
การตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 ในวัคซีนป้องกันวัณโรค ที่ผลิตในประเทศไทย โดยวิธี Real-Time PCR

วิริยามาศย์ เจริญคุณธรรม* สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์* นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา** และสุภาพร ภูมิอมร*
*สถาบันชีววัตถุ **สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 ในวัคซีนป้องกันวัณโรคที่ผลิตในประเทศไทย ยังไม่มีการดำเนินการ จึงได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) เพื่อตรวจหาปริมาณสายพันธุ์ย่อยของเชื้อในวัคซีนที่ผลิตจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทยใน ปี พ.ศ. 2555 2557 และ 2558 จำนวน 15 รุ่นการผลิต จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ >0.99 ค่าความเที่ยงตรงมีสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน <10% และความถูกต้องมีค่าการคืนกลับอยู่ระหว่าง 105-130% โดยการตรวจหาเชื้อสายพันธุ์ย่อยในวัคซีน พบว่ามี subtype II น้อยกว่า 10% ในวัคซีน 12 รุ่น และมีค่ามากกว่า 10% ในวัคซีน 3 รุ่นที่ผลิตในปี 2555 จากการศึกษาี้แสดงว่าวิธี Real-Time PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 ในวัคซีน และวัคซีน BCG ของไทยมีเชื้อ BCG ทั้งสองสายพันธุ์ย่อย

Corresponding author E-mail: wiriya.c@dmsc.mail.go.th

Received: 15 August 2018

Revised: 20 December 2018

Accepted: 28 March 2019

บทนำ

วัคซีน BCG เป็นวัคซีนป้องกันวัณโรคชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ ที่ใช้ในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520^(1,2,3) ใช้ฉีดเข้าทางชั้นผิวหนังให้กับเด็กแรกเกิด ปัจจุบันวัคซีนที่ผลิตในประเทศไทยโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ผลิตจากเชื้อ *Mycobacterium bovis* BCG สายพันธุ์ Tokyo 172-1 ที่ได้รับมาจากประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2531⁽⁴⁾ ซึ่งเป็นหนึ่งในสามสายพันธุ์หลักที่มีการใช้กันทั่วโลกมากที่สุดผ่านการจัดหาสนับสนุนโดย UNICEF อีกสองสายพันธุ์ ได้แก่ Danish 1331 และ Russian BCG-I ทั้งนี้มีรายงานว่าสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตวัคซีนในปัจจุบันมีไม่ต่ำกว่า 14 สายพันธุ์ ซึ่งมีที่มาจากเชื้อตั้งต้นที่เดียวกันคือ Pasteur Institute of Paris และนำไปเพาะเลี้ยงผลิตต่อ จนเกิดการเปลี่ยนแปลงทางยีนที่ต่างกัน^(5,6,7,8) ในปี พ.ศ. 2544 มีรายงานว่าเชื้อ BCG สายพันธุ์ Tokyo 172 ที่ใช้ผลิตวัคซีนของประเทศไทยประกอบด้วยสายพันธุ์ย่อย 2 ชนิดคือ subtype I และ subtype II⁽⁹⁾ ที่สามารถจำแนกความต่างกันทาง phenotype และ genotype โดย subtype I มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7H10 agar และมีการขาดหายไปของดีเอ็นเอ 22 คู่เบส (base pairs: bp) ในบริเวณ Rv3405c (transcriptional regulatory protein) ของ Region of difference (RD)16 ขณะที่ subtype II มีลักษณะโคโลนีแบบหยาบ และไม่มีการขาดหายไปของดีเอ็นเอในตำแหน่งดังกล่าว subtype I มีความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและในอวัยวะหนูทดลอง สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า subtype II อีกทั้งมีปริมาณสัดส่วนเชื้อในวัคซีนมากกว่า 90% ซึ่งเป็นไปได้ว่าคุณสมบัติ high viability และทนต่อความร้อนของเชื้อ BCG Tokyo 172 นั้นจะเป็นคุณสมบัติของ subtype I^(10, 11) การเพิ่มขึ้นของ subtype I อาจเกิดจาก subtype II มีการกลายพันธุ์ภายหลังจากการนำเชื้อ BCG เข้าประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี พ.ศ. 2467 ซึ่งการขาดหายไปของดีเอ็นเอที่บริเวณ RD16 นี้ไม่พบใน BCG substrains อื่นๆ⁽¹²⁾

ข้อมูลการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ภายหลังได้รับวัคซีน จากคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ที่ได้ติดตามในช่วง 10 ปี ระหว่าง พ.ศ. 2550–2559 พบว่ามีอาการต่อมน้ำเหลืองอักเสบ (Lymphadenitis) รวมทั้ง BCG osteitis และ Disseminated BCG disease โดยมีข้อสังเกตว่าปี 2553 และ 2554 มีจำนวนผู้ป่วยเกิดอาการไม่พึงประสงค์สูงกว่าช่วงที่ผ่านมาอย่างชัดเจน ซึ่งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและผู้ผลิตได้ร่วมกันสอบสวนหาสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการข้างเคียงโดยมีสมมติฐานว่าสาเหตุอาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น เทคนิคการฉีดที่ไม่ถูกต้องอาจฉีดลึกเกินหรือฉีดในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสม ปริมาตรของวัคซีนที่ฉีดต่อครั้ง 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าวัคซีนบริษัทอื่นที่ใช้เพียง 0.05 มิลลิลิตร คุณภาพวัคซีนมีการเปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งอาจเกิดจากภาวะสุขภาพภูมิคุ้มกันของผู้ที่ได้รับวัคซีนแต่ละคน ในส่วนของคุณภาพวัคซีนนั้นมีการตรวจสอบและยืนยันแล้วว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการผลิตและผลการควบคุมคุณภาพยังสม่ำเสมอคงเดิม⁽¹³⁾ และในปลายปี พ.ศ. 2558 มีรายงานการศึกษาของ Wada T. และคณะเกี่ยวกับปริมาณของ subtype I และ subtype II ของวัคซีน BCG รายงานว่า วัคซีนจากประเทศไทยตรวจแล้วพบเป็นเชื้อ BCG subtype II ทั้งหมด โดยไม่พบ subtype I ขณะที่วัคซีน BCG ของประเทศญี่ปุ่นตรวจพบ subtype II ไม่เกิน 5% และวัคซีนของประเทศไทยได้พบมี subtype II ประมาณ 40%⁽¹⁴⁾ จึงทำให้เกิดข้อสงสัยในคุณภาพวัคซีนเกี่ยวกับปริมาณของสายพันธุ์ย่อยในวัคซีนของประเทศไทยว่ามี subtype II ที่สูงแตกต่างจากวัคซีนประเทศอื่นหรือไม่ แต่เนื่องจากการตรวจสอบคุณภาพของวัคซีน BCG ตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกไม่ได้กำหนดให้ตรวจหาปริมาณของสายพันธุ์ย่อยของเชื้อในการผลิตและการควบคุมคุณภาพของวัคซีน BCG⁽⁵⁾ จึงยังไม่มีวิธีในการตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยในห้องปฏิบัติการภาครัฐและผู้ผลิตของประเทศไทย

