

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administrationวารสารอาหารและยา
ปีที่ 32 ฉบับที่ 2 (2568): พฤษภาคม – สิงหาคม
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 32 No. 2 (2025): May – August

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไวรัสพาร์โวจากหมู ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์

อชิระ นามจันท์¹ วิภาวี วงชนะ¹ สกาลิน ไตรศิริวานิชย์¹¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรีที่อยู่ติดต่อ: อชิระ นามจันท์ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี 11000
achira.n@dmsc.mail.go.th

Method Validation for Determination of Porcine Parvovirus in Cell Lines used for Vaccine Production by Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR)

Achira Namjan¹ Wipawee Wongchana¹ Sakalin Trisiriwanich¹¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Thailand.

Contact address: Achira Namjan, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi, 11000, Thailand, achira.n@dmsc.mail.go.th

Received: 17 September 2024, Revised: 19 May 2025, Accepted: 20 May 2025

Abstract

Background: Cell lines are crucial for the production of vaccines and other biological products. Detecting adventitious viruses in these cell lines is a critical requirement set by the World Health Organization (WHO) to prevent misidentification and cross-species contamination.

Objectives: This study aimed to develop and validate a method for detecting Porcine parvovirus (PPV) contamination in cell cultures used for vaccine production using Real-time PCR and to implement this method as a standard procedure for quality control of cell cultures in vaccine production.

Methods: This experimental research studied from November 2021 to October 2022 that investigated the optimal conditions for a technique to analyze the quantity of virus from pigs in cell cultures used for vaccine production using Real-time PCR. It also examined

the method's accuracy in terms of parameters such as linearity and analytical range, specificity, precision, accuracy, minimum detectable amount, and sensitivity.

Results: The results showed that the designed primers and probes effectively amplified the target genes of PPV without cross-reacting with other viruses. The standard curve demonstrated linearity with a working range between 8 and 4 log₁₀ copies/μl and an R² value exceeding 0.9996. The coefficient of variation (CV) for intra-day, inter-day, and inter-analyst reproducibility was within the acceptable range of less than 25%. Accuracy analysis showed %CV of 0.510% and %recovery ranging from 101.39% to 100.66%. The limit of detection (LOD95%) was established at 1,857 copies/μl. The Real-time PCR assays exhibited high sensitivity, detecting PPV at a concentration of 7.5 TCID₅₀/ml or 4 log₁₀ copies/μl in PPV-infected ST cells.

Conclusions: The findings indicated that the developed method was effective and reliable for detecting Porcine parvovirus in cell lines used for vaccine production.

Keywords: method validation, porcine parvovirus, real-time PCR

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: เซลล์เพาะเลี้ยงมีบทบาทสำคัญในการผลิตวัคซีนหลากหลายชนิด แต่หากเกิดการปนเปื้อนไวรัสจากวัตถุดิบในการผลิตวัคซีนหรือสารชีววัตถุ อาจก่อโรคและเป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีความสำคัญต่อผู้รับวัคซีนหรือสารชีววัตถุนั้น การตรวจหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นหนึ่งในข้อกำหนดที่องค์การอนามัยโลกระบุไว้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และการข้ามสายพันธุ์ระหว่างชนิด ซึ่งทดสอบวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนมีหลายวิธี แต่วิธี Real-time PCR ยังไม่มีการทดสอบในสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ของไทย

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาและทดสอบวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนด้วยวิธี Real-time PCR และเพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

วิธีการวิจัย: เป็นการวิจัยเชิงทดลองระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2564 ถึงตุลาคม 2565 โดยศึกษาสภาพที่เหมาะสมของเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไวรัสจากหมูในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ความจำเพาะ ความเที่ยง ความแม่นยำ ปริมาณขั้นต่ำสุดของการตรวจพบได้และความไว

ผลการศึกษา: ผลการทดลองพบว่า primers และ probes ที่ออกแบบขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายของไวรัส PPV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสชนิดอื่น กราฟมาตรฐานของ PPV DNA มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง $8-4 \log_{10}$ copies/ μ l โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9996 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำ ทั้งการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน การวิเคราะห์ต่างวัน และการวิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($CV < 25\%$) การทดสอบความแม่นยำของวิธีมีค่า %CV เท่ากับ 0.510 และมีร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 101.391-100.663 เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจพบการปนเปื้อน พบว่าขีดจำกัดของการตรวจพบที่ให้ผลบวกสูงถึง 95% อยู่ที่ 1,857 copies/ μ l และความไวในการตรวจหาปริมาณไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง ST อยู่ที่ 7.5 TCID₅₀/ml หรือ $4 \log_{10}$ copies/ μ l

สรุป: วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมและสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไวรัสจากหมูในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: การทดสอบความถูกต้อง ไวรัสจากหมู เรียลไทม์ พีซีอาร์

บทนำ

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 เป็นต้นมา เซลล์เพาะเลี้ยงเป็นสารตั้งต้นที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตวัคซีนหรือชีววัตถุ โดยผู้ผลิตจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยงให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมและให้ปลอดภัยจากการปนเปื้อนเป็นไปตามมาตรฐานสากลและตามข้อกำหนดมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก ภายใต้หัวข้อ Cell substrates for the production of vaccines for human use หรือ Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks^{1,2} ซึ่งหากเกิดการปนเปื้อนไวรัสจากวัตถุดิบในการผลิตวัคซีนหรือสารชีววัตถุ อาจก่อโรคและเป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีความสำคัญต่อผู้รับวัคซีนหรือสารชีววัตถุนั้น

การทดสอบหาการปนเปื้อนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนหรือสารชีววัตถุ

ถือเป็นรายการทดสอบที่สำคัญ เนื่องจากกระบวนการผลิตวัคซีนมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนไวรัสจากหลายสาเหตุ เช่น เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในกระบวนการผลิต สภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ และการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย Bovine serum รวมถึงการใช้ porcine trypsin ในกระบวนการ trypsinization จากรายงานในปี 1960 พบว่ามีการปนเปื้อนของไวรัสในสกุล Parvovirus ในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์หลายสายพันธุ์ โดยจากการศึกษาพบว่า การติดเชื้อ PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยงอาจเกิดจากการใช้ porcine trypsin ที่ปนเปื้อนไวรัส Porcine Parvovirus (PPV)¹⁻² เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในหมู โดยเป็นไวรัสชนิด DNA สายเดี่ยว มีการค้นพบครั้งแรกในปี 1965 ที่ประเทศเยอรมนี โดยพบการปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยงสุกร (Porcine primary cell) ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส Classical Swine Fever (CSFV)⁵ จากนั้นมีรายงานการพบ PPV ในหลาย

