# บทความวิชาการสำหรับการศึกษาต่อเนื่อง
# สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

**รหัส :** 5003-1-000-001-06-2563

**หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง : 2.5 หน่วยกิต**

**วันที่รับรองบทความ : 15 มิถุนายน 2563**

**วันที่หมดอายุ : 14 มิถุนายน 2564**

**เรื่อง**

Alternative methods for pyrogen test

**ผู้เขียน**

ภก.กรกฤช รัตนพันธุ์ ภญ.อนัญญา ทรัพย์ทิพยรัตนา และ ภก.อนวัช มิตรประทาน

**วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม**

1. ทราบความสำคัญของการตรวจวัดสารก่อไข้ และหลักการของการตรวจวัดสารก่อไข้ด้วยวิธีทางเลือก คือ Monocyte Activation Test (MAT) และ Recombinant Factor C (rFC)
2. ทราบแนวทางในการนำ Monocyte Activation Test (MAT) และ Recombinant Factor C (rFC) มาใช้

**คำสำคัญ**

Pyrogen testing, การทดสอบสารก่อไข้, advanced pyrogen testing, new technology pyrogen testing, MAT test, animal testing, rFC assay

**บทคัดย่อ**

สารก่อไข้ (pyrogen) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ endotoxin pyrogens (LPS) และ non-endotoxin pyrogens (NEP) ในอุตสาหกรรมยาสารก่อไข้ถูกจัดเป็น critical quality attribute ที่มีผลต่อความปลอดภัยจากการใช้ยา จึงมีความจำเป็นต้องควบคุมปริมาณและทำการระบุปริมาณสารก่อไข้ก่อนที่จะทำการปล่อยยาออกขายสู่ท้องตลาดโดยวิธีที่เป็นที่ยอมรับและได้มาตรฐานซึ่งมีกำหนดอยู่ในตำรายา ได้แก่ limulus amoebocyte lysate (LAL) assay และ rabbit pyrogen test (RPT) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้สัตว์ (animal-based test) แต่อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ก็มีข้อจำกัดและข้อเสีย ด้วยเทคโนโลยีทางชีวภาพทำให้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทางเลือกในการทดสอบสารก่อไข้ขึ้น ได้แก่ monocyte activation test (MAT) และ recombinant horseshoe crab factor C assay (rFC assay) แต่อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีจำเป็นต้องมีการทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อที่จะทำให้มั่นใจได้ว่าวิธีในการทดสอบสารก่อไข้เป็นไปตามข้อกำหนดของตำรายาและตามกฎหมายก่อนจะนำวิธีการทางเลือกมาใช้ในการทดสอบจริง

# Alternative methods for pyrogen test

ภก.กรกฤช รัตนพันธุ์ ภญ.อนัญญา ทรัพย์ทิพยรัตนา
และ ภก.อนวัช มิตรประทาน

**วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม**

1. ทราบความสำคัญของการตรวจวัดสารก่อไข้ และหลักการของการตรวจวัดสารก่อไข้ด้วยวิธีทางเลือก คือ Monocyte Activation Test (MAT) และ Recombinant Factor C (rFC)
2. ทราบแนวทางในการนำ Monocyte Activation Test (MAT) และ Recombinant Factor C (rFC) มาใช้ในการตรวจวัดสารก่อไข้