การศึกษานี้ได้พัฒนาและประเมินความถูกต้องเหมาะสมของวิธี Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real time-PCR) ที่ใช้ตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 ในวัคซีน และทำการตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อในวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศ ในปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างและเชื้อมาตรฐาน

วัคซีน BCG สายพันธุ์ Tokyo 172-1 ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย จำนวน 15 รุ่นการผลิตที่ผลิตปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558 โดยแต่ละปีทดสอบตัวอย่างวัคซีน จำนวน 5 รุ่นการผลิต

เชื้อ BCG Tokyo 172 subtype II สายพันธุ์ BCG/pSO246 lot 29092000 จากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งมี pSO246 plasmid ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Kanamycin ใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน subtype II

ดีเอ็นเอของ BCG Tokyo 172 subtype I และ subtype II จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมในการตรวจสอบ subtype ด้วยวิธี PCR

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรุ่น ProFlex™ PCR System และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงรุ่น QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System ของ Applied Biosystems ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Spectrophotometer) รุ่น Nanodrop 2000/2000c ของ Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation system) รุ่น GeneSnap ของ Syngene ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) รุ่น MUPID-eXU ของ Advance ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Agarose, Ethidium bromide, 10x TE buffer, Phosphate buffer saline, TE buffer pH 8.0 low EDTA (molecular biology grade), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) และ Proteinase K (recombinant, PCR grade) ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) และ RNase A solution (Cat.No. A7973) ผลิตภัณฑ์ของ Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา TBE Buffer และชุดน้ำยาสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) KAPA 2G Fast Multiplex PCR Kit (Cat.No. KK5801) ผลิตภัณฑ์ของ Kapabiosystems ประเทศสหรัฐอเมริกา ชุดน้ำยาสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา Real-Time PCR, QPCR Probe Master Mix LRox (Cat. No. BR0500502) และ 50 bp DNA Ladder (Cat. No. BR0800400) ผลิตภัณฑ์ของ Biotech rabbit ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

อาหารเลี้ยงเชื้อ Middlebrook 7H9 broth (Cat.No. 271310) และอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycobacteria 7H11 agar (Cat.No. 283810) ของ Difco TM, BD ประเทศสหรัฐอเมริกา เตรียมตามวิธีที่ระบุในเอกสารกำกับของผู้ผลิต^(15,16) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ BCG subtype I สำหรับ subtype II เติมนานามัยซิน ในอาหารให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลาย Sauton เตรียมตามวิธีที่ระบุในวิธีมาตรฐานการตรวจสอบความแรงและความคงตัวของวัคซีน BCG⁽¹⁷⁾

การออกแบบ Primer และ Probe สำหรับการตรวจด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Real-Time PCR

Primer สำหรับตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อบีซีจีด้วยวิธี PCR และ Real-Time PCR ออกแบบโดยอาศัยความต่างระหว่าง 2 subtypes ในตำแหน่ง RV3405c ของ RD16 region ซึ่ง Primer สำหรับตรวจสอบด้วยวิธี PCR อ้างอิงตำแหน่งจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Mycobacterium bovis* BCG strain Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome, Query ID: CP014566.1⁽¹⁸⁾ แสดงในตารางที่ 1 และ murB-Fw และ murB-Rv เป็น primer สำหรับตรวจสอบ *murB* ซึ่งเป็น housekeeping gene ของเชื้อ BCG

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง และคุณสมบัติของ Primer โดยวิธี PCR

Primer	Sequence 5' to 3'	Position*	Tm (°C)	%GC
BCG-RD16-Fw	CGTTCGATGATGTCAGCGG	3809348-3809366	60.3	57.89
BCG-RD16-Rv	CAAGGACCAACTGGTTGGGG	3809399-3809418	62.7	60.00
murB-Fw	GATAGTGCCGCTCGCTTTTC	3799061-3799080	56.92	55.00
murB-Rv	GTAGTTGGAGGACGGCATGAC	3799169-3799189	58.37	57.14

*อ้างอิง *Mycobacterium bovis* BCG strain Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome, Query ID: CP014566.1

สำหรับการตรวจด้วยวิธี Real-Time PCR ออกแบบ primer และ probe 2 ชุด คือ ชุดที่ใช้ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของ subtype II ประกอบด้วย BCG I/II-Fw primer และ BCG II-Rv primer และตรวจวัดโดยใช้ RD16-probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FAM และชุดที่ใช้ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ BCG ทั้งหมดประกอบด้วย subtype I และ subtype II โดยออกแบบให้ primer และ probe จับอยู่ในตำแหน่งของ *murB* gene ซึ่งเป็นยีนที่จำเป็นเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ peptidoglycan ของผนังเซลล์ของเชื้อ *Mycobacterium*⁽¹⁹⁾ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ห่างจากส่วน RD16 มา 10 kb ใช้ murB-Fw และ murB-Rv primer และใช้ murB-probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง NED ตำแหน่งของ primers และ probes ของวิธี Real-Time PCR อ้างอิงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* AF2122/97 complete genome, Query ID: BX248333.1⁽²⁰⁾ ซึ่งได้แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง และคุณสมบัติของ Primer โดยวิธี Real-Time PCR

Primer	Sequence 5' to 3'	Position*	Tm (°C)	%GC
BCG I/II -Fw	CGGGATATCCGTCCAGCAGTGCC	3777567-3777589	65.48	65.22
BCG II -Rv	CGAAGCTGACCAGACTGTTGCACTCC	3777648-3777673	64.40	57.69
murB-Fw	GATAGTGCCGCTCGCTTTTC	3767223-3767242	56.92	55.00
murB-Rv	GTAGTTGGAGGACGGCATGAC	3767331-3767351	58.37	57.14

*อ้างอิง *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* AF2122/97 complete genome, Query ID: BX248333.1

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และตำแหน่งของ Probe โดยวิธี Real-Time PCR

Probe	Sequence 5' to 3'	Position*
RD16-Probe	VICGGCTAAGACCCGCCCATGTCGGTCMGBNFQ	3777591-3777614
murB-Probe	NEDCGGCAAGAGTCGGATGCCGTAGTAGAAGMGBNFQ	3767246-3767273

*อ้างอิง *Mycobacterium bovis subsp.bovis* AF2122/97 complete genome, Query ID: BX248333.1

การเพาะเลี้ยงเชื้อจากวัคซีนเพื่อแยกโคโลนีเดี่ยวของ BCG Tokyo 172 subtype I และ subtype II

