สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administration

วารสารอาหารและยา THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
ปีที่ 28 ฉบับที่ 1 (2564): มกราคม-เมษายน Vol. 28 No. 1 (2021): January-April
https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index

การทดสอบความแรงของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบีที่จำหน่ายในประเทศไทย

กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล[1] **ฐิตาภรณ์ ภูติภิณโยวัฒน์**[1] **ไพศาล พังจุนันท์**[1] **สุภาพร ภูมิอมร**[1]

[1]สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี
ที่อยู่ติดต่อ: กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000 kanitta.p@dmsc.mail.go.th

Potency Test of Human Hepatitis B Immunoglobulin in Thailand

Kanitta Phuwanartnaranubarn[1], **Titaporn Pootipinyowat**[1], **Paisan Pangjunan**[1], **Supaporn Phumiamorn**[1]

[1]Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand
Contact address: Kanitta Phuwanartnaranubarn, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, kanitta.p@dmsc.mail.go.th

Received: 20 September 2019, **Revised:** 28 January 2020, **Accepted:** 28 May 2020

Abstract

Background: The prevention or treatment for people without immunity who were close-contacted with hepatitis B infection is to apply human hepatitis B immunoglobulin (HBIG) immediately together with hepatitis B vaccine. The potency of human hepatitis B immunoglobulin expresses their competency to bind to Hepatitis B surface antigens. At present, there are five product brands that were approved by the Thai Food and Drug Administration. Three brands are distributed in Thailand, one is produced in the country and the other two are imported. Each manufacturer company uses different immunoassay methods to test the potency of HBIG according to European pharmacopoeia 9.0, whereas the Institute of Biological Products has no method of HBIG potency testing. Hence, study must be conducted for the potency test of HBIG products to be used as a standard method of testing products distributed in the country.

Objectives: To prove that the testing method is suitable and can be used as a standard method for potency test on all HBIG products that are distributed in Thailand.

Methodology: This study selected a commercial test kits for quantitative determination of anti-HBs in serum or plasma with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique which is validated by international standard. Then, the research used it to examine the potency of HBIG products that distributed in the country between 2016 and 2019 in using samples from three product brands including 15 lots of the production and compare the results with the test results of the manufacturers to prove that it can be used as a standard method.

Results: Using the commercial test kit to examine antibody to hepatitis B virus in serum or plasma of patients to test the potency by ELISA method in 15 lots of 3 product brands found that the

test results were similar to those of the manufacturers; there were not statistically significant difference (p>0.05). The results met the requirements of the European Pharmacopeia 9.0 and specification of each licensed products in the country. The application of the commercial test kit can reduce the test preparation period and decrease a variation of substance providing. Moreover, using international standard substance reference on the World Health Organization and use the same dilution method as the samples yielded the test results more reliable.

Conclusions: The results indicate that the commercial test kit is suitable and able to be use as a standard method for potency determination in all products that distributed in Thailand.

Keywords: potency, ELISA, commercial test kit, human hepatitis B immunoglobulin

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: การป้องกันหรือรักษาผู้สัมผัสโรคไวรัสตับอักเสบชนิดบีในผู้ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันมาก่อน คือการให้อิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบีทันที ร่วมกับการให้วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบชนิดบี ซึ่งความแรงของอิมมูโนโกลบูลิน จะแสดงถึงความสามารถต่อการจับกับแอนติเจนที่ทำให้ก่อโรค ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการขึ้นทะเบียนกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 5 ยี่ห้อ โดยมีการจำหน่ายในประเทศไทย จำนวน 3 ยี่ห้อ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศ 1 ยี่ห้อ และนำเข้าจากต่างประเทศ 2 ยี่ห้อ โดยที่แต่ละบริษัทผู้ผลิตจะใช้วิธี Immunoassay เพื่อหาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ตามตำรายายุโรปด้วยวิธีการแตกต่างกัน ในขณะที่สถาบันชีววัตถุยังไม่มีวิธีการทดสอบความแรงของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบี (HBIG) จึงต้องมีการศึกษาการตรวจวิเคราะห์ความแรงของ HBIG เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในประเทศ

วัตถุประสงค์: เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ มีความเหมาะสม สามารถนำมาใช้เป็นวิธีในการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบี ในทุกยี่ห้อที่จำหน่ายในประเทศไทย

