

การพัฒนาเทคนิค Reverse Transcription-Quantitative Real-time PCR สำหรับ ตรวจหาการปนเปื้อนของไวรัสรีโทรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีน โดยใช้ Bacteriophage MS2 เป็นตัวแทนการศึกษา

อชิระ นามจันทร์^{1*} พุริตา โชคเหรียญสุขชัย¹ วิภาวี วงศ์ชนะ¹ สกาลิน ไตรศิริวานิชย์¹ และ สุภาพร ภูมิอมร²

¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

บทคัดย่อ

ความปลอดภัยของวัคซีนเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมโรคติดเชื้อ โดยเฉพาะวัคซีนที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งอาจมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของไวรัส ที่สำคัญคือรีโทรไวรัส ซึ่งเป็นไวรัส RNA ที่สามารถแทรกตัวในจีโนมของเซลล์โฮสต์ผ่านเอนไซม์ reverse transcriptase การปนเปื้อนดังกล่าวอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้รับวัคซีน หน่วยงานกำกับดูแลจึงกำหนดให้มีการตรวจสอบรีโทรไวรัส การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธี reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการตรวจหาเชื้อรีโทรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในกระบวนการผลิตวัคซีน โดยประเมินประสิทธิภาพผ่านการใช้ไวรัส MS2 bacteriophage เป็นต้นแบบของการศึกษา การตรวจสอบครอบคลุมถึงการประเมินความจำเพาะของไพรเมอร์ ความเป็นเส้นตรงของปฏิกิริยา ความเที่ยงของการทดสอบทั้งแบบภายในวันและระหว่างวัน รวมถึงระหว่างผู้ปฏิบัติงาน ชัดจำกัดของการตรวจพบ และความแม่นยำ จากการวิเคราะห์ความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยวิธี *in silico* Primer BLAST พบว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อ MS2 bacteriophage เท่านั้น และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสชนิดอื่น ปฏิกิริยา RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นให้ผลลัพธ์ที่แม่นยำและสม่ำเสมอ สามารถตรวจพบเอนไซม์ในระดับความเข้มข้นต่ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยค่าความไวของการตรวจพบอยู่ในระดับ 500 ไมโครยูนิต/ไมโครลิตร และค่าการคืนกลับของการตรวจวัดอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ดังนั้นผลการพัฒนาวิธี RT-qPCR แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับงานประจำวันเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อรีโทรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

คำสำคัญ: รีโทรไวรัส RT-qPCR การตรวจสอบความถูกต้อง เซลล์เพาะเลี้ยง การผลิตวัคซีน

*ผู้นิพนธ์หลัก: achira.n@dmsc.mail.go.th

วันที่ส่ง: 23 เมษายน 2568

วันที่แก้ไข: 8 สิงหาคม 2568

วันที่ตอบรับ: 16 ตุลาคม 2568



Development of a Reverse Transcription-Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR) Assay for Detecting Retrovirus Contamination in Vaccine-Production Cell Cultures Using Bacteriophage MS2 as a Surrogate

Achira Namjan^{1*}, Puthita Chokreansukchai¹, Wipawee Wongchana¹, Sakalin Trisiriwanich¹
and Supaporn Phumiamorn²

¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi Province, Thailand

²Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi Province, Thailand

Abstract

The safety of vaccines is a critical issue in the management of infectious diseases. The significance of this is especially pronounced for vaccines generated in cell culture systems, which are vulnerable to unintended viral contamination. A major issue is the risk of contamination by retroviruses, which are RNA viruses that employ the enzyme reverse transcriptase to incorporate their genetic materials into the host cell genome. This contamination presents a potential health risk to vaccine recipients; therefore, rigorous retrovirus testing is required by regulatory agencies. This research aimed to validate a newly developed reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) assay for detecting retroviral contaminations in cell substrates utilized in vaccine manufacturing. The performance of the assay was assessed utilizing MS2 bacteriophage as a model system. The validation involved assessing key performance characteristics, including primer specificity, linearity, precision (intra-day, inter-day, and inter-operator), limit of detection (LOD), and accuracy. The *in silico* analysis conducted using Primer-BLAST demonstrated that the designed primers exhibited high specificity for MS2 bacteriophage, showing no predicted cross-reactivity with other viruses. The developed RT-qPCR assay exhibited high precision and consistency, effectively detecting low levels of enzyme activity. The detection limit was set at 500 µU/µL, and the accuracy, assessed through recovery study, satisfied the predetermined acceptance criteria. The results of this validation study indicate that the developed RT-qPCR assay is a robust, sensitive, and reliable method. This method is therefore appropriate for regular application for detecting retroviral contaminations in vaccine manufacturing.

Keywords: Retrovirus, RT-qPCR, Validation, Cell Culture, Vaccine Production

*Corresponding author: achira.n@dmsc.mail.go.th

Received date: April 23, 2025

Revised date: August 8, 2025

Accepted date: October 16, 2025

1. บทนำ

วัคซีนมีความสำคัญทางสาธารณสุขในด้านการสร้างภูมิคุ้มกันโรคแก่ผู้รับวัคซีน การควบคุมมิให้มีการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการผลิตวัคซีนถือเป็นหลักปฏิบัติสำคัญในการสร้างความปลอดภัยแก่ผู้รับ การผลิตวัคซีนหลายชนิดจำเป็นต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเป็นระบบโฮสต์ ซึ่งอาจมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งรีโทรไวรัส ซึ่งเป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอที่มีเอนไซม์ reverse transcriptase ทำให้สามารถแทรกตัวเข้าไปในจีโนมของเซลล์โฮสต์ได้ การปนเปื้อนของรีโทรไวรัสในกระบวนการผลิตวัคซีนอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้รับวัคซีนได้ ดังนั้น การตรวจหาเชื้อรีโทรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์⁽¹⁾ หน่วยงานกำกับดูแลด้านสุขภาพระหว่างประเทศ เช่น European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 5.2.3 และ 2.6.16 รวมถึงข้อกำหนดใน U.S. Food and Drug Administration (FDA) ในหัวข้อ ICH Q5A(R2) กำหนดให้มีการทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อรีโทรไวรัสในวัคซีนหรือผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงและองค์ประกอบเลี้ยงเซลล์ ซึ่งต้องแสดงว่าไม่มีการปนเปื้อนของรีโทรไวรัสหรือมีรีโทรไวรัสในระบบ (endogenous retrovirus) ที่สามารถแพร่กระจายได้⁽¹⁾ ความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของรีโทรไวรัส ได้แก่ การเกิดการกลายพันธุ์แบบแทรก (insertional mutagenesis) และการพัฒนาของโรคนี้ออก⁽²⁾ โดย U.S. FDA และ European Medicines Agency (EMA) ได้กำหนดแนวทางให้ใช้วิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อรีโทรไวรัส ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อวิเคราะห์ infectivity assay การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ reverse transcriptase (RT activity assay) อย่างไรก็ตาม วิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดในด้านความไว (sensitivity) หรือไม่สามารให้ข้อมูลเชิงปริมาณได้อย่างชัดเจน เช่น การเพาะเลี้ยงอาจใช้เวลานานและอาจไม่สามารถตรวจพบเชื้อที่มีระดับต่ำหรือไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในระบบเพาะเลี้ยง ดังนั้น การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อรีโทรไวรัสที่มีความไว ความจำเพาะสูง และความน่าเชื่อถือ เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบความปลอดภัยของวัคซีน จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานความปลอดภัยที่กำหนดไว้⁽¹⁾