ประเทศ เช่น บราซิล และเกาหลีใต้⁶ อาการทางคลินิกของหมูที่ติดเชื้อ PPV คือ การแท้งและการตายในครรภ์ รายงานก่อนหน้านี้ยังชี้ให้เห็นว่าเชื้อไวรัสจากหมูอาจปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในกระบวนการผลิตวัคซีนหรือชีววัตถุได้ องค์การอาหารและยาของสหรัฐฯ (FDA) และองค์การยาแห่งสหภาพยุโรป (EMA) ได้ออกคำแนะนำให้ทดสอบการปนเปื้อนของ PPV ในวัคซีนหรือชีววัตถุที่ใช้ porcine trypsin⁵⁻⁶

การทดสอบหาการปนเปื้อนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนหรือสารชีววัตถุ มีหลายวิธีเช่น การเพาะเชื้อไวรัส (viral culture) การใช้วิธีทางเซรุ่มวิทยา (serological assays) เช่น ELISA การทดสอบแบบ hemadsorption หรือ hemagglutination แต่วิธีการวิเคราะห์โดยเทคนิค Real-time PCR ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในฐานะเครื่องมือที่มีความไวและความจำเพาะสูงสำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง วิธีนี้ไม่เพียงช่วยให้สามารถตรวจพบไวรัสในปริมาณที่น้อยมาก แต่ยังช่วยลดความเสี่ยงของผลลบลวงและผลบวกลวงที่อาจเกิดขึ้นในกระบวนการตรวจสอบ การพัฒนาวิธี Real-time PCR สำหรับการตรวจสอบไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยงจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการรับรองคุณภาพและความปลอดภัยของวัคซีนที่ผลิต ดังนั้น สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูง การศึกษาได้ครอบคลุมการทดสอบด้านความจำเพาะ ความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำ การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ และการทดสอบในสภาวะแวดล้อมที่มีการรบกวน เพื่อรองรับการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำ และให้บริการแก่

หน่วยงานภายนอก เพื่อสร้างความมั่นใจในคุณภาพของวัคซีนหรือชีววัตถุ นอกจากนี้ยังเป็นการวางรากฐานให้วิธีนี้เป็นมาตรฐานของประเทศไทยในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาและทดสอบวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนด้วยเทคนิค Real-time PCR
2. เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองนี้ดำเนินการระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2564 ถึงตุลาคม 2565 โดยทำการทดสอบเพื่อศึกษาความถูกต้องของวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Vero cell เป็นตัวแทนเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีน โดยจัดเตรียมและเพิ่มปริมาณภายในสถาบันชีววัตถุ ซึ่งเซลล์เหล่านี้ได้มาจากสายเซลล์ไตของลิงแอฟริกันกรีนมังกี (African green monkey kidney cell line, ATCC CCL-81) รุ่นการผลิต 70006073

กลุ่มตัวอย่าง

เชื้อไวรัสมาตรฐาน ใช้เชื้อ Porcine parvovirus (PPV) ATCC VR-742 โดยจัดเตรียมภายในสถาบันชีววัตถุ รุ่นการผลิต 64161544 โดยเชื้อ PPV จะถูกนำมาเพิ่มจำนวนด้วย swine testes (ST) cell line ภายในขวดขนาด 75 ml-flash ที่ประกอบด้วย Minimum Essential Media (MEM) (Gibco, USA) ที่มี 10% fetal bovine serum (Gibco, USA) 1% HEPES (Gibco, USA) และ

1% Sodium pyruvates (Gibco, USA) จากนั้นทำการเก็บเชื้อไวรัสโดยการ freeze-thawed 3 ครั้ง จากนั้นเก็บเซลล์ lysate ที่อุณหภูมิ -80°C

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System

2. ฐานข้อมูล BLASTN วิเคราะห์ความจำเพาะของ primer/probe สำหรับการทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ด้วยการทดสอบแบบ in-silico

ขั้นตอนการศึกษา

1. การสกัด DNA ของ PPV ด้วยชุดสกัดโดยสกัด genomic DNA ของ PPV จากเซลล์ lysate ที่มีเชื้อไวรัสปริมาณ 200 µl โดยใช้ชุดสกัด PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad-CA-USA) ขั้นตอนตามคู่มือของบริษัท นำ genomic DNA ที่สกัดได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะใช้งาน

2. Primer และ Probe สำหรับการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR โดย Primer สำหรับตรวจสอบหาการปนเปื้อนเชื้อไวรัส PPV ด้วยวิธี Real-time PCR โดยออกแบบ primer และ probe มีความจำเพาะต่อยีนที่ครอบคลุมส่วน NS1 โดยอ้างอิง Non-structural protein NS1 gene, complete จากฐานข้อมูล GenBank accession number JN400524 ซึ่งเป็นตัวแทนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส PPV จากการศึกษาความจำเพาะของ primer/probe ที่ใช้ในการศึกษานี้แบบ in-silico โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI (National Center for Biotechnology Information) ด้วยเครื่องมือ BLASTN⁸ ซึ่ง primer/probe สังเคราะห์โดย Macrogen มีรายละเอียดได้แก่

- Forward-NS1-3'-CAACAGACATGG AATGGGAATCAGA-5'

- Reverse-NS1-3'-TTTAAACAAGAGAA TCAAAAATCAGTACTTGCC-5'

- Probe-FAM-3'-AAATCGACAGCC TCACAAAA-5'-BHQ1

3. ทำการเพิ่มสารพันธุกรรม PPV และ BPV โดยเตรียมสกัดสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) PPV และ BPV มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น $10 \log_{10}$ copies/µl ตามวิธีคำนวณดังนี้ การคำนวณเปลี่ยนความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากหน่วย ng เป็น copy numbers อ้างอิงจาก Whelan⁹

การทำ real-time PCR โดยเตรียมปฏิกิริยา real-time PCR ดังนี้ RNase free water 6.75 µl, TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) 10 µl, forward primer 0.5 µl (250 nM), reverse primer 0.5 µl (250 nM) และ probe 0.25 µl (125 nM) ปริมาตร 18 µl หลังจากนั้นเติม DNA 2 µl ได้แก่ตัวอย่าง ดีเอ็นเอของ PPV และ negative control ใส่ในหลอดปฏิกิริยาได้ ปริมาตรรวม 20 µl