**บทคัดย่อ**

สารก่อไข้ (pyrogen) เป็นกลุ่มสารเคมีที่สามารถก่อให้เกิดไข้ในร่างกายสิ่งมีชีวิตซึ่งมีที่มาจากหลายแหล่ง เช่น micro-organisms (แบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา) สิ่งแวดล้อม กระบวนการ หรือผลิตภัณฑ์ การปนเปื้อนของสารก่อไข้นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพจนถึงแก่ชีวิต สารก่อไข้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ endotoxin pyrogens (LPS) และ non-endotoxin pyrogens (NEP) ในอุตสาหกรรมยาสารก่อไข้จึงถูกจัดเป็น critical quality attribute ที่มีผลต่อความปลอดภัยจากการใช้ยาโดยเฉพาะยาในรูปแบบยาฉีดและยาชีววัตถุ จึงมีความจำเป็นต้องควบคุมปริมาณและทำการระบุปริมาณสารก่อไข้ก่อนที่จะทำการปล่อยยาออกขายสู่ท้องตลาด โดยวิธีที่เป็นที่ยอมรับและได้มาตรฐานซึ่งมีกำหนดอยู่ในตำรายาไม่ว่าจะเป็น USP หรือ BP ได้แก่ limulus amoebocyte lysate (LAL) assay และ rabbit pyrogen test (RPT) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้สัตว์ (animal-based test) แต่อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ก็มีข้อจำกัดและข้อเสีย ด้วยเทคโนโลยีทางชีวภาพทำให้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทางเลือกในการทดสอบสารก่อไข้เพื่อกำจัดข้อจำกัดและข้อเสียของการทดสอบดั้งเดิม ได้แก่ monocyte activation test (MAT) และ recombinant horseshoe crab factor C assay (rFC assay) โดยวิธี MAT สามารถทดสอบสารก่อไข้ได้ทั้ง 2 ประเภทโดยใช้หลักการที่ว่า exogenous pyrogens จะกระตุ้น human monocytes ให้หลั่ง endogenous pyrogens จากนั้นทำการหาปริมาณ endogenous pyrogens (ส่วนใหญ่จะเป็น IL-6 หรือ IL-1ß) เปรียบเทียบกับผลการตอบสนองที่ถูกกระตุ้นด้วย endotoxin standard curve เพื่อระบุปริมาณสารก่อไข้ วิธี rFC assay สามารถทดสอบสารก่อไข้ประเภท LPS เท่านั้นโดยอาศัยหลักการที่ว่า factor C เมื่อทำปฏิกิริยากับ LPS จะเกิดสารซึ่งสามารถเปลี่ยน fluorogenic substrate เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่เรืองแสง fluorescence (fluorimetric product) ซึ่งทำให้สามารถหาปริมาณ LPS ได้ โดยวิธีนี้เป็นวิธีทางเลือกของวิธี LAL assay โดยผลิต recombinant factor C ในสิ่งมีชีวิตแทนการใช้ lysate จากเลือดแมงดาทะเล แต่อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีจำเป็นต้องมีการทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อที่จะทำให้มั่นใจได้ว่าวิธีในการทดสอบสารก่อไข้เป็นไปตามข้อกำหนดของตำรายา และตามกฎหมายก่อนจะนำวิธีการทางเลือกมาใช้ในการทดสอบจริง

**บทนำ**

สารก่อไข้ (pyrogen) ประกอบด้วยกลุ่มสารเคมีหลากหลายที่ก่อไข้ได้ ซึ่งมาจากหลากหลายแหล่ง ได้แก่ micro-organisms (แบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา) สิ่งแวดล้อม กระบวนการ หรือผลิตภัณฑ์ การปนเปื้อนสารก่อไข้นั้นอาจส่งผลให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย และส่งผลให้เกิดอาการตั้งแต่การเปลี่ยนแปลงของหลอด

เลือดไปจนถึงขั้นช็อค และเสียชีวิตได้[1] สารก่อไข้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Endotoxin pyrogens (LPS) และ Non-Endotoxin pyrogens (NEP)

Endotoxins เป็น lipopolysaccharide complex ที่อยู่บน outer membrane ผนังเซลล์แบคทีเรียก่อโรคแกรมลบ เช่น *Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Pseudomonas, Neisseria, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis* และ *Vibrio cholerae*[2]

NEP คือ สารอื่น ๆ ที่สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาการเกิดไข้ได้ ได้แก่[1]

- Endotoxin associated proteins: Exotoxins
- Peptidoglycans (components of bacterial cell wall): Lipoarabinomannans (from mycobacteria), DNA (bacterial)
- Fungal components (for example; mannans, glucans, mannoproteins), Porins (proteins from the bacterial cell wall), Parasite components (for example; phosphoinositol), Bacterial outer surface proteins
- Viruses, Muramylpeptides (MDP and other subunits of petidoglycan synergise with endotoxins): Non-microbiological contaminations (for example; cytokines, media, cells, breakdown products)
- Lipoteichoic acids and further gram-positive bacterial cell-wall components, Solid materials (for example; medical devices, plastic)
- Superantigens: Drugs (for example steroids, bile salts, dapsone, cytokines)

