

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administrationวารสารอาหารและยา
ปีที่ 32 ฉบับที่ 1 (2568): มกราคม – เมษายน
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 32 No. 1 (2025): January – April

การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินด้วยวิธี Recombinant Factor C

กนิษฐา ภูวนาถนารานูบาล¹ อัสจรรย์ อาเมน¹ เอกลักษณ์ สงแทน¹ สุรพล ศรีมันตะ¹¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญาที่อยู่ติดต่อ: กนิษฐา ภูวนาถนารานูบาล สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
kanitta.p@dmsc.mail.go.th

Study on the Method Validation of Recombinant Factor C Endotoxin Testing Assay

Kanitta Phuwanartnaranubarn¹, Assajun Amen¹, Ekalak Songtan¹, Surapon Sreemanta¹¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand**Contact address:** Kanitta Phuwanartnaranubarn, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, kanitta.p@dmsc.mail.go.th**Received:** 23 February 2024, **Revised:** 6 October 2024, **Accepted:** 10 October 2024

Abstract

Background: Bacterial endotoxins, the pyrogens derived from gram-negative bacteria, are heat-stable and can contaminate vaccine, injectable drug, and medical device products for human and veterinary use during manufacturing. The Limulus Amebocyte Lysate (LAL) method for analyzing the endotoxin determination uses a lysate of horseshoe crab blood, which has a high post-bleeding mortality rate. In accordance with the 3Rs principle of animal welfare, there has been a global effort to find a replacement for the use of animals. A recombinant factor C (rFC) assay has been developed as a replacement for the horseshoe crab lysate assay. Currently, the European and United State Pharmacopoeias have recognized it as a standard method.

Objectives: To study the validation of the recombinant factor C method for analyzing the endotoxin determination for use as a standard method in quality control of biological products to cover all analytical methods in European and United States pharmacopoeias.

Methods: This experimental research was conducted from October 2022 to December 2023 for validation of the endotoxin determination using recombinant factor C method in the parameters such as linearity, accuracy and precision (repeatability and reproducibility by different days and analyst).

Results: The study found that the method demonstrated a linear relationship between the measured values and the concentration of the standard with a correlation coefficient of ≥ 0.980 . The accuracy was assessed by spiking known concentrations of endotoxin into samples, the % recovery was within the acceptance criteria of 50-200%. The precision was evaluated by repeatability and intermediate precision studies. The coefficient of variation (CV) of % recovery was less than 25%. It could be used as a standard method for conducting the endotoxin determination in human vaccine and monoclonal antibody products. However, plasma-derived or blood products could not be analyzed due to interference from the samples.

Conclusions: The recombinant factor C method, which has been studied for its accuracy, is suitable and reliable. It can be used as a standard method for analyzing the quality of vaccines and monoclonal antibodies sold in Thailand.

Keywords: bacterial endotoxin, recombinant factor C, vaccine, monoclonal antibody

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: Bacterial endotoxin เป็นสารก่อไข้เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบซึ่งทนต่อความร้อนได้ดี อาจปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์วัคซีน ยาฉีด เครื่องมือแพทย์ที่ใช้สำหรับมนุษย์และสัตว์ในระหว่างการผลิต เดิมวิธีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินต้องใช้สารสกัดจากเลือดแมงดาทะเลซึ่งมีอัตราการตายของแมงดาทะเลหลังการเจาะเลือดสูงทั่วโลกจึงพยายามหาวิธีทดแทนการใช้สัตว์ตามหลักการ 3Rs จึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยการสังเคราะห์ recombinant factor C (rFC) เพื่อทดแทนการใช้สารสกัดจากเลือดแมงดาทะเล และปัจจุบันตำรายุโรปและอเมริกาให้การยอมรับเป็นวิธีมาตรฐานแล้ว

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินด้วยวิธี recombinant factor C สำหรับใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพชีววัตถุให้ครอบคลุมทุกวิธีการตรวจวิเคราะห์ในตำรายุโรปและอเมริกา

วิธีการวิจัย: เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental research) ระหว่างเดือนตุลาคม 2565 ถึงเดือนธันวาคม 2566 ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินด้วยวิธี recombinant factor C ในพารามิเตอร์ การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น การทดสอบความแม่นยำ การทดสอบความเที่ยง โดยการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกัน วิเคราะห์ต่างวัน และต่างนักวิเคราะห์

ผลการศึกษา: จากการศึกษาความถูกต้องของวิธี พบว่ามีความเป็นเส้นตรงระหว่างความสัมพันธ์ของค่าที่วัดได้และความเข้มข้นของสารมาตรฐานมากกว่าหรือเท่ากับ 0.980 มีความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์จากการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวอย่างอยู่ในเกณฑ์กำหนดที่ 50-200% วิธีการทดสอบมีความเที่ยงจากการทำซ้ำ และจากการเปลี่ยนปัจจัยในการวิเคราะห์โดยการทดสอบต่างวันและต่างนักวิเคราะห์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวน (CV) ของ % recovery น้อยกว่า 25% แสดงให้เห็นวิธีดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินในตัวอย่างวัคซีนและโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในขณะที่ตัวอย่างที่ผลิตจากผลิตภัณฑ์พลาสมามีปฏิกริยารบกวนจากตัวอย่างทำให้ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้

สรุป: การวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินด้วยวิธี recombinant factor C ที่ผ่านการศึกษาคความถูกต้องของวิธีมีความเหมาะสมและน่าเชื่อถือได้ สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์วัคซีนและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำหน่ายในประเทศไทยได้

