

## การพัฒนาเครื่องนับพลาไคของไวรัสเด็งกี

### Development of Dengue Virus Plaque Count Reader Apparatus

เลอชา ยโมสิกรัตน์<sup>1\*</sup> สุทธิ ยกसान<sup>2</sup> และ สุเมธี ธันงกุล<sup>2</sup>

Lerchai Mosikarat<sup>1\*</sup> Sutee Yoksan<sup>2</sup> and Sumethee Thanungkul<sup>2</sup>

<sup>1</sup>นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

<sup>2</sup>สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

<sup>1\*</sup> Graduate student in Master of Science (Biomedical Instrumentation) of Molecular Biosciences Institute,

Mahidol University, Phuttamonthon 4, Rd., Salaya, Phuttamonthon, Nakhonpathom, Thailand 73170

<sup>2</sup> Molecular Biosciences Institute, Mahidol University, Phuttamonthon 4 Rd., Salaya, Phuttamonthon, Nakhonpathom, Thailand 73170

\*Corresponding author, E-mail: th914mr@hotmail.com

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการพัฒนาเครื่องนับพลาไคของไวรัสเด็งกีเพื่อให้อ่านและนับพลาไคของไวรัสเด็งกีได้ทั้ง 4 ซีโรทัยป์แบบอัตโนมัติ เนื่องจากภาระในการนับพลาไคของหน่วยวิจัยเชื้อไวรัสเด็งกีเพิ่มมากขึ้น การนับด้วยวิธีดั้งเดิมแม้จะให้ผลลัพธ์ที่น่าเชื่อถือแต่ก็สิ้นเปลืองเวลามาก อีกทั้งเมื่อนับพลาไคติดต่อกันหลายชั่วโมงจะทำให้เกิดความล้าของกล้ามเนื้อดวงตาของผู้นับส่งผลให้เกิดการนับที่ผิดพลาดได้ จึงคาดหวังว่าเครื่องนับแบบอัตโนมัติจะช่วยให้การนับพลาไคมีประสิทธิภาพมากขึ้น หลักการทำงานของเครื่องเริ่มจากการถ่ายภาพพลาไคในเพลทเพาะเชื้อด้วยกล้องที่มีความละเอียดสูงในรูปแบบดิจิทัล แล้วนำภาพมาแยกหาพลาไคโดยวิเคราะห์ขนาดจำเพาะของแต่ละซีโรทัยป์ด้วยซอฟต์แวร์ประมวลผลภาพ ผลรวมของพลาไคที่นับได้ถูกแสดงผลบนจอมอนิเตอร์ ผู้วิจัยพบว่ามี 2 องค์ประกอบสำคัญซึ่งช่วยให้เครื่องนับทำงานได้ถูกต้องขึ้น ประการแรกคือพารามิเตอร์บางค่าในซอฟต์แวร์ต้องถูกปรับให้จำเพาะแต่ละซีโรทัยป์ของไวรัสเด็งกี ประการที่สองคือเพิ่มชุดไฟ LED โดยวางในระนาบเดียวกันโอบรอบเพลทตัวอย่าง เพื่อจัดการเกิดภาพวัตถุเทียม เครื่องนับพลาไคของไวรัสเด็งกีซึ่งถูกพัฒนาภายใต้แนวคิด FREE (Fast, Reliable, Easy and Economy) นี้ถูกทดสอบการนับด้วย 2 โปรโตคอลเพื่อหาความเป็นมาตรฐาน ผลลัพธ์ของจำนวนพลาไคของไวรัสเด็งกีที่ได้จากเครื่องนับจากเพลทตัวอย่างจำนวน 160 ตัวอย่างถูกเปรียบเทียบกับการนับด้วยคน ผลคือเมื่อคำนวณแบบ Geometric Mean Titer พบว่าเครื่องนับพลาไคของไวรัสเด็งกีมี bias -4.42 เปอร์เซ็นต์ และมีความเที่ยงตรง 100 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการนับเฉลี่ย 15 วินาทีต่อ 1 เพลทแบบ 24 หลุมซึ่งถ้านับด้วยคนจะใช้เวลาประมาณ 5 นาที

คำสำคัญ: เชื้อไวรัสเด็งกี ค่าจำนวนพลาไคของไวรัส แมชชีนวิชั่น

## Abstract

The purpose of this research is to develop an automatic Dengue Virus Plaque Count Reader Apparatus for viral plaque counting of all four dengue serotypes. Since the amount of work load in plaque counting of dengue vaccine research is very high. Even though the traditional human eye method could deliver reliable results of virus plaque count, it is time consuming. After several hours of work, it might cause fatigue of eye muscles and resulting in misinterpretation of plaque counts. It is expected that an automated counter might help to accelerate dengue vaccine development program. Ideally, high-resolution camera of the apparatus captured image of plaque inside a multi-wells plate into digital format. Digital image processing software was developed to identify plaques by specific sizes of each serotype. Summation of plaques detected was then shown on monitor. There were two principles to improve accuracy of the apparatus. Firstly, some parameters in software must be adjusted for each serotype of dengue virus specifically. Secondly, an additional LED light unit was horizontally placed around the sample plate to eliminate undesired visual artifact. Dengue Virus Plaque Count Reader Apparatus developed under the concept of FREE (Fast, Reliable, Easy and Economical), was tested with two protocols to search for a well standardized procedure. The results of virus plaque counts of 160 samples obtained from the Apparatus and from human eye counting were compared. It was concluded that Dengue Virus Plaque Count Reader Apparatus was -4.42 percent bias on Geometric Mean Titer and 100 percent precision. Average processing time for reading each 24-well plate was 15 seconds while 5 minutes was required for human eye counting.