วิธีการวิจัย: คัดเลือกชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีในซีรั่มหรือพลาสมามาใช้ตรวจความแรงของอิมมูโนโกลบูลินด้วยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ซึ่งผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตามมาตรฐานสากลแล้ว จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในประเทศระหว่างปี 2559-2562 ในตัวอย่าง 3 ยี่ห้อ รวม 15 รุ่นการผลิต และเปรียบเทียบผลกับผลตรวจวิเคราะห์ของผู้ผลิตเพื่อพิสูจน์ว่าสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานได้

ผลการศึกษา: ใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบชนิดบีในซีรั่มหรือพลาสม่าของผู้ป่วยมาทดสอบความแรงด้วยวิธี ELISA ในตัวอย่าง 3 ยี่ห้อ รวม 15 รุ่นการผลิต ผลการทดสอบความแรงใกล้เคียงกับผลการตรวจวิเคราะห์ของบริษัทผู้ผลิต โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) โดยผลการทดสอบที่ได้เป็นไปตามข้อกำหนดของตำรายายุโรป 9.0 และเกณฑ์กำหนดของแต่ละผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศ โดยในการประยุกต์ใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปนี้ สามารถลดระยะเวลาในการเตรียมการทดสอบ และความแปรปรวนจากการเตรียมสาร รวมทั้งการเลือกใช้สารมาตรฐานสากลจากองค์การอนามัยโลกโดยตรง และใช้วิธีการเจือจางในรูปแบบเดียวกับตัวอย่าง ทำให้ผลการทดสอบเชื่อถือได้มากขึ้น

สรุป: ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป มีความเหมาะสม สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ความแรงของ HBIG ได้ทุกผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในประเทศ

คำสำคัญ: ความแรง ELISA ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป อิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบี

บทนำ

ไวรัสตับอักเสบชนิดบี เป็นไวรัสที่สามารถติดต่อผ่านทางเลือด การมีเพศสัมพันธ์ และการใช้ของมีคมร่วมระหว่างบุคคล เด็กแรกเกิดอาจติดเชื้อจากมารดาที่เป็นพาหะในขณะคลอดหรือหลังคลอด ซึ่งผู้ติดเชื้ออาจมีหรือไม่มีอาการตับอักเสบ ร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อรักษาอาการป่วยให้หายเองได้ หรืออาจติดเชื้อเรื้อรังไปตลอดชีวิต[1] การป้องกันหลังสัมผัสโรคในกรณีที่ผู้สัมผัสไม่มีภูมิคุ้มกันมาก่อนคือการให้อิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบีที่ได้จากมนุษย์ (Human Hepatitis B Immuno globulin: HBIG) ทันทีหรือภายใน 24 ชั่วโมงหลังสัมผัส ตามด้วยการให้วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบชนิดบี[2] ซึ่ง HBIG เตรียมได้จากพลาสมาของผู้บริจาคโลหิตที่มีภูมิต้านทานสูงต่อไวรัสโรคตับอักเสบชนิดบี[3] ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นทะเบียนกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาทั้งสิ้น 5 ยี่ห้อ 6 ตำรับ แต่มีจำหน่ายในประเทศไทยในช่วงปี 2559-2562 จำนวน 3 ยี่ห้อ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตภายในประเทศ 1 ยี่ห้อ และนำเข้าจากต่างประเทศ 2 ยี่ห้อ[4]

การรักษานั้น อิมมูโนโกลบูลินจะจับกับ hepatitis B surface antigen ในผู้ป่วยเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งประสิทธิภาพหรือความแรงของอิมมูโนโกลบูลิน จะแสดงถึงความสามารถต่อการจับกับแอนติเจนดังกล่าว ดังนั้น หน่วยงานควบคุมกำกับทางห้องปฏิบัติการ จึงจำเป็นต้องควบคุมคุณภาพของชีววัตถุที่จำหน่ายในประเทศไทยเพื่อตรวจสอบว่าการผลิตหรือการนำเข้า HBIG นั้นมีคุณภาพเป็นไปตามที่ขึ้นทะเบียน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศที่ต้องมีการควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการในทุกรายการทดสอบเพื่อการรับรองรุ่นการผลิต รวมทั้งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ ความปลอดภัย และประสิทธิภาพ