สารก่อไข้เป็นหนึ่งใน critical quality attribute ที่มีผลต่อความปลอดภัยจากการใช้ยาโดยเฉพาะยาในรูปแบบยาฉีดและยาชีววัตถุ จึงมีความจำเป็นต้องควบคุมปริมาณและทำการระบุปริมาณสารก่อไข้ก่อนที่จะทำการปล่อยยาออกขายสู่ท้องตลาด[3] โดยวิธีที่เป็นที่ยอมรับและได้มาตรฐานซึ่งมีกำหนดอยู่ในตำรายาไม่ว่าจะเป็น USP หรือ BP ได้แก่ limulus amoebocyte lysate (LAL) assay และ rabbit pyrogen test (RPT) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้สัตว์ (animal-based test)[4] แต่อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ก็มีข้อจำกัดและข้อเสีย เช่น การทดสอบสารก่อไข้ด้วยวิธีเหล่านี้นำไปสู่การให้ผลบวกลวง (false positive result) การใช้สัตว์ยังมีประเด็นทางจริยธรรมในการใช้สัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องมีระบบสนับสนุนที่อาศัยต้นทุนสูงมากเพื่อให้สอดคล้องกับข้อกำหนดตามกฎหมายในการทดสอบ RPT และการทดสอบทั้งสองวิธียังให้ผลที่มีความแปรผันและต้องใช้ความเชี่ยวชาญในการตัดสินใจผลการทดสอบ[3] นอกจากนี้ยังมีความไม่สอดคล้องของการทดสอบ RPT ระหว่าง IP และ ICH pharmacopoeias (JP, USP และ EP) ซึ่งมีความแตกต่างในเรื่องของการออกแบบการทดลอง กระบวนการทำการทดลอง การบันทึกอุณหภูมิ เกณฑ์การยอมรับ และการตัดสินผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** แสดงความแตกต่างของ harmonized bacterial endotoxins test (BET) ระหว่าง JP และ IP, USP และ EP[5]

| Experimental | IP-USP-EP | JP |
|---|---|---|
| Gel-clot techniques: valid test conditions | The lowest concentration of the standard solutions shows a (-) result | When 0.25λ of the standard solution shows a (-) result |
| Photometric quantitative techniques: requirements | ▪ Sol. C comply assurance of criteria<br>▪ endotoxin recovery: 50–200%<br>▪ Sol. D: ≤ blank value of the lysate employed or < endotoxin detection limit | ▪ \|r\| of sol. C: ≥ 0.980<br>▪ endotoxin recovery: 50–200%<br>▪ Sol. D: ≤ blank value of the lysate employed or < endotoxin detection limit |

IP: International Pharmacopoeia; USP: United States Pharmacopoeia; JP: Japanese Pharmacopoeia; EP: European Pharmacopoeia.

การตรวจวัดปริมาณสารก่อไข้นั้นมีความสำคัญในการตรวจสอบความปลอดภัยสำหรับผลิตภัณฑ์ยาฉีดและเครื่องมือแพทย์ แต่เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงใน Pharmacopoeia European 5.1.10 และข้อจำกัดของ BET / LAL test ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาวิธีการทดสอบสารก่อไข้ทางเลือกอื่น ซึ่งเป็นวิธี in-vitro pyrogen tests (IVPT)[6] หรือ monocyte activation tests (MAT) และอีกวิธีหนึ่ง คือ Recombinant Factor C (rFC)

## Monocyte Activation Test (MAT)

In-vitro pyrogen tests (IVPT)[6] หรือเรียกว่า monocyte activation tests (MAT) การทดลอง MAT เป็นวิธีการที่ค่อนข้างใหม่ที่ถูกพัฒนาขึ้นเป็นทางเลือกในการนำมาใช้ทดสอบสารก่อไข้ และสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมยาชีววัตถุ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวต่อสารก่อไข้ทั้งที่เป็น endotoxin และ non-endotoxin based pyrogens โดยให้ข้อดีในเชิงของการลด variability เมื่อเทียบกับ RPT ทั้งยังลดการใช้สัตว์ซึ่งสอดคล้องกับหลัก 3Rs (replacement, reduction, refinement) ซึ่งปกป้องการใช้สัตว์ทดลอง และยังใช้เวลาลดลงในการปล่อยยาสู่ท้องตลาด