เทคนิค reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีความไว ความจำเพาะ และความรวดเร็วสูง ซึ่งได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) สำหรับการตรวจหาและวัดปริมาณไวรัส⁽³⁾ หลักการพื้นฐานของ RT-qPCR คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (cDNA) จากอาร์เอ็นเอของไวรัสด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ตามด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป้าหมายแบบทวีคูณโดยใช้ปฏิกิริยา PCR และตรวจวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นแบบเรียลไทม์โดยใช้สารเรืองแสง⁽³⁾ ข้อได้เปรียบที่สำคัญของ RT-qPCR เหนือวิธีการแบบดั้งเดิม เช่น conventional PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ตรวจสอบผลลัพธ์หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาเท่านั้น (endpoint detection) ได้แก่ ความสามารถในการให้ข้อมูลทั้งเชิงคุณภาพ (การตรวจพบ) และเชิงปริมาณ (ปริมาณไวรัส) ด้วยความแม่นยำและความไวสูง รวมถึงระยะเวลาในการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างสั้น⁽³⁻⁵⁾ ความสามารถรอบด้านของ RT-qPCR ไม่ได้จำกัดอยู่เพียงแค่การตรวจหาเชื้อไวรัสเท่านั้น แต่ยังครอบคลุมถึงการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและการตรวจหาการกลายพันธุ์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประโยชน์และความน่าเชื่อถือของเทคนิคนี้ในสาขาชีววิทยาโมเลกุล^(3,5)

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการตรวจหาเชื้อรีโทรไวรัสที่อาจปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในกระบวนการผลิตวัคซีน การตรวจสอบความถูกต้องนี้ครอบคลุมถึงการประเมินคุณสมบัติที่สำคัญของวิธี ได้แก่ ความจำเพาะของไพรเมอร์ ความเป็นเส้นตรงของปฏิกิริยา ความเที่ยงของการตรวจวัด (ทั้งความเที่ยงภายในชุดการทดลองเดียวกัน ความเที่ยงระหว่างชุดการทดลองที่ต่างกัน และความเที่ยงระหว่างผู้ปฏิบัติงานที่ต่างกัน) ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจพบ (Limit of Detection: LOD) และความแม่นยำของวิธีในการตรวจวัดปริมาณรีโทรไวรัสในตัวอย่างจริง โดยการตรวจสอบความถูกต้องนี้ดำเนินการตามแนวทางและหลักปฏิบัติที่เป็นที่ยอมรับสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี qPCR⁽¹⁾ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมคุณภาพ และเป็นเครื่องมือสำคัญในการตรวจสอบการปนเปื้อนของรีโทรไวรัสในกระบวนการผลิตวัคซีนและผลิตภัณฑ์ชีววัตถุได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. วัสดุและวิธีการ

2.1 ตัวอย่างและสารมาตรฐาน (sample and reference material)

อาร์เอ็นเอของไวรัส MS2 bacteriophage (Cat. No. 10165948001, Roche) นำมาใช้เป็นอาร์เอ็นเอมาตรฐานในการสร้างกราฟมาตรฐานและใช้เป็น RNA surrogate แทนรีโทรไวรัสในการศึกษานี้ โดยอ้างอิงจากข้อมูลจีโนมในฐานข้อมูล GenBank (J02467.1, V00642, M24961; ความยาว 3569 bp, ssRNA) เอนไซม์ reverse transcriptase ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานคือ M-MLV RT (200 U/ μ L, Cat. No. 28025013, Invitrogen) เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้สำหรับการศึกษการปนเปื้อนในสภาวะจำลองคือเซลล์ Vero (African green monkey kidney cell line, ATCC CCL-81, รุ่นการผลิต 70006073) ที่เตรียมโดยสถาบันชีววัตถุ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM (Cat. No. 10569010, Gibco) ที่มีซีรัม (Fetal Bovine Serum, FBS, Cat. No. A5670801, Gibco) 10%, Penicillin-Streptomycin (Cat. No. 15140122, Gibco) 1% และ 1 M HEPES (Cat. No. 15630080, Gibco) และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จนถึงระยะที่เซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 80-90% ก่อนนำมาใช้ในกระบวนการทดลอง

2.2 การสกัด DNA ของ Vero cell ด้วยชุดสกัด

เซลล์ Vero จำนวน 1×10^6 เซลล์ ถูกปั่นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วทำการสกัด genomic DNA จากเซลล์ lysate ที่โดยใช้ชุดสกัด PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Cat. No. 12280050, Invitrogen) ขั้นตอนตามคู่มือของบริษัท และ elute กรดนิวคลีอิกด้วยน้ำกลั่นปราศจาก DNase/RNase ปริมาตร 25 μ L นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

2.3 Primer และ Probe สำหรับการตรวจด้วยวิธี 2-step RT-qPCR

Primer และ probe สำหรับตรวจสอบหาการปนเปื้อนรีโทรไวรัสด้วยวิธี RT-qPCR โดยออกแบบให้มีความจำเพาะต่อบริเวณ 5'-untranslated region (5'-UTR) ของ MS2 bacteriophage ซึ่งถูกใช้เป็นตัวแทนสำหรับการศึกษาสำหรับการตรวจหาไวรัสในการศึกษาตรวจสอบความถูกต้องนี้ โดยมี product size เท่ากับ 76 bp การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ดำเนินการโดยใช้เครื่องมือ Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทั้งหมดของ NCBI เพื่อระบุความเป็นไปได้ในการจับกับอาร์เอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหรือไวรัสชนิดอื่น ๆ ดังแสดงรายละเอียดใน Table 1

Table 1 Characteristics of MS2 bacteriophage amplicons generating primers.

Type and primer sequence (5'-3')	Final concentration (nM)	GenBank Accession no. Genomic location
MS2 bacteriophage (76bp)		V00642.1
MS2-Forward: TCCTGCTCAACTTCCTGTCGAG	250	21-42
MS2-Reverse: CATAGGTCAAACCTCCTAGGAATG	250	109-129
Probe: FAM-TTAATGTCTTTAGCGAGACGC-TAMRA	125	55-75

2.4 การเตรียม RT enzyme standard control

สารมาตรฐานเอนไซม์ reverse transcriptase (RT enzyme standard control) ได้รับการเตรียมโดยใช้อาร์เอ็นเอจาก MS2 bacteriophage (MS2 RNA) เป็นแม่แบบ และใช้เอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase (200 U/ μ L) เป็นมาตรฐานควบคุม ซึ่งการศึกษานี้เป็นการใช้การทดสอบแบบ 2-step RT-qPCR โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการทำ Oligo d(T) annealing ในแต่ละปฏิกิริยา (ปริมาตรรวม 12 μ L) ประกอบด้วย Oligo d(T)16 (50 μ M) 2 ไมโครลิตร dNTP mix (10 mM) 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปลอด RNase (DEPC-treated water) 8 ไมโครลิตร และ MS2 RNA (50 ng/ μ L) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นนำเข้าสู่เครื่อง Thermal cycler ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และลดอุณหภูมิลงที่ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (reverse transcription) เติมนสารละลาย reverse transcription (ปริมาตรรวม 7 ไมโครลิตร) ซึ่งประกอบด้วย 5X First-Strand Buffer 4 ไมโครลิตร DTT 100 mM 2 ไมโครลิตร และ RNaseOUT™ (40 U/μL) 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ผ่านการ annealing แล้ว จากนั้นเติม M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μL) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำเข้าเครื่อง Thermal cycler ตามโปรแกรมดังนี้: 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และคงที่ที่ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่าง cDNA ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR

การตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสทำโดยเทคนิค Real-Time PCR ชนิด TaqMan Probe โดยใช้ primer และ probe ที่จำเพาะต่อ MS2 RNA โดย master mix ของปฏิกิริยาในแต่ละหลอด (ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) 10.0 ไมโครลิตร Forward Primer (10 μM) 0.5 ไมโครลิตร Reverse Primer (10 μM) 0.5 ไมโครลิตร TaqMan Probe (10 μM) 0.25 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปลอดเอนไซม์ 6.75 ไมโครลิตร และ cDNA ตัวอย่างหรือมาตรฐาน 2.0 ไมโครลิตร (ที่ได้จากข้อ 2.4) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Applied Biosystems® QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ดังนี้: 50 องศาเซลเซียส 2 นาที (UNG incubation) 95 องศาเซลเซียส 10 นาที (initial denaturation) 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ hold ที่ 4 องศาเซลเซียส กำหนดค่า threshold เท่ากับ 0.1 และใช้ค่า baseline แบบอัตโนมัติ (auto-baseline) วิเคราะห์ผลจากค่า cycle threshold (Ct)

2.6 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method Validation)

พารามิเตอร์ที่ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วย real-time PCR อ้างอิงตาม The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments⁽⁶⁾

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของปฏิกิริยา RT-qPCR การทดสอบความเป็นเส้นตรงของปฏิกิริยา RT-qPCR ดำเนินการโดยใช้ RT enzyme standard control ที่ทราบความเข้มข้น นำสารละลาย RT enzyme มาตรฐาน (RT enzyme standard control) มาเจือจางแบบ serial dilution ให้มีความเข้มข้นในช่วง 10^{-1} ถึง 10^{-12} RT unit สารละลายเจือจางแต่ละระดับความเข้มข้นถูกนำไปทดสอบด้วยวิธี RT-qPCR จำนวน 3 การทดสอบ โดยแต่ละการทดสอบมี 2 ซ้ำ จากนั้นนำค่า -Ct ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยพลอตค่า Ct บนแกน Y และค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของ RT เอนไซม์มาตรฐาน ($\log_{10}$) บนแกน X ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงโดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) โดยค่า $R^2 \geq 0.98$ เป็นค่าตามเกณฑ์การยอมรับ

การทดสอบความเที่ยง (precision) การทดสอบความเที่ยงตรง ทำการตรวจสอบใน 3 หัวข้อคือ

การทดสอบ repeatability (intra-assay precision) วิเคราะห์ความซ้ำได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยนำสารละลาย RT enzyme standard control ที่มีความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-3} และ 10^{-5} RT unit ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว โดยค่า %CV $\leq 10\%$ เป็นค่าตามเกณฑ์การยอมรับ

การทดสอบ reproducibility (inter-assay precision) วิเคราะห์ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์โดยนำสารละลาย RT enzyme standard control ที่มีความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-3} และ 10^{-5} RT unit โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ในวันและเวลาที่แตกต่างกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว โดยค่า %CV $\leq 25\%$ เป็นค่าตามเกณฑ์การยอมรับ

Intermediate precision ดำเนินการโดยนำสารละลาย RT enzyme standard control ที่มีความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-3} และ 10^{-5} RT unit ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบ Repeatability โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ทำการทดสอบต่างวัน ด้วยเครื่องมือเดิม โดยทำการทดสอบคนละ 3 การทดสอบ การทดสอบละ 2 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า %CV โดยใช้เกณฑ์พิจารณาเดียวกันกับการทดสอบ repeatability

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD_{95%} PCR) การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ดำเนินการโดยใช้สารละลาย RT enzyme standard control ที่มีความเข้มข้น 10^{-6} RT unit จากนั้นทำการเจือจางแบบ 2-fold dilution จำนวน 10 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5×10^{-7} , 2.5×10^{-7} , 1.25×10^{-7} , 6.25×10^{-8} , 3.125×10^{-8} , 1.56×10^{-8} , 7.81×10^{-9} , 3.90×10^{-9} , 1.95×10^{-9} และ 9.75×10^{-10} RT unit แต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 8 ซ้ำ โดยทำการทดสอบจำนวน 3 การทดสอบ จากนั้นคำนวณหาค่า LOD ซึ่งกำหนดเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของ RT เอนไซม์ที่

สามารถตรวจพบได้ด้วยอัตราผลบวก (%Positive rate) $\geq 95\%$ โดยค่า %Positive rate (LOD) ต้องมีค่า $\geq 95\%$ เป็นค่าตามเกณฑ์การยอมรับ⁽⁷⁾

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) การประเมินความแม่นยำของวิธี RT-qPCR ในการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ดำเนินการโดยการเติม (spike) สารละลาย RT enzyme standard control ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ซึ่งเป็นเซลล์ที่นิยมใช้ในการผลิตวัคซีนหลายชนิด เพื่อจำลองสภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับการใช้งานจริงในกระบวนการผลิตวัคซีนหรือผลิตภัณฑ์ชีววัตถุ ในการทดสอบนี้ สารละลาย RT enzyme standard control ถูกเตรียมที่ที่มีความเข้มข้น 10^{-3} และ 10^{-5} RT unit จากนั้นนำไปเติม (spike) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ Vero เพื่อเตรียมตัวอย่างทดสอบ โดยจัดชุดตัวอย่างควบคุมประกอบด้วย 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ Vero ซึ่งเติม RT enzyme standard control (spiked test sample) กลุ่มตัวอย่าง RT enzyme standard control ที่ทราบความเข้มข้น (positive control) และกลุ่มตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ Vero โดยไม่เติม RT enzyme (negative control)

ตัวอย่างทั้งหมดถูกตรวจวัดด้วยวิธี RT-qPCR โดยทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 การทดสอบ เพื่อประเมินความแม่นยำของวิธี จากนั้นทำการคำนวณค่าการคืนกลับของสัญญาณ RT enzyme ที่ตรวจพบ (%recovery) โดยใช้สูตร $\%recovery = (spiked/standard) \times 100\%$ โดยที่ spiked คือ ค่าที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างที่เติม RT enzyme ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และ standard คือค่าที่ตรวจวัดได้จากสารละลาย RT enzyme มาตรฐานที่ไม่ได้ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์

ค่าการคืนกลับที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 80-120% ตามแนวทางการประเมินความถูกต้องของวิธี qPCR ทั้งนี้ การใช้เซลล์ Vero ในการทดสอบมีวัตถุประสงค์เพื่อให้สภาวะของตัวอย่างมีความใกล้เคียงกับการใช้งานจริง เนื่องจากเซลล์ Vero เป็นเซลล์โฮสต์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนหลายชนิด การประเมินความแม่นยำในสภาวะนี้จึงมีความสำคัญต่อการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธี RT-qPCR สำหรับการนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพของกระบวนการผลิตวัคซีน

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลประสิทธิภาพของวิธี RT-qPCR ที่ถูกพัฒนา

การศึกษาความจำเพาะของ primer/probe ด้วยการทดสอบแบบ *in silico* สำหรับการทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ในการตรวจหา MS2 bacteriophage เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โดยใช้ฟังก์ชัน Primer BLAST พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อ MS2 bacteriophage เพียงชนิดเดียวเท่านั้น โดยไม่พบการจับคู่หรือปฏิกิริยาข้ามของไพรเมอร์กับไวรัสสายพันธุ์อื่น