แต่เนื่องจากสถาบันชีววัตถุยังไม่มีวิธีการทดสอบความแรงของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบี จึงได้พัฒนาวิธีนี้ขึ้นมา เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตหรือจำหน่ายในประเทศเพื่อยืนยันว่าเป็นไปตามที่ขึ้นทะเบียนไว้จริง ซึ่งเป็นบทบาทหน้าที่ของสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่เป็นหน่วยงานเดียวในประเทศที่ทำหน้าที่ควบคุมคุณภาพชีววัตถุทางห้องปฏิบัติการ การศึกษานี้ได้ใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนในซีรั่มหรือพลาสมาของมนุษย์มาตรวจวิเคราะห์ความแรงของ HBIG โดยใช้หลักการของ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) และได้ทำการศึกษาความถูกต้องของวิธี (method validation) มาก่อนแล้ว พร้อมกับคัดเลือกชุดน้ำยาทดสอบที่มีความเหมาะสมที่สุดจากหลายยี่ห้อที่มีจำหน่ายในประเทศไทยโดยพิจารณาในแง่ของประสิทธิภาพ ความไว และราคา ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์ความแรงของผลิตภัณฑ์เพื่อนำมาใช้ทดสอบกับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในประเทศแทนการใช้ซีรั่มหรือพลาสมาในการตรวจ ซึ่งแต่ละบริษัทผู้ผลิตมีการพัฒนาใช้ในการตรวจผลิตภัณฑ์ของตนเอง ด้วยเทคนิคของการเตรียมตัวอย่าง วิธีการและยี่ห้อของชุดทดสอบที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ ทรัพยากร และเครื่องมือของแต่ละบริษัทผู้ผลิต ซึ่งก่อนหน้านี้วิธีการทดสอบความแรงของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบี ได้ทำการทดสอบความถูกต้องตามมาตรฐานสากลในหัวข้อความจำเพาะเจาะจง ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงการใช้งาน ความแม่น ความเที่ยง ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ และความทนของวิธีจากการใช้เครื่องวัดและโปรแกรมคำนวณ ซึ่งผลที่ได้ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนดในทุกหัวข้อ การศึกษานี้จึงนำวิธีดังกล่าวมาทำการตรวจวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์หลากหลายยี่ห้อที่จำหน่ายในประเทศไทย และเปรียบเทียบความแรงของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบีของผู้ผลิตที่จำหน่ายในประเทศ เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศได้ในทุกยี่ห้อที่จำหน่ายในประเทศ

วัตถุประสงค์

เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องของวิธีตามมาตรฐานสากลของสถาบันชีววัตถุมีความเหมาะสม สามารถนำมาใช้เป็นวิธีในการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบีในทุกยี่ห้อที่จำหน่ายในประเทศ

ระเบียบวิธีการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader) รุ่น ELx808IU ของบริษัท BioTek สำหรับใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. เครื่องบ่มเพาะเชื้อ (incubator) แบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ±1 °C
3. เครื่องล้างเพลทแบบอัตโนมัติ (automatic plate washer)

ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป สารมาตรฐาน และตัวอย่าง

ชุดทดสอบ Monoelisa™ Anti-HBs Plus ของบริษัท Bio-Rad ประกอบด้วย 96-well plate ที่เคลือบด้วย HBsAg (subtypes ad and ay) Conjugate ที่เป็น horseradish peroxidase-labeled HBsAg (human, subtypes ad and ay) สารตั้งต้น (substrate) ที่เป็น 3.3', 5.5' tetramethylbenzidine (TMB) เพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ น้ำยาสำหรับเจือจาง Conjugate (conjugate diluent) น้ำยาสำหรับเจือจางตัวอย่าง (specimen diluent) น้ำยาสำหรับเจือจางสารตั้งต้น (substrate diluent) น้ำยาสำหรับล้างเพลท (washing solution) และน้ำยาหยุดปฏิกิริยา (stop solution) ที่เป็น sulfuric acid solution โดยมีตัวควบคุมการทดสอบ คือ Anti-HBs negative control 10 mIU/ml และ Positive Control 100 mIU/ml[5] เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C โดยเก็บไว้ในกล่องบรรจุภัณฑ์ของชุดน้ำยาทดสอบที่ป้องกันแสงได้นานจนถึงวันหมดอายุของชุดน้ำยาทดสอบ