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Real-time PCR โดยตั้งโปรแกรมที่ UNG activation อุณหภูมิ 50°C 2 นาที ตามด้วย Taq activation อุณหภูมิ 95°C 10 นาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 40 รอบ ประกอบด้วย denaturation step ที่อุณหภูมิ 95°C 15 วินาที annealing/extension step ที่อุณหภูมิ 60°C 1 นาที เมื่อครบ 40 รอบ hold ที่อุณหภูมิ 4°C วิเคราะห์ผลการทดสอบโดยใช้ Applied Biosystems® 7500 System SDS Software

4. สร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) เตรียมสารละลายดีเอ็นเอ PPV ที่ให้ความเข้มข้น $9 \log_{10}$ copies/µl จากนั้นเจือจางสารละลาย

ดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น ตั้งแต่ $8\log_{10}-4\log_{10}$ copies/ μ l นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR และสร้างกราฟมาตรฐาน โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง cycle threshold (Ct) และ \log_{10} copies/ μ l แล้วจึงนำค่า Ct ที่ได้จากการทดสอบในแต่ละความเข้มข้นมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณกลับเป็นปริมาณไวรัสในหน่วย \log_{10} copies/ μ l ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงโดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ซึ่งค่าที่ยอมรับได้จะต้องมีค่า $R^2 \geq 0.998$ เป็นค่าตามเกณฑ์การยอมรับ

5. ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) พารามิเตอร์ที่ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วย Real-time PCR อ้างอิงตาม guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods¹⁰ และ requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences qPCR and dPCR (ISO 20395:2019(en))¹¹

5.1 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (Range) เจือจางสารละลายดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น ตั้งแต่ $8\log_{10}-4\log_{10}$ copies/ μ l นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง cycle threshold (Ct) และความเข้มข้นของสารละลาย PPV โดยค่า R^2 ควรมีค่ามากกว่า 0.998

5.2 การทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (specificity) ทำการทดสอบความจำเพาะของวิธีกับไวรัส PPV โดยทดสอบเบื้องต้นกับไวรัส BPV ทำปฏิกิริยา Real-time PCR โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ และตรวจสอบความจำเพาะของวิธีโดยเปรียบเทียบ fluorescence signal ของปฏิกิริยา ระหว่างไวรัส PPV และ BPV

5.3 การทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ใน 3 หัวข้อคือ

5.3.1 Repeatability (intra-assay precision) วิเคราะห์ความซ้ำซ้ำได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยเตรียมสารละลายดีเอ็นเอ PPV ความเข้มข้น $7\log_{10}$, $6\log_{10}$ และ $5\log_{10}$ copies/ μ l ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว โดยค่า $\%CV \leq 25$ เป็นค่าตามเกณฑ์การยอมรับ

5.3.2 Reproducibility (inter-assay precision) วิเคราะห์ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดยเตรียมสารละลายดีเอ็นเอ PPV ความเข้มข้น $7\log_{10}$, $6\log_{10}$ และ $5\log_{10}$ copies/ μ l โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ในวันและเวลาที่แตกต่างกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว โดยค่า $\%CV \leq 35$ เป็นค่าตามเกณฑ์การยอมรับ

5.3.3 Intermediated precision ทำการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ PPV เช่นเดียวกับ การทดสอบ Repeatability โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ทำการทดสอบต่างวัน ด้วยเครื่องมือเดิม ทำคนละ 6 ซ้ำ รวม 12 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า $\%CV$ โดยใช้เกณฑ์พิจารณาเดียวกันกับการทดสอบ Repeatability

5.4 การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) การเตรียมสารละลายดีเอ็นเอ PPV ที่ความเข้มข้น $8\log_{10}$ และ $6\log_{10}$ copies/ μ l ทำการหดยดสารละลายดีเอ็นเอ PPV ในแต่ละความเข้มข้น 1 μ l ลงในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยใช้ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ไม่ได้ทำการหดยดเป็น negative control และใช้สารละลายดีเอ็นเอ PPV เป็น positive control ทำการทดสอบด้วยวิธี Real-time PCR จำนวน 3 ซ้ำ คำนวณหาค่า copies/ μ l โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์คำนวณได้จากค่าร้อยละ

การกลับคืน (%Recovery) โดยค่าที่ยอมรับได้ อยู่ในช่วง 80-120%

6. หาปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัส PPV ที่ตรวจพบได้ (Lower Limit of Detection: LOD) เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR แล้วหาปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัส PPV ที่ตรวจพบได้ โดยเจือจางดีเอ็นเอ PPV มาตรฐานจากปริมาณเชื้อตั้งต้น $5 \log_{10}$ copies/ μ l ซึ่งอยู่บริเวณช่วงที่ความเข้มข้นของสารพันธุกรรมลดลงจนไม่สามารถตรวจจับได้หรืออยู่ในระดับต่ำที่ไม่สามารถวัดผลได้อย่างมีนัยสำคัญ (abatement zone) ทำการเจือจางแบบ 2-fold dilution ด้วย RNase-free water มีปริมาณไวรัสลดลงตามลำดับดังนี้ 5×10^4 , 2.5×10^4 , 1.25×10^4 , 6.25×10^3 , 3.125×10^3 , 1.56×10^3 และ 7.8×10^2 copies/ μ l จากนั้นนำไปทดสอบด้วย Real-time PCR โดยทดสอบที่ความเข้มข้นละ 8 ซ้ำ ซึ่งค่าปริมาณขั้นต่ำสุดของการตรวจพบต้องมีค่า %Positive rate $\geq 95\%$ (LOD_{95%PCR})

7. ตรวจหาปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero โดยวิธี plaque titration assay เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero ที่ความเข้มข้น 1×10^4 cell/ml ใส่ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ปริมาตร หลุมละ 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางไวรัส PPV แบบ 10-fold dilution ลงในหลุมที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero หลุมละ 50 μ l ทำซ้ำความเจือจางละ 8 หลุม จำนวน 12 dilution บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 11 วัน

เมื่อครบกำหนดทำการล้างเซลล์ด้วย Hank's buffer จำนวน 2 ครั้ง ทำการยัดเซลล์ด้วย 4% formaldehyde หลุมละ 100 μ l นาน 30 นาที ดูดสารละลายทิ้งล้างด้วยน้ำประปา จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย 0.5% Crystal violet ใน ethanol และ formaldehyde ปริมาตรหลุมละ 50 μ l