**Keywords:** dengue virus, virus plaque count, machine vision

## 1. บทนำ

โรคไข้เลือดออกเด็งกี (Dengue Hemorrhagic Fever: DHF) เป็นโรคติดเชื้อประจำถิ่นของประเทศ ไทยและประเทศอื่น ๆ กว่า 100 ประเทศทั้งในทวีป เอเชีย, ออฟริกาและลาตินอเมริกา เกิดจากเชื้อไวรัสเด็งกี ซึ่งมีอย่างน้อย 4 ชนิดคือ 1) เชื้อไวรัสเด็งกี 1 (DENV-1), 2) เชื้อไวรัสเด็งกี 2 (DENV-2), 3) เชื้อไวรัสเด็งกี 3 (DENV-3) และ 4) เชื้อไวรัสเด็งกี 4 (DENV-4) มียุงลายบ้าน (*Aedes mosquito*) เป็นพาหะนำโรคมาสู่คน การป้องกันโรคสามารถทำได้ โดยการใช้วัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกเด็งกีที่มีประสิทธิภาพซึ่งจะไปกระตุ้นให้เกิดสารภูมิคุ้มกันชนิดทำลายฤทธิ์ (Neutralizing antibody) ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี (สุธี ยกสำน, 2556)

ในกระบวนการวิจัยวัคซีนจำเป็นต้องทราบ ปริมาณสารภูมิคุ้มกันจำเพาะชนิดทำลายฤทธิ์ที่เกิดขึ้น จากการฉีดวัคซีน แต่การหาค่าโดยตรงต้องใช้เทคนิคที่ ยุ่งยาก นักวิจัยจึงใช้วิธีอ้อมคือหาจำนวนพลาไค (Plaque) ของไวรัสเด็งกีแทนแล้วจึงคำนวณย้อนกลับ ไป โดยที่จำนวนพลาไคสัมพันธ์กับปริมาณไวรัสและ ปริมาณไวรัสผกผันกับปริมาณ ภูมิคุ้มกัน (antibody) จำเพาะนี้ การเพาะเลี้ยงเซลล์ในเพลทเพื่อหาปริมาณพลาไค เซลล์ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส (Viral infection) จากนั้นใส่ serum ที่มี ภูมิคุ้มกัน (antibody) เพื่อทำปฏิกิริยากับเชื้อ ไวรัสเด็งกี ภูมิคุ้มกัน (antibody) ที่มีอยู่จะไปจับกับ ไวรัสที่เข้าสู่เซลล์และสลายความเป็นพิษ เซลล์ที่ไม่ถูก จับด้วย ภูมิคุ้มกัน (antibody) จะตายไป เมื่อย้อมสีจะ

เห็นเป็นจุดวงเล็ก ๆ เรียกว่าพลาแก พลาแกหนึ่งจุดเกิดจากไวรัสต้นต่อจำนวน 1 พลาแกเกิดที่เข้าไปอยู่ในเซลล์แรกเริ่มแล้วขยายไปสู่เซลล์ข้างเคียง ฉะนั้นถ้านับจำนวนพลาแกถูกต้องก็สามารถคำนวณหาปริมาณภูมิคุ้มกันโรคชนิดทำลายฤทธิ์ได้ถูกต้องเช่นกัน

เพลทตัวอย่างดังกล่าวถูกเตรียมในห้องปฏิบัติการเฉพาะ เริ่มจากเซลล์เนื้อเยื่อถูกเพาะเลี้ยงในเพลทแบบ 24 หลุมและทำให้ติดเชื้อโดยเติมไวรัสตั้งที่ชนิดที่ 1, 2, 3 หรือ 4 ที่ผ่านการเจือจาง (dilution) พร้อมทั้งใส่ serum ที่มีสารภูมิคุ้มกันชนิดทำลายฤทธิ์ต่อไวรัสตั้งที่ แล้วทำการบ่มให้ไวรัสเข้าไปในเซลล์เนื้อเยื่อนาน 60 นาที จากนั้นใช้วุ้นใสกดทับนาน 7 วัน ช่วงนี้ไวรัสที่สามารถเจริญเติบโตจะแบ่งตัวไปสู่แนวราบ (ขยายขึ้นไปแนวสูงไม่ได้เพราะถูกวุ้นกดทับไว้) เมื่อไวรัสเข้าไปในเซลล์ ๆ จะถูกทำลายและตายไป ยกเว้นเซลล์ที่มี ภูมิคุ้มกัน (antibody) เข้าไปจับไว้ หลังจากครบ 7 วันทำการข้อมสี บริเวณกลุ่มเซลล์ที่ตายจะเห็นเป็นวงขนาดเล็ก กระจายเป็นหย่อม ๆ เรียกว่าพลาแก ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่เล็กมาก (pin point) ไปจนถึงเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร จากนั้นจึงนำเพลทที่มีพลาแกไปทำการนับต่อไป