สารมาตรฐานสากลที่ใช้เป็น WHO International standard 2nd International standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human (NIBSC code: 07/164) ได้จากหน่วยงาน National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) ประเทศสหราชอาณาจักร กำหนดค่าความแรงเท่ากับ 100 IU/ml เก็บที่อุณหภูมิ -30 °C[6]

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบเป็นผลิตภัณฑ์อิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบีที่ได้จากมนุษย์ ที่จำหน่ายในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2559-2562 จำนวน 3 ยี่ห้อ 15 รุ่นการผลิต เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C

การเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง

สารมาตรฐานและตัวอย่าง นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125 และ 0.25 IU/ml ด้วยน้ำยาเจือจางตัวอย่างจากชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป

การคำนวณ

คำนวณค่าความแรงด้วยโปรแกรม Gen5 (version 1.11) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน คูณด้วยความเข้มข้นก่อนเจือจาง รายงานผลการวิเคราะห์เป็น IU/ml[7] หรือใช้โปรแกรม parallel line assay (version Bioassay assist 3.031995) โดยกำหนดเกณฑ์มาตรฐาน ได้แก่ ค่าความสัมพันธ์ของการเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง (preparation) ต้องไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างในลักษณะของ dose-response (regression) ต้องอยู่ในเกณฑ์ของความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 และกราฟที่ได้ต้องมีความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างในลักษณะคู่ขนาน (parallelism) และเป็นเส้นตรง (linearity)[8] และเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างสถาบันชีววัตถุและบริษัทผู้ผลิตในแต่ละรุ่นการผลิต โดยใช้สถิติ paired t-test

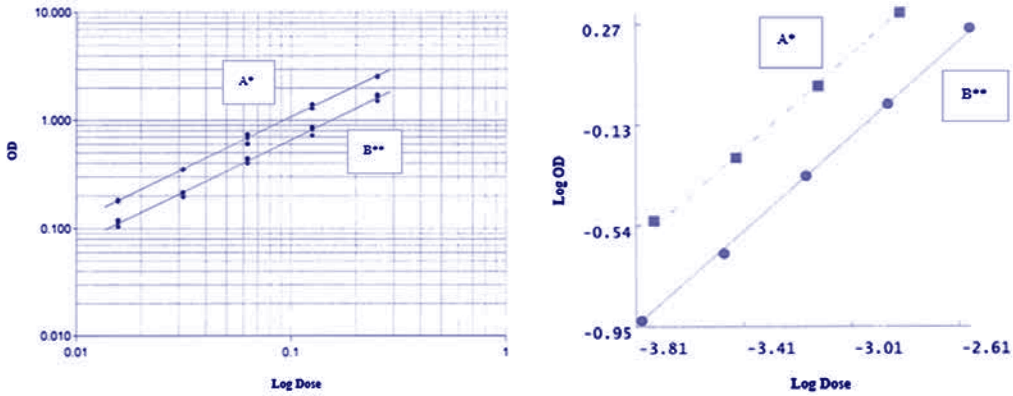
วิธีวิเคราะห์

นำสารมาตรฐานสากลและตัวอย่างที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้น พร้อมทั้งตัวควบคุมการทดสอบ Anti-HBs negative control และ Positive Control ใส่ลงในหลุมของ 96-well plate หลุมละ 100 µl และใส่น้ำยาสำหรับเจือจางตัวอย่าง 100 µl/หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±1 ºC นาน 60±5 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วยน้ำยาสำหรับล้างเพลท 375 µl ต่อหลุม แช่ทิ้งไว้ 30-60 วินาที ทำการล้างเพลท 4 ครั้งด้วยเครื่องล้างอัตโนมัติ จากนั้นซับด้วยกระดาษรองซับน้ำให้เพลทแห้ง แล้วเติม conjugate (horseradish peroxidase-labeled HBsAg (human, subtypes ad and ay)) 100 µl/หลุม และนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37±1 ºC นาน 60±5 นาที ล้างเพลทอีก 4 ครั้ง ก่อนเติมสารตั้งต้น 3.3’, 5.5’ tetramethyl benzidine (TMB) 100 ul/หลุม และนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 18-30 ºC นาน 30±5 นาที

