

การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวัด ระดับแฟคเตอร์ 8 ด้วยวิธี One Stage Clot Based Assay และ Chromogenic Substrate Assay ในผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลีย เอ

มนัสวี ปรามพาล, อภิญญา สุเรียงฤทธิ์, คารินทร์ ขอโสคติกุล

บทคัดย่อ

โรคฮีโมฟีเลียเอ (Hemophilia A) เกิดจากการขาดแฟคเตอร์แปด (Factor VIII) ซึ่งเป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือด การตรวจวัดระดับแฟคเตอร์แปด โดยวิธี chromogenic substrate assay (CSA) เป็นการวัดปริมาณความเข้มของสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้น ซึ่งจะแปรผันตรงกับระดับแฟคเตอร์แปด การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดระดับแฟคเตอร์แปด โดยวิธี one stage clot based Assay (OSA) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดในงานประจำทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา กับวิธี CSA เพื่อพิจารณานำมาใช้เป็นวิธีการตรวจติดตามระดับแฟคเตอร์แปดในผู้ป่วยที่ได้รับแฟคเตอร์ชนิดเข้มข้น โดยใช้ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยฮีโมฟีเลียเอ ก่อนและหลังได้รับการฉีดแฟคเตอร์ จำนวน 18 ราย แบ่งเป็น plasma-derived factor VII (pdFVIII) 17 ราย และ Emicizumab 1 ราย ผลการทดลองพบว่า ค่าที่ตรวจวัดได้ทั้งก่อนและหลังจากได้รับ pdFVIII ของทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value} < 0.0001$) นั่นคือ ผู้ป่วยที่ได้รับ pdFVIII สามารถใช้การตรวจวัดระดับแฟคเตอร์แปดได้ทั้งสองวิธี แต่ผู้ป่วยที่ได้รับยา Emicizumab มีค่าระดับแฟคเตอร์แปดต่ำกว่า lower detection limit ในทั้ง 2 วิธี ดังนั้นการตรวจวัดระดับแฟคเตอร์ทั้ง OSA และ CSA สามารถนำมาใช้ติดตามระดับแฟคเตอร์แปดในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับ pdFVIII ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แต่ไม่เหมาะสมกับผู้ป่วยที่ได้รับยา Emicizumab ในขณะที่การตรวจวัดระดับสารต้านแฟคเตอร์แปด (Factor VIII inhibitor assay) ในผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียเอที่มีสารต้านที่ได้รับยา Emicizumab มีความเหมาะสมกว่าการตรวจวัดระดับสารต้านแฟคเตอร์แปดโดยตรง แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

คำสำคัญ : ฮีโมฟีเลีย, แฟคเตอร์แปด, One Stage clot based assay ,Chromogenic Substrate Assay