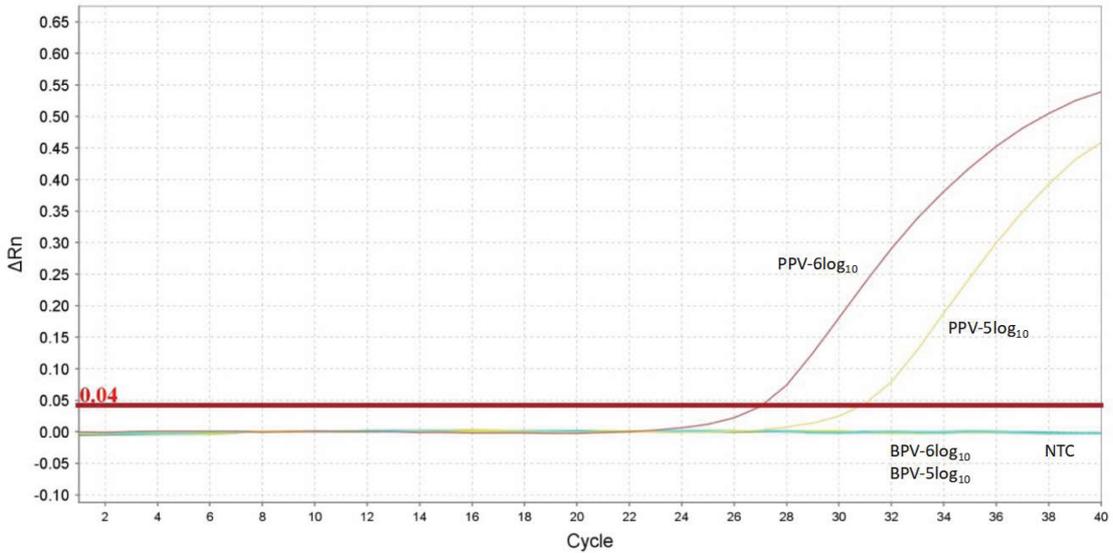
ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วดูดสีย้อมทิ้ง ล้างด้วยน้ำประปา หาไตเตอร์ของไวรัสคำนวณตามวิธีของ Reed และ Muench ความเข้มข้นของไวรัสแสดงเป็น TCID₅₀/ml

8. ทดสอบหาความไว (sensitivity) ในการตรวจหาปริมาณไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero โดย Real-time PCR เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero ที่ความเข้มข้น 1×10^4 cell/ml ใส่ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ปริมาตร หลุมละ 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางไวรัส PPV ให้ได้ค่าความเข้มข้นของไวรัสเท่ากับ $10^{6.5}$, 10^7 , $10^{7.5}$ และ 10^8 ml จากนั้นหยอดลงในหลุมที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero หลุมละ 50 μ l ทำซ้ำความเจือจางละ 4 หลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 72 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพทุกวัน เมื่อครบกำหนด 72 ชั่วโมง เก็บ cell culture supernatant เพื่อหาปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความจำเพาะของ Primer/probe

ผลการศึกษาพบว่า primer/probe ที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะต่อไวรัส PPV มากกว่าร้อยละ 99 (Identities 100%) โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามต่อไวรัสสายพันธุ์อื่น (cross-reactivity) เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของ primer/probe ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่าปรากฏสัญญาณ Fluorescence เฉพาะในดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก PPV เท่านั้น สำหรับตัวอย่าง Bovine parvovirus ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence จึงสรุปเบื้องต้นว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีความจำเพาะต่อไวรัส PPV โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามต่อ parvovirus สายพันธุ์อื่น ดังแสดงในรูปที่ 1

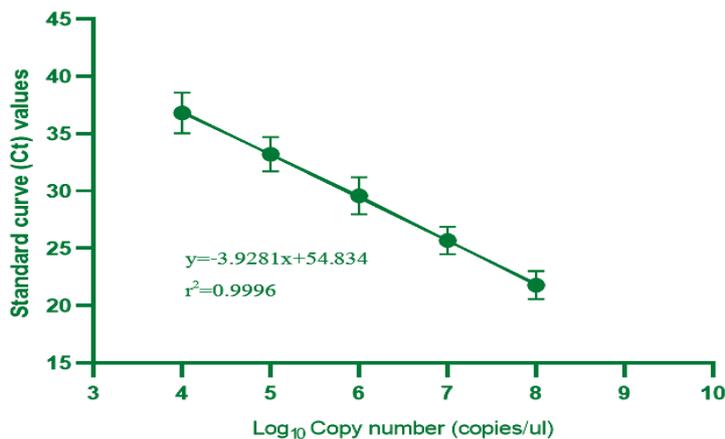


รูปที่ 1 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อการทดสอบหาการปนเปื้อนไวรัส PPV ด้วยการทดสอบ Real-time PCR

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

กราฟมาตรฐานได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Cycle threshold (Ct) กับปริมาณของยีน NS1 ในตัวอย่าง PPV ssDNA ที่ระดับความเข้มข้น 8–4 log₁₀ copies/ul ต่อปฏิกิริยา ซึ่งแสดง amplification curve ของการตรวจหายีน NS1 ด้วยวิธี Real-time PCR โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสัญญาณเรืองแสง

ของ reporter ที่วัดได้ (Delta Rn; ΔRn) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา ทดสอบกราฟมาตรฐานของ PPV ที่ช่วงความเข้มข้นของไวรัส PPV ที่ 4log₁₀–8log₁₀ copies/ μ l มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงดังสมการ $y = -3.9281x + 54.834$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ $r^2 = 0.9996$ โดยที่ x คือ ความเข้มข้นของไวรัส PPV (log₁₀ copies/ μ l) และ y คือ ct value ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธี Real-time PCR

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

จากการวิเคราะห์การทำซ้ำในวันเดียวกัน สำหรับการหาปริมาณไวรัส PPV โดยใช้ตัวอย่าง ดีเอ็นเอมาตรฐานของไวรัส PPV ที่ความเข้มข้น $5\log_{10}$, $6\log_{10}$ และ $7\log_{10}$ copies/ μ l จำนวน 4 ซ้ำ พบค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of Variation, %CV) เท่ากับ 0.708,