ปฏิกิริยา RT-qPCR ให้ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงผ่านเกณฑ์ค่า R^2 ที่ต้องมีค่า ≥ 0.98 โดยค่า R^2 ที่ได้จากการทดสอบทั้ง 3 การทดสอบ การทดสอบละ 2 ซ้ำ ของแต่ละความเข้มข้น อยู่ในช่วง 0.9805 ถึง 0.9817 นอกจากนี้ กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า Ct และความเข้มข้นของ RT enzyme standard control ยังแสดงค่า slope ระหว่าง -3.58 ถึง -3.10 ซึ่งอยู่ในช่วงที่สอดคล้องกับเกณฑ์มาตรฐานของประสิทธิภาพปฏิกิริยา qPCR ดังแสดงใน Fig. 1 และ Table 2

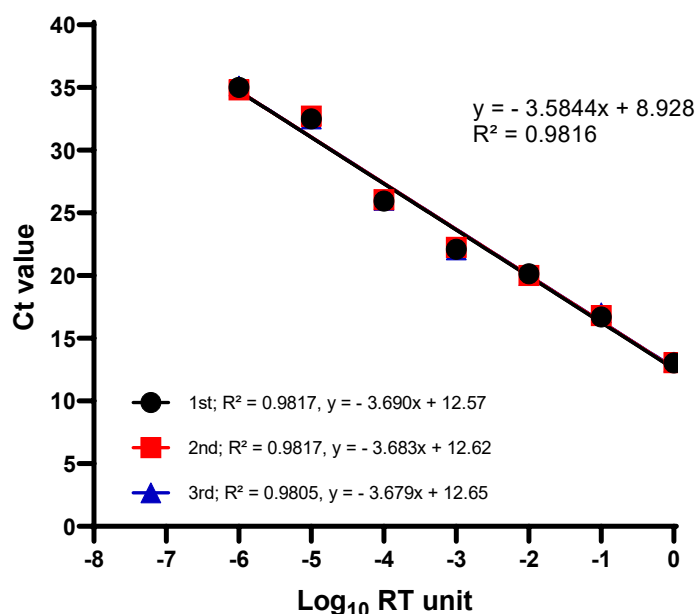


Fig. 1 Standard curve of RT-qPCR showing the correlation between log-transformed concentrations of RT enzyme standard and Ct values. Data were obtained from 3 independent experiments, each with duplicate reactions. The linearity was confirmed with R^2 values ranging from 0.9805 to 0.9817 and slopes between -3.10 and -3.58.

Table 2 Summary of the linearity test results of the RT-qPCR reaction from 3 independent experiments, each performed in duplicate (criteria: $R^2 \geq 0.98$).

Log ₁₀ (RT unit)	Enzyme concentration (Unit/ μ L)	Ct value			Ct mean $\pm$ SD	%CV
		1 st	2 nd	3 rd		
0	1 U/ μ L	13.04	13.06	13.10	13.07 $\pm$ 0.03	0.22
-1	100 mU/ μ L	16.70	16.81	17.02	16.85 $\pm$ 0.16	0.97
-2	10 mU/ μ L	20.15	20.01	20.01	20.05 $\pm$ 0.08	0.41
-3	1 mU/ μ L	22.10	22.25	22.04	22.13 $\pm$ 0.11	0.48
-4	100 μ U/ μ L	25.94	26.06	26.01	26.00 $\pm$ 0.06	0.22
-5	10 μ U/ μ L	32.50	32.73	32.50	32.58 $\pm$ 0.13	0.41
-6	1 μ U/ μ L	35.02	34.81	35.12	34.98 $\pm$ 0.16	0.46

ในการทดสอบความเที่ยงซึ่งประเมินจากการทำซ้ำในวันเดียวกันสำหรับการทดสอบหาการปนเปื้อนเอนไซม์ reverse transcriptase โดยใช้ RT enzyme standard control ที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-3} และ 10^{-5} RT unit จำนวน 3 การทดสอบ การทดสอบละ 2 ซ้ำ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) อยู่ในช่วง 0.36 ถึง 0.76% (Table 3) เมื่อทำการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน เป็นเวลา 3 วัน วันละ 2 ซ้ำ พบว่ามีค่า %CV อยู่ในช่วง 2.02 ถึง 3.74% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ดังแสดงใน Table 4 นอกจากนี้ได้ทำการประเมินความเที่ยงของปฏิกิริยาจากผู้ปฏิบัติงานที่ต่างกัน จำนวน 2 คน ในวันและเวลาต่างกัน พบว่ามีผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยพบว่ามีค่า %CV ที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-3} และ 10^{-5} RT unit มีค่าเท่ากับ 9.49, 4.66 และ 0.62 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า %CV น้อยกว่า 25% ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์ที่กำหนด (Table 5)

Table 3 The repeatability test results of the RT-qPCR reaction from 3 independent experiments, each performed in duplicate (Criteria: %CV $\leq$ 10%).

Log ₁₀ (RT unit)	Enzyme concentration (Unit/μL)	Ct value						Ct means ± SD	%CV
		1 st		2 nd		3 rd			
		1 st	2 nd	1 st	2 nd	1 st	2 nd		
-1	100 mU/μl	16.80	16.82	16.81	16.80	17.12	16.93	16.87 ± 0.13	0.76
-3	1 mU/μl	22.29	22.21	22.14	22.05	22.02	22.07	22.13 ± 0.11	0.49
-5	10 μU/μl	32.84	32.62	32.58	32.63	32.56	32.44	32.61 ± 0.12	0.36

Table 4 The between-day variation (inter-assay variation) test results of the RT-qPCR reaction from 3 independent experiments, each performed in duplicate (Criteria: %CV $\leq$ 10%).

Log ₁₀ (RT unit)	Enzyme concentration (Unit/μL)	Ct value						Ct mean ± SD	%CV
		Day 1		Day 2		Day 3			
		1 st	2 nd	1 st	2 nd	1 st	2 nd		
-1	100 mU/μL	16.80	16.82	16.72	16.69	15.67	15.71	16.39 ± 0.61	3.74
-3	1 mU/μL	22.29	22.21	22.09	22.11	10.66	20.64	21.65 ± 0.78	3.60
-5	10 μU/μL	32.84	32.62	32.57	32.43	33.80	33.60	32.94 ± 0.67	2.02

Table 5 The analyst-to-analyst variation test results of the RT-qPCR reaction from 3 independent experiments, each performed in duplicate (Criteria: %CV $\leq$ 25%).

