



วารสารอาหารและยา
ปีที่ 29 ฉบับที่ 3 (2565): กันยายน - ธันวาคม
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>

THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 29 No. 3 (2022): September - December



การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัว ในเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส

สุภากรณ์ ชุมพล¹ สุกัลยาณี ไชยมี¹ วิริยามารตย์ เจริญคุณธรรม¹ สุภาพร ภูมิอมร¹

¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี

ที่อยู่ติดต่อ: สุภากรณ์ ชุมพล สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
supaporn.c@dmsc.mail.go.th

Method Development and Validation for Detecting Specific Bovine Adventitious Viruses Contaminated in Vero Cell Substrates

Supaporn Chumpol¹, Sukanlayanee Chaimee¹, Wereyamarst Jaroenkunathum¹, Supaporn Phumiamorn¹

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

Contact address: Supaporn Chumpol, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, supaporn.c@dmsc.mail.go.th

Received: 21 January 2022, **Revised:** 29 May 2022, **Accepted:** 23 June 2022

Abstract

Background: Cell substrates are used in the production of vaccines, which must be quality controlled in accordance with World Health Organization requirements. Detection of bovine adventitious virus contaminants in cell substrates is one of the important item tested to confirm that the cell in the production are not contaminated by bovine virus. This study strengthened the laboratory's capacity for characterization and quality control of cells so they are able to be transmitted to Thai domestic vaccine manufacturers and provide quality inspection services for Vero cells used vaccine production.

Objectives: The purpose of this study was to optimize and validate method for the detecting specific bovine adventitious viruses in Vero cell substrates. This method was used as a standard laboratory method for testing the quality of Vero cell substrates in vaccine production.

Methods: The optimal conditions of three analytical techniques including cytopathic effect (CPE), hemadsorption and immunofluorescence assay (IFA) were investigated. In addition, validation method study was performed on the parameters of specificity and limit of detection.

Results: The results of optimal conditions showed that the appropriate cell numbers of bovine turbinate cells (BT), Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK) and African green monkey kidney cells (Vero) for CPE formation were 1×10^5 , 4×10^4 and 4×10^4 cells/mL, respectively. CPE results were consistent with those of IFA, except REO-3 that did not cause CPE in BT cell, but the virus was detected by IFA. The hemadsorption assay was positive only by BPI-3 and BPV viruses. The developed methods were specific to five specific bovine viruses and the lowest viral titers for those bovine viruses were 0.01, 0.1, 0.1, 0.01 and 0.001 CCID₅₀/mL, respectively.

Conclusions: The optimal conditions and validation of detecting specific bovine adventitious viruses contaminated in Vero cell substrates were studied using three methods including CPE, hemadsorption and Immunofluorescent assay. The results found that all three methods were able to detect specific bovine viral contamination and met the acceptance criteria. The standard method for detecting specific bovine adventitious viruses contaminated in Vero cell was obtained to assess the safety and purity of the Vero cell substrates used in vaccine production.

Keywords: Vero cell, bovine adventitious viruses, indicator cell, method validation

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนต้องควบคุมคุณภาพตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก การตรวจหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนจากวัวในเซลล์ตั้งต้นเป็นหนึ่งในรายการทดสอบสำคัญ เพื่อยืนยันว่าเซลล์ที่ใช้ในการผลิตไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อไวรัสวัว โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการเสริมสร้างศักยภาพห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบคุณลักษณะและการควบคุมคุณภาพเซลล์ เพื่อให้สามารถนำมาถ่ายทอดไปยังผู้ผลิตวัคซีนภายในประเทศ และให้บริการตรวจสอบคุณภาพเซลล์ไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัวในเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการในการตรวจคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

วิธีการวิจัย: เป็นการวิจัยเชิงทดลองโดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ 3 วิธี ได้แก่ การตรวจหาความผิดปกติของเซลล์หลังการติดเชื้อ (Cytopathic Effect: CPE) การตรวจปฏิกิริยาการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงบนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ (hemadsorption) และการทดสอบอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (Immunofluorescent Assay: IFA) และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ หาความจำเพาะของวิธี และขีดจำกัดของการตรวจพบ

ผลการศึกษา: ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าจำนวนเซลล์ Bovine Turbinate cells (BT), Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK) และ African green monkey kidney cells (Vero) ที่เหมาะสมสำหรับการเกิด CPE ในเซลล์ คือ 1×10^5 , 4×10^4 และ 4×10^4 cells/mL ตามลำดับ และผลการเกิด CPE มีความสอดคล้องกับการทดสอบ IFA ยกเว้นไวรัส REO-3 ที่ไม่พบ CPE ในเซลล์ BT แต่ตรวจพบไวรัสได้ด้วยวิธี IFA ในขณะที่การเกาะติดของเม็ดเลือดแดงนั้นพบเฉพาะในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส BPI-3 และ BPV ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสวัวทั้ง 5 ชนิด และให้ค่าความแรงต่ำสุดที่ตรวจพบได้ 0.01, 0.1, 0.1, 0.01 และ 0.001 CCID₅₀ /mL ตามลำดับ

สรุป: จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัวในเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส โดยใช้เทคนิคตรวจวิเคราะห์ 3 วิธี ได้แก่ การตรวจหาความผิดปกติของเซลล์หลังการติดเชื้อ การเกิดปฏิกิริยาเกาะติดของเม็ดเลือดแดงบนผิวเซลล์ และการทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าวิธีทั้ง 3 สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัวได้ และผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด จึงได้วิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการในการตรวจหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนจากวัวในเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส ซึ่งเป็นรายการทดสอบหนึ่งในการตรวจประเมินความปลอดภัยและความบริสุทธิ์ของเซลล์ไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนได้

