

การตรวจหาสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสโดยวิธี Real-time Polymerase Chain Reaction

สุกัลยาณี ไชยมี สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์ จิรเดช ปัจฉิม และสุภาพร ภูมิอมร

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ เซลล์เพาะเลี้ยง Vero เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่องที่นำมาใช้ในการผลิตวัคซีนไวรัสหลายชนิดเนื่องจากมีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดมะเร็งและการติดเชื้อไวรัสแอบแฝง ทั้งนี้ขึ้นกับกระบวนการผลิต การทำให้บริสุทธิ์ และการตรวจสอบควบคุมคุณภาพที่ดี โดยปัจจุบันองค์การอนามัยโลกให้การยอมรับปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยงไม่เกิน 10 นาโนกรัมต่อโดสในผลิตภัณฑ์วัคซีน สถาบันชีววัตถุจึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หา DNA ตกค้างในวัคซีนด้วยวิธี Real-time PCR โดยตรวจหาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในตัวอย่างวัคซีนไวรัสสำเร็จรูปจำนวน 16 ตัวอย่าง และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณ DNA ตกค้างอยู่ระหว่าง 0.49-4.48 นาโนกรัมต่อโดส ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์กำหนด เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่า การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงการวิเคราะห์มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.990 ในทุกชุดการทดสอบ โดยช่วงวิเคราะห์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.03-3,000 พิโคกรัมต่อปฏิกิริยา วิธีมีความแม่นยำที่ดี สามารถตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่เติมลงไปในตัวทำลายวัคซีนได้ โดยมีค่าการคืนกลับที่ร้อยละ 87 มีความเที่ยงของวิธีดีเมื่อทำการทดสอบในวันและเวลาเดียวกัน มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนไม่เกินร้อยละ 25 และในการทดสอบความคงทนของวิธี ซึ่งใช้ผู้วิเคราะห์ 2 คน พบว่าผลในการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนรวมไม่เกินร้อยละ 25 แสดงว่าวิธีมีความคงทนดี สรุปได้ว่าวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ เมื่อนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์หา DNA ตกค้างในผลิตภัณฑ์วัคซีนเป็นวิธีที่มีความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำ ความเที่ยง และความคงทนของวิธีดี

บทนำ

เซลล์เพาะเลี้ยง Vero เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง (Continuous cell lineage) ที่เตรียมมาจากเซลล์ไต (kidney epithelial cell) ลิง African green monkey⁽¹⁾ สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนไวรัสเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1980 และองค์การอนามัยโลกได้รับรองว่าเป็นเซลล์ที่สามารถนำมาใช้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงในการผลิตวัคซีนสำหรับมนุษย์ได้⁽²⁾ ปัจจุบันเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนไวรัสอย่างแพร่หลาย ได้แก่ วัคซีนป้องกันโรคโปลิโอ วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอักเสบเฉียบพลัน วัคซีนไวรัสโรตา และวัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบนิดเอ เป็นต้น วัคซีนไวรัสต่างๆ เหล่านี้บางชนิดมีการนำมาจำหน่ายภายในประเทศไทยและใช้ในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคในปัจจุบัน เช่น วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอักเสบเฉียบพลันชนิดเชื้อตาย บางชนิดกำลังพัฒนาเพื่อการผลิตและจำหน่ายในอนาคต เช่น วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอักเสบเฉียบพลันชนิดเชื้อเป็น อย่างไรก็ตาม ถือว่าประเทศไทยยังไม่มีประสบการณ์ในการผลิตวัคซีนโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อจำหน่ายตั้งแต่ต้นน้ำจนถึงปลายน้ำ และเนื่องจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง ในดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid, DNA) ของเซลล์จึงมียีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งอยู่ ซึ่งหากในกระบวนการผลิตมีการกำจัดออกได้ไม่หมด และมีปริมาณ DNA ของเซลล์ตกค้าง (Residual DNA) ในผลิตภัณฑ์วัคซีนมากเกินไปอาจทำให้ผู้รับวัคซีนมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งได้⁽³⁾ นอกจากนี้ยังมีความเสี่ยงจากการติดเชื้อไวรัสแอบแฝง ซึ่งเป็นไวรัสประเภทที่มีการเพิ่มจำนวนโดยการแทรกสารพันธุกรรมเข้ากับเซลล์เจ้าบ้าน เช่น ไวรัสก่อโรคเอดส์ ไวรัสก่อโรคเริม ซึ่งอาจแฝงมากับ DNA ตกค้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ดังนั้น ในการผลิตวัคซีนไวรัสผู้ผลิตจึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบการปนเปื้อน DNA ตกค้างทั้งในขั้นตอนการผลิตจนถึงผลิตภัณฑ์วัคซีนสำเร็จรูปเพื่อให้มั่นใจว่าในผลิตภัณฑ์วัคซีนมีปริมาณ DNA ตกค้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงไม่มากเกินไปเกินเกณฑ์กำหนด โดยองค์การอนามัยโลกได้กำหนดมาตรฐานของปริมาณ DNA ตกค้างไว้ที่ไม่เกิน 10 นาโนกรัมต่อโดส⁽⁴⁾ สำหรับวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างในกระบวนการผลิต และในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปมีหลายวิธี เช่น วิธี Pico Green method⁽⁵⁾ วิธี hybridization⁽⁶⁾ วิธี Threshold⁽⁷⁾ และวิธีปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาพจริง (Real-time Polymerase Chain Reaction, Real-time PCR)⁽⁸⁾ ซึ่งวิธีการเหล่านี้เป็นวิธีการที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในผู้ผลิตวัคซีนที่มีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในการผลิต (cell-based vaccine) โดยผู้ผลิตจะเลือกใช้วิธีที่มีความไว (sensitivity) และเหมาะสมกับขั้นตอนการผลิต จนได้เป็นผลิตภัณฑ์วัคซีนสำเร็จรูป⁽⁸⁾ อย่างไรก็ตาม วิธีการเหล่านี้ยังไม่ได้ถูกกำหนดเป็นวิธีมาตรฐานของประเทศ และยังไม่ได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนในหน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐ สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ตกค้างโดยวิธี Real-time PCR มีผู้ทำการศึกษาไว้โดยมีการศึกษาความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range) การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) การทดสอบความเที่ยง (precision) การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ในการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง CHO (Chinese Hamster Ovary cells) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ชีววัตถุเพื่อการรักษา (biopharmaceutical products)^(9, 10) พบว่าเป็นวิธีที่มีความถูกต้องสามารถใช้ได้ดี มีความไว มีความจำเพาะ และใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์สั้น และสามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน การศึกษาวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาวิธีการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัส และศึกษาความถูกต้องของวิธี Real-time PCR เพื่อนำวิธีดังกล่าวมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