ละลายวัคซีน BCG ด้วยสารละลาย Sauton แล้วเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycobacteria 7H11 agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจสอบและเลือกโคโลนีเดี่ยวแยกแต่ละโคโลนีละลายในสารละลาย Sauton แล้ว subculture ต่อไปจนเห็นลักษณะโคโลนีของเชื้อมีลักษณะเดี่ยว จึงนำมาตรวจยืนยัน subtype I และ subtype II ด้วยวิธี PCR จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวโดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Middlebrook 7H9 broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ เติมน้ำ glycerol ให้มีความเข้มข้น 25% (v/v) แล้วเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การเตรียมดีเอ็นเอ BCG subtype I และ BCG subtype II

ทำการสกัด Genomic DNA⁽²¹⁾ โดยนำเชื้อ subtype I และ subtype II ที่เพาะข้างต้นปั่นตกตะกอนและล้างตะกอนด้วย 0.1x TE buffer จากนั้นละลายเชื้อด้วย 0.1x TE buffer นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แยกเซลล์ด้วย lysozyme ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นย่อยโปรตีนด้วย 10% SDS/proteinase K แล้วเติม 5M NaCl และสารละลาย CTAB/NaCl เพื่อกำจัดสารอื่น แล้วเติม chloroform/isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตูดส่วนใสด้านบนนำมากำจัด RNA ด้วย RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตูดส่วนใสด้านบนทิ้งแล้วเติมน้ำ cold 70% ethanol ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนด้วย 0.1x TE buffer วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ แล้วเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมการตรวจสอบสายพันธุ์และเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานของวิธี Real-Time PCR

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัคซีน BCG เพื่อตรวจหาสายพันธุ์ย่อยด้วยวิธี Real-Time PCR

ละลายวัคซีน BCG ด้วย TE buffer นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ตูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ปั่นล้างซ้ำ 5 ครั้ง แล้วเติม TE ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตูดส่วนใสด้านบนนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ย่อยด้วยเครื่อง QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System วิเคราะห์ผลโดยโปรแกรม QuantStudioTM Software V1.3

การตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อโคลนีเดียวด้วยวิธี **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบโดยปฏิกิริยา PCR ที่มีปริมาตรรวมทั้งหมด 12 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร BCG-RD16-Fw 0.5 μ M, BCG-RD16-Rv 0.5 μ M, murB-Fw 0.5 μ M และ murB-Rv 0.5 μ M ชนิดละ 0.6 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 1.6 ไมโครลิตร และ 2x master mix 6 ไมโครลิตร แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรม Pre-PCR ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที ให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 35 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturation step ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing step ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 15 วินาที และ chain elongation step ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เมื่อครบ 35 รอบ แล้วตามด้วย post-PCR ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาแยกขนาดด้วย gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2% (w/v) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ถ่ายภาพภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation โดย BCG subtype I และ subtype II ตรวจพบ band ที่ขนาด 71 และ 93 bp ตามลำดับ ขณะที่ *murB* gene ซึ่งเป็น house keeping gene ตรวจพบที่ขนาด 128 bp เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 bp

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ย่อย BCG Tokyo 172-1 ด้วยวิธี **Real-Time PCR**

ตรวจด้วยหลักการ TaqMan hydrolysis probe Real-Time PCR โดยใช้ primer และ probe 2 ชุด ตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 และ 3

การศึกษาสภาวะเหมาะสมของการทำปฏิกิริยาโดยดูความจำเพาะของการเพิ่มขยายสายพันธุ์ย่อยเป้าหมายเตรียมดีเอ็นเอ BCG subtype II โดยเจือจางดีเอ็นเอของ BCG subtype II ด้วย TE buffer pH 8.0 ให้มีความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน ส่วนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีใช้ดีเอ็นเอของ BCG subtype I และ subtype II ที่เจือจางให้มีสัดส่วน % ดีเอ็นเอของ BCG subtype I: BCG subtype II เป็น 95:5, 60:40 และ 5:95 ตามลำดับ แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวมแต่ละหลอด 15.85 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย DNA template ของสารมาตรฐาน (DNA subtype II) และวุ้นขึ้นตัวอย่างแยกหลอด หลอดละ 2 ไมโครลิตร โดยใส่สารในแต่ละหลอดประกอบด้วย 10 μ M BCG I/II-Fw และ 10 μ M BCG II-Rv อย่างละ 1.2 ไมโครลิตร 10 μ M murB-Fw 0.6 ไมโครลิตร 10 μ M murB-Rv 0.6 ไมโครลิตร 2 μ M RD16-Probe 1.5 ไมโครลิตร 2 μ M murB-Probe 0.75 ไมโครลิตร 2x qPCR master mix 7.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 0.5 ไมโครลิตร ตรวจปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System โดยโปรแกรม Pre-PCR ตั้งค่าที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 40 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturation step ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที annealing/chain elongation step ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที

คำนวณ % BCG subtype II = [ปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II (พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)] / ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของ BCG (พิโคกรัมต่อไมโครลิตร) x 100

โดยปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II วิเคราะห์ได้จากการใช้ชุด Primer (BCG I/II-Fw, BCG II-Rv) และ RD16-Probe ที่สามารถจับกับ BCG subtype II ซึ่งส่วน RD16 ไม่มีการขาดหายไปของ 22-bp ได้เท่านั้น ส่วนการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ BCG ทั้งหมดใช้ชุด Primer (murB-Fw, murB-Rv) และ murB-Probe ที่จำเพาะกับส่วน *murB* gene เป้าหมาย

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ทำการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ความเที่ยงตรง และความถูกต้อง

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (*Linearity and Range*) ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 พิกogramm ต่อไมโครลิตร ด้วยเครื่อง QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (C_T) กับความเข้มข้นของ DNA วิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (*Coefficient of determination, r^2*)

ความเที่ยงตรง (*Precision*) ตรวจสอบใน 2 หัวข้อ ได้แก่ การทำซ้ำในวันเดียวกัน (*repeatability*) โดยทำการวิเคราะห์หา % BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีน BCG รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 6 ขวด แต่ละขวด ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว วิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% coefficient of variation, %CV) และการทำซ้ำต่างวัน (*Intermediate precision*) โดยทำการวิเคราะห์หา % BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีน BCG รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 6 ขวด โดยแต่ละขวด ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ต่างวัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว วิเคราะห์หา %CV

ความถูกต้อง (*Accuracy*) ตรวจสอบค่าร้อยละการคืนกลับ (%*Recovery*) ของปริมาณดีเอ็นเอ BCG subtype II ในตัวอย่างที่เตรียมให้มีสัดส่วน % ดีเอ็นเอของ BCG subtype I: BCG subtype II ที่ 95:5, 60:40 และ 5:95 ทำการทดสอบ 6 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

คำนวณการคืนกลับ (% *Recovery*) ดังนี้

% *Recovery* = (% ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ที่วัดได้ / % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ที่ทราบค่า) x 100