คำสำคัญ: เอนโดท็อกซิน recombinant factor C วัคซีน โมโนโคลนอลแอนติบอดี

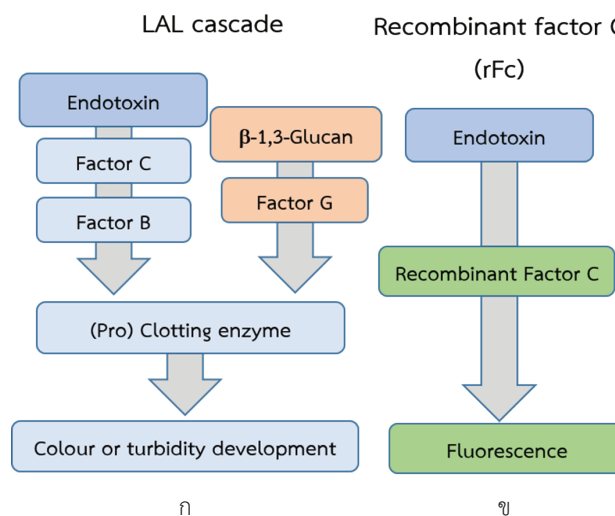
บทนำ

ยาชีววัตถุ (biological products) เป็นยาแผนปัจจุบันซึ่งผลิตจากสิ่งมีชีวิตโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์หรือเซลล์ชั้นสูง (eukaryotic cells) การสกัดสารจากเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตทั้งมนุษย์ สัตว์ และพืช (extraction of substances from biological tissues including human, animal, and plant tissues (allergens)) เทคนิคดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA or rDNA techniques) เทคนิคการผสมต่างพันธุ์ (hybridoma techniques) การขยายพันธุ์จุลินทรีย์ในตัวอ่อนหรือในสัตว์ (propagation of microorganisms in embryo or animals) การสกัดหรือแยกจากเลือดและพลาสมา (derived from blood and plasma) หรือกระบวนการอื่นที่รัฐมนตรีกำหนดเพิ่มเติมโดยประกาศในราชกิจจานุเบกษา¹ ซึ่งยากลุ่มนี้มีบทบาทในการป้องกัน วินิจฉัย และรักษาโรค ได้แก่ วัคซีนและชีววัตถุเพื่อการรักษา

ที่เป็นผลิตภัณฑ์เลือด สารก่อภูมิแพ้ ผลิตภัณฑ์เซลล์บำบัด รวมทั้งโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ผลิตด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดี อินเตอร์เฟอรอน เป็นต้น ทั้งนี้ ในกระบวนการผลิตชีววัตถุนั้นอาจมีการปนเปื้อนแบคทีเรียเอนโดท็อกซิน (bacterial endotoxin) ซึ่งเป็นสารพิษหรือสารก่อไข้ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจากการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้หลั่งสารที่มีผลต่อสมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย ส่งผลให้อุณหภูมิของร่างกายสูงขึ้น นอกจากนี้อาจทำให้เกิดอาการหนาวสั่น หลอดเลือดผิวหนังหดตัว ม่านตาขยายใหญ่ การหายใจช้าลง ความดันโลหิตสูงขึ้น ปวดกล้ามเนื้อ คลื่นไส้และอ่อนเพลีย²⁻³ ซึ่งเอนโดท็อกซินเป็นสารพอลิโพสาคาร์ไรด์ (lipopolysaccharide) ถูกปล่อยออกมาเมื่อเซลล์แบคทีเรียถูกทำลายหรือ

ตาย และทนต่อความร้อนได้ดี ดังนั้นในผลิตภัณฑ์วัคซีน ยาฉีด เครื่องมือแพทย์ที่ใช้เป็นยาสำหรับมนุษย์และสัตว์จึงต้องมีการตรวจสอบความปลอดภัยจากสารดังกล่าว ซึ่งวิธีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินมีหลายวิธีโดยแต่ละวิธีมีความไวและใช้เครื่องมือในการตรวจวัดที่แตกต่างกัน โดยจะเกิดปฏิกิริยาจากเอนโดท็อกซินในตัวอย่างที่เปลี่ยน factor C ในสารสกัดแมงดาทะเลเป็น activated factor C ซึ่งกระตุ้น factor B ให้กลายเป็น activated factor B ที่ทำให้ proclotting enzyme เปลี่ยนเป็น clotting enzyme เพื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น โดยสามารถวัดปฏิกิริยาได้

3 วิธี (LAL cascade) คือ (1) gel clot method เป็นการวัดการแข็งตัวของเจลสามารถสังเกตด้วยตาเปล่า (2) turbidimetric method เป็นการวัดความขุ่นของปฏิกิริยา และ (3) chromogenic method เป็นการวัดความเข้มของสีจากปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตามทั้ง 3 วิธีมีข้อจำกัด เนื่องจากผลิตจากสิ่งมีชีวิตจึงมีความแปรปรวนจากการผลิตและอาจเกิดผลบวกปลอม (false positive) จากตัวอย่างที่มี β -glucan ที่เปลี่ยน factor G ให้เป็น active factor G ที่สามารถกระตุ้น proclotting enzyme ได้เช่นเดียวกับ active factor B^{2,4-5} ดังรูปที่ 1 (ก)



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาระหว่างวิธี LAL และ Recombinant Factor C⁵

ในอุตสาหกรรมยาหรือชีวทางการแพทย์ พบการนำสารสกัดจากเลือดแมงดาทะเลมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เอนโดท็อกซินในตัวอย่าง ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 ทำให้เกิดผลกระทบต่อความอนุรักษนิยมจากการใช้สัตว์ และในปี ค.ศ. 2022 พบว่าชายฝั่งแอตแลนติกมีการใช้แมงดาทะเลมากถึง 911,826 ตัว สำหรับใช้ในชีวการแพทย์ โดยมี 5 บริษัทใช้สารสกัดจากเลือดแมงดาทะเล

ในการตรวจเอนโดท็อกซินในตัวอย่าง ซึ่งมากกว่าที่พบในปี ค.ศ. 2021 ถึงร้อยละ 20 และถึงแม้จะมีการปล่อยแมงดาทะเลคืนสู่ธรรมชาติหลังเจาะเลือดแล้วก็ตามแต่พบว่า มีแมงดาทะเลบางส่วนตายทั้งระหว่างการจับและหลังเจาะเลือดคิดเป็นร้อยละ 15⁶⁻⁷ ดังนั้น ทั่วโลกจึงมีความพยายามที่จะลดการใช้สัตว์ตามหลักการ 3Rs คือ (1) Reduction คือ การลดจำนวนสัตว์ทดลองเพื่อให้ใช้น้อยที่สุด

ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อ การทดสอบ (2) Refinement คือ การลดความเจ็บปวดและความทุกข์ทรมานของสัตว์ทดลอง และ (3) Replacement คือ การทดแทนการใช้สัตว์ทดลองด้วยวิธีอื่น ซึ่งในปี ค.ศ. 1997 Ling Ding Jeak และ Bo How ได้สังเคราะห์ recombinant factor C (rFC) เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เอนโดท็อกซินโดยไม่ต้องใช้สัตว์⁷ ต่อมาหลายบริษัทได้พัฒนาวิธีนี้เป็นวิธีทางเลือกทดแทนการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้สารสกัดจากแมงดาทะเล โดยสารที่สังเคราะห์นี้เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนโดท็อกซินจะเปลี่ยนเป็น activated rFC และวัดการเกิดปฏิกิริยาจากการทำปฏิกิริยาการเรืองแสงกับสารตั้งต้น (fluorogenic substrate) ดังรูปที่ 1 (ข)⁴⁻⁸ ซึ่งปัจจุบันหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา เยอรมนี สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนจีน มีชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซิน

สถาบันชีววัตถุในฐานะหน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐที่ทำหน้าที่ควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของวัคซีนและชีววัตถุของประเทศ ระบุให้มีวิธีตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพเพื่อให้มั่นใจว่าประชาชนได้รับผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและปลอดภัยตามมาตรฐานสากล ซึ่งเดิมวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ด้านความปลอดภัยด้วยการตรวจหาปริมาณเอนโดท็อกซินที่ระบุในตำรายายุโรปและอเมริกา (European Pharmacopoeia and United States Pharmacopoeia) คือ วิธี LAL (gel clot method, turbidimetric method และ chromogenic method) โดยสถาบันชีววัตถุใช้วิธี turbidimetric method เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบประจำ สำหรับวิธี Recombinant Factor C เป็นวิธีใหม่ที่มีการประกาศใช้ในตำรายายุโรปและอเมริกาแล้ว⁹⁻¹⁰ ซึ่งวิธีดังกล่าวมีแนวโน้ม

ที่ผู้ผลิตจะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์และมีความสอดคล้องตามหลักการสากล 3Rs ดังนั้นเพื่อให้ทันต่อเทคโนโลยีที่เปลี่ยนแปลง จึงได้ศึกษาความถูกต้องของวิธีดังกล่าวขึ้น ซึ่งการเลือกใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปนั้นมาจากการพบทวนวรรณกรรม และศึกษาสถานะเบื้องต้น โดยเลือกชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่มีความเหมาะสมทั้งคุณภาพ ราคา และที่สำคัญสามารถใช้กับเครื่องมือที่มีอยู่ในหน่วยงาน รวมทั้งมีตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินในชีววัตถุด้วยวิธี recombinant factor C สำหรับใช้เป็นวิธีมาตรฐานที่ทดแทนการใช้สารสกัดจากสัตว์ในการตรวจวิเคราะห์
2. เพิ่มศักยภาพในการควบคุมคุณภาพชีววัตถุให้ครอบคลุมทุกวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินในตำรายาสากล

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental research) ระหว่างเดือนตุลาคม 2565 ถึงธันวาคม 2566 เพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเอนโดท็อกซินด้วยวิธี recombinant factor C โดยการวัดค่าการกระตุ้นและการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น (excitation และ emission) 380 และ 440 นาโนเมตร (nm) ณ เวลา 0 นาที และ 60 นาที เพื่อวิเคราะห์และคำนวณหาปริมาณเอนโดท็อกซินในตัวอย่างโดยเทียบค่าเอนโดท็อกซินในตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน (standard curve)

กลุ่มตัวอย่าง

เลือกตัวอย่างชีววัตถุเพื่อเป็นตัวแทนในกลุ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดี และผลิตภัณฑ์พลาสมาคือ ยีห้อ A และยี่ห้อ B ตามลำดับ

เครื่องมือ

1. ชุดทดสอบ Pyrogene® Recombinant Factor C (rFC) (Cat. no. 50-658U, Lonza) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C ซึ่งประกอบด้วยเอนโดท็อกซินมาตรฐาน *E. coli* O55:B5 Endotoxin 20 EU/ml, rFC enzyme solution, fluorogenic substrate, rFC assay buffer และ Limulus Amebocyte Lysate (LAL) reagent water ที่ต้องวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง

2. เครื่องมือ เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ ได้แก่ เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงไมโครเพลทรุ่น SpectraMax iD5 (Molecular devices®, USA) ที่มีโปรแกรม SoftMax® Pro version 7, หลอดแก้วที่ปราศจากไพโรเจน (Cat. no. N207, Lonza), เพลทใส 96 หลุม ชนิดปราศจากไพโรเจน (Cat. no. 3599, Corning®, USA), LAL reagent reservoirs (Cat. no. 00190035, Lonza)

ขั้นตอนการศึกษา

1.3 เตรียม positive product control โดยใช้เอนโดท็อกซินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5.0 EU/ml สำหรับเติมในตัวอย่าง (spike) เพื่อทดสอบว่าในตัวอย่างมีกลไกการขัดขวางหรือเพิ่มปฏิกิริยาระหว่าง recombinant factor C และเอนโดท็อกซินหรือไม่ โดยการคำนวณเทียบกันระหว่างปริมาณเอนโดท็อกซินที่วัดได้จากการเติม

1. การเตรียมสารและตัวอย่าง

1.1 เตรียมเอนโดท็อกซินมาตรฐาน *E. coli* O55:B5 Endotoxin 20 EU/ml โดยใช้ปริมาณตามที่กำหนดในใบรับรองของชุดทดสอบแต่ละรุ่น แล้วนำมาเจือจางด้วย LAL reagent water ในหลอดแก้วที่ปราศจากไพโรเจนให้ได้ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 5.0 EU/ml เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับเทียบค่าของตัวอย่าง โดยมีเกณฑ์ยอมรับของกราฟมาตรฐานคือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 0.980¹¹ ค่า slope ต้องอยู่ระหว่าง 0.500 ถึง 1.110 ค่า Y-intercept ต้องอยู่ระหว่าง 6.250 ถึง 8.750 ค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวน (CV) ของการทำซ้ำต้องไม่เกิน 25%