0.243 และ 0.684 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน เป็นเวลา 3 วัน วันละ 4 ซ้ำ พบว่ามีค่า %CV เท่ากับ 6.825, 7.513 และ 7.624 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า %CV น้อยกว่า 25% และ 35% สำหรับการทดสอบการทำซ้ำในวันเดียวกันและ การทำซ้ำในระหว่างวัน เป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลทดสอบความเที่ยงโดยการทดสอบซ้ำในวันเดียวกันและทำซ้ำในระหว่างวัน

Theoretical level (\log_{10} copies/ μ l)	Intra-assay (n=4)		
	Observed (copies/ μ l)	Mean \pm SD	CV (%)
ทดสอบซ้ำในวันเดียวกัน			
5	5.162	32.578 \pm 0.231	0.708
6	6.063	29.195 \pm 0.071	0.243
7	6.885	26.110 \pm 0.178	0.684
ทดสอบซ้ำระหว่างวัน			
5	4.508	35.032 \pm 1.320	6.825
6	5.580	31.009 \pm 1.316	7.513
7	6.525	27.461 \pm 1.016	7.624

จากการวิเคราะห์ซ้ำต่างนักวิเคราะห์ ในการทดสอบหาปริมาณไวรัส PPV โดยผู้ตรวจวิเคราะห์ 2 คน คนละ 3 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น $5\log_{10}$, $6\log_{10}$ และ $7\log_{10}$ copies/ μ l ในวันและเวลาเดียวกัน พบว่ามีผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน

โดยมีค่า พบว่ามีค่า %CV เท่ากับ 5.433, 1.988 และ 1.189 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งมีค่า %CV น้อยกว่า 25% เป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 3

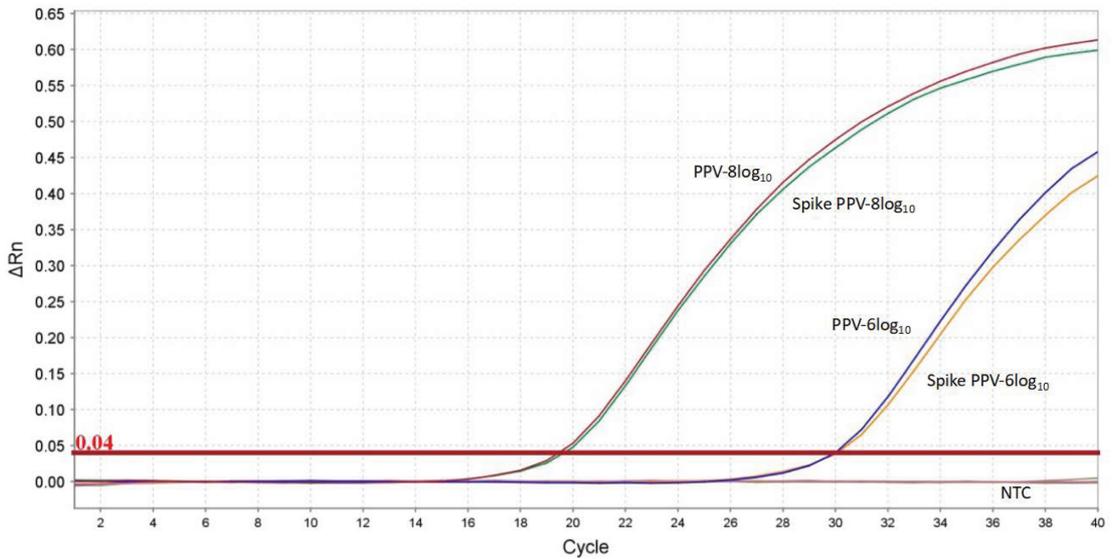
ตารางที่ 3 ผลทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ซ้ำโดยต่างนักวิเคราะห์ (Precision)

Theoretical level (copies/ μ l)	Observed (copies/ μ l) (n=4)		Mean \pm SD	CV (%)
	Analyst 1 st	Analyst 2 nd		
5	5.052	4.678	4.865 \pm 0.264	5.433
6	6.038	5.871	5.995 \pm 0.118	1.988
7	6.992	6.875	6.933 \pm 0.105	1.189

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

พบว่า Amplification curve ระหว่าง ตัวอย่างที่เติมไวรัส PPV และไวรัส PPV มาตรฐาน มีค่า ct value ที่ใกล้เคียงกันในทั้งสองความเข้มข้นที่ 8 และ $6\log_{10}$ copies/ μ l (รูปที่ 3) โดยมีค่า %

recovery อยู่ในช่วง 101.391-100.663 ซึ่งอยู่ในช่วง 80-120% และค่าเฉลี่ย %CV เท่ากับ 0.510 อยู่ในช่วง ดังแสดงตารางที่ 4 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องและแม่นยำ



รูปที่ 3 Amplification curve ของตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่มีการ spike ไวรัส PPV เปรียบเทียบกับไวรัส PPV มาตรฐาน

ตารางที่ 4 ร้อยละของการกลับคืน (% recovery) ของการวิเคราะห์

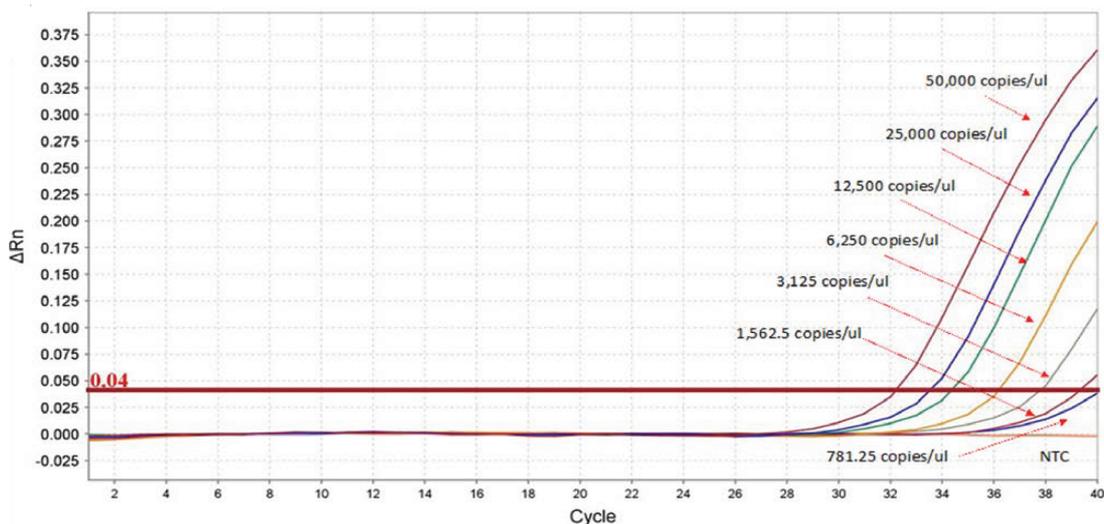
Theoretical level (copies/ μ l)	Observed (copies/ μ l)			%Recovery
	Viral DNA control	Spiked sample	Un-spiked	
6	6.240	6.327	0.000	101.391
8	8.917	8.976	0.000	100.663
			Mean	101.027
			SD	0.515
			%CV	0.510