เมื่อสารตั้งต้นถูกย่อยจะเกิดสารสีน้ำเงิน ซึ่งความเข้มของสีจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของแอนติบอดีในตัวอย่าง จากนั้นเติม sulfuric acid solution เพื่อหยุดปฏิกิริยา ซึ่งทำให้สารสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 450 นาโนเมตร (nm) (reference wavelength 620-700 nm) ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท คำนวณผลโดยใช้โปรแกรม Gen5 หรือ parallel line[5-8] จากนั้นเปรียบเทียบผลกับผู้ผลิตในตัวอย่างที่บริษัทยื่นคำขอหนังสือรับรองรุ่นการผลิตสำหรับยาชีววัตถุที่ใช้สำหรับมนุษย์เพื่อจำหน่ายในประเทศไทย โดยบริษัทได้ดำเนินการตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์ และวิธีการขอรับหนังสือรับรองรุ่นการผลิตยาชีววัตถุ และกำหนดแบบคำขอ และแบบหนังสือรับรองรุ่นการผลิตยาชีววัตถุที่ต้องส่งตัวอย่างและเอกสารหลักฐานให้สถาบันชีววัตถุรับรอง[9] ซึ่งบริษัทระบุว่าใช้วิธี Immunoassay ตามตำรายายุโรป

ผลการศึกษา

ในการคัดเลือกชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบี ได้คัดเลือกชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยมีช่วงของการตรวจวัดที่ครอบคลุมได้กว้างระหว่าง 10-1,000 mIU/ml เมื่อนำมาทดสอบหาสภาวะทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างมีลักษณะคู่ขนาน (parallelism) และเป็นเส้นตรง (linearity) ได้ผลการทดสอบความแรงในตัวอย่างที่ค่าใกล้เคียงกับผลการตรวจวิเคราะห์ของบริษัทผู้ผลิต ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างในลักษณะคู่ขนาน (parallelism) และเป็นเส้นตรง (linearity) ด้วยโปรแกรม Gen5 (ก) และ parallel line assay (ข)

*A คือ ผลิตภัณฑ์ HBIG ** B คือ สารมาตรฐาน anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin

จากการทดสอบความแรงของอิมมูโนโกลบูลินที่ใช้ป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบชนิดบี โดยวิธีได้ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว ในตัวอย่างที่จำหน่ายในประเทศไทยปี 2559-2562 จำนวน 3 ยี่ห้อ (A B และ C) โดยตัวอย่าง A จำนวน 2 รุ่นการผลิต ตัวอย่าง B จำนวน 10 รุ่นการผลิต และตัวอย่าง C จำนวน 3 รุ่นการผลิต รวม 15 รุ่นการผลิต พบว่าในตัวอย่าง A B และ C ผลการตรวจวิเคราะห์ให้ค่าความแรง 84-86, 196-284 และ 302-377 IU/ml ตามลำดับ ในขณะที่ผู้ผลิตตรวจวิเคราะห์ได้ค่าความแรง 58, 204-234 และ 290-356 IU/ml ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

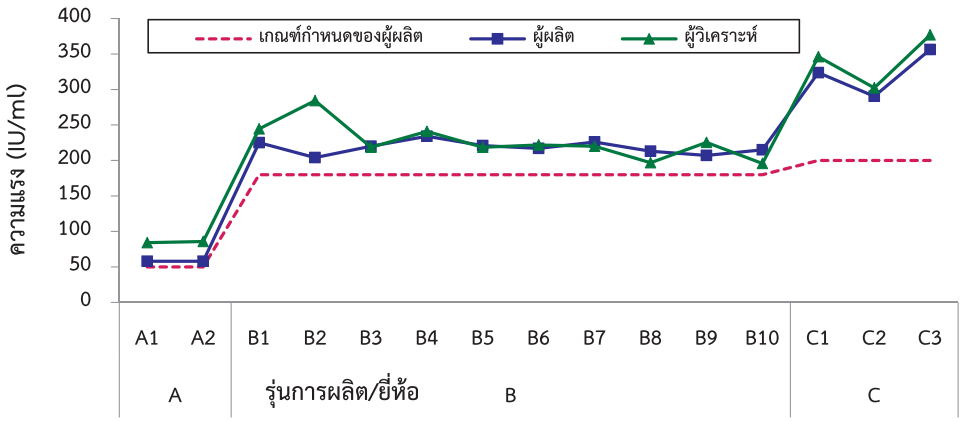
เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ paired *t*-test พบว่า ผลการวิเคราะห์ของผู้ผลิตและสถาบันชีววัตถุไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีค่า *p*-value=0.55