การตรวจปริมาณของ % BCG subtype II ในวัคซีน BCG Tokyo 172-1 ด้วยวิธี Real-Time PCR

วิเคราะห์หา % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีน BCG ด้วยวิธี Real-Time PCR จำนวน 15 รุ่นการผลิต ที่ผลิตในปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558 โดยทดสอบรุ่นการผลิตตัวอย่างละ 3 ขวด ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

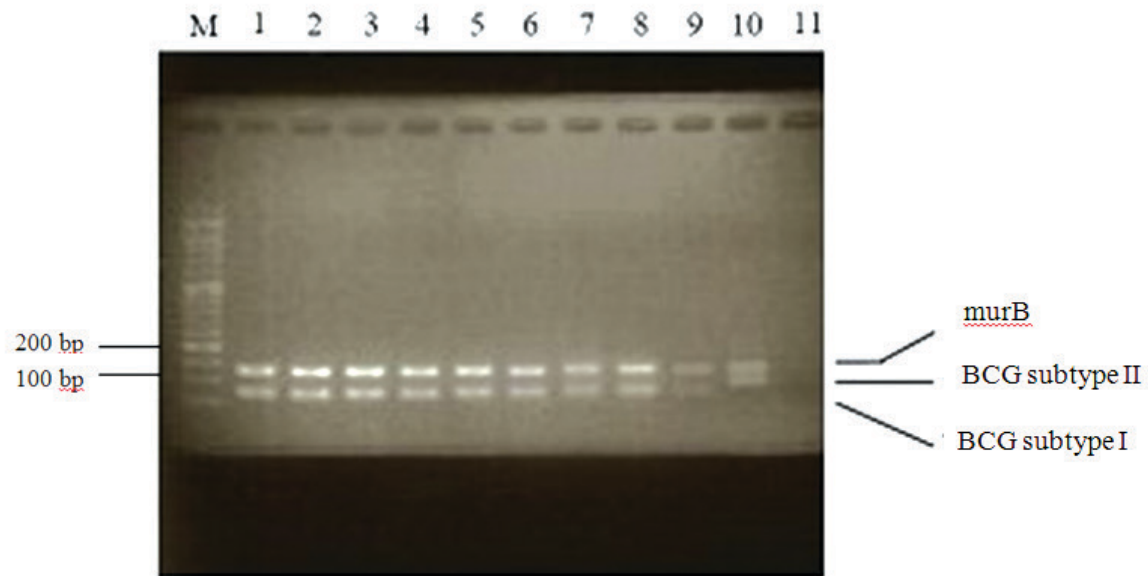
วิเคราะห์และแสดงโดยสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ผล

การเพาะเลี้ยงเชื้อและการตรวจสอบสายพันธุ์

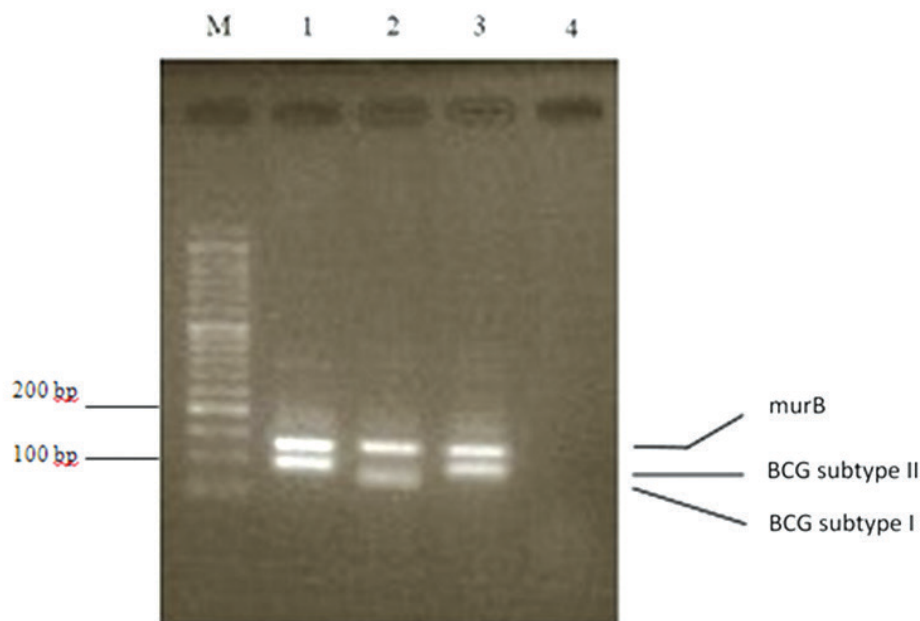
ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ BCG ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวัคซีน BCG บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycobacteria 7H11 agar พบว่าโคโลนีทั้ง 8 โคโลนีที่เลือกมา มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ มีสีเหลืองอ่อน เรียบ ขอบหยัก นูนตรงกลาง เล็กน้อย ส่วนเชื้อ BCG subtype II สายพันธุ์ BCG/pSO246 เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycobacteria 7H11 agar ที่มี kanamycin พบว่าโคโลนีมีลักษณะสีเหลืองอ่อน ขอบหยัก ย่นขรุขระทั้งโคโลนี

เมื่อตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยวิธี PCR (ภาพที่ 1) พบว่าทั้ง 8 โคโลนีที่เลือกมาจากการเพาะเลี้ยงวัคซีน มีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR เท่ากับ 71 bp แสดงว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ทั้งหมดเป็น BCG subtype I สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อสายพันธุ์ BCG/pSO246 พบว่ามีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR เท่ากับ 93 bp (ภาพที่ 2) แสดงว่าเป็น subtype II จึงนำไปใช้ศึกษาความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำและความถูกต้องของวิธี Real-Time PCR



ภาพที่ 1 ผลการตรวจสายพันธุ์เชื้อที่เพาะเลี้ยงจากวัคซีน BCG จากปฏิกิริยา PCR ที่นำมาแยกขนาดโดยใช้ gel electrophoresis บน 2% agarose

Lane M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 bp Ladder; Lane 1-8: ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากวัคซีน 8 โคโลนี Lane 9: ดีเอ็นเอของ BCG subtype I control; Lane 10: ดีเอ็นเอของ BCG subtype II control; Lane 11: negative control (น้ำกลั่น)