การก่อไข้โดยสาร exogenous pyrogens เช่น LPS สามารถกระตุ้นการหลั่ง endogenous pyrogens ได้แก่ IL-1β, IL-6 และ TNFα โดยถ้าหากสารเหล่านี้ถูกหลั่งออกมามากจนเกิน threshold limit จะไปกระตุ้นศูนย์การควบคุมอุณหภูมิของสมองส่วน Hypothalamus ซึ่งสุดท้ายแล้วจะไปกระตุ้นให้เกิดไข้ จากองค์ความรู้นี้นำไปสู่หลักการพื้นฐานของวิธี MAT คือนำ Human monocytes (whole blood, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) หรือ monocytic cell lines) มาบ่มรวมกับสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบสารก่อไข้ภายใต้สภาวะ pyrogen-free (all consumables cell culture grade) หลังจากบ่มแล้วแยกส่วน supernatants มาตรวจหา endogenous pyrogens (ส่วนใหญ่จะเป็น IL-6 หรือ IL-1β) ผลการตอบสนองที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับผลการตอบสนองที่ถูกกระตุ้นด้วย endotoxin standard curve (หรือ reference batch ของผลิตภัณฑ์ยา) ในการทดลองที่กำหนดไว้ความเข้มข้นของ critical endotoxin นั้นใช้ค่าจาก the international endotoxin standard ซึ่งได้มาจาก *E. coli* จากข้อมูลของสัตว์ทดลอง [1, 7] และข้อมูลการทดสอบกับอาสาสมัคร[8, 9] threshold limits นั้นได้มาจากสมมติฐานว่า endotoxin นั้นมีเพียงแค่ pro-inflammatory ที่ปนเปื้อนในสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

นอกจากนี้ MAT ยังสามารถตรวจวัด synergistic effects ระหว่างปริมาณสารปนเปื้อนหลากหลายหรือ pro-inflammatory drug ที่อยู่ในปริมาณต่ำกว่าระดับที่จะทำให้ก่อไข้ได้ ในขณะที่ BET ที่จำเพาะนั้นทำไม่ได้ [10, 11] ความไวของการทดสอบ MAT นั้นคล้ายคลึงกับ RPT โดย RPT จะฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 10 ml/kg ของน้ำหนักตัวกระต่าย สำหรับ MAT ต้องใช้ตัวอย่างที่มี LPS อย่างน้อย 50 pg/ml (fever threshold ของกระต่ายคือ 500pg/kg ของน้ำหนักตัวกระต่าย โดยถ้าฉีดปริมาตร 10 ml จะมีปริมาณ LPS 50 pg/ml

เช่นเดียวกัน)[10] แต่อย่างไรก็ตามสามารถออกแบบการทดลองเพื่อเพิ่ม sensitivity ของการทดลองได้จาก sensitivity ในการตรวจวัด LPS จาก 50 pg/ml เพิ่มได้ถึงประมาณ 3 pg/ml

MAT สามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกแทนการใช้สัตว์ทดลองตาม EU legislative framework ซึ่งถูกระบุใน Pharmacopoeia European 2.6.30.3 ให้ใช้ MAT ในการตรวจสอบ หาปริมาณสารที่สามารถกระตุ้น human monocytes หรือ monocytic cells เพื่อให้หลั่ง endogenous mediators ที่มีบทบาทในการทำให้ก่อไข้ โดยวิธีนี้เหมาะสมหลังจากมีการทำ product specific validation แล้วว่าสามารถใช้ทดแทน RPT ได้

