

Nuôi cấy virus EV71 trong hệ thống lắc cho sản xuất vắc xin phòng bệnh tay, chân, miệng

Nguyễn Thị Yến Nhi^{1,2}, Nguyễn Thị Hạnh Lan¹, Hoàng Ngọc Khánh Quỳnh¹,
Lê Thị Liên¹, Lê Hà Tầm Dương¹, Cao Thị Bảo Vân^{1,3*}

¹Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Viện Công nghệ Y dược Văn Cao

Ngày nhận bài 1/4/2022; ngày chuyển phản biện 5/4/2022; ngày nhận phản biện 4/5/2022; ngày chấp nhận đăng 9/5/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm thiết lập hệ thống nuôi cấy virus EV71 trên tế bào Vero trong hệ thống nuôi cấy lắc (Wave bioreactor) sử dụng các giá mang vi thể để sản xuất vắc xin phòng bệnh tay, chân, miệng (TCM) do virus EV71 gây ra. Kết quả khảo sát 2 loại giá mang vi thể là Cytodex 1 và Cytodex 3 cho thấy, Cytodex 1 cho hiệu quả tốt hơn khi sử dụng để nuôi cấy tế bào Vero trong điều kiện huyền phù. Sự kết hợp với Cytodex 1 trên hệ thống Wave bioreactor cho hiệu suất nuôi cấy tế bào Vero đạt trên 3×10^6 tế bào/ml. Liều gây nhiễm tối ưu của virus EV71 trên tế bào Vero được xác định là 0,0001 TCID₅₀ (50% Tissue culture infectious dose)/ml. Quy trình nuôi cấy virus EV71 trên tế bào Vero đã thiết lập thích hợp cho việc ứng dụng sản xuất vắc xin với hiệu giá virus 10^8 TCID₅₀/ml vào ngày thứ 5 sau gây nhiễm.

Từ khoá: Cytodex 1; EV71; vắc xin phòng bệnh tay, chân, miệng; Vero cell; Wave bioreactor.

Chỉ số phân loại: 3.3

Đặt vấn đề

Bệnh TCM là một bệnh truyền nhiễm phổ biến ở trẻ em, nhất là trẻ dưới 5 tuổi tại khu vực châu Á Thái Bình Dương. Ước tính mỗi năm có khoảng 1 triệu ca mắc bệnh TCM trong khu vực [1]. Dấu hiệu nhận biết thường là xuất hiện những nốt mụn nước trên da trong khoang miệng, lòng bàn tay và bàn chân, ở móng hoặc quanh hậu môn. Bệnh có thể diễn biến nặng và gây biến chứng nguy hiểm như viêm não, màng não, viêm cơ tim, phù phổi cấp dẫn đến tử vong [2]. Cho đến nay bệnh vẫn chưa có thuốc điều trị, vắc xin đang là cách thức tốt nhất để kiểm soát dịch bệnh. Vắc xin phòng bệnh TCM toàn phần bất hoạt được phát triển trên tế bào Vero đã được nghiên cứu tại một số nước như Singapore, Hàn Quốc và Trung Quốc, tuy nhiên chúng sử dụng được lựa chọn và đánh giá trên các chủng đang lưu hành tại từng quốc gia [3] và hiệu quả bảo vệ của chúng đối với các chủng lưu hành tại Việt Nam hầu như chưa được ghi nhận. Trong quy trình sản xuất vắc xin toàn phần bất hoạt, việc thiết lập hệ thống nuôi cấy tế bào và virus đạt năng suất cao phục vụ sản xuất kháng nguyên là một khâu quan trọng góp phần tiết kiệm thời gian, chi phí, tăng hiệu quả sản xuất. Việc sử dụng các hệ thống nuôi cấy huyền phù bioreactor kết hợp các giá mang vi thể (microcarrier) là giải pháp tăng năng suất được áp dụng rộng rãi hiện nay trong các công nghệ sản xuất vắc xin dựa trên nuôi cấy tế bào [4]. Với mong muốn phát triển vắc xin toàn phần bất hoạt phòng bệnh TCM do EV71 dựa trên chủng lưu hành tại Việt Nam, trong phạm vi nghiên

cứ này, các tác giả thực hiện nghiên cứu thiết lập quy trình nuôi cấy virus EV71 trên tế bào Vero trong hệ thống Wave bioreactor kết hợp giá mang vi thể nhằm phục vụ việc sản xuất kháng nguyên EV71 cho vắc xin TCM do EV71 gây ra.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng virus EV71/B5 sử dụng trong nghiên cứu được phân lập từ mẫu bệnh phẩm được gửi đến Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh, được phân lập, định danh và trải qua quá trình thích ứng và chọn lọc trên tế bào Vero cũng như đánh giá để chọn làm chủng ứng cử cho vắc xin TCM.