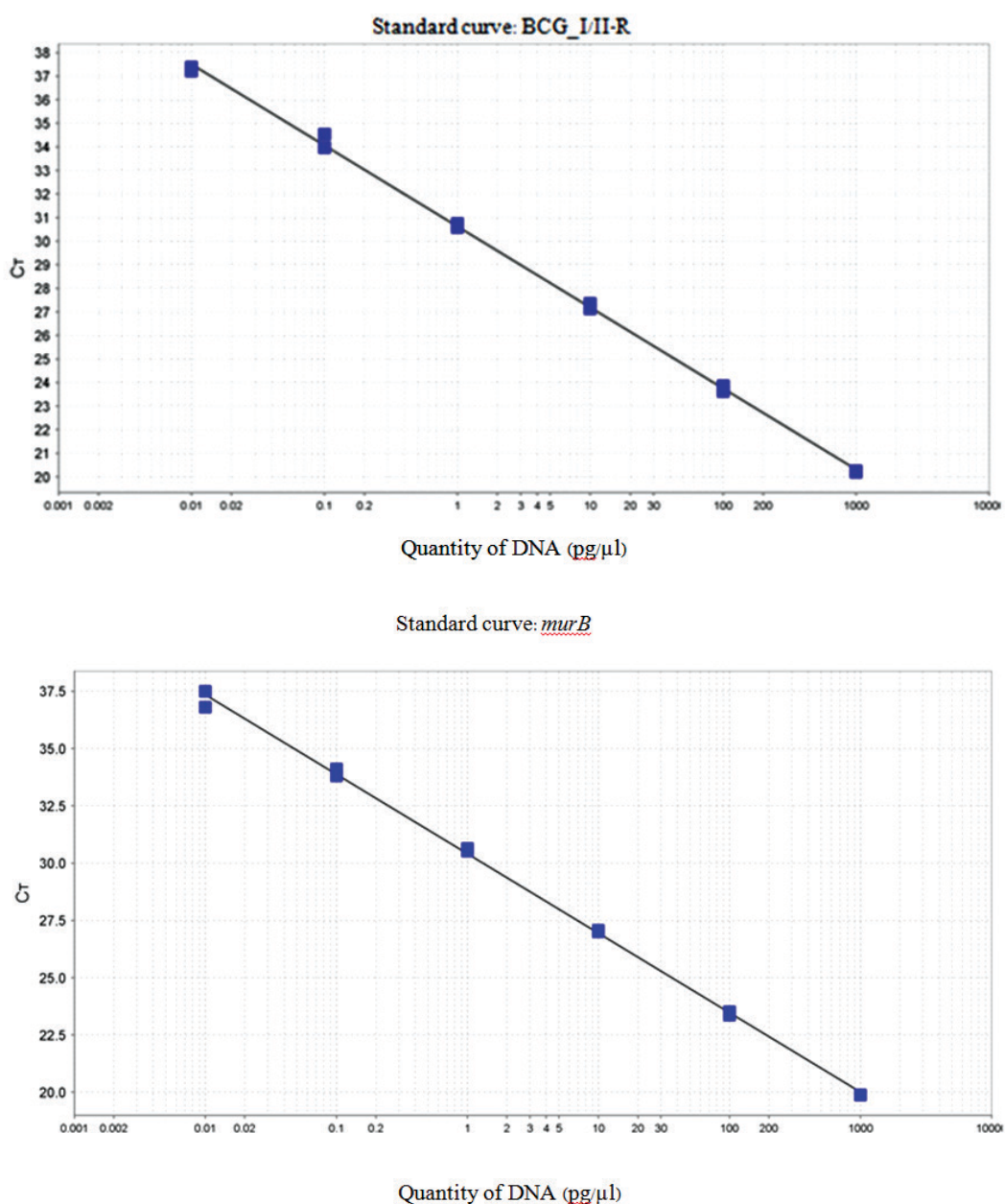


ภาพที่ 2 ผลการตรวจสายพันธุ์เชื้อ BCG /pSO246 จากปฏิกิริยา PCR ที่นำมาแยกขนาดโดยใช้ gel electrophoresis บน 2% agarose

Lane M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 bp Ladder; Lane 1: BCG/pSO246; Lane 2: ดีเอ็นเอของ BCG subtype I control; Lane 3: ดีเอ็นเอของ BCG subtype II control; Lane 4: negative control (น้ำกลั่น)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนา

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี Real-Time PCR ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ย่อยเชื้อ BCG พบว่ากราฟมาตรฐานที่เตรียมจาก BCG subtype II DNA มีความเป็นเส้นตรงในช่วงค่าความเข้มข้นของ DNA ระหว่าง 0.01-1,000 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ดังแสดงในภาพที่ 3 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (CT) กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอของส่วน RD16 target (บน) และ *murB* gene target (ล่าง) ผลวิเคราะห์ค่าของกราฟมาตรฐานจำนวน 6 ครั้ง แสดงในตารางที่ 4 พบว่ากราฟมาตรฐานของชุด RD16 target (BCG_I/II-R) มีค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ slope เท่ากับ -3.457 ± 0.083 , Y-Intercept เท่ากับ 31.093 ± 0.591 , r^2 เท่ากับ 0.998 ± 0.001 และ % efficiency เท่ากับ 94.741 ± 3.152 สำหรับกราฟมาตรฐานของชุด *murB* gene target มีค่า slope เท่ากับ -3.523 ± 0.069 , Y-Intercept เท่ากับ 30.699 ± 0.423 , r^2 เท่ากับ 0.996 ± 0.003 และ % efficiency เท่ากับ 92.312 ± 2.502 ตามลำดับ



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า cycle threshold (CT) กับปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.01 - 1,000 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร (pg/μl) ด้วยวิธี Real-Time PCR

ตารางที่ 4 ค่ากราฟมาตรฐานดีเอ็นเอของ BCG subtype II ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.01-1,000 พิโคกรัม ต่อไมโครลิตร โดยวิธี Real-Time PCR

ครั้งที่	r^2		Y-intercept		Slope		%efficiency	
	BCG_I/II-R	<i>murB</i>	BCG_I/II-R	<i>murB</i>	BCG_I/II-R	<i>murB</i>	BCG_I/II-R	<i>murB</i>
1	0.999	0.999	30.624	30.409	-3.438	-3.469	95.389	94.208
2	0.996	0.992	31.791	30.927	-3.324	-3.408	99.918	96.510
3	0.999	0.998	31.194	30.841	-3.520	-3.573	92.367	90.478
4	0.997	0.996	30.467	30.063	-3.541	-3.549	91.615	91.335
5	1.000	0.994	30.696	30.681	-3.410	-3.581	96.448	90.232
6	0.998	0.995	31.784	31.275	-3.510	-3.555	92.708	91.111
mean	0.998	0.996	31.093	30.699	-3.457	-3.523	94.741	92.312
SD	0.001	0.003	0.591	0.423	0.083	0.069	3.152	2.502

จากกราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอของ BCG subtype II แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถตรวจดีเอ็นเอของ BCG subtype II ได้ต่ำสุดในระดับ 0.01 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ผลการศึกษา precision ในหัวข้อ repeatability เมื่อทำการวิเคราะห์หา % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีนจำนวน 6 ขวด พบว่า % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II อยู่ในช่วงค่า 3.07-3.95%, mean±SD เท่ากับ 3.62±0.33% และ %CV เท่ากับ 9.09 (ตารางที่ 5) สำหรับผลการศึกษา intermediate precision พบ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II อยู่ในช่วงค่า 3.31-3.95%, mean±SD เท่ากับ 3.62±0.23 และ %CV เท่ากับ 6.32 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ความเที่ยงตรงของวิธี Real-time PCR ในการวิเคราะห์ปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ของวัคซีน BCG โดยทดสอบในวันและเวลาเดียวกัน (Repeatability)