**รูปที่ 1** แสดงแผนภาพหลักการของวิธี MAT [11]

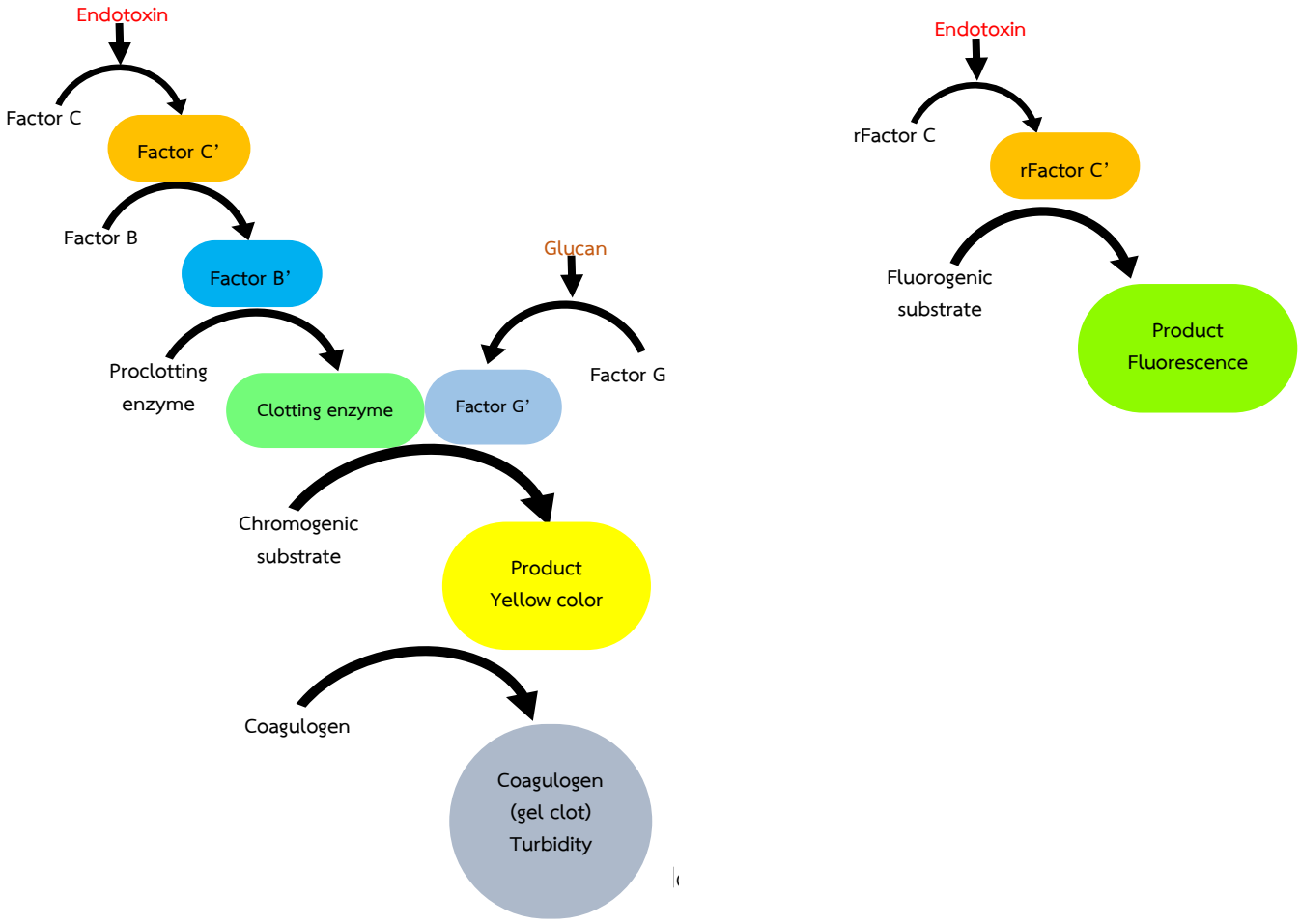
**ตารางที่ 2** เปรียบเทียบวิธีการทดสอบสารก่อไข้ด้วยวิธี Rabbit Pyrogen Test (RPT) Endotoxin Test (LAL / BET) และ Monocyte Activation Test (MAT) [11,12]

| | Rabbit Pyrogen Test (RPT) | Endotoxin Test (LAL / BET) | Monocyte Activation Test (MAT) |
|---|---|---|---|
| Products which cannot be analyzed | - Blood products<br>- Cellular products<br>- Proteins<br>- Sedatives<br>- Analgesics<br>- Cytokines<br>- Antibiotics<br>- Chemotherapeutics | - Blood products<br>- Cellular products<br>- Proteins<br>- Lipids<br>- Aluminum hydroxide adjuvants (common in vaccines) | +/- cytotoxic drugs<br>Other: If the product tested interferes with the detection system, the possibility of detecting pyrogens will depend on the method sensitivity |
| Controls | No | Yes | Yes |
| Detection of | Pyrogens | Endotoxins | Pyrogens |
| Limit of detection (IU/mL) | 0.3–5 | 0.03 | 0.03–0.1 |
| Quantification | No | Yes | Yes |
| Human based reaction | No | No | Yes |
| Spectrum | + all rabbit pyrogens | - (only LPS) | + all human pyrogens |
| Animal testing | In vivo | In vitro | In vitro |