วัคซีนตัวอย่าง

ตัวอย่างวัคซีนที่นำมาทดสอบเป็นวัคซีนไวรัสสำเร็จรูปซึ่งมีการใช้เซลล์ Vero เป็นวัตถุดิบในการผลิต และนำมาส่งตรวจเพื่อขอรับรองรุ่นการผลิตในประเทศกับสถาบันชีววัตถุทั้งหมดจำนวน 16 ตัวอย่าง ได้แก่ วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 11 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้เป็นวัคซีนที่ผลิตในประเทศ 10 ตัวอย่าง และนำเข้า 1 ตัวอย่าง วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอึกเสบเจือชนิดเชื้อเป็นซึ่งเป็นวัคซีนนำเข้าจำนวน 4 ตัวอย่าง และวัคซีนรวม คอตีบ บาดทะยัก ไอกรณชนิดไม่มีเซลล์ โปลิโอชนิดฉีด อีบี และดับอักเสบบี (DTaP+IPV+HIB+HBV) ซึ่งเป็นวัคซีนนำเข้าจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นวัคซีนที่มีการใช้เซลล์ Vero ในการผลิต และนำมาส่งตรวจเพื่อขอรับรองรุ่นการผลิตในประเทศกับสถาบันชีววัตถุ

การสกัด DNA ของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จากตัวอย่างวัคซีน

ละลายตัวอย่างวัคซีนด้วยตัวทำละลายสำหรับวัคซีนชนิดนั้น ๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วสกัด DNA ของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยใช้ชุดน้ำยาสกัด DNA สำเร็จรูป PrepSEQ® Residual DNA sample preparation kit (Life Technologies, Applied biosystems®, USA) โดยนำตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ proteinase K buffer/proteinase K mix ปริมาตร 70 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปลอຍให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติม lysis buffer ปริมาตร 360 ไมโครลิตร เติม magnetic particle ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ binding solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นปั่นผสม นาน 5 นาที นำไปปั่นตกอย่างรวดเร็ว เป็นเวลา 15 วินาที นำหลอดตัวอย่างไปตั้งบน magnetic stand นาน 5 นาที ดูดส่วนใส (supernatant) ทิ้ง หลังจากนั้นล้าง DNA ด้วย wash solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง และใส่ elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้นปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดส่วนใส (eluted DNA) ซึ่งเป็นสารสกัด DNA นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

การตรวจหาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์ Vero โดยวิธี Real-time PCR

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยใช้ resDNASEQ® Quantitative DNA kits (Life Technologies, Applied biosystems®, USA) ซึ่งการเตรียมปฏิกิริยาทำโดยผสม DNA ตัวอย่างที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน reaction mix (ประกอบด้วย 10x primer/probe mix, 2x environmental master mix และน้ำกลั่น) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน MicroAmp® Fast optical 96-well reaction plates โดย 1 ตัวอย่างจะทำ 3 ซ้ำ (หยอดตัวอย่างจำนวน 3 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Applied Biosystems 7500 Fast instrument (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) และวิเคราะห์ผลการทดสอบโดยใช้ Applied Biosystems® 7500 System SDS Software ค่าจากการคำนวณโดยโปรแกรมที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากจำนวน 3 ซ้ำของตัวอย่าง

การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อใช้หาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์ Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสสำเร็จรูป