ตัวอย่างวัคซีน	ดีเอ็นเอทั้งหมด ของ BCG (pg/μl)	ดีเอ็นเอ ของ subtype II (pg/μl)	% ดีเอ็นเอ ของ BCG subtype II
1	22.407	0.854	3.81
2	26.207	1.000	3.81
3	22.947	0.847	3.69
4	31.550	1.247	3.95
5	35.582	1.092	3.07
6	27.761	0.942	3.39
mean±SD			3.62±0.33
%CV			9.09

ตารางที่ 6 ความเที่ยงตรงของวิธี Real-time PCR ในการวิเคราะห์ปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ของวัคซีน BCG โดยทดสอบต่างวัน (Intermediate precision)

ครั้งที่	ดีเอ็นเอทั้งหมด ของ BCG (pg/μl)	ดีเอ็นเอ ของ subtype II (pg/μl)	% ดีเอ็นเอ BCG subtype II
1	22.583	0.818	3.62
2	33.918	1.339	3.95
3	24.665	0.815	3.31
4	39.578	1.456	3.68
5	40.053	1.543	3.85
6	27.491	0.964	3.51
mean±SD			3.62±0.23
%CV			6.32

ผลการศึกษา accuracy แสดง % recovery ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมให้มีสัดส่วนของ subtype I: subtype II จาก 95:5, 60:40 และ 5:95 พบว่าตัวอย่าง subtype II 5% สามารถตรวจ subtype II ได้ค่า mean เท่ากับ 6.49%, recovery เท่ากับ 130% ขณะที่ตัวอย่าง subtype II 40% สามารถตรวจได้ค่า mean เท่ากับ 44.43%, recovery เท่ากับ 111% และเมื่อตัวอย่าง subtype II เป็น 95% สามารถตรวจพบ subtype II ได้ค่า mean เท่ากับ 99.63 และ recovery เท่ากับ 105% แสดงรายละเอียดในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความถูกต้องของวิธี Real-time PCR ในการวิเคราะห์ปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II

% ดีเอ็นเอ BCG subtype I: subtype II	ตัวอย่าง	ดีเอ็นเอทั้งหมด ของ BCG (pg/μl)	ดีเอ็นเอของ subtype II (pg/μl)	% ดีเอ็นเอ ของ BCG subtype II	Mean	% recovery
95:5	1	18.229	1.160	6.37	6.49	130
	2	18.651	1.136	6.09		
	3	19.881	1.246	6.27		
	4	19.585	1.293	6.60		
	5	19.059	1.289	6.76		
	6	20.320	1.397	6.87		
60:40	1	18.738	8.254	44.05	44.43	111
	2	19.840	8.343	42.05		
	3	20.798	8.877	42.68		
	4	19.524	8.538	43.73		
	5	19.493	9.154	46.96		
	6	22.618	10.661	47.13		
5:95	1	17.514	17.262	98.56	99.63	105
	2	19.100	19.003	99.49		
	3	18.933	17.950	94.81		
	4	18.631	19.219	103.15		
	5	18.822	18.947	100.66		
	6	19.997	20.223	101.13		

ปริมาณของ % BCG subtype II ในวัคซีน BCG Tokyo 172-1

จากการนำตัวอย่างวัคซีน BCG ที่ผลิตปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558 จำนวนปีละ 5 รุ่นการผลิต มาตรวจหาปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ด้วยวิธี Real-Time PCR พบว่าวัคซีนที่ผลิตปี พ.ศ. 2555 มีค่าเฉลี่ย % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II อยู่ระหว่าง 7.04–15.25 ขณะที่วัคซีนผลิตปี พ.ศ. 2557 และ 2558 มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 4.98–7.63 และ 4.26–6.59 ตามลำดับ โดยมีค่า %CV ของแต่ละรุ่นการผลิตของทั้งสามปีอยู่ในช่วงค่า 1.46–10.11 ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศ

ปี พ.ศ.	รุ่นการผลิต	ขวดที่	% ดีเอ็นเอของ BCG subtype II	ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
2555	A	1	7.19	7.04	0.13	1.89
		2	6.96			
		3	6.96			
	B	1	10.40	10.31	0.15	1.46
		2	10.14			
		3	10.40			
	C	1	15.47	15.25	0.32	2.13
		2	14.88			
		3	15.41			
	D	1	9.12	8.55	0.58	6.73
		2	8.55			
		3	7.97			
	E	1	13.82	12.92	0.80	6.16
		2	12.31			
		3	12.63			
2557	F	1	5.20	5.15	0.18	3.50
		2	5.30			
		3	4.95			
	G	1	4.77	4.99	0.20	3.95
		2	5.15			
		3	5.05			
	H	1	5.22	4.98	0.34	6.80
		2	5.12			
		3	4.59			
	I	1	6.24	6.22	0.10	1.63
		2	6.11			
		3	6.31			
	J	1	7.79	7.63	0.15	1.99
		2	7.60			
		3	7.49			

ตารางที่ 8 ปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศ (ต่อ)

ปี พ.ศ.	รุ่นการผลิต	ขวดที่	% ดีเอ็นเอของ BCG subtype II	ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
2558	K	1	6.64	6.05	0.58	9.51
		2	5.49			
		3	6.02			
	L	1	5.04	5.37	0.54	10.11
		2	6.00			
		3	5.08			
	M	1	6.03	6.07	0.14	2.38
		2	5.95			
		3	6.23			
	N	1	6.80	6.59	0.41	6.28
		2	6.85			
		3	6.11			
	O	1	4.25	4.26	0.17	4.00
		2	4.09			
		3	4.43			