ตามปกติการนับพลาแกของไวรัสตั้งที่ใช้นับด้วยสายตาโดยผู้ชำนาญการ แต่ละคนจะมีค่าเบี่ยงเบนไม่เท่ากันถือเป็นจุดด้อยอีกทั้งยังสิ้นเปลืองเวลามาก ผู้นับพลาแกที่มีความชำนาญระดับกลางจะใช้เวลา นับพลาแก ประมาณ 5 นาทีต่อ 1 เพลทเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม แต่ผลลัพธ์อาจคลาดเคลื่อนหรือความเร็วในการนับอาจน้อยลงหากนับติดต่อกันนาน ๆ เนื่องจากความล้าของกล้ามเนื้อดวงตาดังนั้นเพื่อให้ได้ค่าจำนวนพลาแกของไวรัสตั้งที่ (Dengue virus plaque count) ถูกต้องตามมาตรฐานสากลและรวดเร็วขึ้น จำเป็นต้องใช้เครื่องมือแบบอัตโนมัติสำหรับนับพลาแกของไวรัสตั้งที่แทนการนับด้วยคน ปัจจุบันเครื่องนับพลาแกของ

ไวรัสโดยตรงมีผู้ผลิตน้อยรายและมีราคาแพงมาก เช่น virus counter 3100 ของบริษัท VIROCYT ใช้หลักการ Flow Cytometer อ่านตัวอย่างด้วยระบบแสงเลเซอร์ (Heider, 2014) ผู้วิจัยจึงได้นำแมชชีนวิชันพร้อมกับซอฟต์แวร์ประมวลผลภาพ (Machine vision and image processing software) ที่มีฟังก์ชันการวิเคราะห์กลุ่มของจุดภาพที่เป็นไปนารี (Blob analysis) และการวิเคราะห์ลักษณะ (Morphology analysis) (Solimac, 2014) มาพัฒนาให้สามารถนับพลาแกของไวรัสตั้งที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เครื่องนับพลาแกชุดนี้ประกอบด้วยคอมพิวเตอร์และกล้องถ่ายภาพ มีแท่นวางเพลทตัวอย่างพร้อมไฟส่องสว่าง มีชุดไฟ LED วางซ้อนด้านบนแท่นวางตัวอย่าง ในส่วนของซอฟต์แวร์ที่ใช้ประมวลผลได้รับการกำหนดค่าพารามิเตอร์ใหม่ให้เป็นแบบเกณฑ์สัมบูรณ์ (Relative Criteria) จำเพาะกับไวรัสตั้งที่แต่ละชนิดโรทัยปี การอ่านและนับพลาแกทดสอบกับเพลทเพาะเชื้อแบบ 24 หลุมซึ่งใช้ตัวอย่างเป็นพลาแกของไวรัสตั้งที่ชนิดโรทัยปี 1, 2, 3 หรือ 4

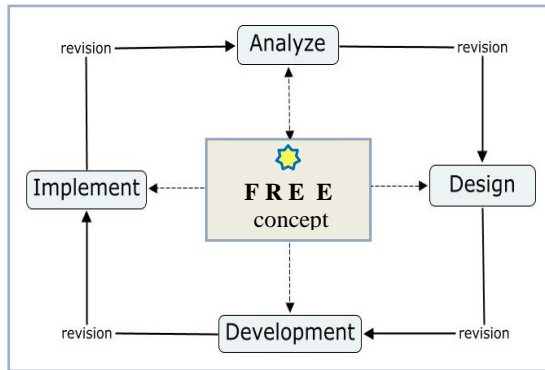
## 2. วัตถุประสงค์

2.1 พัฒนาเครื่องนับพลาแกของไวรัสตั้งที่ที่ให้ผลลัพธ์ถูกต้องทั้ง 4 ชนิดโรทัยปี

2.2 เพื่อสร้างเครื่องมืออัตโนมัติประกอบการวิจัยและพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกตั้งที่

2.3 หาโปรโตคอลที่เป็นมาตรฐานเพื่อใช้กับเครื่องมือดังกล่าว

2.4 พัฒนาเครื่องมือที่เป็นอุปกรณ์ชีวการแพทย์ (Biomedical Instrumentation) ในที่อยู่ภายใต้แนวคิด 'FREE' (Fast, Reliable, Easy, and Economy) แนวคิด 'FREE' ได้แก่: รวดเร็ว (Fast) เชื่อถือได้ (Reliable) ใช้ทำงานง่าย (Easy) และ ประหยัด (Economy)



รูปที่ 1 กระบวนการวิจัยได้พัฒนาตามแนวคิด FREE

### 3. อุปกรณ์และวิธีการ

#### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

##### 3.1.1 ตัวอย่าง

เป็นพลาสมาของไวรัสเด็งกีในเพลทเพาะเชื้อแบบ 24 หลุมซึ่งผ่านการตรวจหา ภูมิคุ้มกัน (antibody) ต่อเชื้อไวรัสด้วยวิธี PRNT (Plaque Reduction Neutralization Test) จำนวนทั้งสิ้น 160 เพลทมีครบทั้ง 4 ซีโรทัยป์ (DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4) การทดลองได้แยกทำครั้งละหนึ่งซีโรทัยป์ไม่ปะปนกัน