Tế bào: Dòng tế bào Vero (ECAAC No.88020401) được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) cung cấp cho sản xuất vắc xin (ống tế bào mang tên W.H.O. VERO SEED LOT 10-87).

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Khoa Vi sinh Miễn dịch, Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh trong thời gian từ năm 2014 đến năm 2018.

Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy tế bào Vero trong bình khuấy (Spinner flask) kết hợp giá mang vi thể: Các giá mang vi thể Cytodex 1 và Cytodex 3 sau khi được xử lý theo hướng dẫn của nhà sản xuất được sử dụng trong bình khuấy thể tích 1 l với nồng độ 2 g/l trong 0,5 l môi trường. Tế bào Vero chuẩn bị trong các chai nuôi cấy chữ T được chuyển vào bình nuôi cấy ở mật

*Tác giả liên hệ: Email: vancao.pasteur@gmail.com

Culture of EV71 virus in wave bioreactor system for production of hand, foot and mouth disease vaccine

Thi Yen Nhi Nguyen^{1,2}, Thi Hanh Lan Nguyen¹,
Ngoc Khanh Quynh Hoang¹, Thi Lien Le¹,
Ha Tam Duong Le¹, Thi Bao Van Cao^{1,3*}

¹Pasteur Institute in Ho Chi Minh city

²University of Science, Vietnam National University,
Ho Chi Minh city

³Vancao Medipharma Technology Institute

Received 1 April 2022; accepted 9 May 2022

Abstract:

The study was carried out to establish an EV71 virus culture system on Vero cells in a shake culture system (Wave bioreactor) incorporating microcarriers for the production of hand, foot and mouth (HFMD) vaccine caused by the EV71 virus. The results of the investigation of 2 types of microcarriers (Cytodex 1 and Cytodex 3), showed that Cytodex 1 gave better efficiency when culturing Vero cells in suspension conditions. The combination with Cytodex 1 on the Wave bioreactor system gave Vero cell culture efficiency of over 3×10^6 cells/ml. The optimal infectious dose of EV71 virus on Vero cells was determined to be 0.0001 TCID₅₀/ml. The optimisation of EV71 virus culture conditions on the Wave bioreactor system has obtained suitable results for the production of vaccine with virus titres 10^8 TCID₅₀/ml on the fifth day after infection. The procedure of production of EV71 virus on Vero cell in Wave bioreactor system was applicable in vaccine production with virus titres 10^8 TCID₅₀/ml on the fifth day after infection.

Keywords: Cytodex 1, EV71, HFMD vaccine, Vero cell, Wave bioreactor.

Classification number: 3.3

độ $1,5 \times 10^4$ - $2,0 \times 10^4$ tế bào/cm² trong môi trường DMEM 10% huyết thanh bào thai bê (FBS), ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, tốc độ khuấy 40 vòng/phút.

Để xác định số lượng tế bào nhân lên trên các giá mang vi thể, phương pháp đếm nhân tế bào thường được sử dụng. Tế bào được xử lý bằng môi trường nhược trương có chất nhuộm để giải phóng nhân. Mẫu huyền phù từ bình nuôi cấy được ly tâm, huyền phù cận giá mang vi thể trong dung dịch nhuộm nhân gồm acid citric 0,1 M có chứa tím tinh thể 0,1%, ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau đó, thực hiện đếm nhân tế bào trên buồng đếm hồng cầu.