1. บทนำ

โรคฮีโมฟีเลียเอ (Hemophilia A) หรือโรคเลือดออกไหลไม่หยุด หรือโรคเลือดออกง่ายหยุดยาก เป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อยบนโครโมโซมเพศ X (X-linked recessive) อุบัติการณ์ของโรคฮีโมฟีเลียในประเทศไทยเท่ากับ 1 : 13,000 ถึง 1:20,000⁽¹⁾ ฮีโมฟีเลียเอเกิดจากการขาดปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่เรียกว่าแฟกเตอร์แปด (FVIII) แบ่งความรุนแรงของโรคเป็น 3 ระดับ คือ รุนแรงมาก ปานกลาง และน้อย แปรตามระดับของปัจจัยการแข็งตัวของเลือด การรักษาคือการเพิ่มระดับแฟกเตอร์แปดในเลือดให้สูงถึงระดับที่ทำให้เลือดหยุดไหล (hemostatic level) โดยการให้แฟกเตอร์ทดแทนชนิดเข้มข้น (replacement therapy) ปัจจุบันการรักษาด้วยแฟกเตอร์เข้มข้นมีหลายชนิด คือชนิดที่มีค่าครึ่งชีวิตของแฟกเตอร์แบบมาตรฐาน (Standard half-life) ได้แก่ plasma-derived factor VII (pdFVIII) และ recombinant activated factor VII (rFVIIa) และชนิดที่มีค่าครึ่งชีวิตของแฟกเตอร์แบบยาวนาน (Extended half-life) ซึ่งโดยทั่วไป ผู้ป่วยจะต้องได้รับการฉีดแฟกเตอร์เป็นประจำทุกๆ 2-3 วัน เพื่อเป็นการป้องกันมิให้มีภาวะเลือดออกง่าย⁽²⁾ แต่ในปัจจุบันการวิจัยและพัฒนาที่มีความก้าวหน้ามากขึ้น จึงทำให้มีผลิตภัณฑ์แฟกเตอร์เข้มข้นชนิดใหม่ ที่ชื่อว่า Emicizumab (Hemibra[®]) ซึ่งเป็นแอนติบอดีชนิด bispecific humanized สามารถทดแทนปัจจัยการแข็งตัวของเลือดตามธรรมชาติที่ขาดหายไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยจะสามารถคงระดับอยู่ในร่างกายได้นานหลายสัปดาห์ และฉีดได้เพียงหนึ่งแทน ส่งผลให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า การตรวจวัดระดับของแฟกเตอร์แปด และสารต้านแฟกเตอร์แปดในผู้ป่วยที่ได้รับการฉีด Emicizumab โดยวิธี One-Stage Clot Based Assay (OSA) นั้น มีข้อจำกัดในการตรวจวัด คือ การมีสารรบกวนปฏิกิริยา (interference) หรือการมีภาวะ Lupus anticoagulant ของผู้ป่วย⁽³⁾ ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดด้วยวิธีปกติได้ จึงต้องใช้การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Chromogenic Substrate Assay (CSA) ซึ่งมีรายงานว่ามีความเหมาะสมในการตรวจวัดระดับ

แฟกเตอร์แปด ในผลิตภัณฑ์แฟกเตอร์เข้มข้นชนิด extended half-life และ rFVIIa มากกว่าวิธี OSA โดยมีความแม่นยำและค่าระดับแฟกเตอร์แปดมีความสัมพันธ์กับประวัติการได้รับแฟกเตอร์ของผู้ป่วย⁽⁴⁾ ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำวิธี CSA มาใช้ในการตรวจวัดเพื่อลดข้อจำกัดจากวิธีปกติ เพื่อให้ค่าระดับของแฟกเตอร์มีความสอดคล้องกับแฟกเตอร์ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษา Emicizumab ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการเปรียบเทียบผลการตรวจวัดระดับของแฟกเตอร์แปด ด้วยวิธี OSA เทียบกับวิธี CSA จากตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียเอ ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อเป็นประโยชน์ในการพิจารณาใช้ตรวจวัดระดับแฟกเตอร์แปดในผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียเอที่ต้องได้รับยา Emicizumab ต่อไปในอนาคต

2. วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการตรวจวัดระดับแฟกเตอร์แปด จากตัวอย่างพลาสมาในสารกันเลือดแข็งชนิด 3.2% Sodium citrate ที่เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียเอ ทั้งก่อนและหลังได้รับ pdFVIII (Hemofil M[®]) 17 ราย และ Emicizumab (Hemibra[®]) 1 ราย โดยตรวจสอบสารต้านแฟกเตอร์แปดในผู้ป่วยรายที่ได้รับยา Emicizumab ร่วมด้วย วิธีการตรวจวัดทำทั้ง 2 วิธี ได้แก่ one-stage clot based assay ด้วยน้ำยา Factor VIII deficiency ,activated partial Thromboplastin time (aPTT reagent) Owren's Veronal Buffer (OVB) และ CaCl₂ (Siemens,Italy) และวิธี chromogenic substrate assay ด้วยน้ำยา Factor X Reagent, Factor IXa Reagent, Substrate Reagent , Substrate buffer (Siemens,Italy) โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการแข็งตัวของเลือด Sysmex CS1600 (Siemens,Italy)