คำสำคัญ: เซลล์ไวรัส เชื้อไวรัสปนเปื้อนจากวัว เซลล์ทดสอบที่จำเพาะ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

บทนำ

เซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส (Vero cell) เป็นเซลล์ที่นิยมนำมาใช้ผลิตวัคซีนป้องกันโรคอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะวัคซีนป้องกันโรคที่ผลิตจากเชื้อไวรัส รวมถึงวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 ที่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสในการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส สำหรับผลิตแอนติเจนในวัคซีน โดยเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสเป็นเซลล์ที่ได้จากไตของลิงเขียวแอฟริกัน (African green monkey kidney cell) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดแรกที่ได้รับการรับรองจาก WHO สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีนในมนุษย์¹ กระบวนการผลิตวัคซีนตามมาตรฐานสากลต้องมีการควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยง ตั้งแต่เซลล์ต้นกำเนิด (master cell bank) เซลล์ที่ใช้สำหรับการผลิต (working cell bank) เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดสอบหลังการผลิตเสร็จสิ้น (end of production cells) ซึ่งต้องมีการทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์เพาะเลี้ยงทางห้องปฏิบัติการ เช่น การตรวจสอบเอกลักษณ์ การตรวจความปลอดภัยเชื้อ การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อมัยโคพลาสมา การทดสอบ Tumorigenicity การทดสอบ oncogenicity และการตรวจหาเชื้อไวรัสต่าง ๆ ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในเซลล์เพาะเลี้ยง (adventitious agents) เป็นต้น² โดย master cell bank จะต้องทำการทดสอบทุกหัวข้อที่กำหนดไว้ตามแนวทางสากล ในขณะที่ working cell bank และ end of production cells จะทดสอบเพียงบางหัวข้อที่จำเป็น³ และการตรวจหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยง เป็นรายการทดสอบหนึ่งที่ใช้ในการประเมินความปลอดภัยและความบริสุทธิ์ของเซลล์ตั้งต้น โดยวิธีการทดสอบหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ตรวจด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ตรวจโดยใช้สัตว์ทดลอง และตรวจโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง⁴ สำหรับวิธีตรวจการปนเปื้อนเชื้อไวรัสจากวัวโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (Indicator cells)

เป็นหนึ่งในรายการตรวจหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส ใช้สำหรับทดสอบคุณภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิต ซึ่งขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อใช้ผลิตแอนติเจนในวัคซีน จะมีการใช้ซีรัมจากวัว (bovine serum) เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำให้เกิดความเสี่ยงที่อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสที่มาจากวัวได้⁵

ประเทศไทยมีนโยบายส่งเสริมอุตสาหกรรมยาชีววัตถุภายในประเทศ เพื่อลดการนำเข้าและเพิ่มโอกาสการเข้าถึงยาชีววัตถุของประชาชน ซึ่งปัจจุบันมีการพัฒนาการผลิตวัคซีนไวรัสหลายชนิดจากเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส แต่ยังไม่มีห้องปฏิบัติการที่ให้บริการทดสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการผลิตวัคซีนและยาชีววัตถุ ดังนั้นสถาบันชีววัตถุในฐานะห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพวัคซีนและยาชีววัตถุภาครัฐ จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัวในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้ indicator cells 3 ชนิด คือ เซลล์เพาะเลี้ยงที่มาจากวัว และเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็นชนิดเดียวกับเซลล์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ซึ่งพิจารณาจากความจำเพาะของเชื้อไวรัสกับเซลล์ และความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์² การวิเคราะห์ประกอบด้วย 3 วิธี ได้แก่ การตรวจหาความผิดปกติของเซลล์หลังการติดเชื้อ (Cytopathic Effect: CPE) การเกิดปฏิกิริยาเกาะติดของเม็ดเลือดแดงบนผิวเซลล์ (hemadsorption) และการทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (Immunofluorescent Assay: IFA) และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ และเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพภาครัฐในการคุ้มครองผู้บริโภค ให้ได้รับวัคซีนและยาชีววัตถุที่มีความปลอดภัย รวมทั้งยังเป็นการสนับสนุนงานวิจัยพัฒนาวัคซีนและยาชีววัตถุของประเทศ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัวในเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส
2. เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการในการตรวจคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

ระเบียบวิธีการวิจัย

วิธีวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยใช้ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero เป็นตัวแทนของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีน เพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนภายในสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยใช้เซลล์ indicator cells 3 ชนิด ได้แก่ Bovine turbinate cells (BT; CRL-1390, ATCC) Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK; CCL-22, ATCC) และ African green monkey kidney cells (Vero) ชนิดเดียวกันกับเซลล์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน (Vero same sp.)

