

การพัฒนาและการตรวจสอบความถูกต้องของ วิธีตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสบนแผ่นในเซลล์ Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงตรวจสอบ

สุกัลยาณี ไชยมี สุภาภรณ์ ชุมพล วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม และ สุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ เซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนต้องมีการควบคุมคุณภาพอย่างเข้มงวด การตรวจหาเชื้อไวรัสบนแผ่นในเซลล์ตั้งต้นโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงตรวจสอบ เป็นรายการหนึ่งในข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบดังกล่าว โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณที่เหมาะสมของเซลล์เพาะเลี้ยงตรวจสอบ 3 ชนิด ประกอบด้วยเซลล์ Vero 76, MRC-5 และ Vero (ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการผลิตวัคซีน) และเชื้อไวรัสตัวแทน 2 ชนิด คือ เชื้อไวรัส measles และ bovine parainfluenza type 3 (BPIV3) ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำตัวอย่างเซลล์ Vero ปริมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสบนแผ่นในเซลล์เพาะเลี้ยงตรวจสอบทั้ง 3 ชนิด โดยการตรวจดูความผิดปกติของเซลล์หลังการติดเชื้อ (cytopathic effect) การตรวจปฏิกิริยาการดูดซับเม็ดเลือดแดงบนผิวเซลล์ติดเชื้อ (hemadsorption) และการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) ผลการทดสอบพบว่า วิธีนี้มีความจำเพาะให้ผลบวกกับไวรัส measles และ BPIV3 และมีขีดจำกัดของการตรวจที่ความแรงต่ำสุด 0.1 และ 0.01 CCID₅₀ ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสบนแผ่นในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero สำหรับใช้ผลิตวัคซีนในห้องปฏิบัติการได้

คำสำคัญ เซลล์เพาะเลี้ยง Vero, เชื้อไวรัสบนแผ่น, การผลิตวัคซีน

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

Received: 11 August 2021

Revised: 18 October 2021

Accepted: 26 November 2021

บทนำ

การผลิตวัคซีนไวรัสส่วนใหญ่ต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในขั้นตอนการผลิต โดยชนิดของเซลล์ที่นำมาใช้นั้นขึ้นอยู่กับข้อมูลการพัฒนาวัคซีนของผู้ผลิต ทั้งนี้เซลล์เพาะเลี้ยงทุกชนิดที่จะนำมาใช้ในการผลิตนั้นจะต้องมีมาตรฐานตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก ระบุแหล่งที่มา มีประวัติที่สามารถสืบค้นได้ และมีการควบคุมคุณภาพตามข้อกำหนดอย่างเข้มงวด สำหรับเซลล์เพาะเลี้ยง Vero เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตชีววัตถุหลายชนิด เช่น วัคซีนป้องกันโรคโปลิโอทั้งชนิดฉีดและชนิดกิน วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า วัคซีนป้องกันโรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรต้า วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอึกเสเบเจอี วัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก วัคซีนป้องกันโรคไข้หัวโตใหญ่ เป็นต้น เซลล์ชนิดนี้มีต้นกำเนิดมาจากไตของลิง (African green monkey) นำมาใช้ในการผลิตวัคซีนมานานกว่า 30 ปี^(1,2) องค์การอนามัยโลกกำหนดให้ใช้เซลล์ Vero ของสถาบันเมอร์ริเออร์ (Institute Merieux) ที่ passage No. 124 เป็นเซลล์ตั้งต้นของกระบวนการผลิต (master cell bank) สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีน โดยพบว่ามีการใช้ทั่วโลกหลายล้านโดส⁽²⁾ การควบคุมคุณภาพของเซลล์ Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนตามมาตรฐานจะต้องมีการทดสอบคุณลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง ได้แก่ การตรวจสอบเอกลักษณ์ การตรวจความปลอดภัย การตรวจหาเชื้อไวรัส การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อมัยโคพลาสมา การทดสอบ tumorigenicity การทดสอบ oncogenicity และการตรวจหาเชื้อไวรัสต่างๆ ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในเซลล์เพาะเลี้ยง⁽³⁾

การตรวจหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตเป็นรายการทดสอบที่สำคัญ เนื่องจากในขั้นตอนการผลิตมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้อไวรัสได้จากหลายสาเหตุ เช่น จากวัตถุดิบที่นำมาใช้ในขั้นตอนการผลิต จากสภาวะแวดล้อม จากขั้นตอนการปฏิบัติงาน ซึ่งรวมถึงการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมวัวเป็นส่วนประกอบ^(4,5) การใช้เอนไซม์ trypsin จากหมูในการย่อยเซลล์⁽⁴⁻⁶⁾ การทดสอบควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนในการผลิตวัคซีนนั้น ต้องทำการทดสอบตั้งแต่ master cell bank เซลล์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต (working cell bank) รวมไปถึงเซลล์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบหลังกระบวนการผลิตเสร็จสิ้น (end-of-production cell) ประกอบด้วยวิธีวิเคราะห์ที่หลากหลาย ได้แก่ การทดสอบในสัตว์ทดลองและไขไก่ฟัก ตรวจหาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) การทดสอบด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล และการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงตรวจสอบ (indicator cells) เพื่อให้มั่นใจว่าในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส⁽³⁾ สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนโดยใช้ indicator cells ในการทดสอบนั้น ชนิดของ indicator cells ที่ใช้ขึ้นกับเซลล์ในกระบวนการผลิตวัคซีนที่ต้องการตรวจสอบว่ามีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากเชื้อไวรัสชนิดใด รวมถึงตามข้อกำหนดต้องใช้เซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์ของมนุษย์และสัตว์ตระกูลไพรเมต (human and a non-human primate cell line) ซึ่งไวต่อเชื้อไวรัสที่อาจปนเปื้อนจากมนุษย์ด้วย ในการตรวจสอบเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ต้องใช้ indicator cells อย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์เพาะเลี้ยง Vero ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการผลิต เซลล์เพาะเลี้ยง MRC-5 ซึ่งเป็น human diploid cell และเซลล์เพาะเลี้ยง Vero 76 ซึ่งเป็น non-human primate cell line ใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนที่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อโครงสร้างของเซลล์หลังติดเชื้อ (cytopathic viruses) และเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemadsorbing viruses) ได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วยการทดสอบ 3 วิธี ได้แก่ การตรวจหาความผิดปกติของเซลล์หลังการติดเชื้อไวรัส (cytopathic effect; CPE) การทดสอบปฏิกิริยาการดูดซับเม็ดเลือดแดงบนผิวของ indicator cells (hemadsorption) และการทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination)⁽⁷⁻⁹⁾