3. วิธีการวิจัย

ทำ calibration curve โดยใช้ Standard Human Plasma และทำการตรวจวัดสารควบคุมคุณภาพ ได้แก่ Normal Control (Control N) และ Pathology Control (Control P)

3.1 One-stage clot-based assay (OSA)

เตรียมละลายน้ำยา activated partial Thromboplastin time (aPTT reagent), Factor VIII deficiency, Owren's Veronal Buffer (OVB), CaCl_2 ตรวจวัดระดับของตัวอย่างควบคุมคุณภาพ Control Normal และ Control Pathology ให้ค่าอยู่ในช่วงที่กำหนด จากนั้นนำพลาสมาผู้ป่วยมาตรวจวิเคราะห์ต่อในลำดับถัดไป หากค่าที่ตรวจวัดได้ต่ำกว่า lower detection limit ของน้ำยา จะรายงานค่าเป็น <0.3 เปอร์เซ็นต์

3.2 Chromogenic Substrate assay (CSA)

เตรียมละลายน้ำยา Factor X Reagent, Factor IXa Reagent, Substrate Reagent, Substrate buffer (Stopping buffer) ตรวจวัดระดับของตัวอย่างควบคุมคุณภาพ Control Normal และ Control Pathology ให้ค่าอยู่ในช่วงที่กำหนด จากนั้นนำพลาสมาผู้ป่วยมาตรวจวิเคราะห์ต่อในลำดับถัดไป หากค่าที่ตรวจวัดได้ต่ำกว่า lower detection limit ของน้ำยา จะรายงานค่าเป็น <1.5 เปอร์เซ็นต์

ค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์จะถูกนำมาคำนวณเป็นค่า Mean $\pm$ SD สถิติที่ใช้ในการประเมิน ได้แก่ correlation, simple linear regression โดยโปรแกรม GraphPadprism 8 วิเคราะห์ method comparison โดย Bland and Altman Analysis ด้วยโปรแกรม MedCalc software

4. ผลการศึกษาวิจัย

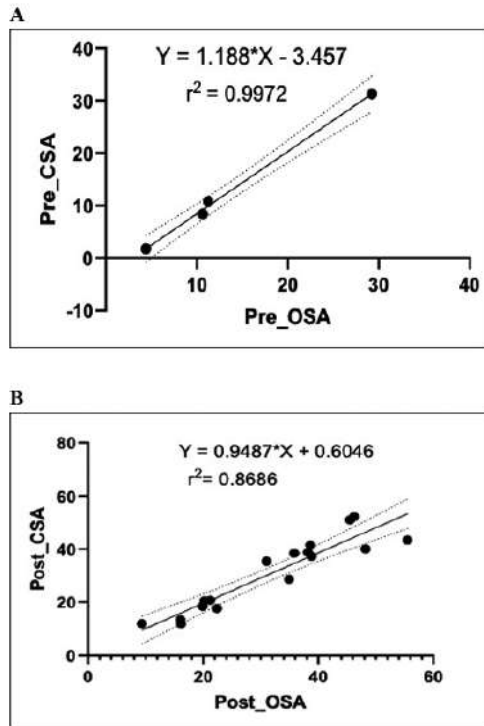
จากผลการตรวจวิเคราะห์ในพลาสมาผู้ป่วยทั้งหมด 18 ราย พบว่าก่อนได้รับการฉีดแฟกเตอร์ ค่าระดับของแฟกเตอร์แปด ส่วนใหญ่จะมีค่าต่ำกว่า lower detection limit ของน้ำยาจากทั้งสองวิธี ซึ่งหลังจากได้รับการฉีดแฟกเตอร์ ระดับของแฟกเตอร์แปดจะมีค่าเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) แต่สังเกตว่า ผู้ป่วยรายที่ 1 ที่ได้รับยา Emicizumab ค่าระดับแฟกเตอร์แปดจะต่ำกว่า lower detection limit ทั้ง 2 วิธี หมายความว่าทั้งวิธี OSA และ CSA ไม่สามารถใช้ตรวจติดตามเพื่อวัดระดับของแฟกเตอร์แปดในพลาสมาของผู้ป่วยที่ได้รับยา Emicizumab ได้ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ค่าการตรวจวัดทั้งหมดที่ไม่ใช่ค่า lower detection limit จะถูกนำไปเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธีต่อไป