Nuôi cấy tế bào Vero trong hệ thống Wave bioreactor kết hợp Cytodex 1: Hạt Cytodex được sử dụng trong hệ thống Wave bioreactor 20/50 EHT với mật độ là 5 g/l. Giá mang vi thể được ổn định trong DMEM 10% FBS ở điều kiện lắc 11 vòng/phút, góc lắc 5°, 37°C từ 1 đến 2 giờ trước khi thêm tế bào dùng nuôi cấy tế bào Vero trong các chai nuôi cấy chữ T chuẩn bị trước cấy vào bioreactor với mật độ $2,0 \times 10^4$ tế bào/cm². Tiến hành nuôi cấy trong điều kiện lắc không liên tục: giai đoạn tế bào bám trên giá mang (tốc độ lắc 16 vòng/phút, góc lắc 5°, thời gian 2 phút; sau đó dừng trong 18 phút, các bước này lặp lại trong vòng 6 giờ); giai đoạn bắt đầu tăng sinh trong 24 giờ tiếp theo hệ thống được duy trì trong điều kiện tốc độ lắc 11 vòng/phút, góc lắc 4°; cuối cùng là giai đoạn tăng sinh ổn định với tốc độ lắc 12 vòng/phút, góc lắc 6° [5].

Gây nhiễm virus EV71: Trong thí nghiệm khảo sát liều gây nhiễm, virus EV71 được gây nhiễm trên chai nuôi cấy chữ T khi tế bào một lớp phủ 90% bề mặt nuôi cấy. Dung dịch virus được pha loãng theo các liều gây nhiễm đã khảo sát và cho hấp phụ trên bề mặt tế bào trong vòng 30 phút, sau đó bổ sung môi trường DMEM 2% FBS, ủ ở 37°C và 5% CO₂. Thu hoạch virus khi tế bào bị hủy hoại hoàn toàn và cất giữ ở -80°C.

Với hệ thống Wave bioreactor, khi tế bào phủ 90% bề mặt hạt Cytodex, virus EV71 được bổ sung vào dịch huyền phù tế bào đang nuôi cấy với liều gây nhiễm phù hợp trong điều kiện lắc liên tục. Điều kiện nuôi cấy trong môi trường DMEM 2% FBS, ở 37°C và 5% CO₂.

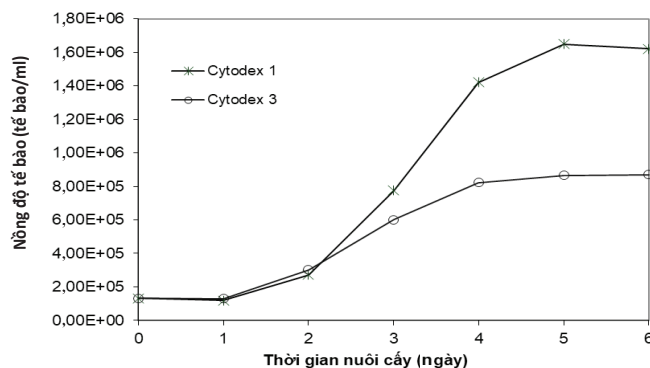
Xác định hiệu giá virus: Hiệu giá virus được xác định bằng TCID₅₀. Tế bào Vero được nuôi cấy trên phiến 96 giếng với mật độ 2×10^4 tế bào/giếng trong 24 giờ, sau đó được gây nhiễm với một dãy nồng độ virus 10^{-1} - 10^{-10} EV71 pha loãng trong môi trường DMEM có bổ sung 5% FBS, ủ ở điều kiện 37°C và 5% CO₂. Kết quả được ghi nhận sau 5 ngày gây nhiễm. Giá trị TCID₅₀ được xác định theo phương pháp Reed - Muench.

Kết quả và bàn luận

So sánh hiệu quả nuôi cấy tế bào Vero trên 2 loại giá mang vi thể Cytodex 1 và Cytodex 3

Nhằm lựa chọn một loại giá mang vi thể cho hiệu suất nuôi cấy tế bào cao nhất, nhóm tác giả chọn đánh giá 2 loại hạt là Cytodex 1 và Cytodex 3 nuôi cấy trong bình khuấy spinner nuôi cấy. Cytodex 1 được tạo thành bằng việc thay thế một mạng lưới dextran liên kết chéo bởi một nhóm N,N-diethylaminoethyl mang điện tích dương. Trong khi đó, Cytodex 3 được phủ một lớp mỏng collagen biến tính lên mạng lưới dextran liên kết chéo hỗ trợ rất tốt cho sự bám dính và phát triển các dòng tế bào trong điều kiện nuôi cấy không bổ sung protein [6].