การสร้างกราฟมาตรฐานทำโดยเจือจาง DNA ควบคุมของเซลล์ Vero (Vero cell DNA control) ที่มีอยู่ในชุดน้ำยาสกัด resDNASEQ® Quantitative DNA Kits Part No. 4458444, Applied Biosystems ตั้งแต่ 3 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา - 30 เฟมโตกรัมต่อปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาของ DNA ควบคุมทุกครั้งที่มีการทดสอบ และ

จะต้องมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R^2) มากกว่า 0.98 สำหรับผลลบควบคุมจาก Negative Extraction Control (NEG) ใช้เป็น blank sample ซึ่งในการทดสอบนี้ใช้ตัวทำละลายวัคซีน (vaccine diluent) โดยการสกัดด้วย PrepSEQ® Residual DNA sample preparation kit (Life Technologies, Applied biosystems®, USA) ไปพร้อมกับตัวอย่าง เพื่อยืนยันว่าในน้ำยาที่ใช้สกัด DNA ไม่มี DNA ปนเปื้อนมา ส่วน Extraction/Recovery Control (ERC) ทำโดยเติม DNA ควบคุม ปริมาตร 10 พิโคกรัม ลงในตัวทำละลายวัคซีน จากนั้นทำการสกัดและทำปฏิกิริยาไปพร้อมกับตัวอย่าง เพื่อดูประสิทธิภาพของการสกัด DNA และการคืนกลับ (recovery) ของ DNA นอกจากนี้ในชุดทดสอบ resDNASEQ® Quantitative DNA kits ยังมี Internal Positive Control (IPC) ซึ่งเป็น DNA ที่มีลำดับเบสไม่ซ้ำกับ DNA ของเซลล์ Vero ผสมรวมอยู่ใน 2x environmental master mix ซึ่งจะควบคุมการทำปฏิกิริยาทุกครั้งของการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพหรือไม่

การทดสอบความถูกต้องของวิธี

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบของวิธี ทำการทดสอบใน MicroAmp® Fast Optical 96-well Reaction Plates โดยเริ่มจากเตรียม DNA ควบคุม ที่มีความเข้มข้น 3,000, 300, 30, 3, 0.3 และ 0.03 พิโคกรัมต่อหลุม ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ด้วยวิธี Real-time PCR โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง เครื่องจะทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (Ct) กับความเข้มข้นของ DNA ควบคุม และวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ออกมา ซึ่งต้องมีค่ามากกว่า 0.990

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy)

เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของวิธี โดยตรวจสอบค่าการคืนกลับ (% recovery) ซึ่งดำเนินการทดสอบโดยวิธีเติม Vero cell DNA control จำนวน 10 พิโคกรัม ลงในตัวทำละลายวัคซีน โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการสกัด DNA และตรวจหาปริมาณ Vero cell DNA ผลที่ได้นำมาวิเคราะห์หาค่าการคืนกลับ ซึ่งควรมีค่าอยู่ในช่วง 80-120% โดยคำนวณค่าการคืนกลับ ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{ปริมาณ Vero cell DNA ที่วัดได้} - \text{ปริมาณ Vero cell DNA จากตัวทำละลายวัคซีน}) \times 100}{\text{ค่าจริงของปริมาณ Vero DNA control}}$$

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธี (Precision)

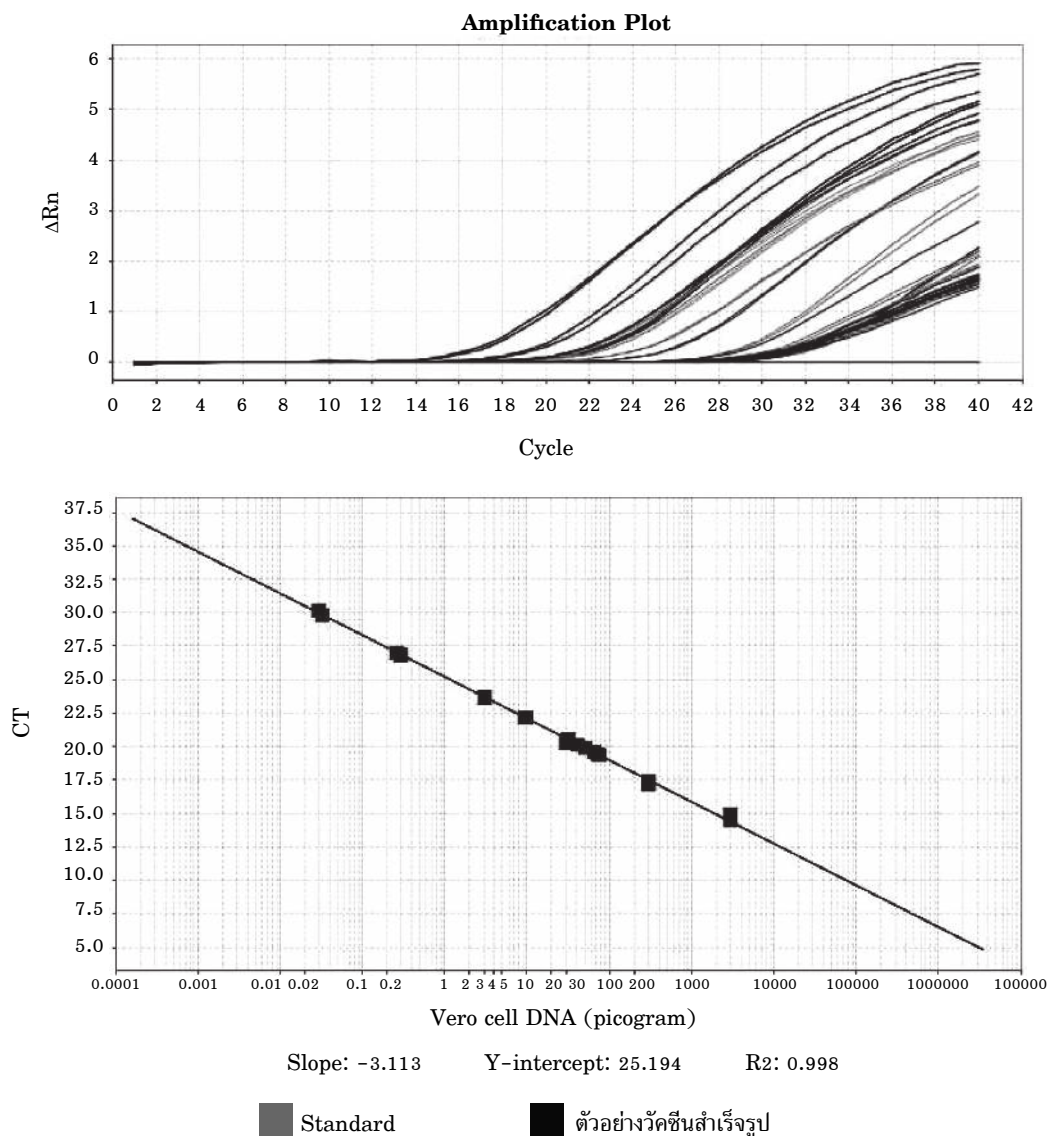
การตรวจสอบความเที่ยงของวิธี โดยทำการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 3 รุ่นการผลิต ในวันและเวลาเดียวกัน 3 ครั้ง แล้วนำผลการทดสอบที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% geometric coefficient of variation, GCV) ซึ่งควรมีค่าไม่เกิน 25%

การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

การทดสอบความคงทนของวิธี ทำโดยการทดสอบหาปริมาณ Vero cell DNA ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 1 รุ่นการผลิต โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน คนละ 3 ซ้ำ แล้วนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งควรมีค่าไม่เกิน 25%

ผล

จากการตรวจหาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสสำเร็จรูป จำนวน 16 ตัวอย่าง ได้แก่ วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอักเสบเฉียบพลัน และวัคซีนรวม คอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ชนิดไม่มีเซลล์ โปลิโอชนิดฉีด อีบ ดับอักเสบปี (DTaP+IPV+HIB+HBV) ด้วยวิธี Real-time PCR ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ปริมาณ DNA ตกค้างจากกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 1) จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารพันธุกรรมที่ตรวจพบในทุกตัวอย่างมีปริมาณที่ต่ำมากอยู่ระหว่าง 0.49 – 4.48 นาโนกรัม/โดส (ตารางที่ 1) และปริมาณของ DNA ที่ตรวจพบในแต่ละรุ่นการผลิตของวัคซีนชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกันให้ปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างที่แตกต่างกันไป แต่ค่าที่ได้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก



ภาพที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้ (ΔRn) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (บน) และผลการวิเคราะห์ปริมาณ DNA ตกค้าง ของวัคซีนไวรัสสำเร็จรูป จำนวน 16 ตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า cycle threshold (Ct) กับปริมาณของ Vero cell DNA control ที่ระดับความเข้มข้น 3,000, 300, 30, 3, 0.3 และ 0.03 พิโคกรัมต่อปฏิกิริยา ด้วยวิธี Real-time PCR (ล่าง)

ตารางที่ 1 การตรวจหาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์ Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสสำเร็จรูปโดยวิธี Real-time PCR

ลำดับที่	ตัวอย่าง	แหล่งผลิต**	ปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์ เพาะเลี้ยง Vero (นาโนกรัมต่อโดส)
1	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 1	L	1.15
2	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 2	L	0.68
3	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 3	L	1.85
4	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 4	L	1.73
5	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 5	L	0.49
6	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 6	L	1.76
7	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 7	L	3.36
8	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 8	L	0.24
9	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 9	L	0.67
10	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 10	L	1.84
11	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 11	I	<0.0015*
12	วัคซีนไขสมองอักเสบเจอี 1	I	< 0.00075
13	วัคซีนไขสมองอักเสบเจอี 2	I	< 0.00075
14	วัคซีนไขสมองอักเสบเจอี 3	I	0.0015
15	วัคซีนไขสมองอักเสบเจอี 4	I	0.0042
16	วัคซีนรวมคอตีบ บาดทะยัก ไอกรณชนิดไม่มีเซลล์ โปลิโอชนิดฉีด อีบี และตับอักเสบบี (DTaP+IPV+HIB+HBV)	I	<0.00075