ตารางที่ 1 ความแรงของ HBIG เปรียบเทียบระหว่างผู้ผลิตและสถาบันชีววัตถุ

ตัวอย่าง	รุ่นการผลิต	ความแรง (IU/ml)		
		ข้อกำหนดยุโรป	ผู้ผลิต*	สถาบันชีววัตถุ*
A	A1	≥ 50	58	84
	A2	≥ 50	58	86
B	B1	≥ 100	225	245
	B2	≥ 100	204	284
	B3	≥ 100	220	219
	B4	≥ 100	234	241
	B5	≥ 100	221	219
	B6	≥ 100	217	222
	B7	≥ 100	226	220
	B8	≥ 100	213	197
	B9	≥ 100	207	226
	B10	≥ 100	215	196
C	C1	≥ 100	324	346
	C2	≥ 100	290	302
	C3	≥ 100	356	377

หมายเหตุ * ค่าที่ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ paired *t*-test พบว่าผลการวิเคราะห์ของทั้งสองหน่วยงานไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีค่า *p*-value 0.55

นอกจากนี้ พบว่าค่าที่ได้เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นทะเบียนไว้ โดยพบว่าผลการวิเคราะห์ค่าความแรงของตัวอย่าง A B และ C มีค่ามากกว่า 50 180 และ 200 IU/ml ตามลำดับ ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ความแรงของ HBIG ของผู้ผลิตและผู้วิเคราะห์เทียบกับเกณฑ์กำหนดของผลิตภัณฑ์แต่ละยี่ห้อ

อภิปรายผล

ตามตำรายายุโรป 9.0 กำหนดวิธีการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบีที่ได้จากมนุษย์โดยวิธี immunoassay ซึ่งมีหลากหลายวิธีขึ้นอยู่กับความสามารถของห้องปฏิบัติการ การศึกษานี้ได้ประยุกต์ใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้ในการหาแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบชนิดบีในซีรั่ม หรือพลาสมาของผู้ป่วยมาใช้ในการวิเคราะห์ความแรงของผลิตภัณฑ์แทน โดยในท้องตลาดมีชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปอย่างน้อย 13 ยี่ห้อ และแต่ละยี่ห้อใช้วิธีแตกต่างกันไป เช่น Radioimmunoassay Enzyme-Link Immunosorbent Assay Chemiluminescence และ Fluorescence เป็นต้น[10-14] โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ได้คัดเลือกจากสามชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในประเทศไทยและนำมาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีโดยมีช่วงของการตรวจวัดที่ครอบคลุมและกว้างระหว่าง 10-1,000 mIU/ml ในขณะที่ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปอีกสองยี่ห้อ มีช่วงในการทดสอบแคบอยู่ระหว่าง 10-100 หรือ 10-160 mIU/ml ซึ่งการเลือกชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปดังกล่าวทำให้ลดความผิดพลาดของการเจือจางให้น้อยลงในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เนื่องจากค่าความแรงของบางผลิตภัณฑ์มีค่ามากกว่า 200,000 mIU/ml และพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างเป็นแบบลักษณะคู่ขนาน (parallelism) และเป็นเส้นตรง (linearity) อยู่ในเกณฑ์ ซึ่งแสดงถึงชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปมีความเหมาะสมกับเครื่องมือที่ใช้ นอกจากนี้สามารถเทียบค่าความแรงกับสารมาตรฐานสากลได้ อีกทั้งเป็นหนึ่งในชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่ร่วมในการกำหนดค่าความแรงของสารมาตรฐานสากลขององค์การอนามัยโลก (WHO International standard 2nd International standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human)[15]

