสัตว์ที่ไวต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการตอบสนองต่อ pyrogen อาจไม่เท่ากัน
6. หากผลิตภัณฑ์ยามีสารรบกวนการทดสอบ เช่น ยาลดไข้ จะไม่สามารถใช้วิธีนี้ได้เนื่องจากการทดสอบด้วยกระต่ายจะดูผลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกระต่าย นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ยาอื่นๆที่ไม่สามารถใช้วิธีนี้ได้เช่น prostaglandin, ฮอร์โมน, ยารักษามะเร็ง, กัมมันตรังสี, ยาชา เป็นต้น

Bacterial endotoxin test หรือ LAL test

เป็นวิธีการทดสอบหาปริมาณ endotoxin เฉพาะที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบโดยใช้สารสกัดจากเลือดแมงดาทะเล เรียกว่า Limulus Amebocyte Lysate (LAL) โดยในปี 1956 Dr. Frederic Bang พบการตายของแมงดาทะเล (horseshoe crab; *Limulus polyphemus*) โดยเลือดของมันจับตัวเป็นก้อนแข็งเมื่อนำไปเพาะเชื้อพบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* และ *Pseudomonas* sp. ต่อมาในปี 1964 Dr. Jack Levin และ Dr. Frederick Bang พบว่าปฏิกิริยาของเลือดแมงดาทะเลเกิดจาก endotoxin จากแบคทีเรียแกรมลบกับ Amebocyte lysate ของแมงดาทะเล เขาจึงได้ทำการสกัดสารจาก Amebocyte cell นำไปเตรียมเป็น reagent เรียก Limulus Amebocyte Lysate (LAL)

LAL test มี 3 เทคนิควิธี ดังนี้

1. Gel-clot techniques เป็นการทดสอบแบบ qualitative อาศัยหลักการที่ว่า LAL จะเกิดการแข็งตัวเมื่อมี gram negative endotoxin โดย gram negative endotoxin จะกระตุ้น proenzyme ใน LAL ให้เป็น activated enzyme เรียกว่า coagulase ซึ่งจะเปลี่ยนสาร coagulogenใน LAL ให้เป็นสาร coagulin เกิดการแข็งตัวเป็นเจล ซึ่งผู้ทดสอบต้องสังเกตการเกิดเจลด้วยตา

$$\text{Proenzyme} \xrightarrow{\text{Endotoxin}} \text{Coagulase}$$

$$\text{Coagulogen} \xrightarrow{\text{Coagulase}} \text{Coagulin}$$

2. Turbidimetric method เป็นการทดสอบแบบ quantitative อาศัยการวัดความขุ่นหลังการแข็งตัวเป็นเจล การวัดเวลาในการเกิดความขุ่นสามารถวัดด้วยเครื่อง photometer หากมีปริมาณ gram negative endotoxin สูง จะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว เมื่อนำไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานจะทราบความเข้มข้นของสาร gram negative endotoxin
3. Chromogenic method เป็นการทดสอบแบบ quantitative อาศัยการเกิดสีหลังจากการแตกออกของ synthetic peptide chromogen complex ซึ่งความเข้มของสีจะขึ้นกับปริมาณ gram negative endotoxin โดย gram negative endotoxin จะกระตุ้น proenzyme ใน LAL ให้เป็น activated enzyme ซึ่งจะเปลี่ยนสารสังเคราะห์ substrate ที่ไม่มีสีให้มีสีเหลือง (p-nitroaniline, pNA) สามารถวัดเวลาในการเกิดสีเหลืองด้วย photometer เมื่อนำไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานจะทราบความเข้มข้นของสาร gram negative endotoxin

$$\text{Proenzyme} \xrightarrow{\text{Endotoxin}} \text{Enzyme(Coagulase)}$$

$$\text{Substrate} + H_2O \xrightarrow{\text{Coagulase}} \text{Peptide} + \text{pNA (yellow)}$$

ตารางที่ 1 การแปลผลการทดสอบ Rabbit pyrogen test

Number of rabbits	(I) Material passes if summed response does not exceed (C)	(II) Material fails if summed response exceed (C)
3	1.15 C	2.65 C
6	2.80 C	4.30 C
9	4.45 C	5.95 C
12	6.60 C	6.60 C