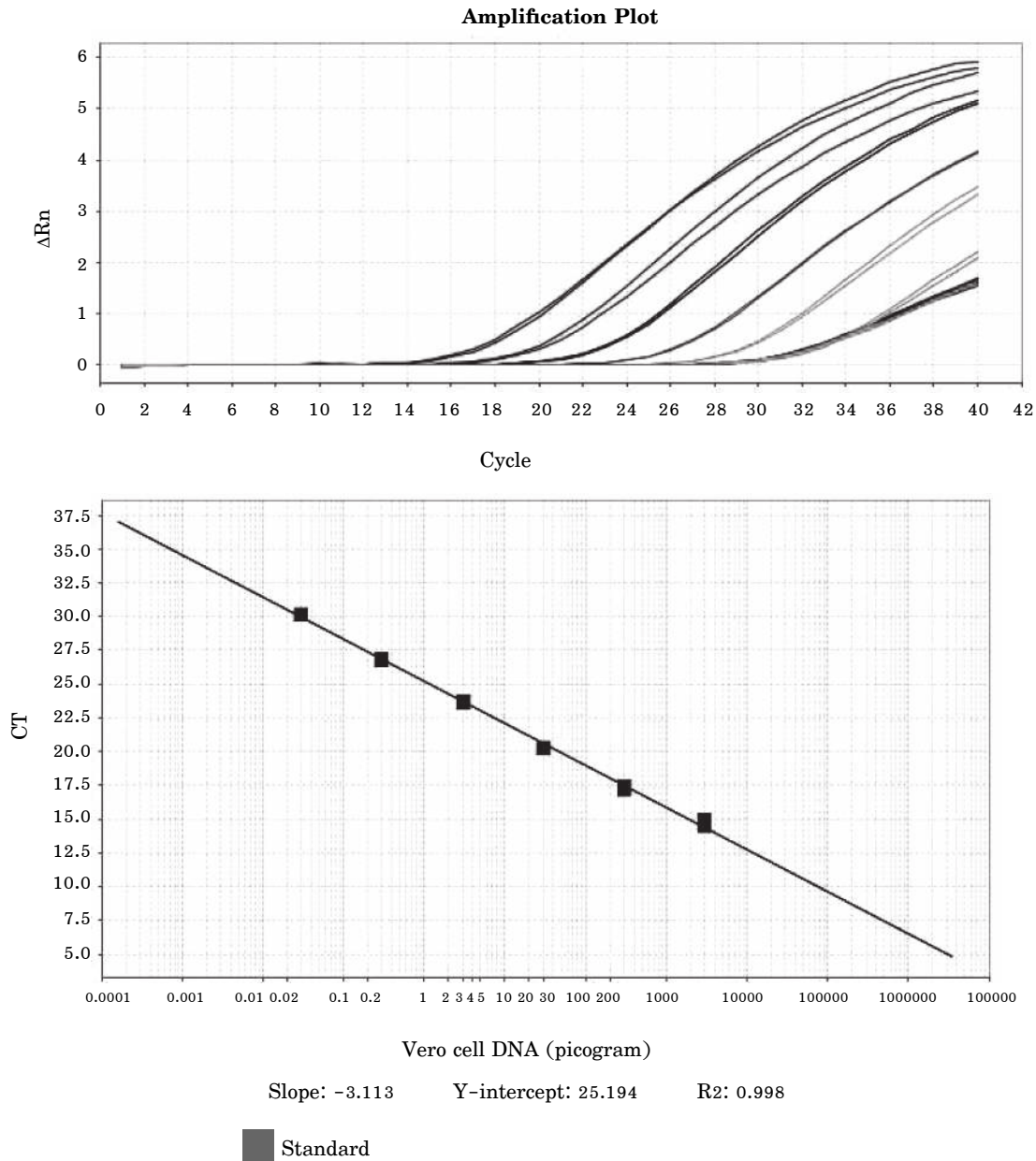
* ตัวอย่างวัคซีนทุกตัวอย่างมีปริมาตรบรรจุ 500 ไมโครลิตรต่อโดส ยกเว้นตัวอย่างที่ 15 มีปริมาตรบรรจุ 1 มิลลิลิตรต่อโดส และขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (limit of detection: LOD) ของชุดทดสอบ resDNASEQ[®] Quantitative Vero DNA เท่ากับ 0.0015 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

** L: หมายถึงวัคซีนที่ผลิตในประเทศ (Local vaccine) และ I: หมายถึงวัคซีนที่นำเข้าจากต่างประเทศ (Imported vaccine)

ผลการตรวจสอบความถูกต้องวิธี

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

จากการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ของกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยใช้ DNA ควบคุม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โปรแกรมจะคำนวณและสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้ (ΔR_n) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (amplification plot) และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (Ct) กับความเข้มข้นของ DNA ควบคุม (ภาพที่ 2) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของวิธีอยู่ที่ 0.998, 0.999 และ 0.999 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เครื่องจะทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (Ct) กับความเข้มข้นของ DNA ควบคุม และวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ออกมา ซึ่งต้องมีค่ามากกว่า 0.990



ภาพที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้ (ΔR_n) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (บน) และกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า cycle threshold (Ct) กับปริมาณของ Vero cell DNA control ที่ระดับความเข้มข้น 3,000, 300, 30, 3, 0.3 และ 0.03 พิโคกรัมต่อปฏิกิริยา ด้วยวิธี Real-time PCR (ล่าง)