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการศึกษาวิจัยพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตวัคซีนไวรัส เพื่อให้สามารถพึ่งพาตนเองได้และลดการนำเข้าวัคซีน จึงมีความจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติและควบคุมคุณภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงที่จะนำมาใช้ในการผลิตวัคซีน แต่เนื่องจากประสบปัญหาไม่มีห้องปฏิบัติการที่สามารถตรวจวิเคราะห์คุณลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงรวมถึงการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสได้ ต้องส่งเซลล์เพาะเลี้ยงตั้งต้นสำหรับการผลิต

ไปตรวจสอบที่ห้องปฏิบัติการต่างประเทศ เพื่อยืนยันคุณภาพของเซลล์ ดังนั้นการศึกษานี้มุ่งหวังที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสบนแผ่นในเซลล์ Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโดยใช้ indicator cells ซึ่งเป็นหนึ่งในรายการตรวจวิเคราะห์ที่สำคัญตามมาตรฐานสากล^(3,7,8) รวมถึงตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ เพื่อให้สามารถนำมาถ่ายทอดยังผู้ผลิตวัคซีนภายในประเทศ หรือให้บริการตรวจสอบคุณภาพเซลล์ Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนต่อไปได้ในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

ในการทดสอบใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ Vero 76 และ Vero (ชนิดเดียวกับเซลล์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน) ประกอบด้วย Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM (Cat. No. 30-2002, ATCC) 900 มิลลิลิตร และ fetal bovine serum; FBS (Cat. No. 30-2020, ATCC) 100 มิลลิลิตร อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ MRC-5 ประกอบด้วย Eagle's Minimum Essential Medium; EMEM (Cat. No. 30-2003, ATCC) 900 มิลลิลิตร และ FBS (Cat. No. 30-2020, ATCC) 100 มิลลิลิตร

เซลล์เพาะเลี้ยง

ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในการผลิตวัคซีนที่ต้องการตรวจสอบ นำมาเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวน ภายในสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

indicator cells ที่ใช้ในการทดสอบมี 3 ชนิด คือ เซลล์ Vero (ชนิดเดียวกับเซลล์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน) เซลล์ MRC-5 (Cat. No. CCL-171, ATCC) และเซลล์ Vero 76 (Cat. No. CRL-1587, ATCC)

เชื้อไวรัสมาตรฐาน

เชื้อไวรัสมาตรฐาน 3 ชนิด คือ bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) (Cat. No. VR-739, ATCC), measles virus รุ่นการผลิต LyoMV210214 และ sendai virus (Cat. No. VR-105, ATCC) โดยเชื้อไวรัส BPIV3 และ measles virus เพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero และหาค่าความแรง (titer) โดยวิธีการไตเตรทในเซลล์เพาะเลี้ยง (microtitration) เพื่อหาค่า cell culture infectious dose 50%/mL (CCID₅₀/mL) สำหรับ sendai virus นำมาเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟัก และทดสอบความแรงด้วยวิธี hemagglutination

การเตรียมตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

นำตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ตัวแทนเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตวัคซีนมาเพิ่มจำนวนในขวดเลี้ยงเซลล์ (cell culture flask) ขนาด 225 ตารางเซนติเมตร ปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้น 1×10^7 เซลล์ต่อปริมาตรที่ใช้ในการทดสอบในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (2 มิลลิลิตร) การศึกษานี้ให้เตรียมอย่างน้อย 40 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกโดยการแช่แข็งแบบเฉียบพลันที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ในตู้แช่แข็ง (deep freezer model 8417, Forma Scientific, USA) นำมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath model SW22, Julabo, Germany) ที่ 37 องศาเซลเซียส (freeze-thawed) จำนวน 3 รอบ จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge model CAX 370, Tomy, Japan) ที่ 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ (cell lysate) โดยใช้ปิเปตดูดส่วนใสใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 3 มิลลิลิตร สำหรับนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสบนแผ่นในเซลล์ กรณีไม่สามารถนำมาตรวจวิเคราะห์ได้ทันทีให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส โดยไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 7 วัน

การตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน⁽⁸⁾

การตรวจวิเคราะห์ประกอบด้วย 3 วิธีทดสอบ ได้แก่ การตรวจหา CPE ใน indicator cells ที่ติดเชื้อไวรัสปนเปื้อน การตรวจวิเคราะห์ hemadsorption และ hemagglutination