เมื่อนำชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่ได้และใช้วิธีที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องข้างต้นมาตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการ ELISA ในตัวอย่าง 3 ยี่ห้อ รวม 15 รุ่นการผลิต พบว่าจากผลการวิเคราะห์ของผู้ผลิต และสถาบันชีววัตถุไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) และผลการทดสอบที่ได้มีค่ามากกว่าค่าความแรงที่ปรากฏบนฉลากยาชีววัตถุ A B และ C ซึ่งมีความสอดคล้องกับเกณฑ์ข้อกำหนดในตำรายายุโรป 9.0 ที่กำหนดค่าความแรงของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบีที่ได้จากมนุษย์สำหรับฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (intravenous administration) ต้องมีค่าความแรงไม่น้อยกว่า 50 IU/ml (ตัวอย่าง A) และค่าความแรงของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบีที่ได้จากมนุษย์สำหรับฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular administration) หรือฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous administration) ต้องมีค่าความแรงไม่น้อยกว่า 100 IU/ml (ตัวอย่าง B และ C) ซึ่งแสดงถึงตัวอย่างทั้งหมดผ่านเกณฑ์กำหนดของตำรายุโรปและตามเกณฑ์กำหนดของผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นทะเบียนไว้[12-13] แต่อย่างไรก็ตามในตัวอย่าง A พบว่าผลการวิเคราะห์ของผู้ผลิต (58 IU/ml) มีค่าต่ำกว่าผลวิเคราะห์ของสถาบันชีววัตถุ (84-86 IU/ml) และสูงกว่าเกณฑ์กำหนดที่ผู้ผลิตขึ้นทะเบียนไว้ 50 IU/ml ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากตัวอย่าง A เป็นผลิตภัณฑ์ผงแห้งที่มีองค์ประกอบแตกต่างจากตัวอย่าง B และ C ทำให้การละลายอาจไม่สมบูรณ์ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื่องจากมีความหนืดจากสารที่ทำให้เกิดความคงตัว (stabilizer) และเมื่อนำมาเจือจางผลที่ได้อาจคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวอาจต้องระมัดระวังในช่วงของการเตรียมตัวอย่างมากขึ้น และเนื่องจากตัวอย่าง A มีจำนวนรุ่นการผลิตจำกัด อาจต้องทำการวิเคราะห์หาความแรงเพื่อเก็บข้อมูลให้มากขึ้นเพื่อดูแนวโน้มค่าความแรงที่ได้ต่อไป

ในการประยุกต์ใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปนี้ สามารถลดระยะเวลาในการเตรียมการทดสอบจาก 2-3 วัน เหลือไม่ถึง 1 วัน และลดความแปรปรวนจากการเตรียมสารเองในแต่ละครั้ง และการเลือกใช้สารมาตรฐานสากลจากองค์การอนามัยโลกโดยตรง และใช้วิธีการเจือจางในรูปแบบเดียวกับตัวอย่าง ทำให้ผลการทดสอบเชื่อถือได้มากขึ้น

สรุปผล

จากการตรวจวิเคราะห์ความแรงของตัวอย่างผลิตภัณฑ์อิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบีที่มีจำหน่ายในปี 2559-2562 โดยใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่ามีความเหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์กับผู้ผลิตในแต่ละผลิตภัณฑ์ พบว่าค่าความแรงที่ได้เป็นไปตามข้อกำหนดของตำรายายุโรปและเกณฑ์กำหนดของผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นทะเบียน และค่าความแรงที่ได้จากผู้วิเคราะห์และผู้ผลิตในแต่ละผลิตภัณฑ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้มีความเหมาะสม สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินป้องกันโรคตับอักเสบชนิดบีที่จำหน่ายในประเทศได้ ทำให้มั่นใจได้ว่าค่าความแรงเป็นไปตามที่ขึ้นทะเบียนไว้ ส่งผลให้ประชาชนได้รับชีววัตถุที่มีคุณภาพ