ผลการศึกษาขีดต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบ (Limit of Detection: LOD) ปริมาณไวรัส PPV

จาก Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods ได้กำหนดค่าขีดจำกัดของการตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR คือการทดสอบต้องให้ค่าผลบวกมาก 95% (95%LOD)⁹

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัส PPV ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าสามารถตรวจสอบระดับต่ำสุดที่ให้ผลบวก 100% มีปริมาณไวรัส

ประมาณ 12,500 copies/ μ l โดยให้ผลการทดสอบตรงกันทั้ง 3 ซ้ำ ขณะที่การเจือจางลงให้ได้ปริมาณไวรัสประมาณ 6,250 และ 3,125 copies/ μ l ให้ผลบวกที่ 87.5% และ 25% ตามลำดับ เมื่อคำนวณทางสถิติและสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Positive results กับปริมาณไวรัส (\log_{10} copies/ μ l) พบว่าปริมาณขั้นต่ำของไวรัส PPV ที่ให้ค่าผลบวกมาก 95% เท่ากับ 1,857 copies/ μ l หรือเทียบเท่ากับ $3.2\log_{10}$ copies/ μ l ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 การศึกษาขีดต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ DNA ของไวรัส PPV ในระดับความเข้มข้น 8 ระดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ที่ 40 cycle

ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero โดยวิธี plaque titration assay

การตรวจหา titers ของไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero โดยการใช้การทดสอบ plaque titration assay พบว่าหลังจากทำการเพิ่มปริมาณไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero เป็นเวลา 11 วัน ไวรัส PPV มีค่าความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ $6.5 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ในเซลล์เพาะเลี้ยง ST โดยในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ไม่พบการติดเชื้อไวรัส PPV ในทุกความเข้มข้น

ผลการทดสอบหาความไว (Sensitivity) ในการตรวจหาปริมาณไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero โดย Real-time PCR

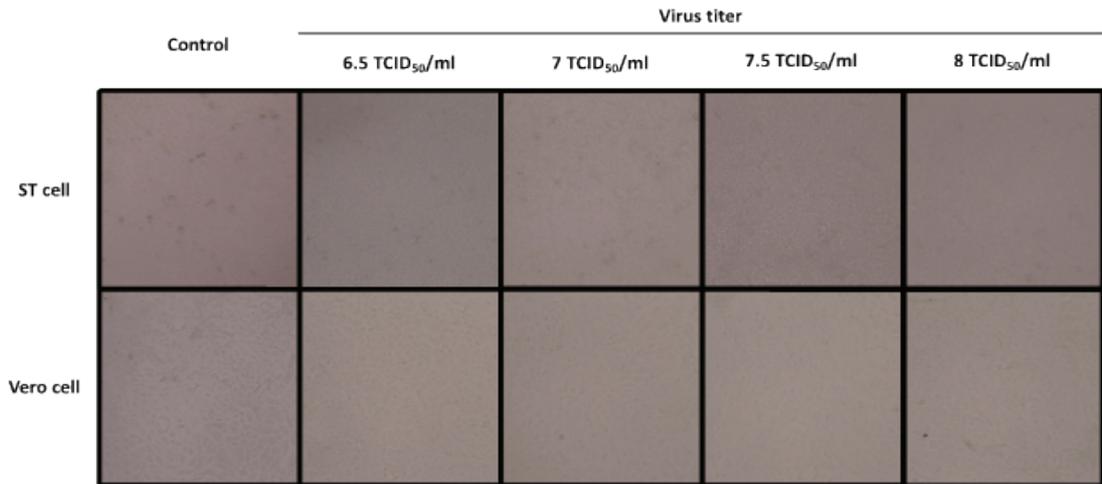
การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาปริมาณไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการติดเชื้อไวรัส PPV ที่ความเข้มข้นต่างกัน มาหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Real-time PCR

จากการเพาะเชื้อไวรัส PPV ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero ที่ปริมาณเชื้อไวรัสความเข้มข้นเริ่มต้น 6.5, 7, 7.5 และ 8 $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$

หรือปริมาณ 5.2, 4.6, 4.6 และ 4.3 $\log_{10} \text{copies}/\mu\text{l}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าไม่มีการเกิดความผิดปกติต่อโครงสร้างของเซลล์หลังติดเชื้อไวรัส (cytopathic effect) ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด (รูปที่ 5)

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมาหาปริมาณไวรัส PPV ด้วยวิธี Real-time PCR ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้น 6.5, 7 และ 7.5 $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ การทดสอบให้ผลบวกทั้งหมดในเซลล์เพาะเลี้ยง ST โดยปริมาณ copies number ของไวรัส PPV มีความสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นของไวรัส PPV ที่ทำการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยง Vero ให้ผลบวกที่ความเข้มข้น 6.5 $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ เมื่อทำการหาปริมาณไวรัส PPV ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าปริมาณ copies number ของไวรัส PPV มีค่าประมาณ 4.3 $\log_{10} \text{copies}/\mu\text{l}$ ซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้นเริ่มต้น 5.2 $\log_{10} \text{copies}/\mu\text{l}$ ดังแสดงในตารางที่ 5

ผลการทดลองบ่งชี้ว่าวิธี Real-time PCR มีความไวในการตรวจหาปริมาณไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง ST โดยต่ำสุด 7.5 $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ โดยไม่พบการเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero



รูปที่ 5 ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง ST เทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง Vero หลังได้รับเชื้อไวรัส PPV ค่าความเข้มข้นต่างกัน ที่เวลา 72 ชั่วโมง (100x)

ตารางที่ 5 การทดสอบหาความไว (Sensitivity) ในการตรวจหาปริมาณไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero โดย Real-time PCR