เมื่อทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธี พบว่าค่าที่ตรวจวัดได้ทั้งก่อนและหลังจากได้รับ pdFVIII ของทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กัน (P -value < 0.0001) หมายความว่า ผู้ป่วยที่ได้รับ pdFVIII สามารถใช้การตรวจวัดระดับแฟกเตอร์แปดได้ทั้งสองวิธี (รูปที่ 1) จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland and Altman Difference plot พบว่าก่อนและหลังได้รับ pdFVIII มีค่า mean difference เท่ากับ 0.9 และ 1.0 หมายความว่า ระดับแฟกเตอร์แปด ก่อนและหลังที่ตรวจวัดได้จากวิธี OSA มีค่าสูงกว่าจาก CSA อยู่ 0.9 เปอร์เซ็นต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 2)

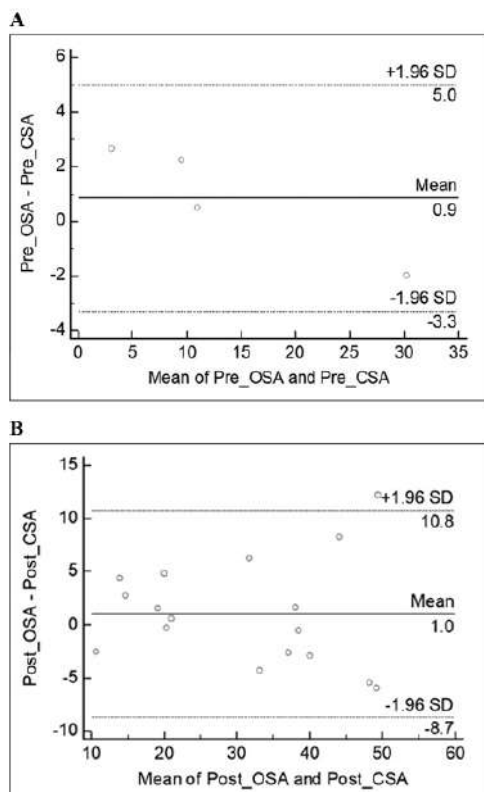
ตารางที่ 1 ค่าระดับแฟกเตอร์แปดในพลาสมาผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียเอ ก่อนและหลังได้รับยา Emicizumab (รายที่ 1) และ pdFVIII (รายที่ 2-18)