1.2 เตรียมตัวอย่างโดยทำการเจือจางตัวอย่างด้วย LAL reagent water ให้มีความเข้มข้นได้ไม่เกินกว่าค่าความเจือจางสูงสุดของตัวอย่างที่ยังให้ความถูกต้อง (Maximum Valid Dilution: MVD)⁹⁻¹¹ โดยต้องมีการทดสอบสถานะเบื้องต้นเพื่อให้ได้ค่าเจือจางที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีต่อไป โดยมีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$MVD = \frac{\text{เกณฑ์กำหนดของตัวอย่าง} \times \text{ความเข้มข้นของตัวอย่าง}}{\text{ความไวของน้ำยาที่ใช้}} \quad \text{เท่า}$$

เอนโดท็อกซินมาตรฐานที่ทราบค่า และในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเอนโดท็อกซินมาตรฐาน

2. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซิน โดยนำ LAL reagent water (สำหรับใช้เป็น blank) และสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.005 – 5.0 EU/ml มาใส่ลงเพลทใส 96 หลุม ชนิดปราศจากไพโรเจน ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร (μl)

จำนวน 3 ซ้ำ สำหรับการ spike จะใส่ตัวอย่าง 100 μ l จำนวน 3 ซ้ำ และใส่ positive product control 11 μ l เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนโดท็อกซินในตัวอย่างเท่ากับ 0.5 EU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที และเติม working reagent ที่มีองค์ประกอบของ fluorogenic substrate, rFC assay buffer และ rFC enzyme solution ในอัตราส่วน 5:4:1 ตามลำดับ โดย recombinant factor C ในชุดทดสอบจะถูกกระตุ้นด้วยเอนโดท็อกซินในตัวอย่าง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 60 นาที และวัดค่าการกระตุ้นและการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 380 และ 440 nm ณ เวลา 0 นาที และ 60 นาที¹¹

3. การหาค่าการเจือจางที่เหมาะสมของตัวอย่าง จะเลือกค่าเจือจางที่น้อยที่สุดที่มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 70-160 % ซึ่งเป็นช่วงค่าที่มีความคงตัวและเหมาะสมสำหรับการทดสอบความถูกต้องของวิธี¹² และต้องมีค่า CV จากการทำซ้ำไม่เกิน 25%

4. การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

4.1 การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) โดยใช้เอนโดท็อกซินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 5.0 EU/ml โดยทำการทดสอบอย่างน้อย 3 ครั้ง ค่า correlation coefficient ของกราฟสารมาตรฐานต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.980 และ CV ของการทำซ้ำต้องไม่เกิน 25%¹¹

4.2 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) โดยเติมเอนโดท็อกซินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.5 และ 2.0 EU/ml ลงในตัวอย่าง และทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และคำนวณ

ค่า % recovery ของการทดสอบในแต่ละความเข้มข้น

4.3 การทดสอบความเที่ยง (precision)

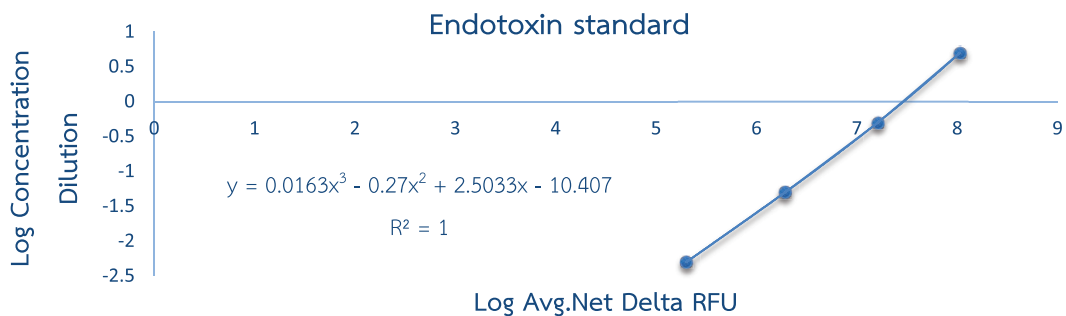
4.3.1 วิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกัน (repeatability) วิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินในตัวอย่างซ้ำภายในวันเดียวกันจำนวน 6 ครั้ง และนำผลการวิเคราะห์หาคำนวนค่า CV ของ % recovery โดยต้องมีค่าอยู่ในเกณฑ์ไม่เกิน 25%

4.3.2 วิเคราะห์ต่างวันและต่างนักวิเคราะห์ (intermediate precision) วิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินในตัวอย่างโดยวิเคราะห์ต่างวันจำนวน 3 วัน และผู้วิเคราะห์ 2 คนๆ ละ 3 ครั้ง นำผลการวิเคราะห์หาคำนวนค่า CV ของ % recovery โดยต้องมีค่าอยู่ในเกณฑ์ไม่เกิน 25%

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ log ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน กับ log ของค่าเฉลี่ยความแตกต่างของค่าที่วัดได้ ณ เวลา 0 และ 60 นาที (Δ RFU) เพื่อหา correlation coefficient โดยใช้ฟังก์ชัน CORREL slope โดยใช้ฟังก์ชัน SLOPE และ Y-Intercept โดยใช้ฟังก์ชัน INTERCEPT ซึ่งมีเกณฑ์กำหนดต้องได้ค่าที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.980, 0.500 ถึง 1.110 และ 6.250 ถึง 8.750 ตามลำดับ โดยเกณฑ์ดังกล่าวกำหนดจากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมเบื้องต้นของการใช้ชุดทดสอบ และเครื่องมือก่อนหน้านี้

2. วิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซิน โดยใช้สมการจาก the 4th order polynomial ระหว่าง log ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับ log ของค่าเฉลี่ยความแตกต่างของค่าที่วัดได้¹³ ณ เวลา 0 และ 60 นาที (Δ RFU) และเทียบค่าเอนโดท็อกซินในตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับ log ของค่าเฉลี่ยความแตกต่างของค่าที่วัดได้ ณ เวลา 0 และ 60 นาที (Δ RFU)

จากกราฟ ค่า $R^2 = 1$ เป็นค่าที่คำนวณโดยใช้วิธีการประมาณค่าแบบ 4th order polynomial วิธีการนี้มีความเหมาะสมกับข้อมูล linear regression โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้วิธีการประมาณค่าแบบ polynomial ที่มีลำดับสูงขึ้น สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้ที่ลำดับที่ 4 ประกอบกับข้อมูลชุดวิเคราะห์หิมนวโน้มเข้าใกล้เส้นตรง สมการ 4th order polynomial นี้สามารถสร้างกราฟเส้นโค้งที่แนบกระชับกับข้อมูลได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี linear regression นอกจากนี้ยังมีการใช้ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 4 ความเข้มข้นซึ่งช่วยให้กราฟเส้นโค้งสามารถตัดผ่านจุดข้อมูลทั้ง 4 จุด ส่งผลให้ค่า R^2 มีโอกาสเท่ากับ 1

3. คำนวณค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ของการทดสอบโดยมีเกณฑ์อยู่ในช่วง 50-200%⁹⁻¹¹ จากสมการ

$$\% \text{ recovery} = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100$$

เมื่อ C1 คือ ปริมาณเอนโดท็อกซินที่วัดได้ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C2 คือ ปริมาณเอนโดท็อกซินที่วัดได้ในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน

C3 คือ ปริมาณเอนโดท็อกซินมาตรฐานที่ทราบค่าที่เติมในตัวอย่าง

ผลการศึกษา

1. การหาค่าการเจือจางที่เหมาะสมของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

จากการหาค่าการเจือจางที่เหมาะสมของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยเลือกช่วงการเจือจางจากประสบการณ์ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินโดยวิธี turbidimetric ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบประจำ (routine test) ของหน่วยงานสำหรับตัวอย่าง A ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในกลุ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดี จะทดสอบที่ค่าการเจือจาง 1:10, 1:20 และ 1:50 ซึ่งพบว่าค่าการเจือจางที่อยู่ในช่วงเกณฑ์กำหนดคือ 1:20 และ 1:50 จึงเลือกค่าการเจือจางที่น้อยที่สุดที่มีค่า % recovery อยู่ในเกณฑ์คือค่าการเจือจางที่ 1:20 เป็นค่าการเจือจางที่ใช้สำหรับการศึกษาความถูกต้องของวิธี โดยมีค่า CV ของ % recovery เท่ากับ 12.45% สำหรับตัวอย่างยี่ห้อ B ซึ่งเป็นตัวอย่างในผลิตภัณฑ์พลาสมาโดยเจือจางที่ 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300 และ 1:400 พบว่าทุกค่าการเจือจางไม่สามารถวิเคราะห์ % recovery ได้ แม้จะเจือจางมากกว่า MVD ที่ 300 เท่าแล้วก็ตาม ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีสารบางอย่างในตัวอย่างรบกวนการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นจึงแก้ปัญหาโดยอ้างอิงจากวิธีการทดสอบหาปริมาณเอนโดท็อกซินในตัวอย่างเลือด

และผลิตภัณฑ์จากเลือดโดยวิธี turbidimetric และ chromogenic คือ วิธีที่ 1 เติม pyrospere ซึ่งเป็นสารที่ใช้จับกับตัวที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวปริมาณ 0.025 ml ต่อ ตัวอย่าง 5 ml¹⁴ และวิธีที่ 2 การให้ความร้อน (heat-inactivate) ในตัวอย่าง โดยการเจือจาง ตัวอย่าง 1:10 นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที¹⁵ และทำการเจือจางที่ 1:100, 1:200, 1:300 และ 1:400 ผลการทดสอบ

พบว่าทั้ง 2 วิธียังให้ผล % recovery อยู่นอกเกณฑ์ กำหนด ดังตารางที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีดังกล่าว ไม่สามารถใช้ได้กับผลิตภัณฑ์เลือดและผลิตภัณฑ์ ที่มาจากเลือดได้ ดังนั้นในการศึกษาความถูกต้อง ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินด้วยวิธี recombinant factor C จะดำเนินการทดสอบ เฉพาะตัวอย่าง A ซึ่งเป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์ ในกลุ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดีเท่านั้น

ตารางที่ 1 ผลของ % recovery ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์พลาสมาที่มีการปรับสภาพตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

การเตรียม ตัวอย่าง	ค่าการเจือจาง	% recovery			ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
ไม่ได้ผ่าน การปรับสภาพ ตัวอย่าง	1:5	Invalid					
	1:10	Invalid					
	1:50	Invalid					
	1:100	3.08	3.79	8.27	-	-	-
	1:200		6.77	2.55	-	-	-
	1:300*		6.32	4.14	-	-	-
	1:400			6.78	-	-	-
ผ่านการปรับ สภาพตัวอย่าง	1:100	4.66	Invalid	Invalid	-	-	-
ด้วยการเติม pyrospere	1:200	5.66	9.31	9.10	8.02	2.05	25.54
	1:300*	Invalid	2.76	7.68	-	-	-
	1:400	0.67	Invalid	6.79	-	-	-
ผ่านการปรับ	1:100	21.81	31.80	26.94	26.65	5.00	18.61
สภาพตัวอย่าง	1:200	28.04	46.66	43.38	39.36	9.94	25.25
ด้วยการใช้	1:300*	41.33	57.22	38.42	45.66	10.12	22.16
ความร้อน	1:400	42.26	65.30	62.13	56.56	12.49	22.08