การตรวจหา CPE ใน indicator cells ที่ติดเชื้อไวรัสปนเปื้อน

นำ indicator cells ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ Vero, MRC-5 และ Vero 76 ที่เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 16 – 24 ชั่วโมง มาล้างผิวหน้าเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (PBS(-)) จากนั้นเติมตัวอย่าง cell lysate ของตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี indicator cells ที่ใช้ทดสอบ สำหรับกลุ่มควบคุมให้เติมเฉพาะอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator model CB 170, Binder, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เติมหาอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับ indicator cell แต่ละชนิด ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยเซลล์ Vero และเซลล์ Vero 76 ให้บ่มต่อเนื่อง 7 วัน ส่วนเซลล์ MRC-5 ให้บ่มต่อเนื่อง 14 วัน ระหว่างนี้อ่านผลการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope model CK2, Olympus, Japan) ทุกวัน เพื่อตรวจหา CPE ของเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส เมื่อครบกำหนดเวลา นำ indicator cells ชุดแรกไปทำให้เซลล์แตกโดยการทำให้ freeze-thawed 3 ครั้ง จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสเพื่อนำไปทำการทดสอบหา CPE ในรอบที่ 2 ซึ่งทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบรอบแรก ตัวอย่าง cell lysate ซึ่งได้จากการทำให้เซลล์แตกในรอบที่ 2 นี้ นำไปทดสอบการหา CPE ของเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนในรอบที่ 3 ในเพลตสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6-well flat bottom cell culture plate, Cat. No. CLS3335, Corning) ก่อนการทดสอบให้ล้างเซลล์ด้วย PBS(-) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร 1 ครั้ง แล้วจึงเติมตัวอย่าง cell lysate ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกในรอบที่ 2 ลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลุม ต่อชนิดของ indicator cells สำหรับหลุมกลุ่มควบคุมให้เติมด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 2 หลุม และหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมบวกให้เติมเชื้อไวรัสมาตรฐานชนิดละ 2 หลุม ได้แก่ BPIV3 และ measles virus มีค่าความแรง 100 CCID₅₀/mL หลุมละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เติมหาอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับ indicator cell แต่ละชนิดลงไป 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มต่อในสภาวะเช่นเดียวกับการทดสอบในรอบที่ 1 และรอบที่ 2 อ่านผลการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน เมื่อครบกำหนดเวลาหรือพบว่ามี CPE มากเกินกว่า 80% ของพื้นที่ผิวเซลล์ที่เป็น indicator cells ให้เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบ hemagglutination ส่วนตัวเซลล์ indicator cell แต่ละชนิดที่ยังคงเกาะอยู่ที่ผิวหน้าของเพลต ให้นำไปใช้ทดสอบ hemadsorption ต่อไป

การทดสอบ hemadsorption

เตรียมสารละลายเม็ดเลือดแดงไก่ผสมเม็ดเลือดแดงหนูตะเภา ความเข้มข้น 0.5% โดยใช้ปิเปตดูดเลือดไก่ในสารละลาย Alsever (จัดซื้อจากโรงพยาบาลบ้านสัตว์ศาลายา) หรือเลือดหนูตะเภาในสารละลาย Alsever (จัดซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นขนาด 15 มิลลิลิตร เติม PBS(-) อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นล้างด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที อย่างน้อย 3 ครั้ง ปิเปตส่วนใสทิ้ง ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนของเม็ดเลือดแดงสัตว์แต่ละชนิด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงใน PBS(-) ซึ่งแช่เย็นไว้แล้วในขวดแก้ว ปริมาตร 19.9 มิลลิลิตร ในขั้นตอนนี้จะได้เม็ดเลือดแดงไก่ และเม็ดเลือดแดงหนูตะเภาที่มีความเข้มข้น 0.5% ให้นำทั้ง 2 ส่วนมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปใช้ในการทดสอบ

การทดสอบ hemadsorption ทำโดย แบ่งการทดสอบเป็น 2 ชุด นำ indicator cell แต่ละชนิดที่ผ่านการทดสอบหา CPE ใน indicator cells จากการทดสอบก่อนหน้านี้และอยู่ในเพลทสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ทำการทดสอบต่อ โดยล้างผิวหน้าเซลล์ด้วย PBS(-) อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเม็ดเลือดแดงไก่ผสมกับเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภาอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้น 0.5% ที่เตรียมไว้ใส่ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 2 มิลลิลิตร จนครบทุกหลุมและทุกเพลท นำชุดการทดสอบชุดแรกของ indicator cell แต่ละชนิด ไปบ่มที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ส่วนอีก 1 ชุด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาล้างผิวหน้าของแต่ละหลุมด้วย PBS(-) อุณหภูมิห้อง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง อ่านผลการทดสอบได้กล้องจุลทรรศน์ โดยหลุมที่เกิดปฏิกิริยา hemadsorption ให้บันทึกผลเป็นบวก หากไม่เกิดปฏิกิริยาให้บันทึกผลเป็นลบ

การทดสอบ hemagglutination

การทดสอบ hemagglutination ทำโดยแบ่งการทดสอบเป็น 2 ชุด นำน้ำเลี้ยงเซลล์จากตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบหา CPE ของเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนมาแล้ว นำไปปั่นที่ 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาหยอดลงในเพลทสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (96-well round bottom cell culture plate, Cat. No. CLS3367, Corning) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปตแบบหลายช่อง โดยเริ่มหยอดจากตัวอย่างที่เป็นกลุ่มควบคุมลบ ตัวอย่าง cell lysate จากเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ส่งตรวจ และกลุ่มควบคุมบวกของการทดสอบ hemagglutination ซึ่งใช้เชื้อไวรัส sendai ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:4 โดยหยอดตลอดแถวในแนวดิ่งของเพลท จำนวน 8 หลุม จากนั้นเติมสารละลายเม็ดเลือดแดงไก่ผสมกับเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภา ความเข้มข้น 0.5% หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทำการทดสอบชุดละ 2 เพลท จากนั้นนำไปบ่มที่ 2-8 องศาเซลเซียส จำนวน 1 ชุด และที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชุด เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลการทดสอบ โดยหลุมที่เม็ดเลือดแดงแผ่กระจายตัวเป็นร่างแห ให้บันทึกผลการทดสอบเป็นบวก ส่วนหลุมที่เกิดเม็ดตะกอนของเม็ดเลือดแดงที่ก้นหลุมให้บันทึกผลเป็นลบ