##### 3.1.2 เครื่องต้นแบบที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย:

3.1.2.1 คอมพิวเตอร์ ADLINK รุ่น E-1000

3.1.2.2 กล้อง Blasler 5MP พร้อมเลนส์ Fujinon HF16SA1

3.1.2.3 แท่นวางเพลทตัวอย่างพร้อมเสายึดกล้อง

3.1.2.4 ซอฟต์แวร์ HALCON รุ่น 11.0 และ Windows XP

3.1.2.5 แหล่งจ่ายไฟฟ้าให้กับระบบแสงสว่าง 2 ชุด

3.1.2.6 เครื่องพิมพ์ Inkjet

3.1.2.7 เครื่องวัด Lux meter; LUTRON LX-1102

3.1.2.8 เครื่องวัด Digital Multi meter; FLUK 115

##### 3.2 การเตรียมเครื่องนับพลาสมาและเตรียมตัวอย่าง

3.2.1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ถูกเชื่อมต่อกับสายสัญญาณเพื่อประกอบเป็นเครื่องนับพลาสมาของไวรัสเด็งกี บริเวณตรงกลางวางคอมพิวเตอร์ มอนิเตอร์ เมาส์และคีย์บอร์ด

ซ้ายมือเป็นแท่นวางเพลทพร้อมเสายึดกล้องและเลนส์ ซึ่งกล้องติดตั้งอยู่บริเวณส่วนปลายของก้านที่ยึดกับเสา ในแนวนอน การปรับโฟกัสทำโดยเลื่อนก้านขึ้นลงและเลื่อนเข้าออกในแนวระนาบเพื่อจับภาพตัวอย่างให้พอดีกับเฟรมภาพโดยตรวจดูที่จอมอนิเตอร์ ใกล้กับแท่นวางตัวอย่างเป็นแหล่งจ่ายไฟฟ้าให้กับระบบแสงสว่าง ทางขวามือเป็นเครื่องพิมพ์ แล้วจึงเสียบสายไฟ AC ของระบบเข้ากับเต้ารับไฟฟ้า



รูปที่ 2 เครื่องนับพลาสมาของไวรัสเด็งกี (Dengue virus plaque count reader apparatus)

3.2.2 ตัวอย่างที่ใช้ นับเป็นพลาสมาของไวรัสที่เพาะในเพลทแบบ 24 หลุม (รูปที่ 3) จำนวน 160 ตัวอย่างมีครบทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ได้ผ่านการนับด้วยสายตาจากเจ้าหน้าที่ผู้ชำนาญการและบันทึกค่าพลาสมาไว้ทุกเพลทเพื่อนำมาเปรียบเทียบผลกับเครื่องนับพลาสมาของไวรัสเด็งกี



รูปที่ 3 พลาสมาของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2 ในเพลทเพาะเชื้อแบบ 24 หลุมและเป็นเพลทควบคุม (Virus control plate) สังเกตแถวล่างสุด (ROW-4) จะไม่มีจุดพลาสมาเกิดขึ้น

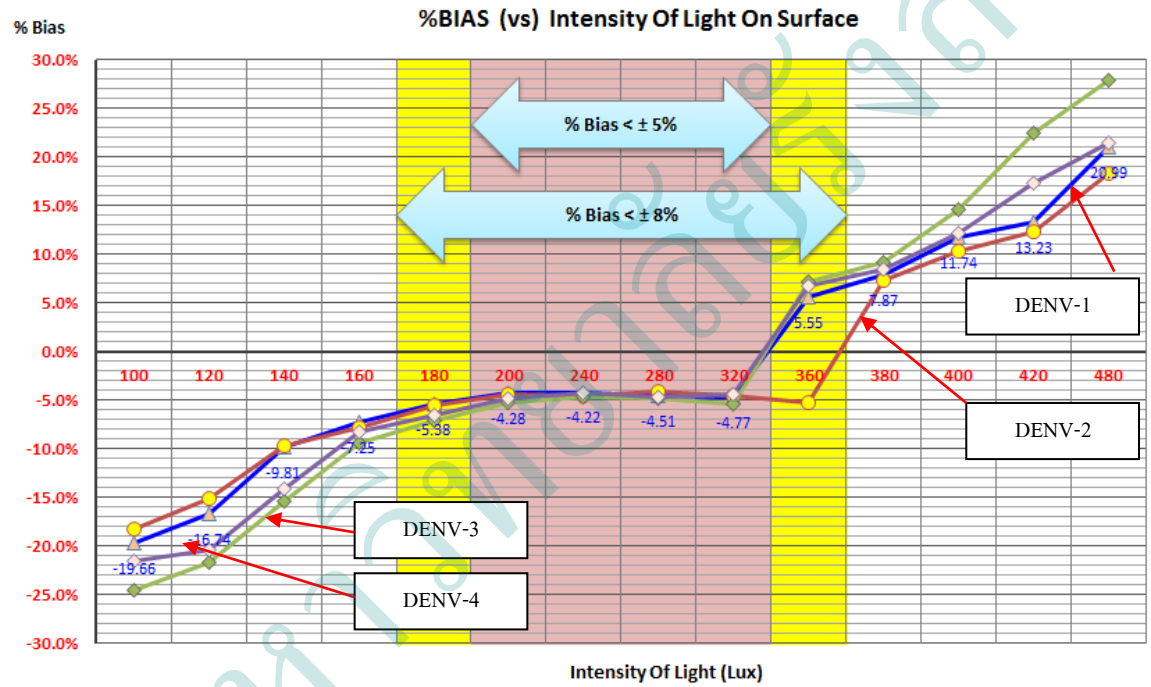
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 ศึกษาความเป็นไปได้