Đường cong tăng trưởng cho thấy, thời gian pha ở 2 loại hạt tương tự nhau, kéo dài khoảng 24 giờ. Sự phát triển trên Cytodex 3 đạt cực đại ở mức $8,7 \times 10^5$ tế bào/ml và sớm đi vào pha ổn định hơn so với hạt Cytodex 1 (hình 1). Nồng độ tế bào cao nhất trên Cytodex 1 đạt $1,65 \times 10^6$ tế bào/ml sau 5 ngày nuôi cấy. Sự khác nhau về hiệu quả nuôi cấy đạt được trên 2 loại hạt được lý giải bởi diện tích bề mặt nuôi cấy của 2 loại hạt này khác nhau với cùng một khối lượng hạt ($4400 \text{ cm}^2/\text{g}$ với Cytodex 1 và $2700 \text{ cm}^2/\text{g}$ với Cytodex 3) trong cùng một thể tích môi trường và mật độ tế bào ban đầu. Như vậy, với tổng diện tích nuôi cấy nhỏ hơn ở Cytodex 3, mật độ tế bào sẽ sớm đi vào pha ổn định và suy tàn do đạt đến mật độ phủ hoàn toàn.



Hình 1. Sự phát triển của tế bào Vero trên 2 loại giá mang vi thể Cytodex 1 và Cytodex 3.

Trong các hệ thống bình khuấy spinner nuôi cấy, hạt Cytodex 1 thường được cấy với mật độ tối đa 5 g/l môi trường và đạt được năng suất tế bào xấp xỉ 2×10^6 tế bào/ml trong 4 hoặc 5 ngày nuôi cấy [7], tương đương với năng suất của chúng tôi đạt được trong khi nghiên cứu này sử dụng mật độ hạt thấp hơn là 2 g/l.

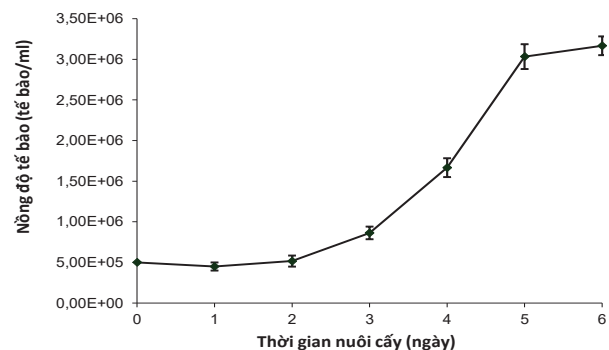
Nuôi cấy tế bào Vero trên hệ thống wave bioreactor với giá thể Cytodex 1

Với những ưu thế của nuôi cấy tế bào trên giá mang vi thể trong hệ thống huyền phù, khảo sát việc sử dụng 2 loại giá mang vi thể là Cytodex 1 và Cytodex 3 trên hệ thống

bình khuấy cho thấy hạt Cytodex 1 có hiệu quả nuôi cấy cao hơn với mật độ tế bào cao hơn trong một đơn vị thể tích. Dựa vào đó, nhóm nghiên cứu tiếp tục khảo sát việc nuôi cấy tế bào Vero trên hệ thống nuôi cấy lắc nhằm tăng thể tích nuôi cấy và chủ động trong khâu kiểm soát các điều kiện nuôi cấy.

Tế bào Vero được cấy vào với mật độ 5×10^5 tế bào/ml. Ngày thứ 1 và 2 sau nuôi cấy, mật độ tế bào có xu hướng giảm do tỷ lệ bám dính trên các giá mang vi thể không đạt 100% và đây là giai đoạn tế bào chưa tăng sinh nhiều. Ngày thứ 3 đến 5 sau nuôi cấy là giai đoạn tăng trưởng pha log, sau 5 ngày nuôi cấy (hình 2), tế bào phủ đều giá mang vi thể và đạt mật độ trung bình đạt $3,2 \times 10^6$ tế bào/ml, sau đó sự phát triển của tế bào có xu hướng tăng trưởng chậm lại và giảm do đã đạt mức độ phủ kín bề mặt giá mang vi thể.