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี^(10,11)

เนื่องจากการตรวจหาเชื้อไวรัสบนแผ่นในเซลล์ Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ซึ่งเป็นการปนเปื้อนในปริมาณที่น้อย และเป็นการตรวจวิเคราะห์ในเชิงคุณภาพ ดังนั้นในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสบนแผ่นในเซลล์ Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงตรวจสอบ มีการดำเนินการใน 2 พารามิเตอร์ ได้แก่ การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (specificity) และขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD)

การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี

ทำการทดสอบโดยนำเชื้อไวรัสที่ใช้ในกลุ่มควบคุมบวก ได้แก่ เชื้อไวรัส measles และ BPIV3 ที่ผ่านการเจือจางให้มีค่าความแรง อยู่ระหว่าง 10-100 CCID₅₀/mL มา spike ลงใน cell lysate ของตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยเติมลงในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นทำการทดสอบโดยเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่าง cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero และกลุ่มควบคุมลบ ซึ่งมีเกณฑ์การทดสอบดังนี้ ตัวอย่าง cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่มีการ spike เชื้อไวรัส measles และ BPIV3 ต้องตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส โดยตรวจพบ CPE ที่มีลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสนั้นๆ บนผิวของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็น indicator cells หรือให้ผลบวกในการทดสอบ hemadsorption หรือ hemagglutination เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมบวก ส่วน cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ไม่มีการ spike เชื้อไวรัส ต้องไม่พบ CPE ของเชื้อไวรัส และให้ผลลบในการทดสอบ hemadsorption และ hemagglutination เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมลบ

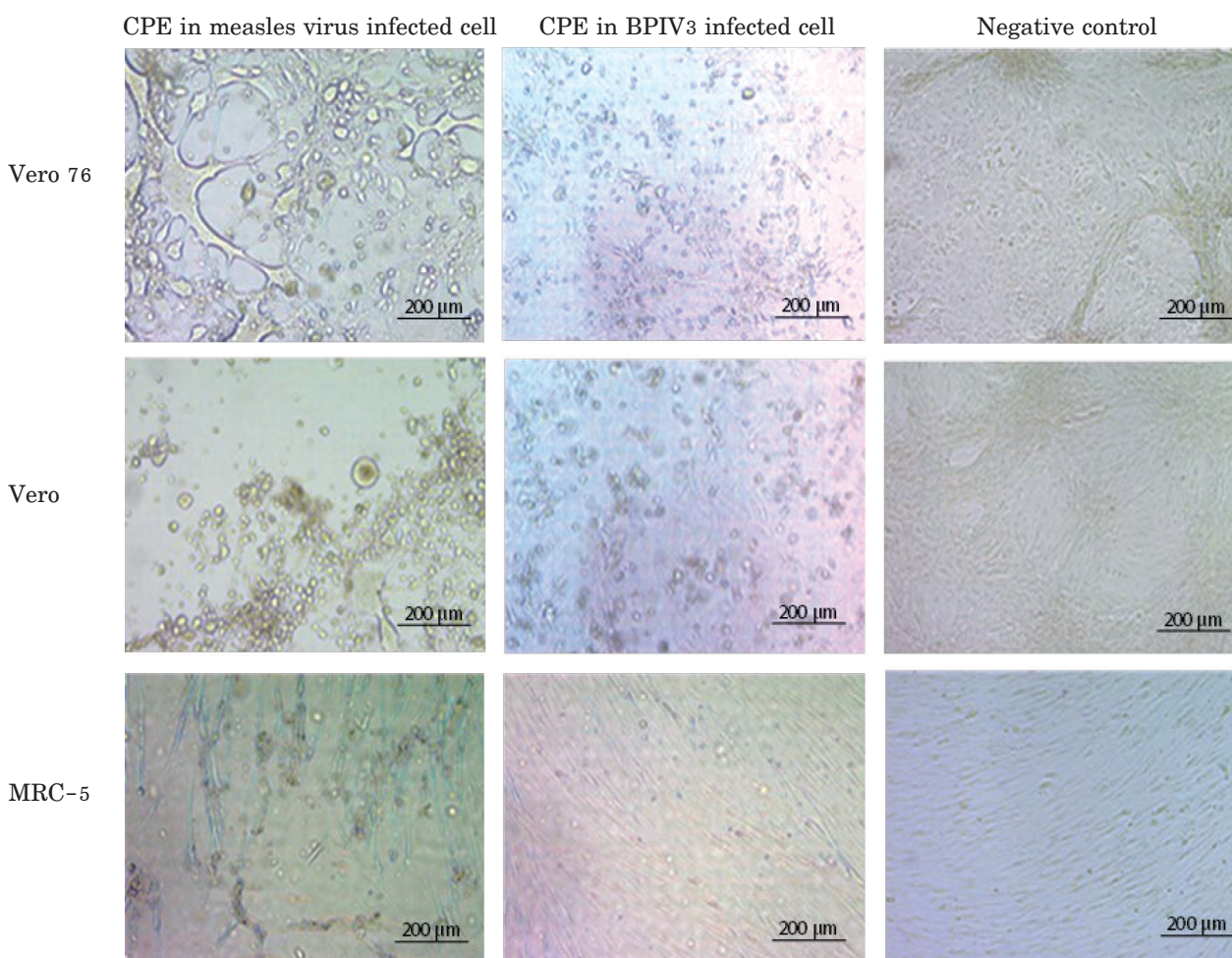
การตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ

ทำการทดสอบโดยนำเชื้อไวรัสที่ใช้สำหรับกลุ่มควบคุมบวก ได้แก่ เชื้อไวรัส measles และ BPIV3 เจือจางด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีค่าความแรง ที่ 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 100.0 และ 1,000.0 CCID₅₀/mL นำการทดสอบมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ จากนั้นอ่านค่า LOD จากระดับความแรงต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส โดยต้องตรวจพบการปนเปื้อนจากการเกิด CPE หรือให้ผลบวกในการทดสอบ hemagglutination หรือ hemadsorption

ผล

การตรวจหา CPE ใน indicator cells ที่ติดเชื้อไวรัสปนเปื้อน

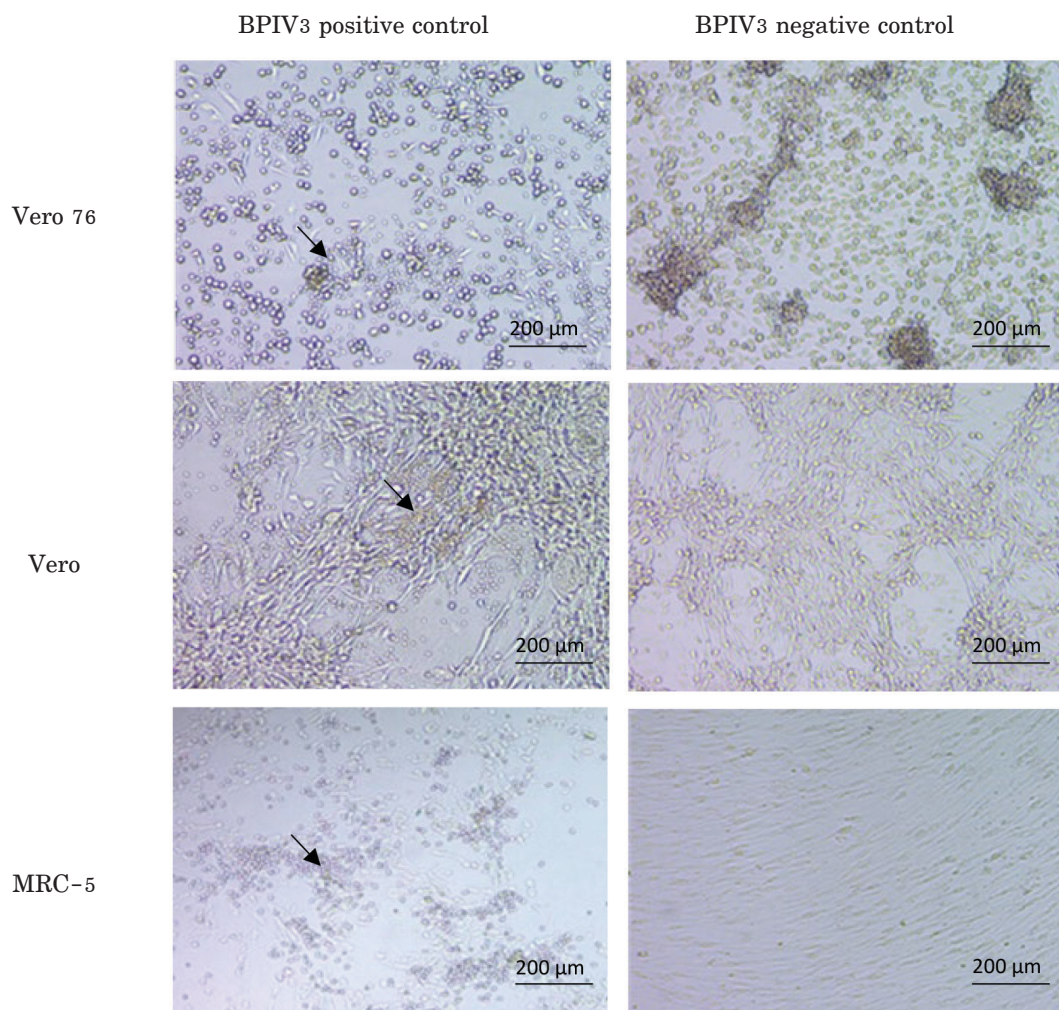
ในการตรวจหา CPE ของเชื้อไวรัสในตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่มีการเติมเชื้อไวรัสควบคุมบวก ได้แก่ measles และ BPIV3 สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ โดย measles เกิด CPE ที่มีลักษณะเซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการหลอมรวมกันของนิวเคลียส (multinucleated giant cells) และ BPIV3 เกิด CPE ที่เซลล์ หดตัว กลม และพบเซลล์ที่ถูกทำลายอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสนั้นๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็น indicator cells ที่ใช้ในการทดสอบ ผลการทดสอบให้ผลเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมบวก ยกเว้นในเซลล์ MRC-5 ซึ่งไม่พบการเกิด CPE ของเชื้อไวรัส BPIV3 ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การเกิด CPE ของเชื้อไวรัส measles และ BPIV3 ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero 76, Vero และ MRC-5 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ

การทดสอบ hemadsorption

เมื่อนำ indicator cells ชนิดต่าง ๆ ซึ่งผ่านการตรวจหา CPE ของเชื้อไวรัสในรอบที่ 3 ทำการทดสอบ hemadsorption พบว่าในตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่มีการ spike เชื้อไวรัสกลุ่มควบคุมบวก สามารถตรวจพบการเกิดปฏิกิริยา hemadsorption บนผิว indicator cells ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมบวก ขณะที่ตัวอย่างเซลล์ Vero ที่ไม่เติมเชื้อไวรัสกลุ่มควบคุมบวก ไม่พบการเกิดปฏิกิริยา hemadsorption หรือให้ผลการทดสอบเป็นลบ เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมลบ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบ hemadsorption ใน indicator cells ชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการ spike เชื้อไวรัส BPIV3 โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ลูกศรแสดงบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา hemadsorption บนผิวของ indicator cells

การทดสอบ hemagglutination

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ของ indicator cells ชนิดต่าง ๆ ซึ่งผ่านการตรวจหา CPE รอบที่ 3 มาทำการทดสอบ hemagglutination พบว่าหากตัวอย่างเติมเชื้อไวรัส BPIV3 ในตัวอย่างเซลล์ Vero เกิดปฏิกิริยา hemagglutination หรือให้ผลการทดสอบเป็นบวกทุกชนิด เช่นเดียวกับหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมบวก ขณะที่ตัวอย่างเซลล์ Vero ซึ่งเติมเชื้อไวรัส measles ให้ผลการทดสอบเป็นลบทั้งหมด เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ Vero และกลุ่มควบคุมลบ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบ hemagglutination

การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี

เมื่อทำการ spike เชื้อไวรัส measles และ BPIV3 ลงใน cell lysate ที่ได้จากตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero เพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่างเซลล์ที่มีการปนเปื้อนจากเชื้อไวรัสโดยวิธีการทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสเมื่อตรวจสอบหาการเกิด CPE ใน indicator cells ที่ติดเชื้อไวรัสปนเปื้อนได้ เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมบวก ในขณะที่ไม่พบการเกิด CPE ในตัวอย่าง cell lysate ของเซลล์ Vero ที่ไม่มีการ spike เชื้อ เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมลบ และ indicator cell ชนิด MRC-5

เมื่อนำเซลล์ที่อยู่ในเพลทหลังการทดสอบด้วยการตรวจหา CPE มาทดสอบต่อด้วยวิธี hemadsorption พบว่าในหลุมที่มีการเติม cell lysate ที่มีการ spike เชื้อไวรัส measles และ BPIV3 ให้ผลเป็นบวกใน indicator cells ทั้ง 3 ชนิด รวมทั้งเซลล์ MRC-5 ซึ่งไม่พบการเกิด CPE ในการทดสอบก่อนหน้านี้ ในหลุมที่มีการเติมตัวอย่าง cell lysate ของเซลล์ Vero ที่ไม่มีการ spike เชื้อ ให้ผลการทดสอบเป็นลบ เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมลบ

สำหรับน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากหลุมที่ผ่านการตรวจหา CPE ได้นำมาทดสอบต่อด้วยวิธี hemagglutination พบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากหลุมที่มีการ spike เชื้อไวรัส BPIV3 ให้ผลการทดสอบเป็นบวกเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมบวก ในขณะที่น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากหลุมที่มีการ spike เชื้อไวรัส measles ให้ผลการทดสอบเป็นลบ เช่นเดียวกับน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากหลุมที่ไม่มีการ spike เชื้อ และกลุ่มควบคุมลบ ดังแสดงในตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสได้ เมื่อในตัวอย่างเซลล์ Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนมีเชื้อไวรัสปนเปื้อน โดยมีผลการทดสอบเป็นบวกในวิธีการทดสอบใดการทดสอบหนึ่ง จากการตรวจหา CPE ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส หรือ hemadsorption หรือ hemagglutination อาจให้ผลบวกมากกว่า 1 วิธีได้ และไม่พบการปนเปื้อนหรือให้ผลเป็นลบ เมื่อไม่มีการ spike เชื้อไวรัส

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสบนแผ่นในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงร่วมในเซลล์ตรวจสอบ

ตัวอย่าง	การทดสอบหา CPE			hemadsorption			hemagglutination			การแปลผล
	Vero76	Vero	MRC-5	Vero76	Vero	MRC-5	Vero76	Vero	MRC-5	
น้ำเลี้ยงเซลล์ Vero	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	negative
น้ำเลี้ยงเซลล์ Vero + measles virus	+	+	+	+	+	+	-ve	-ve	-ve	positive
น้ำเลี้ยงเซลล์ Vero + BPV13	+	+	-ve	+	+	+	+	+	+	positive
measles positive control	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	positive
BPV13 positive control	+	+	-ve	+	+	+	ND	ND	ND	positive
sendai virus positive control	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	positive
negative control	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	negative

*ND: Not done

การตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ

พบว่าใน indicator cells ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ Vero 76, Vero และ MRC-5 เกิดลักษณะ CPE ที่เฉพาะของเชื้อไวรัสแต่ละชนิด แต่ในเซลล์เพาะเลี้ยง MRC-5 ไม่เกิด CPE ของเชื้อไวรัส BPV 3 ดังแสดงในภาพที่ 1 ในขณะที่ผลการทดสอบ hemadsorption ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้องให้ผลการทดสอบเหมือนกัน โดยสามารถตรวจพบการเกิดปฏิกิริยาการ hemadsorption บนผิวของ indicator cells ทั้ง 3 ชนิด โดยค่าความแรงต่ำสุดของเชื้อไวรัส measles และ BPV13 ที่ตรวจพบได้จากการตรวจหา CPE ของเชื้อใน indicator cells คือ 0.1 และ 0.01 CCID₅₀/mL ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในการทดสอบ hemagglutination พบว่ามีเพียงเชื้อไวรัส BPV13 ที่สามารถตรวจพบได้ที่มีความแรงต่ำสุดคือ 0.01 CCID₅₀/mL แต่เมื่อทดสอบด้วยเชื้อไวรัส measles ซึ่งแม้จะให้ผลบวกจากการทดสอบ CPE และการทดสอบ hemadsorption ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จาก indicator cells ทุกชนิดพบว่าให้ผลการทดสอบเป็นลบในการทดสอบ hemagglutination ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบของวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสบนแผ่นในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงร่วมในเซลล์ตรวจสอบ