ขั้นตอนการศึกษา

1. นำตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ตัวแทนเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนมาเพิ่มจำนวนแล้วปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 1×10^7 cells/mL ปริมาตร 20 mL นำมาทำให้เซลล์แตกโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C ที่ไนโตรเจนแข็งตัว ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C โดยทำขั้นตอน freeze-thaw cycle จำนวน 3 รอบ นำมาปั่นตกตะกอนที่ 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วเก็บเฉพาะน้ำเลี้ยงเซลล์ (cell lysate) มาแบ่งบรรจุในหลอดสำหรับปั่น ขนาด 15 mL ปริมาตรหลอดละ 3 mL สำหรับนำไปใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัวในเซลล์ Vero
2. เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง indicator cells สำหรับใช้ในการทดสอบ โดยมีรายละเอียดอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังนี้ สำหรับเซลล์ BT ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์สำเร็จรูป Dulbecco's Modified Eagle

Medium: DMEM (Cat No. 30-2002, ATCC) ที่เติม 10% Horse serum (Cat No. 30-2040, ATCC) สำหรับเซลล์ MDBK ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์สำเร็จรูป Eagle's Minimum Essential Medium: EMEM (Cat No. 30-2003, ATCC) ที่เติม 10% Horse serum (Cat No. 30-2040, ATCC) สำหรับเซลล์ Vero same sp. ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์สำเร็จรูป Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM (Cat No. 30-2002, ATCC) ที่เติม 10% Fetal Bovine serum (Cat No. 30-2020, ATCC) และทำการเพาะเลี้ยง Indicator cells แต่ละชนิดในฟลาस्कขนาด 25 cm^2 ชนิดละ 2 ฟลาस्क โดยเตรียมเซลล์ BT จำนวน 1×10^5 cells/mL ปริมาตร 5 mL เซลล์ MDBK จำนวน 4×10^4 cells/mL ปริมาตร 5 mL และเซลล์ Vero same sp. 4×10^4 cells/mL ปริมาตร 5 mL แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C แบบใช้ 5% CO_2 นาน 16-24 ชั่วโมง

3. เตรียมเชื้อไวรัสมาตรฐาน เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ใช้เชื้อไวรัสมาตรฐานจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Bovine Parainfluenza virus 3 (BPI-3; VR-739, ATCC), Bovine Parvovirus (BPV; VR-767, ATCC), Bovine Adenovirus 3 (BAV-3; VR-639, ATCC), Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV; VR-534, ATCC), และ Reovirus 3 (REO-3; VR-232, ATCC) โดยทำการเจือจางให้มีค่าความแรง $100\text{ CCID}_{50}/\text{mL}$

4. ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัวในเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส ด้วย 3 วิธีทดสอบ ได้แก่ การตรวจหาความผิดปกติของเซลล์หลังการติดเชื้อ (CPE) การตรวจปฏิบัติการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงบนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ (hemadsorption) และการทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (IFA)

5. ตรวจหาความผิดปกติของเซลล์หลังการติดเชื้อ โดยนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ (cell lysate) ของตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C มาละลายที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นเติมลงไป ใน Indicator cells ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ BT, MDBK และ Vero same sp. อายุ 16-24 ชั่วโมง ที่ได้เตรียมไว้

ข้างต้นแล้ว ปริมาตรพลาสติกละ 2 mL สำหรับพลาสติกที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมลบให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์วีโรแทน จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C แบบใช้ 5% CO₂ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับ Indicator cells แต่ละชนิด ปริมาตร 3 mL แล้วนำไปบ่มที่ตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C แบบใช้ 5% CO₂ นาน 7 วัน ระหว่างนี้สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำเซลล์ Indicator cells ที่ผ่านการทดสอบชุดแรกทำให้เซลล์แตกโดยทำ freeze-thawed จำนวน 3 ครั้ง แล้วปั่นตกตะกอนที่ 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสเพื่อนำไปตรวจหา CPE ในรอบที่ 2 ซึ่งทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบรอบแรก ตัวอย่าง cell lysate ซึ่งได้จากการทำให้เซลล์แตกในรอบที่ 2 นี้จะนำไปตรวจหา CPE ในรอบที่ 3 ซึ่งทำการทดสอบในเพลทสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6 well tissue culture plate) ซึ่งมี Indicator cells ชนิดละ 1 เพลท โดยก่อนการทดสอบให้ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS(-) ปริมาตร 3 mL ก่อน 1 ครั้ง แล้วจึงเติมตัวอย่าง cell lysate ที่ได้จากทำให้เซลล์แตกในรอบที่ 2 ปริมาตร 1 mL ลงไป จำนวน 2 หลุม ต่อชนิดของ Indicator cells สำหรับหลุมที่เป็นหลุมควบคุมลบให้ใส่น้ำอาหารเลี้ยงเซลล์วีโรแทน และหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมบวกให้เติมเชื้อไวรัสมาตรฐาน โดยเติมเชื้อไวรัส BPI-3 ซึ่งผ่านการเจือจางให้มีค่าความแรงประมาณ 100 CCID₅₀ /mL หลุมละ 1 mL จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C แบบใช้ 5% CO₂ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับ Indicator cells แต่ละชนิดลงไปอีก 3 mL จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C แบบใช้ 5% CO₂ นาน 7 วัน ระหว่างนี้อ่านผลการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน โดยหากไม่มีการเกิด CPE ให้บันทึกผลเป็นลบ และหากมี CPE ให้บันทึกผลเป็นบวก และนำเซลล์ indicator cells แต่ละชนิด ซึ่งยังคงเกาะอยู่ที่ผิวหน้าของเพลททดสอบนำไปตรวจปฏิกิริยาการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงบนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อต่อไป

6. ตรวจปฏิกิริยาการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงบนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ (hemadsorption) โดยนำเซลล์ indicator cells แต่ละชนิดที่ผ่านการตรวจหา CPE ซึ่งอยู่ในเพลทสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม มาทำการทดสอบต่อด้วยวิธี hemadsorption โดยล้างผิวหน้าเซลล์ด้วย PBS(-) ปริมาตร 3 mL แล้วเติมน้ำสารละลาย 0.5% (v/v) เม็ดเลือดแดงไก่ผสมกับเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภา หลุมละ 2 mL โดยแบ่ง 1 ชุดการทดสอบของเซลล์ indicator cells แต่ละชนิดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 2-8°C ส่วนอีก 1 ชุดบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25-30°C นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาล้างด้วย PBS(-) ปริมาตรหลุมละ 3 mL จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปอ่านผลการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยหลุมที่เกิดปฏิกิริยาการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงบนผิวเซลล์ติดเชื้อให้บันทึกผลเป็นบวก และหากไม่มีการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงให้บันทึกผลเป็นลบ

7. ทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (IFA) โดยที่ก่อนทำการทดสอบ IFA นำตัวอย่าง cell lysate จากการตรวจหา CPE ในรอบที่ 2 ซึ่งผ่านการทำให้เซลล์แตกโดยทำ freeze-thawed จำนวน 3 ครั้ง แล้วปั่นตกตะกอนที่ 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำไปตรวจหา CPE รอบที่ 3 ในเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 48 หลุม โดยล้างผิวหน้าเซลล์ด้วย PBS(-) ปริมาตร 1 mL แล้วเติมตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ หลุมละ 1 mL จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C แบบใช้ 5% CO₂ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับ Indicator cells แต่ละชนิด ปริมาตร 500 µL แล้วนำไปบ่มที่ตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C แบบใช้ 5% CO₂ นาน 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาให้นำมาทดสอบด้วยวิธี IFA โดยล้างผิวหน้าเซลล์ด้วย PBS(-) ปริมาตรหลุมละ 500 µL แล้วทำการ fix เซลล์ด้วย 80% cold acetone ปริมาตรหลุมละ 100 µL แล้วนำเพลทไปบ่มที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -10°C ถึง -20°C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลากำจัด 80% cold acetone แล้วรอให้เพลทแห้งสนิท ขั้นตอนถัดไปเติมแอนติบอดีที่ติดฉลาก

ด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนท์ (FITC) ซึ่งมีความจำเพาะเชื้อไวรัสแต่ละชนิด ได้แก่ BPI-3-FITC conjugate, BPV-FITC conjugate, BAV-3-FITC conjugate, BVDV-FITC conjugate และ REO-3-FITC conjugate โดยเติมแอนติบอดีหุ้มนละ 100 μ L แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 2-8°C นาน 18-20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลากำจัดแอนติบอดี และล้างด้วย PBS(-) ปริมาตรหุ้มนละ 200 μ L และอ่านผลการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนท์ หากมีการเรืองแสงสีเขียวให้ถือว่าให้บันทึกผลบวก และหากไม่มีการเรืองแสงให้บันทึกผลเป็นลบ

8. ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยหาความจำเพาะของวิธี (specificity) โดยตรวจเชื้อไวรัส 5 ชนิด ได้แก่ เชื้อไวรัส BPI-3, BPV, BAV-3, BVDV และ REO-3 ที่ผ่านการเจือจางให้มีค่าความแรงอยู่ระหว่าง 10-100 CCID₅₀ /mL มาเติม (spike) ลงในตัวอย่าง cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส อัตราส่วน 1:10 จากนั้นทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (เชื้อไวรัสที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์) และกลุ่มตัวอย่าง cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสที่ไม่มีการ spike เชื้อไวรัส โดยมีเกณฑ์การทดสอบดังนี้ ตัวอย่าง cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสที่มีการ spike เชื้อไวรัสแต่ละชนิดต้องตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส โดยตรวจพบ CPE ที่มีลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสชนิดนั้น บนผิวของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็น indicator cells หรือให้ผลบวกในการทดสอบ hemadsorption หรือให้ผลบวกในการทดสอบ IFA เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมบวก ส่วนกลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มตัวอย่าง cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสที่ไม่มีการ spike เชื้อไวรัส ต้องไม่พบ CPE และให้ผลลบในการทดสอบ hemadsorption และ IFA เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมลบ

ทำการหาขีดจำกัดของการตรวจพบของวิธี (Limit of Detection: LOD) โดยนำเชื้อไวรัสที่ใช้สำหรับกลุ่มควบคุมบวก ได้แก่ เชื้อไวรัส BPI-3, BPV, BAV-3, BVDV และ REO-3 มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความแรงที่ 0.00001, 0.0001, 0.001,

0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 100.0, 1000.0 CCID₅₀ /mL นำมาทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ จากนั้นอ่านค่า LOD จากระดับความแรงต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส โดยต้องสามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้จากการพบ CPE หรือให้ผลบวกในการทดสอบ hemadsorption หรือ IFA