ทดสอบการนับพลาไคกับเพลทตัวอย่างจำนวน 4 เพลทเป็นเพลทที่มีพลาไคของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 1, 2, 3 และ 4 อย่างละเพลท ช่วงแรกของการพัฒนาเครื่องนับได้ค่าความถูกต้องต่ำและค่าความเที่ยงตรงไม่แน่นอน พบว่ามี 2 องค์ประกอบสำคัญที่

ส่งผลกระทบต่อผลลัพธ์ของค่าจำนวนพลาไคของไวรัส (Virus plaque count: VPC) อย่างชัดเจน ตัวแปรแรกได้แก่แสงสว่างที่ตกกระทบยังพื้นผิวของตัวอย่าง (สมการที่ 1; A=Accuracy,  $I_0$ = intensity of light falling on the surface of sample)

$$A_{(VPC)} \propto I_0 (I_x - I_y) \dots\dots\dots (1)$$



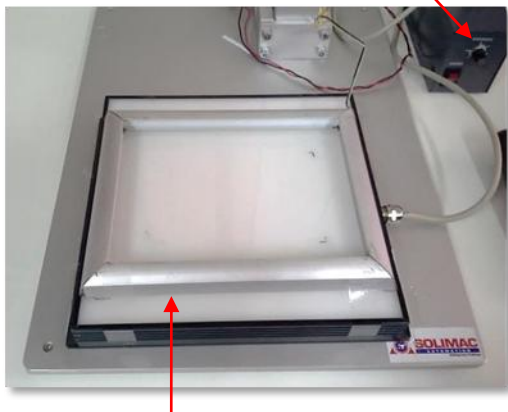
รูปที่ 4 ช่วงค่าความถูกต้องที่ดีที่สุดของเครื่องนับพลาไคของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์สัมพันธ์กับความเข้มของแสงในช่วง 200-320 lux bias เฉลี่ยไม่เกิน 0(-5)%

สมการที่ (1) และกราฟรูปที่ 4 ค่าจำนวนพลาไคของไวรัสยังคงถูกต้องเมื่อปรับความเข้มของแสงที่ตกกระทบผิวของตัวอย่างให้อยู่ในช่วงความเข้มของแสง  $I_x$  ถึง  $I_y$  คำนี้นหาได้จากทดลองจ่ายกระแสไฟฟ้าให้กับแท่นวางตัวอย่างซึ่งมีไฟส่องแสงให้ความสว่างแก่เพลทที่วางอยู่ พบว่าค่าแรงดันไฟฟ้าช่วง 9.50 ถึง 14.50 โวลท์ที่จ่ายให้หลอดไฟซึ่งมีความสว่างเท่ากับค่าความเข้มของแสง 200 ถึง 320 lux จะได้ค่าความถูกต้องของ

ผลลัพธ์โดยรวมอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ถ้าปรับแรงดันไฟฟ้าสูงเกินช่วงดังกล่าวจะเกิดการอิ่มตัวของแสง (Saturation) ผลลัพธ์ของค่าจำนวนพลาไคของไวรัสจะคลาดเคลื่อนไปทางบวก ในทางกลับกันถ้าลดแรงดันไฟฟ้าให้น้อยกว่าช่วงนี้แสงสว่างที่ผิวตัวอย่างไม่เพียงพอจะเกิดอาการพร่ามัว (Insufficient illumination) ผลลัพธ์จะคลาดเคลื่อนไปทางลบ

เพื่อเพิ่มค่าความถูกต้องให้สูงขึ้นจึงเพิ่มไฟส่องสว่างชนิด LED วางบนแท่นวางตัวอย่างในระนาบเดียวกันและรอบเพลา นอกจากจะเพิ่มความเข้มของแสงบนพื้นผิวตัวอย่างแล้วยังขจัดการเกิดภาพตัดเทียม (Visual artifact) อีกด้วย

ปุ่มปรับแรงดันไฟฟ้าของแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า



รูปที่ 5 ชุดกรอบไฟส่องสว่างชนิดLEDวางไว้บนแท่นวางเพลา

ก่อนสั่งให้เครื่องนับพลาไคของไวรัสเด็งกีทำการนับต้องตั้งค่าความเข้มแสงตามตารางที่ 1 ก่อน อย่างไรก็ตามความคลาดเคลื่อนของระบบในส่วนฮาร์ดแวร์(สมการที่ 2)ยังมีอยู่จึงหาทางลดโดยชดเชยจากการปรับปรุงในส่วนซอฟต์แวร์

$$\epsilon_i = |X_i - T| \dots\dots\dots(2)$$

สมการที่(2) ค่าความคลาดเคลื่อน ( $\epsilon$ ) ในระบบ ( $X$ ) ตามอุดมคติต้องเท่ากับ ( $T$ ) จึงจะทำให้ผลรวมของค่า  $\epsilon=0$  แต่ความเป็นจริงเป็นไปได้น้อยมาก