รายที่	วิธี OSA Mean (%) $\pm$ SD		วิธี CSA Mean (%) $\pm$ SD	
	Pre-	Post-	Pre-	Post-
1	<0.3	<0.3	<1.5	<1.5
2	<0.3	38.85 $\pm$ 2.47	<1.5	37.25 $\pm$ 5.73
3	<0.3	46.20 $\pm$ 7.92	<1.5	52.15 $\pm$ 8.56
4	<0.3	38.60 $\pm$ 5.37	<1.5	41.50 $\pm$ 2.97
5	<0.3	9.35 $\pm$ 1.48	<1.5	11.90 $\pm$ 2.40
6	<0.3	31.00 $\pm$ 1.56	<1.5	35.35 $\pm$ 1.91
7	<0.3	45.50 $\pm$ 0.85	<1.5	50.95 $\pm$ 3.18
8	0.6 $\pm$ 0.42	19.90 $\pm$ 0.00	<1.5	18.40 $\pm$ 2.26
9	0.4 $\pm$ 0.28	16.05 $\pm$ 0.49	<1.5	13.35 $\pm$ 0.92
10	<0.3	22.40 $\pm$ 0.00	<1.5	17.6 $\pm$ 0.99
11	0.5 $\pm$ 0.35	16.15 $\pm$ 0.07	<1.5	11.80 $\pm$ 0.14
12	0.9 $\pm$ 0.64	20.20 $\pm$ 0.99	<1.5	20.55 $\pm$ 2.90
13	4.40 $\pm$ 0.14	55.50 $\pm$ 0.28	1.75 $\pm$ 0.21	43.35 $\pm$ 0.78
14	3.55 $\pm$ 0.21	21.25 $\pm$ 3.32	<1.5	20.70 $\pm$ 0.85
15	2.3 $\pm$ 0.28	38.2 $\pm$ 0.28	<1.5	38.75 $\pm$ 5.02
16	11.25 $\pm$ 2.62	35.80 $\pm$ 9.33	10.75 $\pm$ 0.78	38.45 $\pm$ 17.32
17	29.25 $\pm$ 2.62	48.20 $\pm$ 5.66	31.25 $\pm$ 2.33	40.00 $\pm$ 3.54
18	10.65 $\pm$ 0.49	34.90 $\pm$ 0.99	8.40 $\pm$ 0.14	28.65 $\pm$ 0.49

รูปที่ 1 กราฟเปรียบเทียบระดับแฟกเตอร์แปด ก่อน (A) และ หลัง (B) ได้รับ pdFVIII โดยวิธี OSA และ CSA



รูปที่ 2 กราฟเปรียบเทียบระดับ Factor VIII ก่อน (A) และหลัง (B) ได้รับ pdFVIII โดยวิธี OSA และ CSA



ในส่วนของผู้ป่วยรายที่ 1 ที่ได้รับยา Emicizumab ที่พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ค่าที่ต่ำกว่า lower detection limit นั้น เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์สารต้านแฟกเตอร์แปด (Factor VIII Inhibitor) ด้วยวิธี One Stage Bethesda Assay (OSBA) และ Chromogenic Bethesda Assay (CBA) พบว่าวิธี OSBA ไม่สามารถตรวจวัดสารต้านแฟกเตอร์แปดได้ แต่วิธี CBA ตรวจวัดได้ค่า เท่ากับ 3.5 CBU นั่นคือ ผู้ป่วยที่ได้รับ Emicizumab รายนี้ ตรวจพบสารต้านแฟกเตอร์แปด เท่ากับ 3.5 CBU แต่ไม่สามารถตรวจวัดระดับแฟกเตอร์แปดด้วยวิธี OSBA ได้