Log ₁₀ (RT unit)	Enzyme concentration (Unit/ μ L)	Analyst 1		Analyst 2		Ct mean $\pm$ SD	%CV
		1 st	2 nd	1 st	2 nd		
-1	100 mU/ μ L	16.72	16.69	19.382	19.272	18.02 $\pm$ 1.33	9.49
		16.72	16.69	19.227	19.247		
		17.12	16.93	19.117	19.123		
-3	1 mU/ μ L	22.09	22.11	23.757	23.802	22.83 $\pm$ 0.84	4.66
		22.09	22.11	22.921	22.943		
		22.02	22.07	23.211	23.429		
-5	10 μ U/ μ L	34.94	35.10	32.946	32.888	32.64 $\pm$ 0.20	0.62
		34.94	35.09	32.946	32.849		
		32.56	32.44	32.427	32.683		

3.2 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection; LOD_{95%} PCR)

การศึกษาปริมาณต่ำสุดของ RT enzyme ที่ตรวจพบได้ด้วยเทคนิค RT-qPCR จาก Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods⁽⁸⁾ ได้กำหนดค่าขีดจำกัดของการตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR คือการทดสอบต้องให้ค่าผลบวกมากกว่า 95% (95% LOD) โดยทำการทดสอบ 3 การทดสอบ การทดสอบละ 8 ซ้ำ ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD_{95%} PCR) ปริมาณของ RT enzyme ด้วยปฏิกิริยา RT-qPCR พบว่าความเข้มข้นของ RT enzyme ต่ำสุดที่ตรวจพบและให้ผล %Positive rate $\geq$ 95% คือ 500 μ U/ μ L ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด (Table 6)

Table 6 The limit of detection (LoD_{95%}) test results for the RT enzyme using RT-qPCR from 3 independent tests, each performed with eight replicates (Criteria: %Positive rate (LoD) $\geq$ 95%).

log ₁₀ RT	Enzyme concentration (Unit/ μ L)	%Positive rate			Mean of %Positive rate	SD	%CV
		1 st	2 nd	3 rd			
-6	1	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
-6.30	500	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
-6.60	250	100.00	100.00	50.00	83.33	28.87	34.64
-6.90	125	12.50	100.00	100.00	70.83	50.52	71.32
-7.20	62.50	12.50	0.00	25.00	12.50	12.50	100.00
-7.51	31.25	12.50	50.00	100.00	54.17	43.90	81.04
-7.81	15.63	87.50	12.50	12.50	37.50	43.30	115.47
-8.11	7.81	12.50	25.00	25.00	20.83	7.22	34.64
-8.41	3.91	0.00	87.50	12.50	33.33	47.32	141.97
-8.71	1.95	0.00	25.00	12.50	12.50	12.50	100.00
-9.01	0.98	12.50	0.00	50.00	20.83	26.02	124.90

3.3 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

จากการทดสอบความแม่นยำ พบว่าตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ทำการเติม RT enzyme standard control ลงไป มีค่า %recovery $\geq$ 95% โดยค่า %recovery ที่ได้จากการเติม RT enzyme standard control ที่ความเข้มข้น 10⁻³ และ 10⁻⁵ RT unit อยู่ในช่วง 105.25% ถึง 113.63% ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนดคือ %recovery $\geq$ 95% ดังแสดงใน Table 7

Table 7 Percent recovery values of the analysis.

Samples	Triplicate (Ct mean)						Ct means ± SD	%CV	% Recovery
	1 st		2 nd		3 rd				
	1 st	2 nd	1 st	2 nd	1 st	2 nd			
Enzyme positive 10 ⁻³ RT	19.05	19.15	19.13	19.06	19.27	19.27	19.16 ± 0.01	0.50	-
Enzyme positive 10 ⁻⁵ RT	22.94	22.96	23.10	23.07	23.12	23.18	23.06 ± 0.09	0.41	-
Vero cell spike 10 ⁻³ RT	20.19	20.06	20.17	20.22	20.18	20.15	20.16 ± 0.05	0.26	105.25
Vero cell spike 10 ⁻⁵ RT	26.12	26.18	26.19	26.29	26.26	26.19	26.21 ± 0.06	0.24	113.63
Negative control	0	0	0	0	0	0	0	0	0

4. วิจารณ์

การศึกษาความถูกต้องของวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโดยวิธี RT-qPCR ครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธี RT-qPCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีน⁽⁹⁻¹¹⁾ โดยมุ่งเน้นการตรวจสอบพารามิเตอร์ที่สำคัญ ได้แก่ ความจำเพาะ ความไว ความแม่นยำ ความเป็นเส้นตรง และขีดจำกัดของการตรวจพบ เพื่อยืนยันความเหมาะสมของวิธีในการประยุกต์ใช้ในกระบวนการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ชีววัตถุ

การตรวจหาการปนเปื้อนของไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนหรือชีววัตถุด้วยเทคนิค RT-qPCR เป็นการตรวจทางอ้อม โดยอาศัยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ RT ที่อาจหลุดรอดออกมาปนเปื้อนใน supernatant ของเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่ง RT เป็นเอนไซม์เฉพาะของไวรัสกลุ่มรีโทรไวรัส โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการจำลองตัวได้ (replication-competent virus)^(12,13) ซึ่งการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ RT จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางอ้อมในการตรวจจับการปนเปื้อนของไวรัสในระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ ในการศึกษา ผู้วิจัยเลือกใช้ MS2 bacteriophage ซึ่งเป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอที่ปลอดภัย ไม่ก่อโรคในมนุษย์ และสามารถควบคุมปริมาณ RNA ได้อย่างแม่นยำ มาเป็น RNA surrogate แทนรีโทรไวรัสจริงสำหรับการประเมินความถูกต้องของระบบ RT-qPCR การเลือกใช้ MS2 มีจุดแข็งในด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety level) และความเป็นไปได้เชิงปฏิบัติ เนื่องจากการใช้รีโทรไวรัสจริงมีข้อจำกัดทั้งในด้านความเสี่ยงทางชีวภาพ และข้อกำหนดด้านจริยธรรมในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลระดับทั่วไป ในการพัฒนา RT-qPCR จำเป็นต้องมีการออกแบบ primer และ probe ที่มีความจำเพาะเชื้อไวรัสตัวแทนเพื่อหาการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่มีการผลิตเอนไซม์ RT ด้วยวิธี RT-qPCR เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ได้รับการประเมินในการศึกษานี้ เพื่อช่วยให้มั่นใจได้ว่าวิธี RT-qPCR สามารถแยกแยะเชื้อไวรัสออกจากสารพันธุกรรมอื่น ๆ ที่อาจมีอยู่ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้^(14,15) จากการประเมินความจำเพาะของไพรเมอร์ (Primer specificity) ที่ออกแบบโดยอาศัยฐานข้อมูล Primer BLAST แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อ MS2 bacteriophage เพียงชนิดเดียว และไม่เกิดการจับข้ามกับสายพันธุ์ไวรัสอื่น อย่างไรก็ตามการประเมินความจำเพาะโดยอาศัยโปรแกรม Primer-BLAST เป็นเพียงการวิเคราะห์ในเชิง bioinformatics โดยโปรแกรมนี้รวมคุณสมบัติของ BLAST (local alignment) เข้ากับการจัดตำแหน่งแบบ global alignment เพื่อประเมินลำดับไพรเมอร์เทียบกับฐานข้อมูลจีโนมในลักษณะที่ครอบคลุมทั้งลำดับ⁽¹⁶⁾ แม้ว่า Primer-BLAST จะมีความไวในการประเมินเป้าหมายที่มีความคล้ายคลึงกันในระดับสูง และมีความสามารถในการหลีกเลี่ยงบริเวณ SNP หรือ exon/intron ที่ไม่เหมาะสม แต่ก็ยังคงเป็นการประเมินในระดับ *in silico* ที่อาจไม่สามารถสะท้อนความจำเพาะจริงในสภาวะเชิงปฏิบัติการได้ทั้งหมด จึงอาจมีข้อจำกัดในการยืนยันความจำเพาะอย่างสมบูรณ์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในระบบ RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น โดยเฉพาะในกรณีที่มีสารพันธุกรรมจากไวรัสอื่นปนเปื้อนในตัวอย่าง ดังนั้นควรมีการทดสอบเพิ่มเติมในอนาคตโดยใช้ไวรัสจริงหรือจีโนม recombinant เพื่อประเมินความจำเพาะในสภาวะที่