ตัวแปรที่สองที่มีผลต่อค่าความถูกต้องได้แก่ค่าพารามิเตอร์ของพิกเซลซึ่งเป็นตัวแทนแบบดิจิทัลที่แปลงมาจากภาพถ่ายของพลาไค ในอัลกอริทึมชุดที่ใช้แยกกลุ่มพิกเซลซึ่งเป็นตัวแทนพลาไคของไวรัสเด็งกีถูกแยกตามขนาด S,M,L เนื่องจากพลาไคแต่ละซีโรทัยป์มีขนาดเล็กใหญ่ไม่เท่ากัน ซอฟต์แวร์จะคัดกรองพิกเซลตามค่าที่กำหนดไว้ จากนั้นจึงให้เครื่องนับพลาไคของ

ไวรัสเด็งกีทำการนับพลาไคจนหมด ตารางที่ 2 เป็นค่าที่กำหนดให้ต้องป้อนค่าพิกเซลเฉพาะตามนี้

ตารางที่ 1 ค่าความเข้มแสงจำเพาะแต่ละซีโรทัยป์

SEROTYPES	ค่าเริ่มต้น	หน่วย
DENV-1*	230	lux
DENV-2	200	lux
DENV-3	320	lux
DENV-4	350	lux

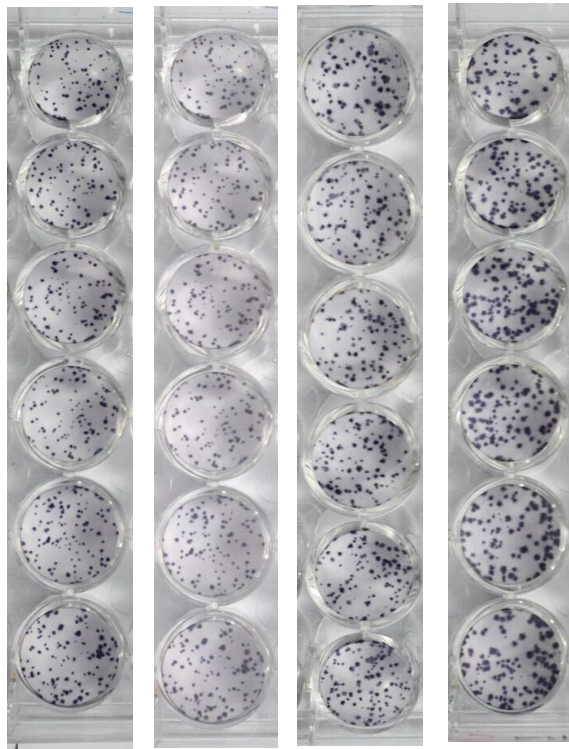
ตารางที่ 2 ค่าจำนวนพิกเซลจำเพาะแต่ละซีโรทัยป์

SEROTYPES	ค่าเริ่มต้น	หน่วย
DENV-1*	250	pixel
DENV-2	200	pixel
DENV-3	290	pixel
DENV-4	450	pixel

หมายเหตุ \* ค่าของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์1(หรือ2,3,4)

เหตุที่ต้องปรับค่าความเข้มของแสงต่างกัน อย่างจำเพาะทั้ง 4 ซีโรทัยป์ (ตารางที่ 1) เพราะกล้องจะถ่ายภาพพลาไคได้ผลดีตามแสงที่กระทบพื้นผิวตัวอย่างเหมาะสมตามคุณสมบัติทางกายภาพของพลาไคที่ต่างกันหลังจากผ่านการย้อมสีที่มีความเข้มข้นต่างกันตามแต่ละชนิดในกระบวนการเตรียมตัวอย่าง

ส่วนการปรับค่าพิกเซลที่ต่างกันตามแต่ละซีโรทัยป์ (ตารางที่ 2) เพราะว่าไวรัสเด็งกีแต่ละชนิดก่อให้เกิดพลาไคขนาดเล็ก ๆ มีขนาดแตกต่างกัน ดังนั้นเวลาจะถ่ายภาพจึงต้องตั้งค่าพารามิเตอร์ในโปรแกรมให้กล้องรับรู้ขนาดพลาไค (Plaque sizes) ของไวรัสเด็งกีแต่ละซีโรทัยป์ด้วยขนาดที่สอดคล้องกันกับขนาดของหน่วยพิกเซล (Pixel size) ของกล้องที่ใช้จับภาพ กล้องที่ใช้มีความละเอียดร้านพิกเซลและมีขนาดหน่วยพิกเซลเท่ากับ 2.2x2.2 ไมโครเมตร



DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
--------	--------	--------	--------

รูปที่ 6 เปรียบเทียบขนาดพลาไคของไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ พลาไคของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2 มีขนาดเล็กสุดและซีโรทัยป์ 4 มีขนาดใหญ่สุด (ถ่ายจากเพลทเพาะเชื้อจริงในสัดส่วนเท่า ๆ กัน)

### 3.3.2 หาโปรโตคอลมาตรฐาน

เพื่อให้การใช้เครื่องนับพลาไคของไวรัสเด็งกีเป็นมาตรฐานเดียวกันในการนับจึงทดลองหาคุณลักษณะการนับใน 2 กรรมวิธีดังนี้