5. บทวิจารณ์

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า วิธี CSA มีความเหมาะสมในการตรวจวัดระดับแฟกเตอร์แปด ในผลิตภัณฑ์แฟกเตอร์เข้มข้นชนิด extended half-life และ rFVIIIa แต่วิธีนี้ยังไม่สามารถนำมาใช้ในงานประจำทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยาได้ เนื่องจากข้อจำกัดด้านระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำยาและด้านต้นทุนของน้ำยาที่มีราคาค่อนข้างสูงกว่าวิธี OSA ที่เป็นวิธีการตรวจวัดที่นิยมใช้กัน จึงทำให้ CSA เหมาะกับงานวิจัยมากกว่า ซึ่งจากการศึกษาวิจัยของ Cid AR *et al.* ได้เปรียบเทียบระดับแฟกเตอร์แปดจากการตรวจวัดตัวอย่างของผู้ป่วยทั้ง 163 ราย ด้วยวิธี OSA และ CSA พบว่า ผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียชนิดรุนแรงน้อยจำนวน 32 คน มีผลการตรวจจากทั้งสองวิธีให้ค่าไม่สอดคล้องกัน ส่วนผู้ป่วยอีก 24 คน มีผลการตรวจจากวิธี OSA ให้ค่าสูงกว่าวิธี CSA และมีผู้ป่วย 8 คน ที่พบว่า วิธี CSA ให้ค่าสูงกว่าวิธี OSA⁽⁶⁾ ซึ่งความไม่สอดคล้องกันของทั้งสองวิธีนี้ได้รับการศึกษาอย่างต่อเนื่อง โดยจากงานวิจัยของ Akkaya E. *et al.* ได้สรุปไว้ว่า หากระดับแฟกเตอร์แปดของผู้ป่วยมีค่าน้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ จะส่งผลให้การตรวจวัดด้วยวิธี OSA ให้ค่าสูงกว่าวิธี CSA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและหากระดับแฟกเตอร์แปดของผู้ป่วยมีค่าน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้การตรวจวัดด้วยวิธี CSA ไม่สามารถออกค่าได้เนื่องจากเป็น lower detection limit⁽⁷⁾ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ พบว่า วิธี OSA จะให้ค่าสูงกว่า CSA

แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในผู้ป่วยทั้งก่อนและหลังได้รับการฉีด pdFVIII ดังนั้นการตรวจวัดระดับแฟกเตอร์ทั้ง OSA และ CSA สามารถนำมาใช้ติดตามระดับแฟกเตอร์แปรในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับ pdFVIII ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แต่ไม่เหมาะสมกับผู้ป่วยที่ได้รับยา Emicizumab นอกจากนี้มีรายงานวิจัยของ Amiral J. *et al.* ได้เปรียบเทียบผลการตรวจวัดระดับแฟกเตอร์แปรในผู้ป่วยที่ได้รับยา Emicizumab พบว่าวิธี OSA ให้ค่าสูงกว่าวิธี CSA⁽⁸⁾ ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ คือ ตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยที่ได้รับยา Emicizumab เมื่อตรวจวัดด้วยวิธี OSA พบว่าให้ค่าเกินช่วงกราฟมาตรฐาน ในขณะที่วิธี CSA ไม่สามารถรายงานค่าได้ทั้งก่อนและหลังได้รับแฟกเตอร์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Nogami *et al.* ที่พบว่าวิธี OSA ให้ค่า overestimated เช่นเดียวกัน⁽⁹⁾ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดลองตรวจวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยการตรวจหาสารต้านแฟกเตอร์แปร (Factor VIII inhibitor) ด้วยวิธี OSBA และ CBA แทนการตรวจแฟกเตอร์แปรโดยตรง พบว่าวิธี CBA สามารถรายงานค่าสารต้านแฟกเตอร์แปรได้ อาจกล่าวได้ว่าผู้ป่วยที่ได้รับยา Emicizumab ควรใช้การวัดระดับสารต้านแฟกเตอร์แปรด้วยวิธี CBA เพื่อใช้ติดตามและประเมินการให้การรักษาของผู้ป่วย จึงจะมีความเหมาะสมกว่าการตรวจวัดระดับแฟกเตอร์แปรโดยตรง

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนน้ำยา FVIII Chromogenic Substrate assay จาก บริษัท Med-one ขอขอบคุณผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียเอที่เข้าร่วมในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และทุนวิจัยกลุ่มขับเคลื่อนการวิจัย Special Task Force for Activating Research (STAR) ปีที่ 1/2563