ใกล้เคียงกับการใช้งานจริง และยืนยันความจำเพาะของไพรเมอร์และลดความเสี่ยงของผลบวกปลอม (false positive) จากข้อมูลความจำเพาะของไพรเมอร์แสดงความจำเพาะสูงเป็นปัจจัยสำคัญในการลดความเสี่ยงของผลบวกปลอมเนื่องมาจากการจับกับสารพันธุกรรมที่ไม่ใช่เป้าหมาย และเพิ่มความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งสอดคล้องกับแนวทางของ Bustin, *et al.* (2009) ที่ระบุว่าความจำเพาะของไพรเมอร์เป็นองค์ประกอบหลักของความน่าเชื่อถือในการตรวจแบบ qPCR^(6,17) อย่างไรก็ตาม การใช้ MS2 RNA เป็น surrogate ก็มีข้อจำกัด เนื่องจากไม่สามารถแทนที่ลักษณะทางพันธุกรรมของรีโทรไวรัสทุกชนิดที่อาจปนเปื้อนในระบบการผลิตวัคซีนได้ ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โครงสร้างจีโนม หรือองค์ประกอบโปรตีนของรีโทรไวรัสแต่ละสายพันธุ์ อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการตรวจวัดของระบบ RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น ด้วยเหตุนี้ จึงควรมีการศึกษาต่อยอดในอนาคต โดยใช้โมเดลทางพันธุกรรมที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสจริงมากขึ้น เช่น recombinant plasmid ที่มีรหัสลำดับพันธุกรรมของรีโทรไวรัส หรือ pseudotyped retrovirus ที่มีความปลอดภัยและสามารถใช้ทดสอบในระบบปิดได้ มีรายงานว่า การใช้ MS2 RNA ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ RT อาจก่อให้เกิดผลบวกปลอมในบางระบบ เช่น ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ตามที่รายงานโดย Kothapalli, *et al.* (2003)¹⁸ ดังนั้นการเลือกใช้มาตรฐานอ้างอิงอื่นที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อรีโทรไวรัสจริงในระดับจีโนม และสามารถควบคุมปริมาณได้อย่างแม่นยำ เช่น ดีเอ็นเอพลาสมิดที่ออกแบบเฉพาะ อาจเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ที่ต้องการความแม่นยำสูงขึ้น หากมีข้อจำกัดด้านความปลอดภัยหรือทรัพยากรในการใช้ไวรัสจริง ทั้งนี้ การทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้ไวรัสจำลอง (experimental retrovirus) หรือระบบพลาสมิดที่คล้ายคลึงกับไวรัสเป้าหมายในเชิงอุตสาหกรรม จะช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือของวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นในการใช้งานจริงต่อไป

การทดสอบความจำเพาะเพิ่มเติมโดยใช้รีโทรไวรัสเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีน อาจเป็นประโยชน์ในการยืนยันความจำเพาะของวิธีนี้ การแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของไพรเมอร์จึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการสร้างความน่าเชื่อถือให้กับวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น ความเป็นเส้นตรงของปฏิกิริยา RT-qPCR เป็นอีกหนึ่งพารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) และค่าความชันของกราฟมาตรฐานที่เหมาะสม บ่งชี้ถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ระหว่างค่า Ct และลอการิทึมของปริมาณเริ่มต้นของสารพันธุกรรมเป้าหมาย⁽¹⁴⁾ ความเป็นเส้นตรงนี้มีความสำคัญต่อการหาปริมาณของเชื้อรีโทรไวรัสที่อาจมีการปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างได้อย่างแม่นยำ หากกราฟมาตรฐานของปฏิกิริยา RT-qPCR ไม่มีความเป็นเส้นตรง การประมาณค่าของปริมาณไวรัสอาจไม่ถูกต้อง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประเมินความเสี่ยงและการตัดสินใจในการควบคุมคุณภาพวัคซีน ความเป็นเส้นตรงที่ดีของปฏิกิริยา RT-qPCR ซึ่งมีค่า R^2 สูงและค่าความชันที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถใช้ในการหาปริมาณรีโทรไวรัสได้อย่างเหมาะสมและแม่นยำ⁽¹⁹⁻²¹⁾ โดยจากปฏิกิริยา RT-qPCR มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9805-0.9817 ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่รายงานในงานวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี RT-qPCR⁽²⁰⁻²²⁾

ความเที่ยงของวิธี RT-qPCR ซึ่งประเมินจากความสามารถในการให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกันเมื่อทำการทดสอบซ้ำภายใต้สภาวะเดียวกัน (repeatability) และภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันเล็กน้อย เช่น วันที่ต่างกัน ผู้ปฏิบัติงานต่างกัน (intermediate precision) เป็นอีกหนึ่งพารามิเตอร์ที่สำคัญสำหรับการตรวจสอบความถูกต้อง⁽¹⁴⁾ ผลการทดสอบ repeatability และ intermediate precision พบว่าค่า CV มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูง สามารถให้ผลลัพธ์ที่เชื่อถือได้และความสม่ำเสมอในการตรวจหาเชื้อรีโทรไวรัส ซึ่งให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกันเมื่อทำการทดสอบซ้ำภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยผู้ปฏิบัติงานต่างกัน และในวันที่ต่างกัน^(20,23) ค่า CV ที่สูงขึ้นเล็กน้อยในการทดสอบ intermediate precision เป็นสิ่งที่สามารถพบได้เนื่องจากมีปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อความแปรปรวนเพิ่มขึ้น เช่น ความแตกต่างในการปฏิบัติงานของแต่ละบุคคล หรือความผันผวนของสภาวะแวดล้อมในแต่ละวัน⁽¹⁹⁾ โดยผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ Oliveira, *et al.* ในปี ค.ศ. 2021 ที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเปลี่ยนผู้ปฏิบัติงานหรือวันทดสอบ ผลการทดสอบที่ได้จะยังมีค่าคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย แต่ผลที่ได้ยังอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด⁽¹⁴⁾

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เป็นหนึ่งในพารามิเตอร์ที่สำคัญซึ่งใช้ประเมินประสิทธิภาพของวิธี RT-qPCR ในการศึกษาครั้งนี้ โดยค่า LOD ที่รายงานเป็นปริมาณต่ำสุดของเอนไซม์ reverse transcriptase ที่สามารถตรวจพบได้ใน $\geq 95\%$ ของการทดสอบซ้ำ ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ยอมรับกันโดยทั่วไปตามแนวทาง MIQE Guidelines การที่วิธี RT-qPCR สามารถตรวจพบ RT enzyme ที่ระดับ 500 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$ ในการทดสอบนี้ แสดงให้เห็นถึงความไวที่เพียงพอในการตรวจจับการปนเปื้อนของรีโทรไวรัสในระดับต่ำ^(6,14,15) ซึ่งมีความสำคัญต่อความปลอดภัยของกระบวนการผลิตวัคซีน^(19,20) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากหน่วย