3.3.2.1 โปรโตคอลที่ 1 ทำการปรับแต่งทุก ๆ เพลททั้ง 2 ค่าคือค่าความเข้มของแสงและค่าพิกเซลตามที่กำหนดไว้ในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 แล้วสั่งให้เครื่องทำการนับทดลองทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ๆ ละ 25 ตัวอย่างรวมทั้งสิ้นจำนวน 100 ตัวอย่าง

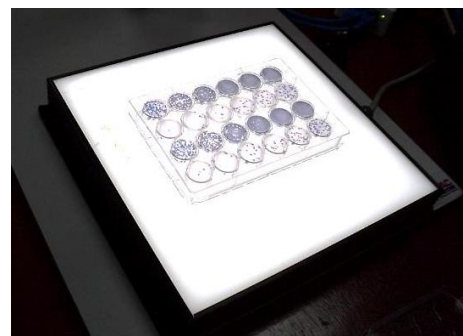
3.3.2.2 โปรโตคอลที่ 2 ปรับแต่งเฉพาะเพลทแรกซึ่งเป็นเพลทคอนโทรลไวรัส ปรับทั้งค่าความเข้มของแสงและ

ค่าพิกเซลตามที่กำหนดไว้ตามตารางที่ 1 และ 2 แล้วนำผลจากเพลทแรกไปใช้กับเพลทอื่น ๆ ทดลองทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ๆ ละ 15 ตัวอย่างรวมทั้งสิ้นจำนวน 60 ตัวอย่าง

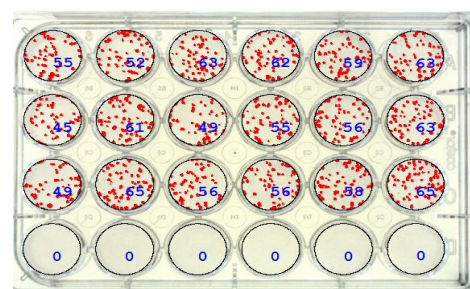
หลังจากทดสอบพบว่าโปรโตคอลที่ 2 ใช้เวลาน้อยกว่าไม่ยุ่งยากและให้ผลลัพธ์ใกล้เคียงกับโปรโตคอลที่ 1 โปรโตคอลที่ 2 จึงถูกใช้ในการทดลองครั้งต่อ ๆ ไป

### 3.4 ทดสอบการใช้งานจริง

หลังจากได้ทดสอบเครื่องต้นแบบพร้อมทั้งเก็บข้อมูลการนับแล้ว จึงได้นำเครื่องนับพลาไคของไวรัสเด็งกีไปทดสอบนับพลาไคที่ห้องปฏิบัติการจริงเป็นเวลา 3 เดือนด้วยเงื่อนไขเช่นเดียวกับเครื่องต้นแบบและบันทึกผลไว้ตามตารางที่ 3 พบว่ายังมีความยากในการปรับค่าเมื่อทดสอบนับกับพลาไคของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 3 เช่นเดียวกันกับการทดลองก่อนหน้านี้



รูปที่ 7 เพลทตัวอย่างถูกวางบนแท่นไฟส่องสว่าง



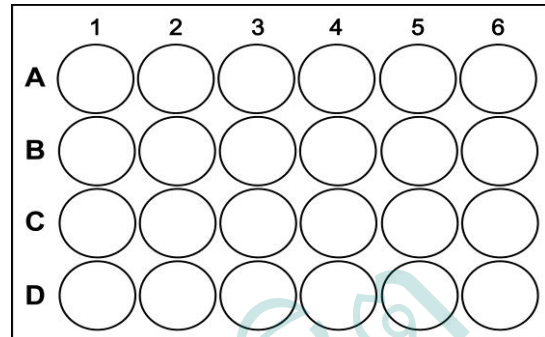
รูปที่ 8 ภาพผลการนับที่ปรากฏบนจอมอนิเตอร์ จุดสีแดงคือพลาไคของไวรัส มีจำนวนพลาไคเฉลี่ย 20-80 ไม่เกิน 120 จุดต่อหลุม

#### 4. ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการนับด้วยเครื่องนับพลาทของไวรัสเด็งกี (reader) กับการนับด้วยคน (manual)

Protocol 2; Target DENV-1 PRNT <sub>50</sub>				
Plate#	Row No.	Titer/Manual	Titer/Reader	Log <sub>2</sub> Difference
2	A-B <sup>*</sup>	419	537	-0.36
	C-D <sup>*</sup>	1199	1273	-0.09
3	A-B	<10	<10	0.00
	C-D	3694	3898	-0.08
4	A-B	1529	1546	-0.02
	C-D	102	95	0.10
5	A-B	78	78	0.00
	C-D	48	51	-0.09
6	A-B	61	54	0.18
	C-D	51	48	0.09
7	A-B	<10	<10	0.00
	C-D	7967	8937	-0.17
8	A-B	184	171	0.11
	C-D	149	148	0.01
9	A-B	46	39	0.24
	C-D	<10	<10	0.00
10	A-B	2516	2170	0.21
	C-D	156	143	0.13
11	A-B	1679	1592	0.08
	C-D	94	88	0.10
12	A-B	1956	1807	0.11
	C-D	<10	<10	0.00
13	A-B	833	824	0.02
	C-D	115	110	0.06
14	A-B	1114	1745	-0.65
	C-D	429	459	-0.10
15	A-B	N/A	N/A	N/A
	C-D	117	63	0.89
GMT**		N/A	N/A	bias = - 4.42 %