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเชื้อจากวัคซีน BCG เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยวของสายพันธุ์ย่อย BCG Tokyo 172 subtype I และ subtype II ที่ใช้เตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-Time PCR พบว่าเป็น BCG subtype I ทั้งหมด ซึ่งมีขนาดของ PCR amplicon น้อยกว่า BCG subtype II สอดคล้องกับการรายงานของ Honda I. และคณะ⁽¹⁰⁾ ที่รายงานลักษณะโคโลนีแบบเรียบและแบบหยาบ และพบการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ของ BCG Tokyo 172 subtype I แสดงให้เห็นว่าการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถแยก BCG subtype II ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจากวัคซีนแม้มีการ subculture ไปไม่ต่ำกว่า 8 ครั้ง ซึ่งอาจเกิดจากการที่สายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG ในวัคซีนส่วนใหญ่เป็น subtype I ซึ่งเป็น subtype ที่มีลักษณะเป็น “spreading colonies”⁽²²⁾ ทำให้ type I เจริญเติบโตได้ดีกว่า type II และสอดคล้องกับการรายงานของ Shibayama K. และคณะ⁽²³⁾ ที่พบ subtype II 19.5% ใน BCG Tokyo 172-1 และลดลงเหลือเพียง 3.6% เมื่อมีการ subculture ต่อมาเป็น Tokyo 172-2 แสดงว่าจำนวนครั้งของการ subculture ที่เพิ่มขึ้น สามารถส่งผลให้ปริมาณเชื้อ BCG Tokyo 172 subtype II ลดลง ทำให้การเพาะแยกเชื้อ subtype II จากวัคซีนทำได้ยาก นอกจากนี้ลักษณะจำเพาะของเชื้อ BCG ที่ผิวเซลล์มักเกาะกัน การแยกให้เป็นเชื้อเดี่ยวในการ subculture ต้องทำการ subculture มากกว่า 20 ครั้งขึ้นไป จึงจะสามารถแยกสายพันธุ์ที่ปนกันอยู่ได้ในการศึกษานี้จึงได้ใช้เชื้อ BCG Tokyo 172 subtype II สายพันธุ์ BCG/pSO246 ที่ตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและตรวจยืนยัน subtype ด้วย PCR เพื่อเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานของ subtype II

วิธี Real-Time PCR ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้มีการพัฒนาดัดแปลงมาจากวิธีของ Shibayama K. และคณะ⁽²³⁾ ในการตรวจหา subtype I และ subtype II โดยอาศัยความต่างระหว่าง 2 subtypes ในตำแหน่งของ RD16 region จากการใช้ primer และ probe ที่ออกแบบไว้ 2 ชุด คือ ชุดที่ใช้ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของ subtype II และชุดที่ใช้ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ BCG ทั้งหมด ทำให้สามารถคำนวณปริมาณของเชื้อ BCG subtype I ในวัคซีน BCG ได้

ผลการประเมินความถูกต้องเหมาะสมของวิธี Real-Time PCR พบว่ากราฟมาตรฐานของการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ มีความเป็นเส้นตรงในช่วงของการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ที่ช่วงความเข้มข้น 0.01–1,000 พิกोगรามต่อไมโครลิตร ซึ่งผลการตรวจสอบความแม่นยำและความเที่ยงตรงของวิธี แสดงให้เห็นว่าวิธี Real-Time PCR สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II ในวัคซีนตัวอย่างได้อย่างเที่ยงตรง มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต่ำ ทั้งการซ้ำในวันเดียวและต่างวันกัน วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II ได้ใกล้เคียงกับค่าจริง แต่เมื่อปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II มีระดับต่ำกว่า 5% ได้ค่าร้อยละการคืนกลับถึง 130 ซึ่งอาจเกิดจาก matrix ที่ใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานกับ matrix ที่ใช้ในการตรวจความแม่นยำนั้นต่างกัน กล่าวคือกราฟมาตรฐานดีเอ็นเอของ BCG subtype II นั้น *murB* gene target จะถูกเจือจางด้วยดีเอ็นเอของ BCG subtype II เพียงอย่างเดียว ขณะที่การศึกษาความแม่นยำ *murB* gene target จะถูกเจือจางด้วยดีเอ็นเอของ BCG subtype II และ subtype I ประกอบกับกราฟมาตรฐานของ *murB* gene ค่า copy number จะตกอยู่ในช่วง 10–100 พิกोगราม ทำให้ค่าเบี่ยงเบนค่อนข้างสูงในการตรวจวัดปริมาณที่ต่ำ จึงเป็นไปได้ที่จะตรวจพบปริมาณ subtype II ได้ค่าสูงกว่าค่าจริงในวัคซีน ซึ่งส่วนมากจะมี subtype II ต่ำกว่า 10%^(7,23)

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ subtype II ในวัคซีนที่ผลิตในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558 ทั้ง 15 รุ่นการผลิต พบว่าวัคซีน BCG ของประเทศไทยมีเชื้อสายพันธุ์ย่อยทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างจากวัคซีนที่ผลิตจากต่างประเทศ^(7,23) โดยพบว่ามี subtype II น้อยกว่า 10% ในวัคซีน 12 รุ่น และมี subtype II มากกว่า 10% ในวัคซีน 3 รุ่น ที่ผลิตในปี 2555 โดยมีค่าใกล้เคียงกันในรุ่นการผลิตเดียวกันและรุ่นที่ผลิตในปีเดียวกัน ทั้งนี้พบว่าวัคซีนที่ผลิตในปี พ.ศ. 2555 มีปริมาณและความเบี่ยงเบนระหว่างรุ่นการผลิตค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับวัคซีนที่ผลิตในปี พ.ศ. 2557 และ 2558 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าขั้นตอนการเลือกลักษณะโคโลนีของเชื้อเพื่อนำไปใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในกระบวนการผลิตวัคซีนปี พ.ศ. 2557 และ 2558 มีความเข้มงวดมากขึ้น จึงทำให้มีปริมาณ subtype II ในวัคซีนค่อนข้างต่ำคงที่และใกล้เคียงกัน สำหรับปี พ.ศ. 2556 ไม่มีการผลิตวัคซีนจึงไม่มีตัวอย่างนำมาศึกษา

ผลการตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG ในวัคซีนที่ผลิตในประเทศไทย ยืนยันได้ชัดเจนว่าวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศไทยนั้น ประกอบด้วยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ย่อย โดยวัคซีนส่วนใหญ่พบเชื้อ subtype II น้อยกว่า 10% จึงเป็นข้อมูลที่ตรงข้ามกับผลการศึกษาของ Wada T. และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่รายงานว่าวัคซีน BCG ที่ผลิตจากประเทศไทยเป็น BCG subtype II 100% จากข้อมูลนี้ได้นำไปใช้ยืนยันคุณภาพวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศไทยว่ามีสัดส่วนของสายพันธุ์ย่อยเชื้อ BCG ที่ไม่แตกต่างจากวัคซีนของต่างประเทศ จึงไม่น่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์หลังการใช้วัคซีนเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่ผ่านมา การสอบสวนหาสาเหตุของอาการไม่พึงประสงค์ที่เพิ่มขึ้นนั้นจึงควรพิจารณาปัจจัยอื่นด้วย