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ โดยวิธี Real-time PCR ในการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์จากการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ DNA ควบคุมที่มีความเข้มข้น 3,000, 300, 30, 3, 0.3 และ 0.03 พิโคกรัมต่อหลอด ตามลำดับ

ครั้งที่ทำการทดสอบ	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
1	0.998
2	0.999
3	0.999

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธี

เมื่อทำการเติม DNA ควบคุมของเซลล์ Vero ปริมาณ 10 พิโคกรัม ลงในตัวอย่างละลายวัคซีน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าวิธีสามารถตรวจพบปริมาณของ DNA ได้โดยมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean, GM) ที่ 8.76 พิโคกรัม มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิต (Geometric Standard Deviation, GSD) ที่ 1.24 และค่าการคืนกลับที่ 87.6% (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบความแม่นยำของวิธี Real-time PCR ในการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ควบคุมของเซลล์ Vero ปริมาณ 10 พิโคกรัม ที่เติมลงในตัวอย่างละลายวัคซีน

ตัวอย่างที่	ปริมาณสารพันธุกรรมตกค้าง (นาโนกรัมต่อโดส)	GM	GSD	% Recovery
1	10.94	8.76	1.24	87.6 %
2	7.06			
3	8.70			

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธี

เมื่อทำการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 3 รุ่นการผลิต ในวันและเวลาเดียวกัน 3 ครั้งต่อรุ่นการผลิต พบว่าในวัคซีนตัวอย่างที่ 1 ตรวจพบปริมาณของ DNA จากเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตอยู่ที่ 2.56 นาโนกรัมต่อโดส มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิตที่ 1.31 นาโนกรัมต่อโดส และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ 27.14% ในวัคซีนตัวอย่างที่ 2 ตรวจพบปริมาณของ DNA จากเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตอยู่ที่ 3.59 นาโนกรัมต่อโดส มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิตที่ 1.19 นาโนกรัมต่อโดส และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ 17.16% และในวัคซีนตัวอย่างที่ 3 ตรวจพบปริมาณของ DNA จากเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตอยู่ที่ 4.58 นาโนกรัมต่อโดส มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิตที่ 1.12 นาโนกรัมต่อโดส และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ 11.40% (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบความเที่ยงของวิธี Real-time PCR ในการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 3 รุ่นการผลิต

ตัวอย่าง	ชุดที่	ปริมาณ DNA ตกค้าง (นาโนกรัมต่อโดส)	GM	GSD	%GCV
วัคซีนพิษสุนัขบ้า รุ่นการผลิตที่ 1	1	1.91	2.56	1.31	27.14
	2	3.21			
	3	2.75			
วัคซีนพิษสุนัขบ้า รุ่นการผลิตที่ 2	1	3.37	3.59	1.19	17.16
	2	4.36			
	3	3.16			
วัคซีนพิษสุนัขบ้า 3 รุ่นการผลิตที่ 3	1	5.18	4.58	1.12	11.40
	2	4.48			
	3	4.14			

การทดสอบความคงทนของวิธี

จากการทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า จำนวน 1 รุ่นการผลิต โดยผู้ตรวจวิเคราะห์ 2 คน คนละ 3 ซ้ำ ในวันและเวลาเดียวกัน พบว่ามีผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน คือ มีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตอยู่ที่ 3.99 และ 4.85 นาโนกรัมต่อโดส มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิตที่ 1.12 และ 1.11 และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ 11.25 และ 10.54 ในผู้วิเคราะห์คนที่ 1 และคนที่ 2 ตามลำดับ และเมื่อนำมาคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิตรวมของการทดสอบ จะมีค่าเท่ากับ 1.11 และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 10.42% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความคงทนของวิธี Real-time PCR โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้ารุ่นการผลิตเดียวกัน

ครั้งที่	ปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero (นาโนกรัมต่อโดส)	
	ผู้วิเคราะห์คนที่ 1	ผู้วิเคราะห์คนที่ 2
1	4.03	4.96
2	4.44	5.31
3	3.55	4.32
G.M.	3.99	4.85
Geo S.D.	1.12	1.11
Geo C.V.	11.25	10.54
G.M. (รวม)	4.40	
Geo S.D. (รวม)	1.11	
% Geo C.V. (รวม)	10.42	

วิจารณ์

ปัจจุบันวัคซีนไวรัสหลายชนิดมีการผลิตโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง ซึ่งคุณสมบัติของเซลล์เพาะเลี้ยงเหล่านี้ได้ได้รับการศึกษาแล้วว่าสามารถนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนได้ มีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดมะเร็งและการติดเชื้อไวรัสโดยไม่พึงประสงค์ โดยเฉพาะถ้าในการผลิตนั้นมีกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (purification) มีกระบวนการตรวจสอบควบคุมคุณภาพที่ดี และมี DNA ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตในผลิตภัณฑ์วัคซีนเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้โดยองค์การอนามัยโลก⁽¹¹⁾