หมายเหตุ invalid หมายถึง เครื่องไม่สามารถอ่านค่าได้เนื่องจากมีสารรบกวนปฏิกิริยา

* หมายถึง ค่า MVD ของตัวอย่างที่ได้จากการคำนวณ

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

ผลการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นของ เอนโดท็อกซินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 5.0 EU/ml จากการทดสอบ 16 ครั้ง

ที่เป็นอิสระต่อกัน และในแต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ พบว่าค่า correlation coefficient (r) ของกราฟ สารมาตรฐานมีค่าอยู่ในช่วง 0.980 – 1.000 และ ค่า CV ของการทำซ้ำไม่เกิน 25% ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน

ครั้งที่	Correlation coefficient	ครั้งที่	Correlation coefficient
1	0.9990	9	1.0000
2	0.9990	10	1.0000
3	0.9970	11	0.9990
4	0.9990	12	1.0000
5	1.0000	13	0.9990
6	1.0000	14	0.9990
7	0.9970	15	0.9990
8	0.9980	16	0.9990

ผลการทดสอบความแม่นยำจากการเติมเอนโดท็อกซินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.05, 0.5 และ 2.0 EU/ml ลงในตัวอย่างเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน และทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง พบว่าค่า % recovery ในแต่ละความเข้มข้นผ่านเกณฑ์กำหนดที่ 50-200% ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำจากการใส่เอนโดท็อกซินมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นเอนโดท็อกซิน มาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง (EU/ml)	% recovery			ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
0.05	112.78	106.94	99.51	106.41	6.65	6.25
0.5	95.71	90.38	92.97	93.02	2.67	2.87
2	131.76	93.41	101.03	108.73	20.30	18.67

ผลการทดสอบความเที่ยง (1) วิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวจำนวน 6 ครั้ง พบว่ามีค่า CV ของ % recovery เท่ากับ 9.28% (2) ผลการวิเคราะห์ต่างวันและต่างนักวิเคราะห์ พบว่ามีค่า CV ของ % recovery เท่ากับ 7.25-11.35% และ 8.82% ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า 25% ดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบจากการทำซ้ำภายในวันเดียว

% recovery						ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6			
118.81	122.58	116.88	116.11	92.85	114.20	113.57	10.54	9.28

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบต่างนักวิเคราะห์และต่างวัน

ตัวอย่าง	ผลการทดสอบ		ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
	นักวิเคราะห์คนที่ 1	นักวิเคราะห์คนที่ 2			
A	110.83	105.15	100.41	8.86	8.82
	90.38	94.41			
	92.97	108.72			
Mean	98.06	102.76			
SD	11.13	7.45			
% CV	11.35	7.25			

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ขยายผลโดยใช้วิธีที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องของวิธีนี้แล้วในผลิตภัณฑ์วัคซีนและชีววัตถุที่มีการส่งตรวจเพื่อตรวจวิเคราะห์ในสถาบันและมีการตรวจวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายตามที่ขึ้นทะเบียนไว้ที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้แก่ ผลิตภัณฑ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 10 ยี่ห้อๆ ละ 1 รุ่นการผลิต วัคซีนป้องกันไข้สมองอักเสบเจอีจำนวน 1 ยี่ห้อ ๆ ละ 3 รุ่นการผลิต วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบีจำนวน 2 ยี่ห้อ ๆ ละ 2 รุ่นการผลิต พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรวจหาปริมาณเอนโดท็อกซินในตัวอย่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้น้อยกว่า 0.25 EU/ml และมี % recovery เท่ากับ 57.33 – 98.87 ในขณะที่ตัวอย่างวัคซีนพบว่าวัคซีนป้องกันไข้สมองอักเสบเจอี จำนวน 1 ยี่ห้อ 3 รุ่นการผลิต มีปริมาณเอนโดท็อกซินได้

น้อยกว่า 0.05 EU/ml และมี % recovery เท่ากับ 94.93–106.27 วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบีจำนวน 2 ยี่ห้อๆ ละ 2 รุ่นการผลิต พบปริมาณเอนโดท็อกซินได้น้อยกว่า 8 EU/ml และมี % recovery เท่ากับ 64.25 – 104.88 วัคซีนป้องกันโรคไทรน 2 ยี่ห้อๆ ละ 2-3 รุ่นการผลิต พบปริมาณเอนโดท็อกซินได้น้อยกว่า 25-150 EU/ml และมี % recovery เท่ากับ 70.09 – 128.76 และวัคซีนป้องกันโรคคอตีบจำนวน 1 ยี่ห้อ 1 รุ่นการผลิต พบปริมาณเอนโดท็อกซินได้น้อยกว่า 150 EU/ml และมี % recovery เท่ากับ 106.87 ซึ่งทุกผลิตภัณฑ์มีผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดที่ % recovery 50-200% และเกณฑ์ข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ดังตารางที่ 6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในผลิตภัณฑ์วัคซีนและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ตารางที่ 6 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ

ชื่อสามัญ	ปริมาณเอนโดท็อกซินที่ตรวจพบ (เกณฑ์กำหนดของผลิตภัณฑ์)	ร้อยละการคืนกลับ (%) (เกณฑ์ 50-200%)
Tecilstamab	< 0.05 EU/ml ($\leq$ 16.66 EU/ml)	57.78
Revulizumab	< 0.25 EU/ml ($\leq$ 2.5 EU/ml)	80.05
Eptinezumab	< 0.25 EU/ml ($\leq$ 30.4 EU/ml)	83.12
Anifrolumab	< 0.25 EU/ml ($\leq$ 27 EU/ml)	86.58
Tremelimumab	< 0.25 EU/ml ($\leq$ 3.5 EU/ml)	72.31
Aflibercept	< 0.05 EU/ml (< 0.4 EU/ml)	57.33
Tezepelumab	< 0.05 EU/ml ($\leq$ 18.7 EU/ml)	86.29
Adalimumab	< 0.05 EU/ml ($\leq$ 5 EU/ml)	66.97
Infliximab	< 0.25 EU/ml ($\leq$ 2 EU/ml)	59.92
Pertuzumab	< 0.05 EU/ml ($\leq$ 8 EU/ml)	98.87
Japanese encephalitis vaccine 1	< 0.05 EU/ml ($\leq$ 10 EU/ml)	94.93
Japanese encephalitis vaccine 2	< 0.05 EU/ml ($\leq$ 10 EU/ml)	104.21
Japanese encephalitis vaccine 3	< 0.05 EU/ml ($\leq$ 10 EU/ml)	106.27
hepatitis B, purified antigen 1	< 8 EU/ml (< 30 EU/ml)	71.54
hepatitis B, purified antigen 2	< 8 EU/ml (< 30 EU/ml)	85.33
hepatitis B, purified antigen 3	< 8 EU/ml (< 12.50 EU/ml)	104.88
hepatitis B, purified antigen 4	< 8 EU/ml (< 12.50 EU/ml)	64.25
pertussis, purified antigen 1	< 150 EU/ml (< 200 EU/ml)	109.17
pertussis, purified antigen 2	< 100 EU/ml (< 200 EU/ml)	98.30
pertussis, purified antigen 3	< 100 EU/ml (< 200 EU/ml)	70.09
Acellular pertussis 1	< 50 EU/ml (< 200 EU/ml)	120.58
Acellular pertussis 2	< 25 EU/ml (< 200 EU/ml)	128.76
Diphtheria and Tetanus Vaccine Adsorbed	< 150 EU/ml (< 200 EU/ml)	106.87

อภิปรายผล

การทดสอบค่าการเจือจางที่เหมาะสมของตัวอย่างก่อนการศึกษาความถูกต้องของวิธีพบว่าตัวอย่าง A ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่างในกลุ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดี สามารถคัดเลือกค่าการเจือจางที่มี % recovery อยู่ในเกณฑ์กำหนดได้ ในขณะที่ตัวอย่าง B ซึ่งเป็นตัวอย่างในกลุ่มผลิตภัณฑ์พลาสมา พบว่าแม้จะเจือจาง

ตัวอย่างมากกว่าค่า MVD ที่ 300 เท่าแล้ว ผลการทดสอบ % recovery ยังอยู่นอกช่วงเกณฑ์กำหนด และเมื่อดำเนินการเตรียมตัวอย่างเพิ่มเติมทั้งการเติม pyrosperser และการเตรียมตัวอย่างโดยการให้ความร้อน¹⁴⁻¹⁵ เพื่อจัดการสารที่รบกวนการเกิดปฏิกิริยาแล้วก็ตาม พบว่า % recovery ยังอยู่นอกเกณฑ์กำหนดอาจเป็นไปได้ว่าเลือดหรือผลิตภัณฑ์ที่มาจากเลือดของมนุษย์มีผลต่อการวัด

ปริมาณเอนโดท็อกซินในการทดสอบ ซึ่งมีงานวิจัยที่พบว่าสิ่งส่งตรวจ จากมนุษย์ เช่น พลาสมา ซีรัม และ whole blood สามารถยับยั้งการทำปฏิกิริยาของการทดสอบ LAL test ทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อนได้ จึงไม่สามารถนำมาใช้กับการทดสอบ LAL ได้โดยตรง ต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อน เช่น การให้ความร้อนหลังการเจือจาง การใช้สารเคมี เช่น คลอโรฟอร์ม กรดอะซิติก กรดเปอร์คลอริก กรดไนตริก โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และสารลดแรงตึงผิว เพื่อลดการรบกวนของสารประกอบอื่น ๆ ในเลือดและทำให้ผลการทดสอบแม่นยำขึ้น¹⁶ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การเตรียมตัวอย่างด้วยการเติม pyrospore และการให้ความร้อนไม่สามารถยับยั้งสารรบกวนปฏิกิริยาโดยวิธี rFC ได้ แต่พบว่าการให้ความร้อนมีแนวโน้มในการยับยั้งสารที่รบกวนปฏิกิริยาได้ดีกว่า โดยเมื่อมีการเจือจางมากขึ้น % recovery จะมีค่ามากขึ้น แต่ไม่สามารถนำมาใช้ในการทดสอบต่อในพารามิเตอร์ของการทดสอบความถูกต้องของวิธีได้ เนื่องจากมีการเจือจางมากกว่าค่า MVD ซึ่งเป็นความเสี่ยงที่ทำให้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอนโด ท็อกซินไม่ถูกต้องจากการเจือจางมากกว่าเกณฑ์กำหนด

จากการศึกษาความถูกต้องของวิธี โดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานเอนโดท็อกซิน พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของกราฟสารมาตรฐานอยู่ในช่วงกำหนดคือมากกว่าหรือเท่ากับ 0.980 แสดงให้เห็นถึงความเป็นเส้นตรงระหว่างความสัมพันธ์ของค่าที่วัดได้และความเข้มข้นของสารมาตรฐานสำหรับความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ เพื่อแสดงค่า % recovery จากการเติมสารมาตรฐานเอนโดท็อกซิน (spike) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวอย่าง

พบว่ามีค่าอยู่ในเกณฑ์กำหนดของการทดสอบประจำที่ 50-200% แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความแม่นยำอย่างไรก็ตามในการ spike ในการทดสอบประจำยังคงใช้ค่า spike ที่ความเข้มข้น 0.5 EU/ml เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพการทดสอบ และจากการทดสอบความเที่ยงโดยการทำซ้ำภายในวันเดียว การทดสอบต่างวันและต่างนักวิเคราะห์ พบว่ามีค่า CV ของ % recovery น้อยกว่า 25% แสดงว่าวิธีการทดสอบมีความเที่ยงจากการทำซ้ำ และจากการเปลี่ยนแปลงปัจจัยในการวิเคราะห์จากการทดสอบต่างวันและต่างนักวิเคราะห์ แสดงให้เห็นวิธีดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซินในตัวอย่างวัคซีนและโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งวิธีนี้มีแนวโน้มที่จะได้รับความนิยมมากขึ้นในอนาคตจากแนวคิดอนุรักษ์นิยมไม่ใช้สัตว์ในการทดสอบ เพื่อเป็นไปตามหลัก 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement) ที่องค์การอนามัยโลกพยายามรณรงค์ให้หน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐพัฒนาวิธีการในการควบคุมคุณภาพชีววัตถุ¹⁷ ทั้งนี้วิธี recombinant factor C อาจเข้ามาแทนที่วิธี LAL test ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นการสังเคราะห์สารเพื่อใช้แทนสารสกัดจากแมงดาทะเล จึงมีความจำเพาะสูงและมีความแปรปรวนของแต่ละรุ่นการผลิตน้อยกว่าสารสกัดจากสิ่งมีชีวิต รวมทั้งลดข้อจำกัดจากตัวอย่างที่มี β -glucan ที่จะไปส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยาทำให้เกิดผลบวกปลอมได้^{6-7,16} ดังนั้น ผลการศึกษานี้จึงสนับสนุนให้ใช้วิธี recombinant factor C เป็นวิธีมาตรฐานในการวัดปริมาณเอนโดท็อกซินในชีววัตถุ เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