Hạt Cytodex thường được sử dụng với mật độ 0,5-5 g/l, nếu có sự bổ sung môi trường thích hợp, kiểm soát không khí và pH có thể sử dụng nhiều hơn 5 g/l [8]. Trong nghiên cứu này, với hệ thống Wave bioreactor, chúng tôi sử dụng mật độ hạt 5 g/l và đạt mật độ tế bào trung bình $3,2 \times 10^6$ tế bào/ml, tương đương với nghiên cứu sử dụng hệ thống lắc Wave bioreactor tương tự trước đây [9].

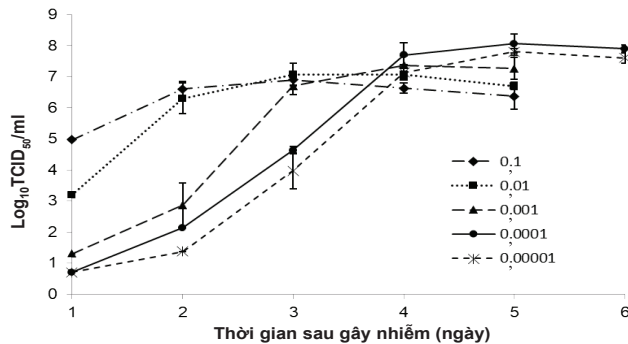


Hình 2. Mật độ tế bào trên hệ thống Wave bioreactor.

Khảo sát liều gây nhiễm tối ưu và thời gian thu hoạch virus

Liều gây nhiễm của virus là số virus cần đưa vào trên tổng số tế bào, cần khảo sát để xác định liều gây nhiễm tối ưu nhằm đạt được hiệu quả lây cao nhất, hay nói cách khác là thu được lượng virus cao nhất phục vụ cho việc sản xuất kháng nguyên. Ở đây chúng tôi khảo sát các liều gây nhiễm 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 và 0,00001 TCID₅₀/tế bào trên chai nuôi cấy chữ T. Kết quả khảo sát cho thấy, tại liều gây nhiễm 0,1 và 0,01 TCID₅₀/tế bào, hiệu giá virus tăng rất nhanh vào ngày thứ 1 sau gây nhiễm và đạt cực đại vào ngày thứ 2-3 sau gây nhiễm với hiệu giá trung bình đạt khoảng 7 TCID₅₀/ml. Với liều gây nhiễm 0,001 TCID₅₀/tế bào, hiệu giá virus đạt tăng chậm hơn, sau ngày thứ 3 hiệu giá virus mới đạt cao nhất tại mức khoảng 7 TCID₅₀/ml. Với các liều gây nhiễm 0,0001 và 0,00001 TCID₅₀/tế bào, hiệu giá virus tăng chậm nhất, sau 5 ngày nuôi cấy hiệu giá đạt cao nhất

với trung bình khoảng 10^8 TCID₅₀/ml và giảm dần những ngày sau đó. Hiệu giá virus đạt được sau nuôi cấy liều gây nhiễm 0,00001 và 0,0001 TCID₅₀/tế bào không có khác biệt về mặt thống kê. Tuy nhiên, đường cong tăng trưởng của virus sau gây nhiễm ở liều gây nhiễm 0,00001 nằm thấp hơn so với liều 0,0001 TCID₅₀/tế bào (hình 3) thể hiện xu hướng giảm dần của sự tăng trưởng nên chúng tôi chọn liều gây nhiễm 0,0001 TCID₅₀/ml để trên hệ thống nuôi cấy sản xuất kháng nguyên.



Hình 3. Sự nhân lên của virus với các liều gây nhiễm khác nhau.