Pre-infection Virus titer		Infection time 72 h			
		ST cells		Vero cells	
TCID ₅₀ /ml	Copy number*	Ct value	Copy number*	Ct value	Copy number*
6.5	5.2	31.74	5.9	38.1	4.3
7	4.6	32.37	5.7	N/A**	-
7.5	4.6	39.02	4.0	N/A**	-
8	4.3	N/A**	-	N/A**	-

*log₁₀ copies/ul

** N/A; Not available

อภิปรายผล

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR สำหรับการตรวจหาไวรัสจากหมู (PPV) ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนหรือชีววัตถุ ซึ่งเป็นวิธีที่ความจำเพาะและความไวสูง มีความสามารถในการทำซ้ำได้ มีความไวในการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Soares และคณะ ได้ทำการศึกษาทางระบาดวิทยาของการติดเชื้อ PPV ในสุกรด้วยวิธี hemagglutination

assay และได้ทำการเปรียบเทียบกับวิธี nested-PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ NS1 ผลการศึกษาพบว่า PCR สามารถตรวจพบการปนเปื้อน PPV ในตัวอย่างได้สูงกว่าการทดสอบด้วยเทคนิค hemagglutination¹² ปัจจุบันได้นำเทคนิค Real-time PCR มาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ PPV ในหมู โดยใช้เทคโนโลยี TaqMan probe และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง NS1 ของ PPV ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบ

ความจำเพาะของ primer และ probe ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA สุกรโดยใช้ primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อ Genomic DNA สุกรในส่วน Non-structural protein 1 (NS1) โดยให้ผลบวกเฉพาะ DNA ที่สกัดได้จากไวรัส PPV และไม่เกิด cross-contamination กับ Bovine parvovirus ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ ซึ่งทำการตรวจหาเชื้อ PPV ในสุกร โดยใช้เทคโนโลยี TaqMan probe PCR ซึ่งมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง VP2 ของ PPV โดยมีค่า limit of detection เท่ากับ 2.08 genome copy equivalent (gce) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดที่เป็นผลบวกสามารถตรวจพบด้วยวิธี real-time PCR เมื่อเทียบกับวิธี conventional PCR ซึ่งให้ผล false negative แสดงให้เห็นว่า real-time PCR สามารถเพิ่มขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของ PPV ได้¹³

การทดสอบ *in-silico* พบว่า primer/probe ที่ออกแบบมี Tm ที่เหมาะสม (55–60°C) และมี GC content 50% ซึ่งช่วยให้การจับกับลำดับเป้าหมายมีเสถียรภาพ นอกจากนี้ ไม่พบการจับที่ไม่จำเพาะในฐานข้อมูล BLAST และไม่มี การเกิด hairpin หรือ dimer ในโครงสร้างทุติยภูมิ ซึ่งผลทดสอบสอดคล้องกับการทดสอบแบบ *in-vitro* การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้นของไวรัส PPV ได้ 8 – 4log₁₀ copies/μl โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R²) เท่ากับ 0.9996 จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับได้ โดยค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (CV) ที่ได้ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR มีค่า %CV อยู่ระหว่าง 10-35%¹⁴⁻¹⁶ หรือมีค่าน้อยกว่า ≤ 25% สำหรับการทดสอบ repeatability และ ≤ 35% สำหรับการทดสอบ reproducibility¹⁷

เมื่อทำการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบได้ค่า %CV เท่ากับ 0.510 โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 101.391 - 100.663

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัส PPV ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่า ขีดจำกัดของการตรวจพบที่ให้ค่าผลบวกมาก 95% เท่ากับ 1,857 copies/μl ซึ่งขีดจำกัดของการทดสอบมีค่าสูงกว่าผลการศึกษาของ Wilhelm และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 ระบุว่า SYBR® Green real-time PCR มีความแม่นยำในการตรวจหาการติดเชื้อ PPV ในเนื้อเยื่อสุกร โดยทำการศึกษาดำเน่งยีน VP2 ซึ่งระดับการปนเปื้อนดีเอ็นเอความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้คือ 6×10⁰ - 6×10¹ DNA copies/ul¹³ แต่เนื่องจาก SYBR Green สามารถเข้าจับกับตำแหน่ง minor groove ของ double stranded DNA ซึ่งไม่ได้จำเพาะต่อตำแหน่งที่ต้องการศึกษาโดยตรง ซึ่งอาจเกิด false positive หรือประสิทธิภาพการทดสอบลดลง แตกต่างจากเทคนิค TaqMan probe¹⁸⁻¹⁹

การศึกษาเปรียบเทียบความไวในการตรวจพบเชื้อไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี plaque titration assay และวิธี Real-time PCR เนื่องจากเซลล์เพาะเลี้ยง ST ใช้เป็นแบบจำลองสำหรับการศึกษาไวรัส PPV ซึ่งมีความไวต่อการติดเชื้อในระดับสูง โดยไวรัส PPV สามารถจับและเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการแบ่งตัวได้ นอกจากนี้ จำเป็นต้องทำการศึกษาการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero cell เนื่องจากเป็นเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนและชีววัตถุหลายชนิดซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนของไวรัส PPV ได้ จากการศึกษาการติดเชื้อไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง ST และ Vero เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นดูลักษณะสัญญาณวิทยาของเซลล์ที่เปลี่ยนไป จากการศึกษาพบว่า เซลล์เพาะเลี้ยง ทั้ง 2 ชนิด ไม่เกิด cytopathic effect จากนั้น นำน้ำเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมาหาปริมาณไวรัส PPV

ด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่า ความไวในการตรวจหาปริมาณไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง ST มีค่าเท่ากับ 7.5 TCID₅₀/ml โดยหลังจากการติดเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยปริมาณ copies number ของไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero มีปริมาณน้อยกว่าความเข้มข้นเริ่มต้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่ระบุว่าไวรัส PPV จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ PK15 (swine kidney), Vero (African green monkey kidney) และ Marc 145 (fetal rhesus monkey kidney) cells ได้^{20,21}

การผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า Real-time PCR สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัส PPV ได้ในระดับต่ำ โดยสามารถตรวจหาการปนเปื้อนในตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงและให้ผลการทดสอบเป็นบวก ซึ่งมีความรวดเร็วกว่าการทดสอบด้วยเทคนิค Plaque assay และสามารถตรวจสอบได้ก่อนการเปลี่ยนแปลงลักษณะพยาธิสภาพของเซลล์