สรุปผล

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเอนโดท็อกซินด้วยวิธี recombinant factor C ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนดทุกพารามิเตอร์สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเอนโดท็อกซินในตัวอย่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและวัคซีนได้ แต่ไม่เหมาะกับการทดสอบในตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์พลาสมา ซึ่งยังคงต้องใช้วิธีมาตรฐาน turbidimetric method ที่หน่วยงานใช้ในการวิเคราะห์ประจำต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่างพลาสมา ที่ต้องมีการปรับสภาพตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ ต้องมีการทวนสอบค่าการเจือจางที่เหมาะสมก่อนการทดสอบ และกรณีพบสารรบกวนปฏิกิริยา ต้องมีการปรับสภาพของตัวอย่างเบื้องต้น

เอกสารอ้างอิง

1. กระทรวงสาธารณสุข. กฎกระทรวงว่าด้วยการรับรองรุ่นการผลิตยาแผนปัจจุบันที่เป็นยาชีววัตถุ พ.ศ. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 23 ก.ย. 2567]. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม127, ตอนที่ 66 ก (ลงวันที่ 3 พฤศจิกายน 2553). เข้าถึงได้จาก: <https://drug.fda.moph.go.th/ministerial-regulations/bio-product-certification>
2. Sandle T. Pharmaceutical microbiology: essentials for quality assurance and quality control: Chapter 11 Endotoxin and pyrogen testing. United Kingdom: Woodhead; 2016. p. 131-145.
3. Beishuizen A, Thijs LG. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. J Endotoxin Res. 2003;9(1):3-24.

4. Atlantic States Marine Fisheries Commission. Review of the interstate fishery management plan: Horseshoe crab (Limulus polyphemus) 2022 Fishing year [Internet]. Arlington: Plan Review Team; 2023 [cited 2024 Jan 14]. Available from: http://www.asmfc.org/uploads/file/6539318aHSC_FMP_Review_FY2022.pdf
5. Tindall B, Demircioglu D, Uhlig T. Recombinant bacterial endotoxin testing: a proven solution. BioTechniques 2021; 70(5):1-11.
6. Piehler M, Roeder R, Blessing S, Reich J. Comparison of LAL and rFC assays: participation in a proficiency test program between 2014 and 2019. Microorganisms 2020;8(418):1-11.
7. Maloney T, Phelan R, Simmons N. Saving the horseshoe crab: a synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. PLoS Biol 2018;16(10):1-10.
8. Gorman R. Atlantic horseshoe crabs and endotoxin testing: perspectives on alternatives, sustainable methods, and the 3Rs (replacement, reduction, and refinement). Front Mar Sci 2020;7:1-11.
9. European Directorate for the Quality of Medicine & HealthCare of the Council of Europe. European Pharmacopoeia: 2.6.32 Test for bacterial endotoxins using recombinant factor C. 11th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2022. p. 252-254.

10. United States Pharmacopeia and the National Formulary. <86> Bacteria endotoxins test using recombinant reagents [Internet]. 2022 [cited 2024 Jan 25]. Available from: https://online.uspnf.com/uspnf/document/2_GUID-340F38C0-BC8B-4A80-A8BD-F9BA702EEF7B_10101_en-US?source=Search%20Results&highlight=86
11. Lonza Walkersville, Inc. PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay [Internet]. 2012 [cited 2024 Jan 21];1-30 Available from: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/download/product/asset/30836
12. Lonza Walkersville, Inc., editor. Endotoxin detection: method reviews different approaches to the bacterial endotoxins test. Trends and improvements in endotoxin testing; 2016 Sep 22; Bangkok. Thailand. Bangkok: Thai Can Biotech; 2016.
13. Lonza Walkersville, Inc. Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Pyrogen™ 5000 [Internet]. 2007 [cited 2024 Jan 21];1-28. Available from: https://www.lonzabio.jp/products/endotoxin/pdf/00190233_en.pdf
14. Lonza Walkersville, Inc. Pyrosperser™ Dispersing Agent [Internet]. 2013 [cited 2024 Jan 21];1-28. Available from: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/download/product/asset/27876
15. Lonza Walkersville, Inc. Serum/Plasma testing with PYROGENT™-5000 and Kinetic-QCL™ assays technical tips [Internet]. 2012 [cited 2024 Sep 23];1-2. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Thomas-Winkler-12/post/What_is_the_best_method_to_measure_endotoxin_LPS_in_serum_samples/attachment/5a6060884cde266d58841aa7/AS%3A584074448084992%401516265608321/download/Serum+Plasma+Testing.pdf
16. Tamura H, Reich J, Nagaoka I. Outstanding contributions of LAL technology to pharmaceutical and medical science: Review of methods, progress, challenges, and future perspectives in early detection and management of bacterial infections and invasive fungal diseases. *Biomedicine* 2021;9(536):1-15.
17. Lilley E, Bruysters M, Das P, Gill S, Isbrucker R, Jones D, Holmes A. Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals: Responses from a survey of national control laboratories and national regulatory authorities. *Biologicals* 2023;84:1-9.