เซลล์เพาะเลี้ยง Vero เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่องที่ผู้ผลิตนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนไวรัสอย่างแพร่หลายมากกว่า 80% ของวัคซีนไวรัสที่มีการจำหน่าย และใช้ในการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันของประชากรทั่วโลกผลิตจากเซลล์ชนิดนี้⁽³⁾ ซึ่งถือเป็นเซลล์ที่ทั่วโลกรู้จักกันดี และมีการศึกษาถึงความปลอดภัย สามารถนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนได้

เพื่อเป็นการตรวจสอบผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้และมีการขอรับรองรุ่นการผลิตในประเทศ รวมถึงได้พัฒนาวิธีการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสสำเร็จรูปด้วยวิธี Real-time PCR การศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจหาปริมาณ DNA ของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างวัคซีนไวรัสสำเร็จรูปจำนวน 16 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นวัคซีนที่มีการใช้เซลล์ Vero ในการผลิต และนำมาส่งตรวจเพื่อขอรับรองรุ่นการผลิตในประเทศกับสถาบันชีววัตถุโดยวิธีดังกล่าว ผลการทดลองพบ DNA ตกค้างในปริมาณ

ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้โดยองค์การอนามัยโลกในทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ แม้ว่าค่าปริมาณ DNA จะมีความแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์และต่างกันในแต่ละรุ่นการผลิต ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการสกัดเอาสารพันธุกรรมออกจากผลิตภัณฑ์ในแต่ละรุ่น หรือแม้แต่นับแต่รุ่นเดียวกันในกระบวนการผลิตวัคซีนนั้นไม่สามารถกำหนดค่าที่แน่นอนได้ จึงทำให้ปริมาณที่ตรวจพบมีความแตกต่างกัน

เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นวิธีที่เหมาะสม ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง จึงได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ที่สำคัญ ได้แก่

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ มากกว่า 0.990 ในทุกชุดการทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่า cycle threshold (Ct) กับปริมาณของ Vero cell DNA control มีความสัมพันธ์กัน และสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ได้ โดยช่วงวิเคราะห์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.03–3,000 พิโคกรัมต่อปฏิกิริยา

ในการตรวจสอบความแม่นยำของวิธี โดยการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ควบคุมของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จำนวน 10 พิโคกรัม ที่เติมลงในตัวอย่างวัคซีนนั้น คณะผู้ศึกษาวิจัยเลือกใช้ปริมาณ DNA นี้ เนื่องจากเป็นปริมาณที่ต่ำ ใกล้เคียงกับค่าที่ตรวจพบจริงในตัวอย่างวัคซีน และอยู่ในช่วงวิเคราะห์ที่เหมาะสม คือ อยู่ระหว่าง 0.03–3,000 พิโคกรัม จากการศึกษาพบว่า วิธีนี้สามารถตรวจหา DNA ควบคุมของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่เติมลงไปในตัวทำละลายวัคซีนได้ โดยมีค่าการคืนกลับที่ 87% ซึ่งอยู่ในช่วง 80–120% จึงถือว่าวิธีมีความแม่นยำดี

ส่วนการตรวจสอบความเที่ยงของวิธีนั้น ใช้ตัวอย่างวัคซีนในการทดสอบเพื่อให้มีสภาวะใกล้เคียงกับเมื่อต้องการทำการทดสอบในตัวอย่างวัคซีนจริง ๆ โดยคัดเลือกจากวัคซีนตัวอย่างจำนวน 16 ตัวอย่าง ที่ทำการศึกษามาแล้ว ในขั้นต้น และมีปริมาณของ DNA ตกค้างในระดับที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้จำนวน 3 รุ่นการผลิต เมื่อทำการทดสอบในวันและเวลาเดียวกัน (within-day variation) มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ 27.14%, 17.16% และ 11.40% ตามลำดับ ซึ่งตามที่กำหนดไว้ควรมีค่าไม่เกิน 25% แต่จะเห็นว่าในตัวอย่างที่ 1 ของวัคซีนพิษสุนัขบ้าที่นำมาใช้ในการศึกษาความเที่ยงนั้นมีค่าเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ในขณะที่อีกสองตัวอย่างมีค่าไม่เกินเกณฑ์กำหนด อย่างไรก็ตามในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนนี้ เป็นการวิเคราะห์หาสารซึ่งมีปริมาณน้อยมากในผลิตภัณฑ์วัคซีน มีหน่วยเป็นพิโคกรัม และนาโนกรัม ทำให้มีผลต่อการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนได้ แต่จากผลการทดสอบมีค่าไม่ต่างจากเกณฑ์กำหนดมากนัก และ 2 ใน 3 ตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์มีค่าผ่านเกณฑ์ จึงถือว่าเป็นวิธีมีความแปรปรวนของผลการทดสอบน้อย แสดงว่าวิธีมีความเที่ยงดี

ในการทดสอบความคงทนของวิธี ซึ่งใช้ผู้วิเคราะห์ 2 คนในการทดสอบ พบว่าผลในการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ตกค้างมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าวิธีมีความคงทนดี