สรุป

ข้อมูลจากการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีแสดงให้เห็นว่าวิธี Real-Time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ BCG subtype II ในวัคซีนได้ถูกต้อง แม่นยำ และเมื่อนำมาใช้ตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยในวัคซีน BCG ที่ผลิตปี 2555, 2557 และ 2558 พบว่าวัคซีน BCG ของประเทศไทยมีเชื้อสายพันธุ์ย่อยทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างจากวัคซีนที่ผลิตจากต่างประเทศ โดยวัคซีนส่วนใหญ่มี subtype II น้อยกว่า 10% ข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์ใช้ยืนยันคุณภาพวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศไทย และอธิบายสัดส่วนของสายพันธุ์ย่อยเชื้อ BCG ในการสอบสวนหาสาเหตุการเกิดอาการไม่พึงประสงค์หลังได้รับวัคซีน ซึ่งวิธี Real-Time PCR ที่พัฒนาขึ้นจะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจติดตามสัดส่วนสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG ในวัคซีนเพื่อการควบคุมคุณภาพวัคซีนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.เดือนฉนอม พรหมชาติแก้ว ผู้ทรงคุณวุฒิด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (เทคโนโลยีชีวภาพ) ที่อนุเคราะห์เชื้อสายพันธุ์ BCG/pSO246 จากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ ขอคุณ รศ. สพญ. ดร.ศุภร พงษ์ลัดดา และนางสาวรัตตภา จินลิส ที่ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาแนะนำทำให้งานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และสถาบันวัคซีนแห่งชาติที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. กุลกัญญา โชคไพบูลย์กิจ, เกษวดี ลาภพระ, จุฑารัตน์ เมฆมัลลิกา, จิตติอร นาคบุญนำ, อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์, บรรณาธิการ. ใน : ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคปี 2556. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา; 2556. หน้า 15-6.
2. Bhunbhu T. Expanded programme on immunization in Thailand. Rev Infect Dis 1989; 11(Suppl 3): S514-7.
3. Muangchana C, Thamapornpilas P, Karnkawinpong O. Immunization policy development in Thailand: the role of the Advisory Committee on Immunization Practice. Vaccine 2010; 28 (Suppl 1): A104-9.
4. คณะศึกษาดูงานศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการผลิตและควบคุมคุณภาพวัคซีนบีซีจี. เอกสารรายงานการหาสาเหตุและแก้ไขปัญหาการเกิดอาการข้างเคียงหลังได้รับวัคซีนบีซีจีของประเทศ. วันที่ 1-2 มิถุนายน 2560. กรุงเทพฯ : Japan BCG Laboratory; 2560.
5. World Health Organization. WHO expert committee on biological standardization sixty-second report. WHO Technical report series 2013; 979: 137-60.
6. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Proc Natl Acad Sci 2007; 104: 5596-601.
7. Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. Whole genome sequence analysis of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. Vaccine 2009; 27: 1710-6.
8. Gomes LH, Otto TD, Vasconcellos EA, Ferrão PM, Maia RM, Moreira AS, et al. Genome sequence of Mycobacterium bovis BCG Moreau, the Brazilian vaccine strain against tuberculosis. J Bacteriol 2011; 193: 5600-1.
9. Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. Vaccine 2001; 19: 2146-51.
10. Honda I, Seki M, Ikeda N, Yamamoto S, Yano I, Koyama A, et al. Identification of two subpopulations of bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 172 substrain with different RD16 regions. Vaccine 2006; 24: 4969-74.
11. Gheorghiu M, Lagrange PH. Viability, heat stability and immunogenicity of four BCG vaccines prepared from four different BCG strains. Ann Immunol (Inst Pasteur) 1983; 134C: 125-47.
12. Seki M, Sato A, Honda I, Yamazaki T, Yano I, Koyama A, et al. Modified multiplex PCR for identification of Bacillus Calmette-Guérin substrain Tokyo among clinical isolates. Vaccine 2005; 23: 3099-102.

13. เอกสารรายงานการประชุมหรือโครงการวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับวัคซีนบีซีจี. วันที่ 3 พฤษภาคม 2559. นนทบุรี : สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข; 2559.
14. Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, et al. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette-Gue'rin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. *Sci Rep* 2015; 5: 18727. (9 p.).
15. Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol. [Online]. [cited 2018 Jun 20]; [2 screens]. Available from: URL: https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/212352.pdf.
16. Seven H11 Agars. [Online]. [cited 2018 Jun 20]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/283810.pdf.
17. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การตรวจสอบความแรงและความคงตัวของวัคซีนบีซีจี. ใน : วิษุตา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาสิน ไตรศิริวัฒน์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จตุรกีตตินันท์, คณะบรรณาธิการ. มาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพฯ : บริษัท Full Force จำกัด; 2558. หน้า 19.
18. *Mycobacterium bovis* BCG strain Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome NCBI Reference Sequence: NZ_CP014566.1. [Online]. 2019; [cited 2019 Mar 25]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NZ_CP014566.1?report=fasta.
19. Baulard AR, Gurdyal S, Besra GS, Brennan PJ. The cell-wall core of mycobacterium: structure, biogenesis and genetics. In: Ratledge C, Dale JW, editors. *Mycobacteria: molecular biology and virulence*. London: Blackwell Science Ltd; 1999. P. 244.
20. *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* AF2122/97 complete genome GenBank: BX248333.1. [Online] 2019; [cited 2019 Mar 25]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/BX248333.1?report=fasta>.
21. Isolation of Genomic DNA from Mycobacteria. [Online]. [cited 2017 Feb 2]; [2 screens]. Available from: URL: <http://www.moleculartrib.org/gb/pdf/protocols/Isolation.pdf>.
22. Osborn TW. BCG vaccine: and investigation of colony morphology from four different strains after their introduction as seed for vaccine preparation in four production laboratories. *J Biol Stand* 1983; 11: 19-27.
23. Shibayama K, Mochida K, Yagi T, Mori S, Arakawa Y, Yamamoto S. Quantification of two variant strains contained in freeze-dried Japanese BCG vaccine preparation by real-time PCR. *Biologicals* 2007; 35: 139-43.

Investigation of BCG Tokyo 172-1 Subpopulations in Tuberculosis Vaccine Produced in Thailand using Real-Time PCR

Wereyarmarst Jaroenkunathum* Sompong Sapsutthipas* Nuanjun Wichukchinda
and Supaporn Phumiamorn***

**Institute of Biological Products, **Medical Life Science Institute, Department of Medical Sciences,
Nonthaburi 11000, Thailand*

Abstract Subpopulations of BCG Tokyo-172-1 in tuberculosis vaccines manufactured in Thailand have not been investigated, therefore, a method using Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) was developed and validated to determine BCG Tokyo-172-1 subpopulations in 15 lots of vaccines manufactured in 2012, 2014 and 2015. Our validation results showed good performance on linearity with coefficient of determination (r^2) was greater than 0.99. The developed method demonstrated its precision and accuracy, as determined by percentages of coefficient of variance (CV) and recovery range, was <10 and 105-130, respectively. In addition, less than 10% of subtype II was found in 12 lots and more than 10% of subtype II was determined in 3 lots that were produced in 2012. Our study suggested that the established Real-Time PCR method was suitable to detect subpopulations of BCG Tokyo-172-1 and BCG vaccine produced in Thailand contained both subtypes.

Keywords: BCG Tokyo 172-1, tuberculosis vaccine, Real-Time PCR