**Recombinant Factor C (rFC)**

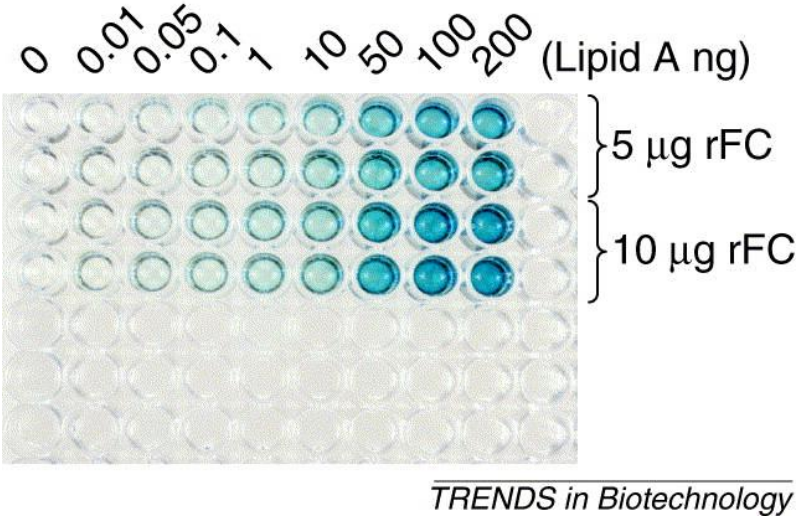
วิธีทางเลือกในการทดสอบสารก่อไข้ นอกจากวิธี MAT แล้วยังมีวิธี Recombinant Factor C (rFC) จากหลักการของ LAL test สาร endotoxin จะกระตุ้น LAL ให้เกิด cascade ของ เอนไซม์ serine

proteases และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะเกิดการก่อตัวของเจลขึ้น (gel clot) Factor C ใน LAL ทำหน้าที่เป็น zymogen ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการ coagulation cascade ในร่างกายสิ่งมีชีวิต (in vivo) Factor C เป็นตัวตรวจจับทางชีวภาพ (biosensor) ซึ่งจะแจ้งเตือนให้แมงดาทะเล horseshoe crab ทราบว่ามีผู้บุกรุกที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบเข้ามา กระบวนการแข็งตัวของเลือดจะจับและฆ่าแบคทีเรียแกรมลบเพื่อจำกัดการติดเชื้อต่อไป อย่างไรก็ตามการนำ LAL มาใช้เป็นเครื่องมือในการวัด endotoxin มีความแปรผันในความไวและความจำเพาะเจาะจงของ LAL ต่อ endotoxin นอกจากนี้ปริมาณของ horseshoe crabs ในธรรมชาติที่ลดลงอย่างต่อเนื่องยังเป็นปัญหาและความท้าทายของอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ จึงเป็นที่มาของการพัฒนา rFC โดย rFC มีขนาดโมเลกุล 132 kDa ทำหน้าที่เป็น proenzyme ที่สามารถถูกเหนี่ยวนำด้วย endotoxin[12]




rFC เป็น recombinant protein ซึ่งถูกผลิตจากลำดับเบส DNA ของ Factor C enzyme จาก species หรือ subspecies ของแมงดาทะเล horseshoe crab ที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้น เช่น การใช้ Factor C cDNA จาก *Carcinoscorpius rotundicauda* หรือ Singapore (mangrove) horseshoe crab และการใช้ Factor C cDNA จาก *Tachypleus species* ซึ่งทั้งสองวิธี rFC assays นี้อยู่บนสมมติฐานที่ว่า Factor C enzymes จากทุก horseshoe crab genera (limulus, carcinoscoripus และ tachypleus) มีคุณสมบัติคล้ายกับทุกโปรตีนที่พบใน aqueous amoebocyte extract ซึ่งลำดับของ DNA สามารถถูกแสดงออกได้ใน *Escherichia coli*, yeast และ mammalian cells[13]

ในการหาปริมาณ endotoxin โดยใช้ rFC zymogen จะใช้วิธี Fluorimetric assay โดยอาศัยหลักการกระตุ้น rFC ด้วย endotoxin ได้เป็น rFC' ซึ่งจะไป hydrolyse สารตั้งต้นที่เป็น Fluorogenic substrate เช่น fluorigenic substrate Boc-Val-Pro-Arg-MCA (Boc, butoxy-carbonyl; MCA, 7-amido-4-methylcoumarin) ทำให้เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ให้เรืองแสง fluorescence (fluorimetric product) ซึ่งถูกวัดที่ความยาวคลื่นที่ excitation state เท่ากับ 380 nm และความยาวคลื่น emission state เท่ากับ 40 nm ในการทดลองจะมีการใช้ rFC หลากลายความเข้มข้น โดยความเข้มข้นของ rFC ที่สูงจะยิ่งเพิ่มความไวในการตรวจวัดปริมาณ endotoxin จาก 0.005 EU/ml ถึง 0.001 EU/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับการวัดด้วย LAL ที่มีขายตามท้องตลอด ณ สภาวะเดียวกันพบว่าการใช้ rFC มี background reading ที่ต่ำกว่า และให้ความไวในการตอบสนองต่อ endotoxin ที่สูงกว่า[14]