- ถ้าอุณหภูมิรวม $\leq$ ค่าในคอลัมภ์ (I) ผลการทดสอบ ผ่าน ปราศจากสารไพโรเจน
- ถ้าอุณหภูมิรวม > (I) แต่ $\leq$ (II) ให้ทดสอบซ้ำ
- ถ้าอุณหภูมิรวม > (II) ผลการทดสอบ ไม่ผ่าน มีการปนเปื้อนสารไพโรเจน

ข้อดีของวิธี LAL test คือ

1. เป็น *in vitro* test
2. ใช้พื้นที่ วัสดุ อุปกรณ์ และบุคลากรในการทดสอบน้อย ค่าใช้จ่ายน้อย ทำได้ง่ายกว่า
3. รวดเร็วในการทดสอบ (ภายใน 90 นาที)
4. มีความไวในการทดสอบมากกว่าวิธี rabbit pyrogen test โดย
   - Endotoxin threshold ในคนประมาณ 2 ng/kg
   - Endotoxin threshold ในกระต่ายประมาณ 0.2-3.5 ng/kg
   - LAL สามารถตรวจสอบ Endotoxin ต่ำสุดได้ 0.01-0.14 ng/mL
5. ใช้ได้ดีกับยาที่ไม่สามารถทดสอบด้วยกระต่าย เช่น
   - ยาฉีดกัมมันตภาพรังสี 99m Tc
   - ยาฉีดเข้าน้ำไขสันหลัง (Intrathecal)
   - ยารักษามะเร็ง
   - ยาลดไข้

ข้อด้อยของ LAL test

1. ทดสอบได้เฉพาะ pyrogen ที่เกิดจาก gram negative bacteria ชนิด lipopolysaccharide เท่านั้น
2. มีปฏิกิริยาระหว่าง LAL reagent กับตัวยาที่ใช้ทดสอบ ทำให้ไม่สามารถใช้ได้กับตัวยาทุกตัว
3. Sensitivity จะแปรตาม endotoxin ของเชื้อชนิดต่างๆ

การทดสอบไพโรเจนในผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องมือแพทย์เป็นสิ่งจำเป็นและมีความสำคัญทำให้ผู้ใช้มั่นใจได้ในคุณภาพและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ โดยควรเลือกใช้วิธีทดสอบให้เหมาะสมและเป็นไปตามมาตรฐานสากล ในหลายปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิธีอื่นๆ สำหรับทดสอบสารไพโรเจนในผลิตภัณฑ์โลหิต (plasma derived medicinal product) เรียกว่า Monocytes Activation tests (MAT) โดยนำ human monocytes ที่ได้จากโลหิตมนุษย์ หรือ human peripheral mononuclear cells ทำการวัดปริมาณ IL-1, IL6 และ TNF-alpha ซึ่งได้ผลดี อย่างไรก็ตามก็ตามวิธีดังกล่าวยังเป็นวิธีทางเลือก นอกเหนือจากการทดสอบด้วยกระต่ายแล้ว หน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องได้พยายามสนับสนุนการใช้วิธี bacterial endotoxin test เพื่อลดการใช้สัตว์ทดลองซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงทั้งในด้านสถานที่ เครื่องมืออุปกรณ์รวมทั้งบุคลากร อีกทั้งยังต้องคำนึงถึงจรรญาบรรณในการใช้สัตว์ทดลองด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. *USP 30-NF25 <85> bacterial Endotoxin. Rockville, MD: United States Pharmacopeia (2007).*
2. *EP 6.0 (2.6.8) Pyrogens. Strasbourg, France: European Pharmacopoeia (2008).*
3. *Mark EB, Shauna NH. Bacterial contamination of blood components. Clinical Microbiology Reviews 2005;18:195-204.*
4. *Thomas P, Gerard L, Claire P, et al. Two cases of fatal shock after transfusion of platelets contaminated by Staphylococcus aureus: Role of superantigenic toxins (Brief report). Clinical Infectious Diseases 2004;39:e106-9.*