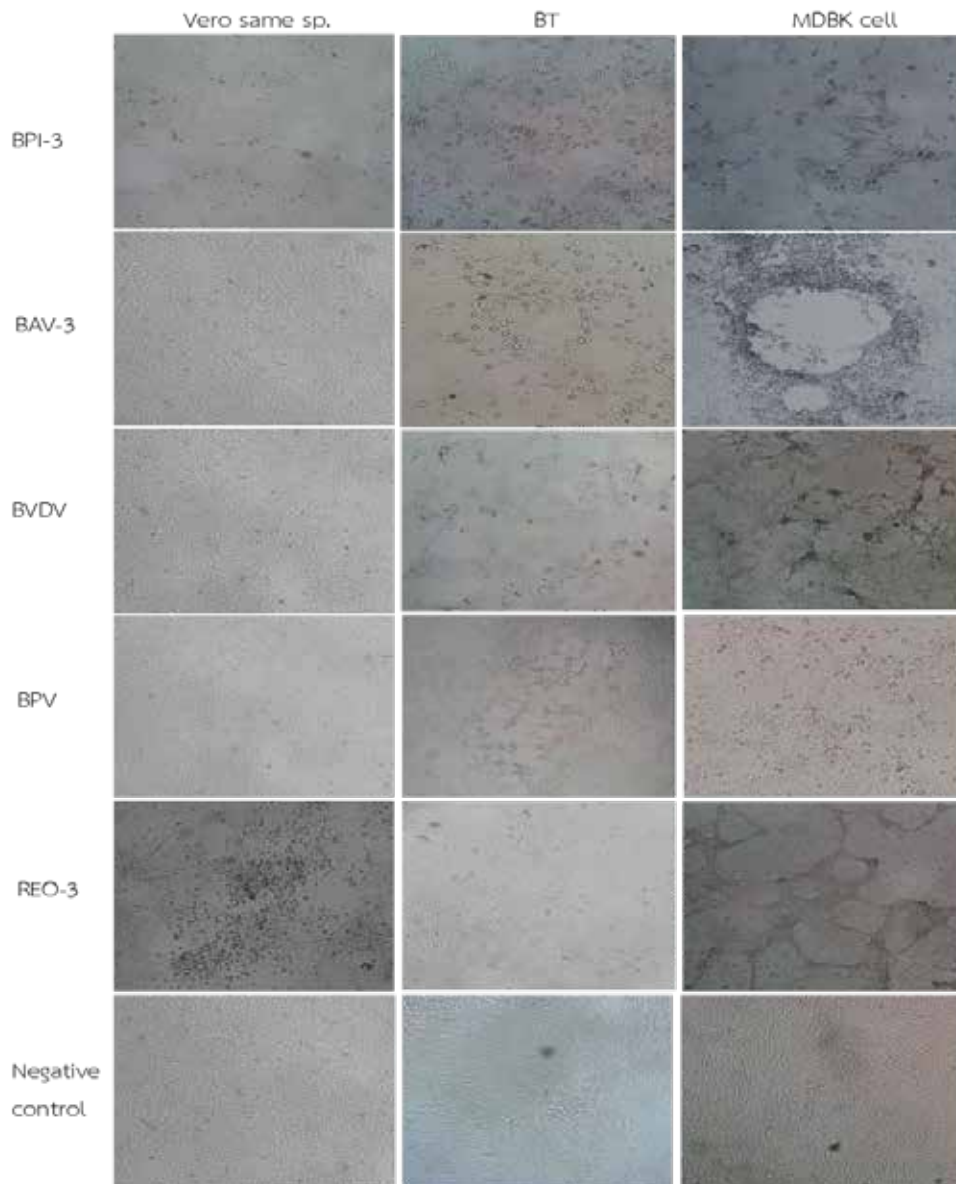
ผลการศึกษา

การพัฒนาวิธีตรวจการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวุ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส โดยใช้ indicator cells 3 ชนิด คือ เซลล์ BT, MDBK และ Vero same sp. นำมาทดสอบการติดเชื้อไวรัสจากวุ้น 5 ชนิด ได้แก่ BPI-3, BPV, BAV-3, BVDV และ REO-3 โดยใช้การตรวจหาเชื้อไวรัส 3 วิธี ได้แก่ การตรวจหา CPE การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาเกาะติดของเม็ดเลือดแดง และการทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค IFA ผลการศึกษพบว่าจำนวนเซลล์ BT, MDBK และ Vero same sp. ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการเกิด CPE ในพลาสติกขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ปริมาตร 5 mL คือ 1×10^5 , 4×10^4 และ 4×10^4 cells/mL ตามลำดับ และจำนวนเซลล์ BT, MDBK และ Vero same sp. ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการเกิด CPE และ hemadsorption ในเพลททดสอบ 6 หลุม ปริมาตร 3 mL คือ 6×10^4 , 3×10^4 และ 3×10^3 cells/mL ตามลำดับ และจำนวนเซลล์ BT, MDBK และ Vero same sp. ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการทดสอบการเกิด CPE และ IFA ในเพลททดสอบ 48 หลุม ปริมาตร 1 mL คือ 2×10^4 , 1×10^4 และ 1×10^4 cells/mL ตามลำดับ

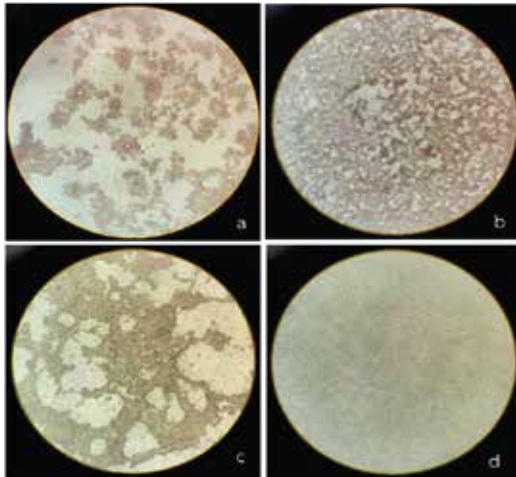
ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวุ้น พบว่าทั้ง 3 วิธีทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยการตรวจหา CPE ในตัวอย่าง cell lysate ที่มีการ spike เชื้อไวรัสลงไป สามารถตรวจพบการเกิด CPE ที่มีลักษณะจำเพาะในเซลล์ indicator cells ดังนี้ เชื้อไวรัส BPI-3 พบ CPE ใน indicator cells ทั้ง 3 ชนิด เชื้อไวรัส BPV พบ CPE เฉพาะในเซลล์ BT เชื้อไวรัส BAV-3