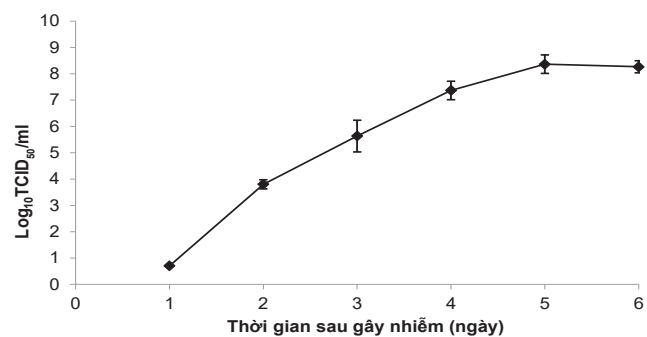
Kết quả này cũng được ghi nhận bởi nhiều nghiên cứu trước đây, không chỉ với virus EV71 mà còn với những virus khác sau quá trình thích nghi trên dòng tế bào nuôi cấy như virus cúm [10, 11]. Nguyên nhân được lý giải là khi được gây nhiễm với liều gây nhiễm cao, ngay lập tức các virus được cấy vào sẽ xâm nhập toàn bộ các tế bào trong chai nuôi cấy dẫn đến hiệu giá tăng lên rất nhanh, tuy nhiên khi toàn bộ tế bào bị xâm nhập và phá hủy nhanh chóng, chúng sẽ không thể tiếp tục nhân lên thêm trong bình nuôi cấy làm các virus vừa sinh ra không còn tế bào để xâm nhập dẫn đến việc mặc dù tăng sinh rất nhanh nhưng hiệu giá virus không cao. Với những liều gây nhiễm đủ nhỏ 10^{-5} - 10^{-6} TCID₅₀/tế bào, khi mới bắt đầu được gây nhiễm, chỉ một lượng nhỏ các tế bào bị xâm nhập, các tế bào khỏe mạnh còn lại sẽ tiếp tục tăng sinh lấp vào khoảng trống của các tế bào đã chết, nhờ đó mà các thế hệ virus về sau vẫn còn tế bào để xâm

nhập nhiều vòng đời hơn dẫn đến hiệu suất tăng sinh cao hay virus sẽ đạt hiệu giá cao hơn.

Khảo sát thời điểm thu hoạch virus trên hệ thống Wave bioreactor

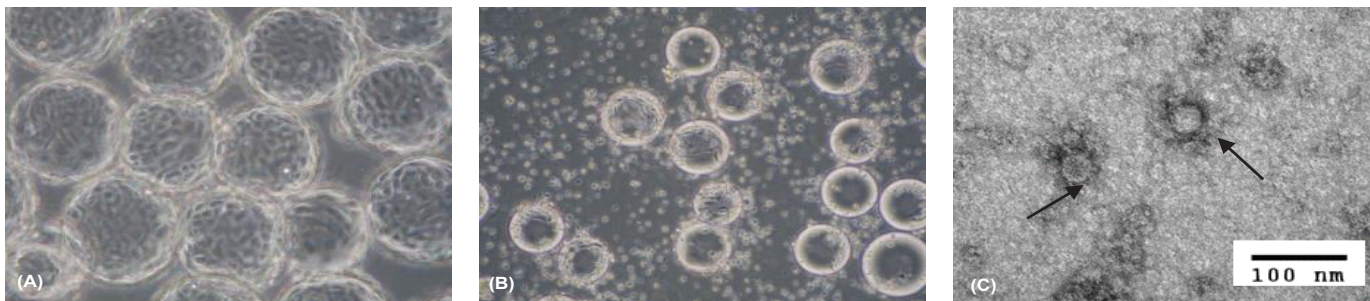
Thông thường trên các hệ thống nuôi cấy không huyền phù như chai chữ T hay chai xoay, virus sẽ được thu hoạch khi các tế bào đã bị xâm nhập và phá hủy hoàn toàn. Tuy nhiên trên các hệ thống nuôi cấy huyền phù, việc quan sát tế bào không thuận tiện nên cần xác định thời gian thu mẫu tối ưu để chủ động và chuẩn hóa các khâu của quy trình. Với liều gây nhiễm tối ưu đã được xác định ở trên là 0,0001 TCID₅₀/tế bào, chúng tôi tiến hành khảo sát thời gian thu mẫu cho sản lượng virus cao nhất trong nuôi cấy trên hệ thống lắc Wave bioreactor.

Kết quả khảo sát hiệu giá virus theo thời gian trên hệ thống Wave bioreactor cho thấy, sau 2 ngày nuôi cấy virus đạt hiệu giá 10^3 - 10^4 TCID₅₀/ml và tiếp tục tăng cho đến ngày thứ 5 đạt hiệu giá cao nhất $\sim 10^8$ TCID₅₀/ml, sau đó hiệu giá virus ổn định và có xu hướng giảm (hình 4).



Hình 4. Thời gian nhân lên của virus trên hệ thống Wave bioreactor.