การศึกษาความถูกต้องของวิธี Real-time PCR ในการตรวจหา DNA ตกค้างนี้เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้⁽¹²⁾ และเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง CHO (Chinese Hamster Ovary cells) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ชีววัตถุเพื่อการรักษา (biopharmaceutical products)^(9, 10) แต่ยังคงขาดการตรวจสอบความถูกต้องในบางพารามิเตอร์ ได้แก่ การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) แต่เนื่องจากชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้ในการศึกษานี้ได้มีการกำหนดขีดจำกัดของการตรวจพบไว้ที่ 0.0015 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้โดยองค์การอนามัยโลก ทางคณะผู้ทำการศึกษายังจึงไม่ได้ทำการศึกษาในสองพารามิเตอร์นี้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาต่อไป หากมีการศึกษาเพิ่มเติมในสองพารามิเตอร์นี้ ก็จะช่วยให้การศึกษาความถูกต้องของวิธีมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

สรุป

จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์หา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสสำเร็จรูป และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ความแม่นยำ ความเที่ยง และความคงทนของวิธีแสดงให้เห็นว่าวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่ดี มีความเหมาะสม สามารถนำมาใช้สำหรับตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสได้ หากในอนาคตมีการศึกษาในสองพารามิเตอร์ ได้แก่ การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณเพิ่มเติมอาจนำมากำหนดเป็นวิธีมาตรฐานภายในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคได้ และการศึกษาสามารถใช้เป็นแนวทางในการขยายขอบข่ายการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ ในผลิตภัณฑ์ชีววัตถุต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวัคซีนแห่งชาติที่สนับสนุนงบประมาณเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Yasumura Y, Kawakita M. The research for the SV40 by means of tissue culture technique. Nippon Rinsho 1963; 21(6): 1201-19.
2. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health organ Tech Rep Ser 1998; 878: i-vi, 1-101.
3. Cao S, Dong G, Tang J, Li J, Liu J, Shi L, et al. Development of a Vero cell DNA reference standard for residual DNA measurement in China. Hum Vaccin Immunother 2012; 9(2): 413-9.
4. Yang H. Establishing acceptable limits of residual DNA. PDA J Pharm Sci Technol 2013; 67(2): 155-63.
5. DiPaolo B, Pennetti A, Nugent L, Venkat K. Monitoring impurities in biopharmaceuticals produced by recombinant technology. Pharm Sci Technol Today 1999; 2(2): 70-82.
6. Mehta S, Keer JT. Performance characteristics of host-cell DNA quantification methods. BioProcess Int 2007; 5(9): 44-58.
7. Kung VT, Panfili PR, Sheldon EL, King RS, Nagainis PA, Gomez B, et al. Picogram quantitation of total DNA using DNA-binding proteins in a silicon sensor-based system. Anal Biochem 1990; 187(2): 220-7.
8. Wang X, Morgan DM, Wang G, Mozier NM. Residual DNA analysis in biologics development: review of measurement and quantitation technologies and future directions. Biotechnol Bioeng 2012; 109(2): 307-17.
9. Hu B, Sellers J, Kupec J, Ngo W, Fenton S, Yang TY, et al. Optimization and validation of DNA extraction and real-time PCR assay for the quantitative measurement of residual host cell DNA in biopharmaceutical products. J Pharm Biomed Anal 2014; 88: 92-5.
10. Lee DH, Bae JE, Lee JH, Shin JS, Kim IS. Quantitative detection of residual E. coli host cell DNA by real-time PCR. J Microbiol Biotechnol 2010; 20(10), 1463-70.
11. Yang H, Zhang L, Galinski M. A probabilistic model for risk assessment of residual host cell DNA in biological products. Vaccine 2010; 28(19): 3308-11.
12. Broeders S, Huber I, Grohmann L, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR Methods. Trends in Food Science & Technology 2014; 37: 115-26.

Determination of Residual Vero Cell DNA in Viral Vaccine Products by Real-time PCR

**Sukanlayanee Chaimee Sompong Sapsutthipas Jiradej Patchim
and Supaporn Phumiamorn**

*Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi
11000, Thailand.*

ABSTRACT Vero cells are continuous cell lines which are used as a substrate for producing many viral vaccines because of their safety, non-tumorigenicity and non-latent viruses. However, the safety of the vaccines using the Vero cell also depends on the production, purification, and quality control processes. The World Health Organization currently recommends 10 ng/dose as an upper limit of DNA residue for any vaccines produced from continuous cell lines. Institute of Biological Products had validated the Real-time PCR method to determine residual DNA of Vero cells in viral vaccine. Sixteen Vero cell-based vaccine samples were employed. The testing results showed that small amounts of residual DNA were present in all samples from 0.49 to 4.48 ng/dose, which is lower than WHO's specification. From the analysis of linearity and range, it was found that the appropriate working range was 0.03–3,000 pg/reaction and the correlation coefficient was more than 0.990. For the accuracy, the recovery rate was 87% which was within the acceptance limit (80–120%). This method showed good repeatability when the test was conducted in the same day and at the same time and the coefficient of variance was less than 25%. For the analysis of robustness using two different analysts, it was found that the results were very close to each other and the coefficient of variance was less than 25%. Therefore, this method also showed good robustness. In conclusion, this developed real-time PCR when had been used for determination of residual Vero cell DNA in viral vaccines showed good results in linearity, accuracy, precision and robustness.

Key words: Vero cell, residual DNA, Real-time PCR