และ BVDV พบ CPE ในเซลล์ BT และ MDBK และ เชื้อไวรัส REO-3 พบ CPE ในเซลล์ Vero same sp. และ MDBK (ภาพที่ 1) ซึ่งการตรวจหาเชื้อไวรัส แต่ละชนิดโดยใช้เซลล์ indicator cells จำเป็นต้อง พบการเกิด CPE ในเซลล์ indicator cells อย่างน้อย 1 ชนิดจาก 3 ชนิด เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างมีการปนเปื้อน เชื้อไวรัส ในขณะที่ตัวอย่าง cell lysate ที่ไม่มีการ spike เชื้อไวรัส และกลุ่มควบคุมลบไม่พบ CPE ในเซลล์ indicator cells ทั้ง 3 ชนิด

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในการ ตรวจสอบความจำเพาะของวิธี hemadsorption พบว่าตัวอย่าง cell lysate ที่มีการ spike เชื้อไวรัส ให้ผลการทดสอบเป็นบวกเพียง 2 ชนิด คือ BPI-3 ให้ผลบวกในเซลล์ indicator cells ทั้ง 3 ชนิด และ เชื้อไวรัส BPV ให้ผลบวกเฉพาะในเซลล์ BT ในขณะที่ ตัวอย่าง cell lysate ที่ไม่มีการเติมเชื้อไวรัส และ กลุ่มควบคุมลบให้ผลการทดสอบเป็นลบ ดังรูปที่ 2



รูปที่ 1 ผลการตรวจหา CPE ใน Indicator cells ชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ Negative control

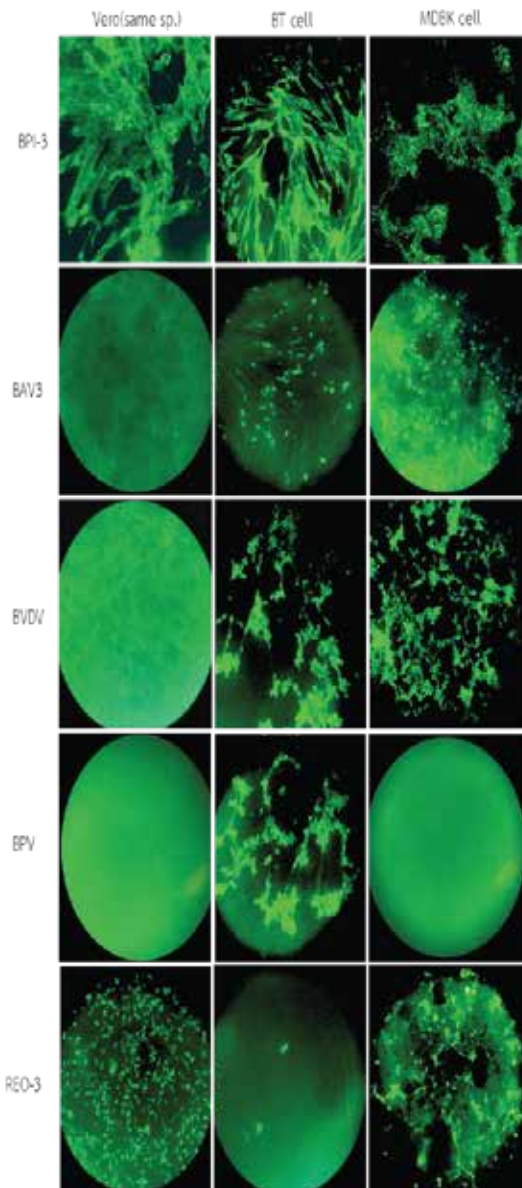


รูปที่ 2 ผลการตรวจปฏิบัติการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงบนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ (hemadsorption) ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็น Indicator cells

หมายเหตุ: a คือ Vero same sp., b คือ BT, c คือ MDBK และ d คือ Negative control

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค IFA พบว่าตัวอย่าง cell lysate ที่มีการ spike เชื้อไวรัสให้ผลการทดสอบเป็นบวกสอดคล้องกับการเกิด CPE โดยเมื่อผลการทดสอบ CPE เป็นบวก จะพบว่าผลการทดสอบ IFA เป็นบวกด้วยเช่นกัน ยกเว้นเชื้อไวรัส REO-3 ไม่พบ CPE ในเซลล์ BT แต่ตรวจพบเชื้อไวรัสได้ด้วยวิธีการทดสอบ IFA ดังรูปที่ 3 ในขณะที่ตัวอย่าง cell lysate ที่ไม่มีการเติมเชื้อไวรัส และกลุ่มควบคุมลบให้ผลการทดสอบเป็นลบ

ผลการตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) พบว่า เชื้อไวรัส ได้แก่ BPI-3, BPV, BAV-3, BVDV และ REO-3 ให้ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบได้ 0.01, 0.1, 0.1, 0.01 และ 0.001 CCID₅₀ /mL ตามลำดับ โดยศึกษาจากการทดสอบการตรวจหา CPE, hemadsorption และ IFA ซึ่งระดับค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ ในแต่ละ indicator cells และแต่ละรายการทดสอบดังตารางที่ 1