สรุปผล

จากการพัฒนาเทคนิค real-time PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็นเทคนิคที่มีศักยภาพและผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยมีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความไวสามารถให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบดีเอ็นเอเป้าหมายได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำและมีความจำเพาะต่อไวรัสที่ต้องการทดสอบ ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์วัคซีนหรือชีววัตถุของประเทศในอนาคต เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาความไวและความจำเพาะของเทคนิค Real-time PCR กับสายพันธุ์ของไวรัส

ที่หลากหลาย เนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความจำเพาะของ primer/probe เฉพาะกับสายพันธุ์มาตรฐานของ PPV และ Bovine parvovirus (BPV) เท่านั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยครอบคลุม adventitious ในสายพันธุ์ที่หลากหลาย เพื่อตรวจสอบความครอบคลุมและประสิทธิภาพของ primer/probe ที่ออกแบบในสถานการณ์จริง

2. มีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค Real-time PCR กับวิธีการวิเคราะห์อื่นอย่างเป็นระบบ แม้ว่าผลการศึกษานี้จะแสดงให้เห็นว่าเทคนิค Real-time PCR มีความไวและความแม่นยำสูง แต่ยังไม่มีการเปรียบเทียบเชิงสถิติกับวิธีอื่น เช่น ddPCR หรือ Next-generation sequencing ซึ่งการศึกษาที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแต่ละเทคนิคอย่างเป็นระบบจะช่วยยืนยันความเหมาะสมของวิธีในการใช้งานในห้องปฏิบัติการจริง

3. ควรขยายการทดสอบไปยังเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตวัคซีน จากผลการศึกษา พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยง ST มีความไวต่อการติดเชื้อ PPV ขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยง Vero ไม่พบการเพิ่มจำนวนของไวรัส อย่างไรก็ตามในกระบวนการผลิตวัคซีนยังมีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่น เช่น CHO, MRC5 และ BHK-21 ดังนั้นควรมีการประเมินความสามารถของเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อ PPV ในเซลล์เพาะเลี้ยงอื่น ๆ เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้วิธีการนี้ได้อย่างครอบคลุมในทุกบริบทของอุตสาหกรรม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้การสนับสนุนงบการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Fikrig MK, Tattersall P. Latent parvoviral infection of continuous cell lines. *Dev Biol Stand.* 1992; 76:285–93. PMID: 1335934.
2. Croghan DL, Matchett A, Koski TA. Isolation of porcine parvovirus from commercial trypsin. *Appl Microbiol.* 1973 Sep;26(3): 431–3. PMID: 4584585.
3. Streck AF, Canal CW, Truyen U. Molecular epidemiology and evolution of porcine parvoviruses. *Infection, Genetics and Evol.* 2015 Dec;36:300–6. doi:10.1016/j.meegid.2015.08.002.
4. Soares RM, Cortez A, Heinemann MB, Sakamoto SM, Martins VG, Bacci M, et al. Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. *J Gen Virol.* 2003 Jun;84(6):1505–15. doi: 10.1099/vir.0.19011-0.
5. Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry-characterization and qualification of cell substrates and other biological materials used in the production of viral vaccines for infectious disease indications [Internet]. Geneva: U.S FDA; 2022 Apr [cited 2022 Apr 22];50. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/characterization-and-qualification-cell-substrates-and-other-biological-materials-used-production>
6. European Medicines Agency. Guideline on the use of porcine trypsin used in the manufacture of human biological medicinal products: 8 [Internet]. 2014 Mar [cited 2022 Apr 1]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/use-porcine-trypsin-used-manufacture-human-biological-medicinal-products-scientific-guideline>
7. ดวงดาว วิชาดากุล. ชีวสารสนเทศ 1 แนวทาง อัลกอริทึม [อินเทอร์เน็ต]. ภาควิชาวิศวกรรมคอมพิวเตอร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2561 [เข้าถึงเมื่อ 24 ก.ค. 2566]. เข้าถึงได้จาก: <http://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/60368>
8. Whelan JA, Russell NB, Whelan MA. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunological Methods.* 2003 Jul;278(1–2):261–9. doi: 10.1016/S0022-1759(03)00223-0.
9. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends Food Sci Technol.* 2014 Jun; 37(2):115–26. doi:10.1016/j.tifs.2014.03.008.
10. International Organization for Standardization. ISO 20395:2019. Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR. Geneva: ISO; 2019. Available from: <https://www.iso.org/standard/68554.html>.
11. Soares RM, Durigon EL, Bersano JG, Richtzenhain LJ. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *J Virol Methods.* 1999 Mar;78(1–2): 191–8. doi:10.1016/S0166-0934(99)00010-4. PMID: 10204709.

12. Chen HY, Li XK, Cui BA, Wei ZY, Li XS, Wang YB, et al. A TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus. *J Virol Methods*. 2009 Mar;156(1-2):84-8. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.12.014.
13. Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögreen B, Linz L, Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif*. 2017 Jun;12:1-6. doi: 10.1016/j.bdq.2017.04.001.
14. Haugland RA, Siefiring S, Varma M, Oshima KH, Sivaganesan M, Cao Y, et al. Multi-laboratory survey of qPCR enterococci analysis method performance in U.S. coastal and inland surface waters. *J Microbiol Methods*. 2016 Apr;123:114-25. doi:10.1016/j.mimet.2016.02.015.
15. Klymus KE, Merkes CM, Allison MJ, Goldberg CS, Helbing CC, Hunter ME, et al. Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environ DNA*. 2020 Jul;2(3):271-82. doi:10.1002/edn3.29.
16. European Commission. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing: European Network of GMO Laboratories (ENGL) [Internet]. LU: EU; 2008 [cited 2023 Feb 19]. Available from: <https://data.europa.eu/doi/10.2788/65827>
17. Wilhelm J. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Research*. *Nucleic Acids Res*. 2003 May;31(10):e56. doi: 10.1093/nar/gng056.
18. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *BioTechniques*. 1997 Jan;22(1):130-8. doi: 10.2144/97221bi01.
19. Ni J, Qiao C, Han X, Han T, Kang W, Zi Z, et al. Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in China. *Virol J*. 2014 Dec;11(1):203. doi: 10.1186/s12985-014-0203-2.
20. Mészáros I, Olasz F, Cságola A, Tijssen P, Zádori Z. Biology of Porcine Parvovirus (Ungulate parvovirus 1). *Viruses*. 2017 Dec;9(12):393. doi:10.3390/v9120393.