Như vậy, chúng tôi chọn mốc thời thời thu hoạch virus là vào ngày thứ 5 sau gây nhiễm, khi hầu hết các tế bào đã bị virus hủy hoại (hình 5). Trong nghiên cứu của J.Y. Chang và cs (2012) [12], virus EV71 được nuôi cấy trên tế bào Vero trong hệ thống chai xoay với liều gây nhiễm 10^{-5} TCID₅₀/tế



Hình 5. Sự hủy hoại bào sau gây nhiễm virus. (A) Tế bào Vero trên các hạt microcarrier tại thời điểm gây nhiễm virus; (B) Tế bào Vero bị virus xâm nhập và hủy hoại sau 5 ngày nuôi cấy; (C) Hình ảnh virus EV71 trong dịch nuôi cấy được chụp dưới kính hiển vi điện tử truyền suốt (vị trí mũi tên).

bào, hiệu giá virus cũng được ghi nhận tăng nhanh từ ngày ngày thứ 2 và đạt được cao nhất vào ngày thứ 5 sau gây nhiễm với khoảng $3-5 \times 10^7$ TCID₅₀/ml.

Kết luận

Từ việc khảo sát hiệu quả nuôi cấy trên các loại giá mang vi thể khác nhau, chúng tôi đã chọn được hạt Cytodex 1 và ứng dụng vào hệ thống nuôi cấy Wave bioreactor. Trên hệ thống này, năng suất tế bào Vero đạt được cao nhất là $3,2 \times 10^6$ tế bào/ml. Liều gây nhiễm tối ưu được xác định là 0,0001 TCID₅₀/ml, hiệu giá virus EV71 trên hệ thống Wave bioreactor đạt $\sim 10^8$ TCID₅₀/ml sau 5 ngày nuôi cấy. Hiệu quả này có thể ứng dụng trong việc sản xuất kháng nguyên cho vắc xin EV71.

LỜI CẢM ƠN

Chúng sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Phòng Xét nghiệm virus đường ruột, Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Zhao, et al. (2016), "Age patterns and transmission characteristics of hand, foot and mouth disease in China", *BMC Infect. Dis.*, **16**(1), DOI: 10.1186/s12879-016-2008-y.
- [2] P. Chong, et al. (2015), "Review of enterovirus 71 vaccines", *Clin. Infect. Dis.*, **60**(5), pp.797-803.
- [3] M.L. Li, et al. (2021), "Enterovirus A71 vaccines", *Vaccines*, **9**(3), DOI: 10.3390/vaccines9030199.
- [4] S. Kiesslich, A.A. Kamen, "Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines", *Biotechnol. Adv.*, **44**, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107608.
- [5] H.T.K. Chi (2013), *Nghiên cứu quy trình nuôi cấy và thu nhận Enterovirus type 71 sử dụng tế bào Vero*, Luận văn thạc sỹ, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
- [6] K. Wierzchowski, et al. (2021), "Intensification of chondrocytes proliferation by microcarriers and wave-induced mixing: Reynolds number influence on CP5 cells growth", *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, **166**, DOI: 10.1016/j.ccep.2021.108472.
- [7] Y.F. Tseng, et al. (2011), "Adaptation of high-growth influenza H5N1 vaccine virus in Vero cells: Implications for pandemic preparedness", *PLOS ONE*, **6**(10), DOI: 10.1371/journal.pone.0024057.
- [8] G. Blüml (2007), "Microcarrier cell culture technology", *Animal Cell Biotechnology*, **24**, pp.149-178.
- [9] J. Yang, et al. (2019), "Large-scale microcarrier culture of HEK293T cells and Vero cells in single-use bioreactors", *AMB Express*, **9**(1), DOI: 10.1186/s13568-019-0794-5.
- [10] A. Abdoli, et al. (2013), "Determining influenza virus shedding at different time points in madin-darby canine kidney cell line", *Cell*, **15**(2), pp.130-135.
- [11] G. Gränicher, et al. (2019), "Efficient influenza A virus production in high cell density using the novel porcine suspension cell line PBG.PK2.1", *Vaccine*, **37**(47), pp.7019-7028.
- [12] J.Y. Chang, et al. (2012), "Selection and characterization of vaccine strain for Enterovirus 71 vaccine development", *Vaccine*, **30**(4), pp.703-711.