รูปที่ 3 ผลการทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค IFA

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ ใน indicator cells แต่ละชนิด เมื่อทดสอบด้วยวิธีการตรวจหา CPE, hemadsorption และ IFA

ไวรัส	Indicator cells	ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบเชื้อไวรัส (CCID ₅₀ /mL)		
		การตรวจหา CPE	hemadsorption	IFA
BPI-3	Vero (same sp.)	0.1	0.01	0.01
	BT	0.1	0.1	0.1
	MDBK	0.01	0.01	0.01
BPV	Vero (same sp.)	-	-	-
	BT	0.1	0.1	0.1
	MDBK	-	-	-
BAV-3	Vero (same sp.)	-	-	-
	BT	0.1	-	0.1
	MDBK	0.1	-	0.1
BVDV	Vero (same sp.)	-	-	-
	BT	1.0	-	1.0
	MDBK	0.01	-	0.01
REO-3	Vero (same sp.)	0.001	-	0.001
	BT	-	-	1000
	MDBK	0.1	-	0.001

อภิปรายผล

วิธีตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัวในตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส โดยใช้ indicator cells เป็นรายการทดสอบเพื่อควบคุมคุณภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตวัคซีนตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก โดยเฉพาะการผลิตวัคซีนไวรัสที่จำเป็นต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส สำหรับผลิตแอนติเจนสารสำคัญที่ใช้ในวัคซีน และเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนมีประวัติการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ซีรัมวัว เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์ไวรัสนั้นต้องมีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัสที่อาจพบและก่อให้เกิดโรคได้ ได้แก่ BVDV, BPI-3, BPV, REO-3, BAV, rabies virus, vesicular stomatitis virus เป็นต้น² ทางคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีโดยศึกษาสภาวะเหมาะสมของ indicator cells แต่ละชนิดเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัวทั้ง 3 วิธี ได้แก่ การตรวจหา CPE การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาเกาะติดของเม็ดเลือดแดงบนผิวเซลล์ และการทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสด้วย

เทคนิค IFA และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเนื่องจากรายการวิเคราะห์นี้เป็นการตรวจหาเชื้อไวรัสที่อาจมีการปนเปื้อนในตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งใช้ตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในปริมาณน้อย⁶ ดังนั้นจึงดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีใน 2 พารามิเตอร์ คือ การทดสอบหาความจำเพาะของวิธี (specificity) และขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)⁷⁻⁸

ผลการตรวจหาสภาวะเหมาะสมของ indicator cells สำหรับการตรวจหา CPE ในพลาสติก 25 cm² ต้องเตรียมจำนวนเซลล์ BT, MDBK และ Vero same sp. ประมาณ 1x10⁵, 4x10⁴ และ 4x10⁴ cells/mL ตามลำดับ สำหรับการตรวจหา CPE และ hemadsorption ในเพลททดสอบ 6 หลุม ต้องเตรียมจำนวนเซลล์ประมาณ 6x10⁴, 3x10⁴ และ 3x10³ cells/mL ตามลำดับ และสำหรับการตรวจหา CPE และ IFA ในเพลททดสอบ 48 หลุม ต้องเตรียมจำนวนเซลล์ประมาณ 2x10⁴, 1x10⁴ และ 1x10⁴ cells/mL ตามลำดับ ซึ่งการหาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละการทดสอบมีความจำเป็นต้องศึกษา เนื่องจากเซลล์ indicator cells นำมาทดสอบด้วยวิธี Co-

cultivation ดังนั้นเซลล์ต้องมีการเรียงตัวเป็น monolayer culture และมีสภาพที่แข็งแรงอยู่ได้นานถึง 7-14 วันเพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ซึ่งหากเซลล์ตั้งต้นที่ใช้ผลิตวัคซีนมีการปนเปื้อนโดยเชื้อไวรัสจะสามารถสังเกตการณ์เกิด CPE ได้

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่าวิธีมีความจำเพาะสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจากวัวทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อไวรัส BPI-3, BPV, BAV-3, BVDV และ REO-3 เมื่อมีการ spike เชื้อไวรัสที่มีปริมาณน้อย ๆ ลงไปที่ความแรงประมาณ 1-10 CCID₅₀ /mL โดยการตรวจพบ CPE ใน Indicator cell ชนิดใดชนิดหนึ่งจาก 3 ชนิด อาจเกิด CPE ได้ในบางเซลล์หรือทุกเซลล์ ขึ้นกับความเหมาะสมของเซลล์ต่อเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษา ไวรัสบางชนิดอาจมีการติดเชื้อในเซลล์ได้ แต่ไม่เกิด CPE ขึ้น จึงต้องมีการยืนยันการติดเชื้อด้วยการทดสอบอื่น เช่น hemadsorption หรือ IFA2 จากการศึกษาพบว่า การเกิด CPE ให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ยกเว้นไวรัส reovirus 3 ที่ไม่พบ CPE ในเซลล์ BT แต่ตรวจพบไวรัสได้ด้วยวิธี IFA ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 3 และผลการศึกษา hemadsorption พบว่าเซลล์ indicator cells ที่ติดเชื้อไวรัส BPI-3 และ BPV เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ผิวเซลล์ติดเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นเมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงติดเชื้อไวรัสในกลุ่ม influenza และ parainfluenza viruses จะมีการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส (hemagglutinin) บนผิวเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่ง hemagglutinin เป็นสารประเภทไกลโคโปรตีนทำหน้าที่เป็นตัวรับลิแกนด์บนผิวของเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงสามารถเกาะกับผิวเซลล์ที่ติดเชื้อได้¹⁰⁻¹¹ สำหรับการตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ใช้เชื้อไวรัสแต่ละชนิดที่ค่าความแรงตั้งแต่ 0.00001-1000 CCID₅₀ /mL เพื่อหาระดับค่าความแรงต่ำสุดที่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยง ผลการทดสอบพบว่าเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ มีขีดจำกัดของการตรวจพบที่ระดับค่าความแรงต่ำสุดไม่เท่ากัน โดยเชื้อไวรัส REO-3

สามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้ที่ระดับค่าความแรงต่ำสุด 0.001 CCID₅₀ /mL ในขณะที่เชื้อไวรัส BPI-3 และ BVDV สามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้ที่ระดับค่าความแรงต่ำสุด 0.01 CCID₅₀ /mL และเชื้อไวรัส BPV และ BAV-3 สามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้ที่ระดับค่าความแรงต่ำสุด 0.1 CCID₅₀ /mL ดังตารางที่ 1 ซึ่งการตรวจสอบ LOD บ่งชี้ถึงความน่าเชื่อถือของวิธีว่ามีความไวสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสที่ค่าความแรงระดับใด โดยทั่วไปเมื่อใช้เซลล์ indicator cells ในการทดสอบ พบว่าความไวในการตรวจพบเชื้อไวรัสที่ระดับความแรงต่ำสุด 0.1 หรือ 0.01 CCID₅₀ /mL⁴

สรุปผล

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัวในเซลล์เพาะเลี้ยงวิธีที่ใช้สำหรับการผลิตวัคซีนอาศัยเทคนิค co-cultivation โดยใช้เซลล์ indicator cells จำนวน 3 ชนิด คือ เซลล์ BT, MDBK และ Vero ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการผลิตวัคซีนในการทดสอบพบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสจำเพาะจากวัวทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ BPI-3, BPV, BAV-3, BVDV และ REO-3 และสามารถกำหนดค่าความแรงต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสได้ในระดับค่าความแรง 0.01, 0.1, 0.1, 0.01 และ 0.001 CCID₅₀ /mL ตามลำดับ และจากผลการศึกษาทั้งหมดสรุปได้ว่าวิธีตรวจการปนเปื้อนเชื้อไวรัสที่จำเพาะจากวัวในเซลล์เพาะเลี้ยงวิธีที่ใช้สำหรับการผลิตวัคซีนโดยใช้ indicator cells ในการทดสอบ เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง และเหมาะสมสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการได้

ข้อเสนอแนะ

เซลล์เพาะเลี้ยง indicator cells (เซลล์ BT, MDBK และ Vero same sp.) ต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของเซลล์ก่อนการนำมาใช้ในการทดสอบ ได้แก่ การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย

มัยโคพลาสมา (*Mycoplasma* sp.) การตรวจสอบความปราศจากเชื้อ (Sterility) และตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นปกติ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวัคซีนแห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ได้มอบทุนสนับสนุนการพัฒนาภายใต้โครงการการเสริมสร้างศักยภาพของห้องปฏิบัติการภาครัฐ ในการตรวจสอบคุณลักษณะและการควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยง Vero สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีน และขอขอบคุณสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการสนับสนุนการดำเนินงานในทุกด้าน

เอกสารอ้างอิง

1. Kiesslich S, Kamen AA. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotech Adv.* [Internet]. 2020 [Cited 2021 Dec 19]; 44; [9 screens]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107608>.
2. World Health Organization. Annex 3 recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. TRS 978, Geneva; 2013 p. 123-65.
3. 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]. Rockville; 2011 [cited 2020 Sep 9]; [50 screens]. Available from: <https://www.fda.gov/media/78428/download>
4. Gombold J, Karakasidis S, Niksa P, Podczasy J, Neumann K, Richardson J, et al. Systematic Evaluation of In Vitro and In Vivo adventitious virus assays for the detection of viral contamination of cell banks and biological products. *Vaccine* 2014; 32(24): 2916–26.
5. Marcus-Sekura C, Richardson JC, Harston RK, Sane N, Sheets RL. Evaluation of the human host range of bovine and porcine viruses that may contaminate bovine serum and porcine trypsin used in the manufacture of biological products. *Biologicals* 2011; 39: 359-69.
6. Nims RW. Detection of adventitious viruses in biologicals—a rare occurrence. *Dev Biol (Basel)* 2006; 123: 153-64.
7. World Health Organization. Annex 4 supplementary guidelines on good manufacturing practices: validation, appendix 4 analytical method validation. TRS 937, Geneva; 2006. p. 136-40.
8. International Conference on Harmonization (ICH). ICH Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology [Internet]. 2005 [cited 2020 June 18]; [17 screens]. Available from: [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2\(R1\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf)
9. European pharmacopoeia. 5.2.3 Cell substrates for the production of vaccines for human use. [Internet]. 2020 [cited 2020 November 21]; [4 screens]. Available from: https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/COVID-19/updated_covid-19_vaccines_package_oct_2020.pdf
10. Landry ML, Hsiungb GD. Diagnostic techniques: isolation and identification by culture and microscopy. In: Granoff A, Webster R, editors. *Encyclopedia of virology*. 2nd ed. London: Academic; 1999. p. 395-403.
11. MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Chapter 3 pathogenesis of viral infections and diseases. In: Barthold SW, Swayne DE, Winton JR, editors. *Fenner's Veterinary Virology*. 5th ed. London: Academic; 2017. p. 47-78.