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากจำนวนตัวอย่าง A และ C มีจำหน่ายในประเทศไทยเพียง 2-3 รุ่น เท่านั้น ซึ่งยังต้องมีการศึกษาข้อมูลและตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเพิ่มเติมอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในประเทศไทยมีน้อย และบางชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะในการวิเคราะห์ ทำให้ต้องเลือกใช้ชุดน้ำยาทดสอบที่เหมาะสมกับเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเป็นหลัก หากในอนาคตชุดน้ำยาทดสอบขาดแคลน อาจจำเป็นต้องใช้ชุดน้ำยาทดสอบอื่นมาทดแทน ซึ่งจะต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในปีงบประมาณ 2562 และขอขอบคุณนายอัศจรรย์ อาเมน สถาบันชีววัตถุ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการทดสอบทางสถิติที่ใช้ในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. ศรินยา พงศ์พันธุ์. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคประจำปี 2560: โรคตับอักเสบ (Viral hepatitis) [อินเทอร์เน็ต]. นนทบุรี: กรมควบคุมโรค; 2560 [เข้าถึงเมื่อ 15 ส.ค. 2562]. เข้าถึงได้จาก: https://apps.boe.moph.go.th/boeeng/download/AESR-6112-24.pdf?fbclid=IwAR0Q0txRBtDo5PWtS9AKDp-16QTuq7NTQ3AnEF1ib2VpSifU-TzQCUbBEeA
2. สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค ปี 2556: บทที่ 7.2 วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B vaccine: HB) [อินเทอร์เน็ต]. นนทบุรี: กรมควบคุมโรค; 2556 [เข้าถึงเมื่อ 15 ส.ค. 2562]. เข้าถึงได้จาก: http://e-lib.ddc.moph.go.th/pdf/material-25/material-25.pdf
3. Akay S, Karasu Z. Hepatitis B immune globulin and HBV-related liver transplantation. Expert Opinion on Biological Therapy 2008; 8:1815-22. doi.org/10.1517/14712598.8.11.1815.

4. กองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ระบบค้นหาข้อมูลผลิตภัณฑ์ยา [อินเทอร์เน็ต]. นนทบุรี: กองยา; 2559. [เข้าถึงเมื่อ 15 ส.ค. 2562]. เข้าถึงได้จาก: http://pertento.fda.moph.go.th/FDA_SEARCH_DRUG/SEARCH_DRUG/FRM_SEARCH_DRUG.aspx
5. Bio-Rad. Monolisa™ anti-Hbs plus: enzyme immunoassay (EIA) for the detection and level determination of antibody to hepatitis b surface antigen (anti-hbs) in human serum or plasma [Internet]. Marnes-la-Coquette: Bio-Rad. 2009. [cited 2019 Aug 12]; [17 screens]. Available from: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/883582_EN.pdf
6. National Institute for Biological Standards and Control. WHO international standard 2nd international standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human [Internet]. Hertfordshire: Institute; 2008 [cited 2019 Aug 12]. Available from: https://www.nibsc.org/documents/ifu/07-164.pdf
7. BioTek Instruments. Gen5™ microplate reader and imager software. Vermont. 2011.
8. National Institute of Infectious Diseases. Biostatistics program (2006): how to use the statistical quality control program [CD-ROM]. Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare; 2006.
9. กองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์ และวิธีการขอรับหนังสือรับรองรุ่นการผลิตยาชีววัตถุ และกำหนดแบบคำขอ และแบบหนังสือรับรองรุ่นการผลิตยาชีววัตถุ [อินเทอร์เน็ต]. 2557. [เข้าถึงเมื่อ 17 ก.ย. 2562]. เข้าถึงได้จาก: http://www.fda.moph.go.th/sites/drug/Shared%20Documents/Law04-Notification-ThFDA/FDA-20140926.pdf
10. Bonanni P, Bruzzone BM, Ansaldi F, Lai P, Orione L, Fulgheri M, Icardi GC. Hepatitis B immunization and anti-HBs quantitation: comparative performance of thirteen commercial immunoassays. J Prev Med Hyg 1998;39:46-50.
11. Huzly D, Schenk T, Jilg W, Neumann-Haefelin D. Comparison of nine commercially available assays for quantification of antibody response to hepatitis virus surface antigen. J Clin Microbiol 2008(46): 1298–306. doi. 10.1128/JCM.02430-07.
12. European Pharmacopoeia. Human hepatitis B immunoglobulin. 9th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2017. p. 2684.
13. European Pharmacopoeia. Human hepatitis B immunoglobulin for intravenous administration. 9th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2017. p. 2684.
14. European Pharmacopoeia. 2.7.1 Immunochemical. 9th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2017. p. 239-40.
15. Ferguson M, Yu MW, Heath A. Calibration of the second international standard for hepatitis B immunoglobulin in an international collaborative study. Vox Sanguinis 2010(99):77–84. doi: 10.1111/j.1423-0410.2010.1314.x. PMID: 20202182.