7. บรรณานุกรม

1. อ่ำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์, บรรณาธิการ, โรคฮีโมฟีเลีย การรักษาและการป้องกัน. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: ศูนย์ฝึกอบรมนานาชาติโรคเลือดออกง่าย-กรุงเทพฯ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2549
2. คารินทร์ ซอโสตถิกุล, บรรณาธิการ, เอกวัฒน์ สุวันทโรจน์, รองบรรณาธิการ, สารสัมพันธ์ผู้ป่วยฮีโมฟีเลีย. ฉบับที่ 1: มุขนิรโรคเลือดออกง่ายฮีโมฟีเลียแห่งประเทศไทย, 2558
3. Novembrino C, Boscolo Anzoletti M, Mancuso ME, Shinohara S, Peyvandi F. Evaluation of an automated chromogenic assay for Factor VIII clotting activity measurement in patients affected by haemophilia A. *Haemophilia*. 2019;25:521-526.
4. Adcock DM, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *Int J Lab Hematol*. 2018;40:621-629.
5. Rosén S. Assay of factor VIII:C with a chromogenic substrate. *Scand J Haematol Suppl*. 1984;40:139-45.
6. Cid AR, Calabuig M, Cortina V, et al. One-stage and chromogenic FVIII:C assay discrepancy in mild haemophilia A and the relationship with the mutation and bleeding phenotype. *Haemophilia*. 2008;14:1049-54
7. Akkaya E, Hatiboglu S, Koc B, Genc S, Unuvar A, Karaman S, Omer B, Karakas Z, Zulfikar B. Evaluation of Chromogenic Factor VIII Assay Compared with One-Stage Clotting Assay. *Clin Lab*. 2020 Oct 1;66(10).
8. Amiral J, Haubry K, Skrzypczak L, Cornuejols I, Dunois C. ISTH Melbourne: FVIII chromogenic assay and variant method for measuring emicizumab and FVIII inhibitor antibodies in human plasma.

[Internet] Hyphen BioMed, NEUVILLE SUR OISE, France; 2019. [cited 2019 July 6-10]. Available from: https://www.coachrom.com/fileadmin/news_import/Amiral_et_al._ISTH_2019_FVIII_chromogenic_assay_and_variant_method_for_measuring_emicizumab_and_.pdf

9. Nogami K, Soeda T, Matsumoto T, Kawabe Y, Kitazawa T, Shima M. Routine measurements of factor VIII activity and inhibitor titer in the presence of emicizumab utilizing anti-idiotypic monoclonal antibodies. *J Thromb Haemost*. 2018;16:1383-1390.

Comparative Study between One Stage Clot Based assay and Chromogenic Substrate Assay for Monitoring Factor VIII Activity in Hemophilia A Patients

Manussavee Prapphal, Aphinya Suroengrit, Darintr Sosothikul

*Department of Pediatrics Hematology and Oncology, Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University*

Abstract

Hemophilia A is caused by a genetic deficiency in clotting factor VIII (FVIII). FVIII activity can be measured by the one-stage clotting assay (OSA). OSA is still the most widely used, but some limitations are led to misdiagnosis. Therefore, the chromogenic substrate assay (CSA) which is used to measure a color intensity produced, is directly proportional to the amount of FXa, subsequently turned to the FVIII activity. This study aimed to compare the FVIII levels between OSA and CSA methods in patient's plasma, before and after FVIII therapy (N=18). 17 patients for plasma-derived factor VII (pdFVIII) therapy and 1 patient for Emicizumab therapy were recruited in this study. We reported the FVIII levels, both before and after pdFVIII therapy, from two methods significantly correlated (P-value < 0.0001). Briefly, both methods were a suitable for follow-up the FVIII level in pdFVIII plasma, but Emicizumab plasma showed the lower detection limit in both methods that were related to previous reports. In case of hemophilia A patient with inhibitor who treated with Emicizumab, Factor VIII inhibitors were determined by using a special chromogenic Bethesda assay (CBA) method. We suggest the Emicizumab therapy's patient should be used FVIII inhibitor by CBA for a follow-up method.

Keyword : Hemophilia A, Factor VIII, One Stage clot-based assay, Chromogenic Substrate Assay