ไวรัส	Indicator cells	การทดสอบหา CPE			การทดสอบ hemadsorption			การทดสอบ hemagglutination		
		ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (CCID ₅₀ /mL)	+VE	-VE	ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (CCID ₅₀ /mL)	+VE	-VE	ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (CCID ₅₀ /mL)	+VE	-VE
measles	Vero 76	0.1	+	-ve	0.1	+	-ve	-ve	+	-ve
	Vero	1	+	-ve	1	+	-ve	-ve	+	-ve
	MRC-5	1	+	-ve	1	+	-ve	-ve	+	-ve
BPV13	Vero 76	0.01	+	-ve	0.01	+	-ve	0.01	+	-ve
	Vero	0.1	+	-ve	0.1	+	-ve	0.1	+	-ve
	MRC-5	-ve	-ve	-ve	10	+	-ve	10	+	-ve

วิจารณ์

ในการนำวิธีตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยเทคนิคที่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในการทดสอบมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพเซลล์สำหรับการผลิตวัคซีนนั้น จำเป็นต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธีก่อน เพื่อให้มั่นใจได้ว่าวิธีที่ใช้มีความถูกต้องและเหมาะสม เนื่องจากการตรวจหาการปนเปื้อนของสารที่มีปริมาณน้อยมากในตัวอย่างที่ตรวจ⁽¹²⁾ ในการตรวจสอบความถูกต้องจึงทำใน 2 พารามิเตอร์ คือ การทดสอบหาความจำเพาะของวิธี และขีดจำกัดของการตรวจพบ^(10,11) ในการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีสามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้ตามข้อกำหนด แม้ว่าในเซลล์ MRC-5 ไม่พบการเกิด CPE ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส BPIV3 ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์ดังกล่าวสามารถติดเชื้อได้แต่ไม่เกิด CPE และให้ผลการทดสอบเป็นบวกในการทดสอบ hemadsorption และ hemagglutination ในขณะที่การทดสอบเมื่อใช้เชื้อไวรัส measles พบว่าในการทดสอบ hemagglutination ให้ผลการทดสอบเป็นลบทั้งหมด เมื่อมีการ spike เชื้อไวรัสในตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ทั้งที่เชื้อไวรัส measles เป็นเชื้อไวรัสที่มีโปรตีน hemagglutinin จากข้อมูลที่มีการศึกษาทำมาก่อนหน้า พบว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้ในน้ำเลี้ยงเซลล์มีปริมาณต่ำกว่าในเซลล์ที่ติดเชื้อมาก และเสียความสามารถในการติดเชื้อเมื่ออยู่นอกเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใน 13 ชั่วโมง⁽¹³⁾ จึงเป็นไปได้ว่าผลการทดสอบ hemagglutination ให้ผลลบ ซึ่งผลการทดสอบในกลุ่มควบคุมบวกที่ใช้เชื้อไวรัส measles ก็ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามในการทดสอบหา CPE สามารถตรวจพบ CPE ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสได้ชัดเจน และให้ผลบวกในการทดสอบ hemadsorption

สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องในการทดสอบความจำเพาะของวิธี พบว่าสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสได้ตามข้อกำหนด และในการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ สามารถกำหนดค่าความแรงต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสที่ใช้ทดสอบได้ โดยเชื้อไวรัส measles สามารถตรวจพบได้ที่ระดับความแรงต่ำสุด 0.1 CCID₅₀/mL และเชื้อไวรัส BPIV3 สามารถตรวจพบได้ที่ระดับความแรงต่ำสุด 0.01 CCID₅₀/mL ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้า ซึ่งมีการตรวจพบเชื้อไวรัสปนเปื้อนที่ระดับความแรงต่ำสุดต่ำกว่า 1.0 CCID₅₀/mL แต่มีการใช้ชุด indicator cells ต่างกันคือ เซลล์ Vero, MRC-5 และ HeLa⁽⁶⁾ ซึ่งในการศึกษานี้หากใช้เชื้อไวรัสในการศึกษาเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีมากกว่านี้ จะทำให้ผลการศึกษามีความแม่นยำขึ้น จากผลการศึกษาพบว่า วิธีการวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero สำหรับการผลิตวัคซีน โดยเทคนิคที่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงตรวจสอบ สามารถนำมาใช้ในการทดสอบหาเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนได้หากใช้ indicator cells ที่เหมาะสม ทั้งนี้ในการจะตรวจหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตวัคซีนหรือชีววัตถุจำเป็นต้องใช้หลายวิธีทดสอบประกอบกัน เนื่องจากวิธีการทดสอบนี้ยังมีข้อจำกัด คือจะสามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้เฉพาะเมื่อเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนนั่นเป็นชนิดที่ทำให้เกิด CPE ใน indicator cells ที่ใช้ในการทดสอบได้ หรือเป็นเชื้อไวรัสที่สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยา hemadsorption หรือ hemagglutination เท่านั้น⁽¹⁴⁾ การศึกษานี้นำไปสู่การเปิดบริการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสทั่วไปในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero สำหรับการผลิตวัคซีน นับเป็นนวัตกรรมบริการของสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเปิดให้บริการตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2564⁽¹⁵⁾ และในอนาคตอาจนำไปประยุกต์ใช้กรณีเซลล์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนหรือชีววัตถุเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ ได้ โดยต้องมีการเลือกชนิดของ indicator cells เพื่อใช้ในการทดสอบให้เหมาะสมกับเชื้อไวรัสที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในเซลล์ที่ใช้ในการผลิตชนิดนั้น รวมถึงตรวจสอบความถูกต้องของวิธีก่อนที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนในตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงต่อไป