enzyme unit และ copies/reaction เป็นหน่วยวัดคนละประเภท จึงไม่สามารถแปลงค่าโดยตรงได้ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าขีดจำกัดของการตรวจพบที่ยอมรับกันในชุดตรวจหา SARS-CoV-2 ของ WHO ที่รายงานผลการศึกษาของ Corman, *et al.* ในปี ค.ศ. 2020 ระบุว่า LOD ของ RT-qPCR อยู่ในช่วง 3.6-12 copies/reaction ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม⁽²⁴⁾ ซึ่งสะท้อนถึงความไวที่จำเป็นต่อการประกันคุณภาพของผลิตภัณฑ์ชีววัตถุ การที่วิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถให้ผล LOD ภายใต้เกณฑ์ 95% positive detection rate ในระดับปริมาณที่ใกล้เคียงกับมาตรฐานที่ยอมรับนี้ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของวิธีดังกล่าวในการนำไปใช้ในบริบทของการควบคุมคุณภาพในกระบวนการผลิตวัคซีนอย่างเหมาะสม ทั้งนี้การกำหนดค่า LOD เป็นประเด็นสำคัญในการรับรองประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อในระดับชีวโมเลกุล การเปรียบเทียบ LOD ที่ได้จากวิธีตรวจหาวิธีอื่น ๆ เช่น วิธี droplet digital PCR (ddPCR)⁽²⁵⁾ หรือ infectivity assays อาจให้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับประสิทธิภาพของวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น⁽³⁾ จากงานวิจัยก่อนหน้าของ Ding, *et al.* ในปี ค.ศ. 2024 และ Suo, *et al.* ในปี ค.ศ. 2020 ระบุว่า RT-qPCR และ ddPCR ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกันในตัวอย่างที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอสูง แต่ RT-ddPCR ให้ความแม่นยำในการวัดปริมาณที่มากกว่า โดยทั้งสองวิธีมีค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) ใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี^(26,27) แต่ด้วยวิธี ddPCR มีต้นทุนของการทดสอบที่สูงกว่า RT-qPCR อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในการควบคุมคุณภาพห้องปฏิบัติการ หากวิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถผ่านการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) อย่างเป็นระบบ โดยมีการตรวจสอบความแม่นยำ ความเที่ยง และความคงที่ของค่ามาตรฐาน (slope และ efficiency ของ standard curve) อย่างสม่ำเสมอ ก็อาจเพียงพอสำหรับการใช้งานในการตรวจในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสอยู่ในระดับปานกลางถึงสูงได้

ความแม่นยำ (accuracy) ของวิธี RT-qPCR เป็นอีกหนึ่งพารามิเตอร์ที่ควรได้รับการศึกษาครั้งนี้ ความแม่นยำหมายถึงความใกล้เคียงระหว่างผลลัพธ์ที่ได้จากวิธี RT-qPCR กับค่าที่แท้จริงของปริมาณเชื้อไวรัสในตัวอย่าง⁽²⁸⁾ โดยทั่วไป ความแม่นยำจะได้รับการประเมินโดยการเปรียบเทียบผลลัพธ์กับวิธีมาตรฐานอ้างอิง หรือโดยการหา %recovery ของเอนไซม์ RT ที่เติมลงในตัวอย่างควบคุมหรือในตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีที่มีการเติมเอนไซม์มาตรฐาน reverse transcriptase ลงในตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero พบว่ามีค่า %recovery อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (80-120) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณรีโทรไวรัสในตัวอย่างที่มีองค์ประกอบซับซ้อนได้อย่างถูกต้อง^(19,20) การใช้เซลล์ Vero ซึ่งเป็นเซลล์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ทำให้ผลการทดสอบความแม่นยำมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการใช้งานจริงของวิธีนี้⁽²⁹⁾

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษานี้กับงานวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี RT-qPCR สำหรับการตรวจหาไวรัส พบว่าค่าความเป็นเส้นตรง ความเที่ยง และความแม่นยำที่ได้นั้นอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้และมีความสอดคล้องกับมาตรฐานที่แนะนำ⁽²¹⁾ เทคนิค RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีข้อได้เปรียบในด้านความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว โดยสามารถรายงานผลภายในระยะเวลาไม่เกิน 3-4 ชั่วโมง และสามารถตรวจวัดปริมาณ RNA ไวรัสได้อย่างแม่นยำในระดับต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับแนวทางการควบคุมคุณภาพในระบบการผลิตวัคซีนที่ต้องการเครื่องมือวิเคราะห์ที่สามารถให้ผลได้ภายในวันเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับ infectivity assay ซึ่งใช้เวลานานและมีความไม่แน่นอนจากปัจจัยชีวภาพต่าง ๆ รวมถึงความเสี่ยงในการจัดการไวรัสมีชีวิต⁽³⁰⁾ และเทคนิค ddPCR ที่แม้มีความไวสูงสามารถตรวจจับไวรัสได้ดีกว่า qRT-PCR แต่มีต้นทุนสูงและต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ^(25,31,32) RT-qPCR จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในบริบทของห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพในการผลิตวัคซีน ด้วยข้อดีด้านต้นทุนที่เหมาะสม ความไวและความจำเพาะในระดับที่ยอมรับได้ และสามารถรายงานผลได้รวดเร็วภายในไม่กี่ชั่วโมง อีกทั้งยังสามารถปรับปรุงศักยภาพได้ด้วยการออกแบบไพรเมอร์อย่างเหมาะสม และการใช้ RNA surrogate ที่ควบคุมปริมาณได้ ส่งผลให้ RT-qPCR มีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้งานจริงในการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสในระดับอุตสาหกรรม

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธี RT-qPCR เพื่อใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสกลุ่มรีโทรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีน⁽⁹⁻¹¹⁾ โดยใช้ MS2 bacteriophage RNA เป็นตัวแทน (RNA surrogate) ที่ปลอดภัย ไม่ก่อโรคในมนุษย์ และสามารถควบคุมปริมาณได้อย่างแม่นยำ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของระบบ RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้น โดยวิธีนี้ผ่านการประเมินความถูกต้องในทุกพารามิเตอร์ ทั้งความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำ และความคงทน ทั้งนี้ แม้วิธี RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นนี้จะมีศักยภาพในการตรวจวิเคราะห์เชื้อรีโทรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังมีข้อจำกัดในการใช้ RNA surrogate แทนไวรัสจริง และยังไม่ได้มีการยืนยันผลในสภาพแวดล้อมของสายการผลิตจริง จึงอาจยังสรุปไม่ได้ว่าวิธีนี้สามารถนำไปใช้เป็นมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของรีโทรไวรัสได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้

สนับสนุนว่า RT-qPCR ที่พัฒนาขึ้นมีแนวโน้มและความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในเชิงสนับสนุนงานควบคุมคุณภาพของการผลิตชีววัตถุในระดับห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะในขั้นตอนการประเมินความปลอดภัยของเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของหน่วยงานกำกับดูแล เช่น องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) และสำนักงานยาแห่งสหภาพยุโรป (EMA) ที่ระบุให้ต้องมีการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อรีโทรไวรัสในกระบวนการผลิตวัคซีนอย่างเข้มงวด^(1,33-35) เนื่องจากไวรัสกลุ่มนี้สามารถแทรกสารพันธุกรรมเข้าสู่จีโนมของเซลล์โฮสต์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายหากปนเปื้อนในวัคซีนและเข้าสู่ร่างกายมนุษย์

5. สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาความถูกต้องของการตรวจหาเชื้อรีโทรไวรัสด้วยวิธี reverse transcription-quantitative PCR ซึ่งมีการตรวจสอบความถูกต้องตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ในหลายพารามิเตอร์ ได้แก่ ความจำเพาะ ความเป็นเส้นตรง ความเที่ยง (ทั้ง repeatability และ intermediate precision) ชัดจำกัดของการตรวจพบ และความแม่นยำ ซึ่งผลการทดสอบความถูกต้องแสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อรีโทรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง รวมถึงสามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาเป็นคู่มือมาตรฐานการปฏิบัติงานสำหรับการตรวจหาเชื้อรีโทรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีน เพื่อประยุกต์ใช้ในระบบควบคุมคุณภาพ และสามารถต่อยอดไปสู่การนำไปใช้ภายใต้ระบบ GMP หรือการประเมินในระดับการผลิตอุตสาหกรรม เพื่อยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์วัคซีนในอนาคต