**รูปที่ 3** แสดงการหาปริมาณ endotoxin ด้วย rFC เทคนิค fluorimetric assay ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ rFC และความเข้มข้นของ lipid A การเพิ่มขึ้นของความเข้มของสีซึ่งผ่านกระบวนการถูก hydrolysis ด้วย enzyme สามารถมองเห็นได้จาก 0.01 ถึง 200 ng ของ lipid [15]

**การใช้วิธีทางเลือกในการหาปริมาณหรือระบุสารก่อไข้**

USFDA ระบุให้ผู้ผลิตที่ต้องใช้วิธีการทดสอบสารก่อไข้ทางเลือกในผลิตภัณฑ์จะต้องมีข้อมูล accuracy, sensitivity, precision, selectivity หรือ adaptability to automation หรือ computerized data reduction และภายใต้สถานการณ์อื่น ๆ ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องตามหัวข้อ USP General Chapter <1225>, Validation of Compendial Procedures และผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ต้องให้ผลที่เทียบเท่าหรือเหนือกว่า เมื่อมีความแตกต่าง หรือมีข้อโต้แย้งใด ๆ จากที่ระบุไว้ใน pharmacopoeia ผลการตัดสินใจจะต้องอยู่บนพื้นฐานของข้อกำหนดใน USP ของวิธี gel clot หรือวิธีที่ระบุไว้ใน monograph ของผลิตภัณฑ์ที่ถูกทดสอบ[16] โดยแนวทางในการใช้วิธีทางเลือกในการหาปริมาณหรือระบุสารก่อไข้แบ่งออกเป็น 2 วิธีดังนี้

1. Monocyte Activation Type Pyrogen Test (MAT)

ถ้าผู้ผลิตเลือกใช้ Monocyte Activation Type Pyrogen Test ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องตามผลิตภัณฑ์นั้น (product-specific validation) เพื่อสร้างการทดสอบที่จำเพาะต่อสารที่เหมาะสมในการประเมินวิธี monocyte activation method การตรวจสอบความถูกต้องต้องมีหัวข้อ การทดสอบการรบกวนผลการทดสอบ (interference testing), ความถูกต้องในการตรวจหา pyrogen ในแต่ละตัวอย่างทดสอบ (accurate detection of pyrogen) และสำหรับเครื่องมือหรืออุปกรณ์ต้องแสดงให้เห็นถึงความสามารถของ test system ในการสัมผัสกับ monocytes ได้โดยตรง

2. Recombinant Horseshoe Crab Factor C Assay

ถ้าผู้ผลิตเลือกใช้ recombinant factor C-based assay การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ต้องเป็นไปตามข้อกำหนดของ USP Chapter <85>, Bacterial Endotoxins Test ในส่วนของ Photometric Quantitative Techniques และ USP Chapter <1225>, Validation of Compendial Procedures[17]

จากบทความข้างต้นจะเห็นได้ว่าวิธีทางเลือกในการทดสอบสารก่อไข้ทั้งสองวิธี ได้แก่ monocyte activation type pyrogen test และ recombinant horseshoe crab factor C assay เป็นวิธีที่น่าสนใจในการนำมาทดสอบสารก่อไข้ โดย MAT สามารถหาปริมาณสารก่อไข้ได้ทั้งชนิด endotoxin pyrogens และ non-endotoxin pyrogens ในขณะที่ rFC assay สามารถหาปริมาณสารก่อไข้ชนิด endotoxin pyrogens เท่านั้น โดยวิธีการทางเลือกทั้งสองวิธีสามารถลดข้อจำกัดและข้อเสียของการทดสอบสารก่อไข้ด้วยวิธี rabbit pyrogen test และ LAL test โดยเฉพาะการลดการใช้สัตว์ในการทดลอง แก้ไขปัญหาจริยธรรมในการใช้สัตว์ อีกทั้งลดความหลากหลายของผลการทดสอบ และสามารถเพิ่มความไวและความจำเพาะในการวิเคราะห์ได้อีกด้วย ทว่าการจะนำวิธีการทางเลือกมาใช้ในการวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์ยาเพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐาน USFDA ได้มีข้อแนะนำให้แสดงข้อมูลการศึกษาเพื่อพิสูจน์ให้เห็นว่าการใช้วิธีทางเลือกมีความเหมาะสมต่อผลิตภัณฑ์ที่ทำการตรวจ และสามารถให้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้องแม่นยำเป็นไปตามข้อกำหนดที่ระบุไว้ในตำรายามาตรฐานและสอดคล้องกับกฎหมาย