สรุป

การทดสอบหาเชื้อไวรัสปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยเทคนิคที่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงตรวจสอบ (indicator cells) เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง โดยผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีใน 2 พารามิเตอร์ คือ การทดสอบหาความจำเพาะของวิธีและขีดจำกัดของการตรวจพบ โดยในการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีพบว่าสามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้ตามข้อกำหนด และในการตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ สามารถกำหนดค่าความแรงต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสที่ใช้ทดสอบได้ โดยในการศึกษานี้สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนที่ใช้ในการศึกษาได้ที่ระดับความแรงต่ำสุด 0.01 CCID₅₀/mL จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาใช้ในการทดสอบหาเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนในเซลล์ Vero ซึ่งใช้ในการผลิตวัคซีนหรือชีววัตถุได้ หากใช้เซลล์เป้าหมายสำหรับการทดสอบที่เหมาะสม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวัคซีนแห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ได้สนับสนุนทุนเพื่อการพัฒนาภายใต้โครงการเสริมสร้างศักยภาพของห้องปฏิบัติการภาครัฐ ในการตรวจสอบคุณลักษณะและการควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยง Vero สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีน และขอขอบคุณสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนการดำเนินงานในทุกด้าน

เอกสารอ้างอิง

1. Kiesslich S, Kamen AA. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnol Adv.* [serial online]. 2020; [cited 2021 Oct 17]; 44: [9 screens]. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975020301105?via%3Dihub>.
2. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8(5): 607-18.
3. World Health Organization. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks Annex 3, TRS No 978. [online]. 2013; [cited 2021 Mar 2]; [110 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications/m/item/animal-cell-culture-trs-no-978-annex3>.
4. Sadeghi M, Kapusinszky B, Yugo DM, Phan TG, Deng X, Kanevsky I, et al. Virome of US bovine calf serum. *Biologicals* 2017; 46: 64-7.
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(6): 359-69.
6. Schirtzinger EE, Suddith AW, Hause BM, Hesse RA. First identification of porcine parvovirus 6 in North America by viral metagenomic sequencing of serum from pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virol J.* [serial online]. 2015; [cited 2021 Mar 2]; 12: [10 screens]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4609089/pdf/12985_2015_Article_401.pdf.
7. European Medicines Agency. Quality of biotechnological products: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin, ICH Q5A (R1). [online]. 1997; [cited 2021 Oct 17]; [29 screens]. Available from: URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q5a-r1-quality-biotechnological-products-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived>.

8. 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 diseases indications. [online]. 2010; [cited 2021 Oct 17]; [50 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/media/78428/download>.
9. 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.
10. Appendix 4 Analytical method validation. In: World Health Organization. Annex 4 Supplementary guidelines on good manufacturing practices: validation, TRS No. 937. Geneva: World Health Organization; 2006. p. 136-140.
11. European Medicines Agency. ICH harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). [online]. 2005 [cited 2021 Oct 17]; [17 screens]. Available from: URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
12. Nims RW. Detection of adventitious viruses in biologicals--a rare occurrence. *Dev Biol (Basel)* 2006; 123: 153-64.
13. Matumoto M. Multiplication of measles virus in cell cultures. *Bacteriol Rev* 1966; 30(1): 152-76.
14. Morris C, Lee YS, Yoon S. Adventitious agent detection methods in bio-pharmaceutical applications with a focus on viruses, bacteria, and mycoplasma. *Curr Opin Biotechnol* 2021; 71: 105-14.
15. เซลล์เพาะเลี้ยง Vero สำหรับการผลิตวัคซีนใน: ระเบียบกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ว่าด้วยอัตราค่าบำรุงการตรวจวิเคราะห์และให้บริการ ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2564). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 80 ง (วันที่ 9 เมษายน 2564). หน้า 10.

Development and Validation for Determination of Adventitious Viruses in Vero Cells Used for Vaccine Production Using Indicator Cells

Sukanlayanee Chaimee, Supaporn Chumpol, Wereyamarst Jaroenkunathum, and Supaporn Phumiamorn

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT A Vero cell substrate used to produce vaccines requires strict quality control. The determination of adventitious viruses by using indicator cells is one of the tests according to the WHO requirements. Therefore, the objectives of this study were to develop and validate a testing method to determine adventitious viruses in Vero cells. The optimal concentration of three indicator cells including Vero 76, MRC-5 and Vero cells (the same species used in the vaccine production) and the titers of two representative measles virus and bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) were analyzed. In this study, a Vero cell culture (1×10^7 cells/mL) was used for detection of viral contamination with co-culture in three indicator cells by observation of cytopathic effect (CPE), hemadsorption and hemagglutination. The results showed that this method had specificity that was positive to measles virus and BPIV3 at the limitation of lowest titers of 0.1 and 0.01 CCID₅₀/mL, respectively. It is thus indicated that this method could be beneficial to determine the contamination of adventitious viruses in Vero cells used for vaccine production in laboratory.

Keywords: Vero cells, Adventitious viruses, Vaccine production