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้การสนับสนุนงบการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Birmingham CL, Dupont D, Riou P, Armanet C, Edamura KN, Martinho B, *et al.* Detection of Avian Retroviruses in Vaccines by Amplification on DF-1 Cells with Immunostaining and Fluorescent Product-Enhanced Reverse Transcriptase Endpoint Methods. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1496-504.
2. Al Fayed N, Nassar MS, Alshehri AA, Alnefaie MK, Almughem FA, Alshehri BY, *et al.* Recent Advancement in mRNA Vaccine Development and Applications. *Pharmaceutics* 2023; 15: 1972.
3. Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes* 2022; 13: 2387.
4. Dutta D, Naiyer S, Mansuri S, Soni N, Singh V, Bhat KH, *et al.* COVID-19 Diagnosis: A Comprehensive Review of the RT-qPCR Method for Detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics* 2022; 12: 1503.
5. Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects Med* 2006; 27: 254-98.
6. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611-22.
7. U.S. Pharmacopeial Convention. General Chapter <1130> Nucleic acid-based techniques—approaches for detecting trace nucleic acids (residual DNA testing) [Internet]. 2012 [cited 2025 Jul 26]. Available from: http://usp35.infostar.com.cn/uspfnf/pub/data/v35300/usp35nf30s0_c1130.html.
8. 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; 37: 115-26.
9. Ma H, Khan AS. Detection of Latent Retroviruses in Vaccine-related Cell Substrates: Investigation of RT Activity Produced by Chemical Induction of Vero Cells. *PDA J Pharm Sci Technol* 2011; 65: 685-9



10. Dittmer U, Brooks DM, Hasenkrug KJ. Characterization of a Live-Attenuated Retroviral Vaccine Demonstrates Protection via Immune Mechanisms. *J Virol* 1998; 72: 6554-8.
11. Victoria JG, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, *et al.* Viral Nucleic Acids in Live-Attenuated Vaccines: Detection of Minority Variants and an Adventitious Virus. *J Virol* 2010; 84: 6033-40.
12. Pyra H, Böni J, Schüpbach J. Ultrasensitive retrovirus detection by a reversetranscriptase assay based on product enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1544-8.
13. Pizzato M, Erlwein O, Bonsall D, Kaye S, Muir D, McClure MO. A one-step SYBR Green I-based product-enhanced reverse transcriptase assay for the quantitation of retroviruses in cell culture supernatants. *J Virol Methods* 2009; 156: 1-7.
14. Oliveira JG, Souto S, Bandín I, Dopazo CP. Development and Validation of a SYBR Green Real Time PCR Protocol for Detection and Quantification of Nervous Necrosis Virus (NNV) Using Different Standards. *Animals* 2021; 11: 1100.
15. Zhang Y, Dong F, Xing J, Tang X, Sheng X, Chi H, *et al.* Characterization of Nervous Necrosis Virus (NNV) Nonstructural Protein B2 and Its Enhancement on Virus Proliferation. *Viruses* 2022; 14: 2818.
16. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2012 Dec; 13: 134 [cited 2025 Jul 26]. Available from: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-13-134>.
17. Tang Q, Zhou GC, Liu SJ, Li W, Wang YL, Xu GY, *et al.* Selection and Validation of Reference Genes for qRT-PCR Analysis of Gene Expression in *Tropaeolum majus* (Nasturtium). *Horticulturae* 2023; 9: 1176.
18. Kothapalli R, Danyluck GM, Bailey RD, Loughran TP. Problems associated with product enhancement reverse transcriptase assay using bacteriophage MS2 RNA as a template. *J Virol Methods* 2003; 109: 203-7.
19. Ma H, Bell KN, Loker RN. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Mol Ther-Methods Clin. Dev* 2021; 20: 152-68.
20. de Gonzalo-Calvo D, Marchese M, Hellemans J, Betsou F, Skov Frisk NL, Dalgaard LT, *et al.* Consensus guidelines for the validation of qRT-PCR assays in clinical research by the CardioRNA consortium. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2022; 24: 171-80.
21. Schröder HM, Niebergall-Roth E, Norrick A, Esterlechner J, Ganss C, Frank MH, *et al.* Drug Regulatory-Compliant Validation of a qPCR Assay for Bioanalysis Studies of a Cell Therapy Product with a Special Focus on Matrix Interferences in a Wide Range of Organ Tissues. *Cells* 2023; 12: 1788.
22. Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends Biotechnol* 2019; 37: 761-74.
23. 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; 12: 1-6.
24. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* [Internet]. 2020 Jan 23 [cited 2025 Jul 28]; 25(3). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.



25. Souto S, Oliveira JG, López-Vázquez C, Bandín I, Dopazo CP. Designing and Validation of a Droplet Digital PCR Procedure for Diagnosis and Accurate Quantification of Nervous Necrosis Virus in the Mediterranean Area. *Pathogens* 2023; 12: 1155.
26. Suo T, Liu X, Feng J, Guo M, Hu W, Guo D, *et al.* ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. *Emerg microbes & infect* 2020; 9: 1259-68.
27. Ding J, Xu X, Deng Y, Zheng X, Zhang T. Comparison of RT-ddPCR and RT-qPCR platforms for SARS-CoV-2 detection: Implications for future outbreaks of infectious diseases. *Environ Int* 2024; 183: 108438.
28. US Food and Drug Administration. 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]. Silver Spring (MD): FDA; 2010 [cited 2025 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/media/78428/download>.
29. Center for Biologics Evaluation and Research. Q5A viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin [Internet]. Silver Spring (MD): US FDA; 2024 Jan [cited 2025 Jul 28]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q5ar2-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-or-animal-origin>.
30. Rodríguez RA, Pepper IL, Gerba CP. Application of PCR-Based Methods To Assess the Infectivity of Enteric Viruses in Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 297-307.
31. Ahmed W, Smith WJM, Metcalfe S, Jackson G, Choi PM, Morrison M, *et al.* Comparison of RT-qPCR and RT-dPCR Platforms for the Trace Detection of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater. *ACS ES T Water* 2022; 2: 1871-80.
32. Shinde M, Lavania M, Rawal J, Chavan N, Shinde P. Evaluation of droplet digital qRT-PCR (dd qRT-PCR) for quantification of SARS CoV-2 RNA in stool and urine specimens of COVID-19 patients. *Front Med (Lausanne)* [Internet]. 2023 Jun 26 [cited 2025 Jul 26]; 10: 1148688. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2023.1148688/full>.
33. Chinese Center for Food and Drug Inspection. Common problems and technical requirements of replication-competent lentivirus detection [Internet]. 2024 Dec [cited 2025 Apr 11]. Available from: <https://www.ccfdie.org/en/fgflf/webinfo/2024/12/1732613154516555.htm>.
34. Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Supplemental guidance on testing for replication-competent retrovirus in retroviral vector-based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors [Internet]. *Hum Gene Ther*. 2001 Feb 10 [cited 2025 Jun 11]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11177567/>.
35. European Medicines Agency. Virus safety evaluation of biotechnological investigational medicinal products – Scientific guideline [Internet]. London: EMA; 2009 Feb 01 [cited 2025 Apr 11]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/virus-safety-evaluation-biotechnological-investigational-medicinal-products-scientific-guideline>.