**เอกสารอ้างอิง**

1. Today‘s Online Textbook of Bacteriology, Endotoxin
2. Novel Pyrogen Tests Based on the Human Fever Reaction, The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 43.
3. Valentini S, Santoro G, Baffetta F, Franceschi S, Paludi M, Brandini E, et al. Monocyte-activation test to reliably measure the pyrogenic content of a vaccine: An in vitro pyrogen test to overcome in vivo limitations. Vaccine. 2019;37(29):3754-60.
4. F. De Mattia, J.M. Chapsal, J. Descamps, M. Halder, N. Jarrett, I. Kross, et al.The consistency approach for quality control of vaccines - A strategy to improve quality control and implement 3Rs. Biologicals, 39 (1) (2011), pp. 59-65
5. Franco E, Garcia-Recio V, Jimenez P, Garrosa M, Girbes T, Cordoba-Diaz M, et al. Endotoxins from a Pharmacopoeial Point of View. Toxins. 2018;10(8).
6. Dinarello, C.A. Cytokines as endogenous pyrogens. J.Infect.Dis. 179 Suppl 2 (0022-1899 (Print)), S294-S304 (1999).
7. Spreitzer, I., Fischer, M., Hartzsch, K., Luderitz-Puchel, U., & Montag, T. Comparative study of rabbit pyrogen test and human whole blood assay on human serum albumin. ALTEX. 19 Suppl 1 (0946-7785 (Print)), 73–5 (2002).
8. Hochstein, H.D., Fitzgerald, E.A., McMahon, F.G., & Vargas, R. Properties of US Standard Endotoxin (EC-5) in human male volunteers. Journal of Endotoxin Research 1, 52–6 (2010).
9. Suffredini, A.F., Hochstein, H.D., & McMahon, F.G. Dose-related inflammatory effects of intravenous endotoxin in humans: evaluation of a new clinical lot of Escherichia coli O:113 endotoxin. J.Infect.Dis. 179 (5), 1278–82 (1999).
10. Pardo-Ruiz, Z., Menéndez-Sardiñas, D.E., Pacios-Michelena, A., Gabilondo-Ramírez, T., Montero-Alejo, V., & Perdomo-Morales, R. Soluble β-(1,3)-glucans enhance LPS-induced response in the monocyte activation test, but inhibit LPS-mediated febrile response in rabbits: implications for pyrogenicity tests. European journal of pharmaceutical sciences official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences (2015).
11. Kikkert, R., Bulder, I., Groot, E.R. de, Aarden, L.A., & Finkelman, M.A. Potentiation of Tolllike receptor-induced cytokine production by (1-->3)-beta-D-glucans: implications for the monocyte activation test. J.Endotoxin.Res. 13 (3), 140–9 (2007).
12. Ding JL, Ho B. Endotoxin Detection – from Limulus Amebocyte Lysate to Recombinant Factor C. In: Wang X, Quinn PJ, editors. Endotoxins: Structure, Function and Recognition. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010. p. 187-208.
13. Abate W, Sattar AA, Liu J, Conway ME, Jackson SK. Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with Limulus amebocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay. Journal of medical microbiology. 2017;66(7):888-97.

14. Maloney T, Phelan R, Simmons N. Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. PLoS biology. 2018;16(10):e2006607.
15. Ding JL, Ho B. A new era in pyrogen testing. Trends in biotechnology. 2001;19(8):277-81.
16. Heed K. Endotoxin Testing Using Recombinant Reagents. 2018 [cited 2019 Sep 4]. Available from: https://www.pda.org/pda-letter-portal/home/full-article/endotoxin-testing-using-recombinant-reagents
17. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers. 2012[cited 2019 Sep 4]. Available from: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/pyrogen-and-endotoxins-testing-questions-and-answers.