\*\* Geometric Mean Titer



รูปที่ 9 เทมเพลตของเพลทเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม มี 4 แถวคือ A, B, C และ D มี 6 คอลัมน์ คือ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6

\* ค่าของ A-B ในตารางที่ 3 เป็นค่า titer ที่คำนวณจากจำนวนพลาทที่นับได้ในหลุมเพลทของแถว A จำนวน 6 หลุมรวมกับหลุม B จำนวน 6 หลุม

ปริมาณพลาทของเชื้อไวรัสมีลักษณะการเจริญเติบโตแบบอิสระ การหาแนวโน้มเข้าสู่ศูนย์กลางของข้อมูลจึงเลือกคำนวณด้วย Geometric Mean Titer เพื่อหาค่า bias แล้วจึงนำมาประเมินค่าความถูกต้องของเครื่องนับพลาท

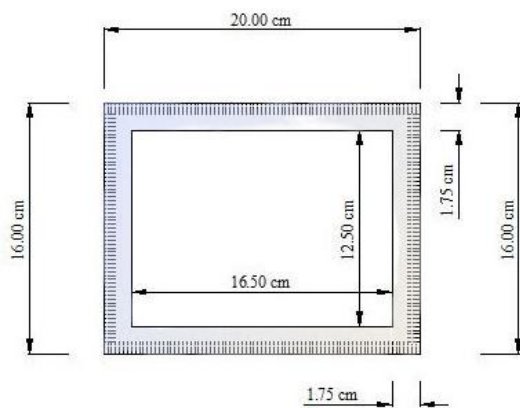
จากการคำนวณเวลาการนับแต่ละเพลทโดยใช้เครื่องนับนี้ได้ค่าเฉลี่ยในการนับ 15 วินาทีต่อ 1 เพลทแบบ 24 หลุม ซึ่งถ้านับด้วยผู้ชำนาญการระดับกลางจะใช้เวลาประมาณ 5 นาที

#### 5. การอภิปรายผล

จากผลการนับในห้องปฏิบัติการจริงตามตารางที่ 3 บันทึกผลแล้วคำนวณค่า bias ได้ - 4.42 % เป็นความโน้มเอียงของผลลัพธ์ที่ได้ค่าน้อยกว่าคนนับ (อ้างอิงว่าผลการนับของคนถูกต้อง 100%) ค่าซึ่ง <5% นี้เจ้าหน้าที่วิจัยและพัฒนาวัคซีนยอมรับได้

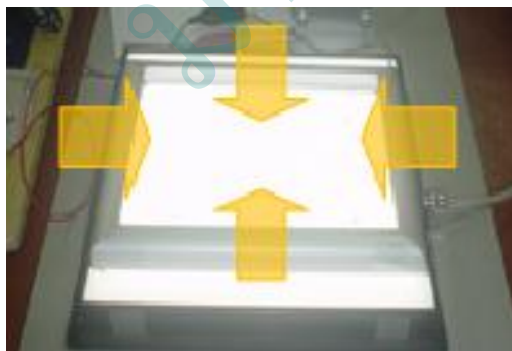


ก่อนนำเครื่องนับพลาทของไวรัสตั้งก็ไปใช้  
 ในอนาคตควรตรวจสอบส่วนประกอบของฮาร์ดแวร์ที่  
 ยังมีความคลาดเคลื่อนในระบบ (Systematic errors)  
 เพื่อให้เครื่องนับมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด



รูปที่ 10 ขนาดของชุดไฟส่องสว่าง LED (หน่วย: ซม.)

ชุดไฟLEDถึงแม้ว่าช่วยเพิ่มความถูกต้องของ  
 ผลลัพธ์โดยขจัดการเกิดภาพวัตถุเทียมตามที่  
 ตั้งสมมติฐานว่าแสงไฟจากแท่นวางตัวอย่างอาจทำให้  
 เกิดภาพวัตถุเสมือนเมื่อแสงส่องไปกระทบขอบโค้ง  
 ของหลุมเพลทซึ่งอาจมองไม่เห็นด้วยสายตามนุษย์ และ  
 ลักษณะการวางแผงไฟที่ตั้งฉากเข้าหากันอาจทำให้เกิด  
 การรบกวนกันทางแสง (Noise) ได้ (รูปที่11)



รูปที่ 11 แสงไฟจากLED แต่ละฝั่งต่างส่องเข้าหากัน

นอกจากนี้ค่าเบี่ยงเบนจากการนับของ  
 ไวรัสตั้งก็ซีโรทัยป์ 3 ที่สูงกว่าซีโรทัยป์อื่น (รูปที่4  
 เส้นกราฟสีเขียว) เนื่องจากระหว่างการเพาะเชื้อมีการ  
 ใช้น้ำยาข้อมที่ค่อนข้างเข้มข้นซึ่งเป็นข้อจำกัดเฉพาะ จึง  
 ปรับแต่งด้วยค่าตามกำหนดได้ยากกว่า

## 6. บทสรุป

6.1 หลังจากวิจัยและพัฒนาเครื่องนับพลาทของ  
 ไวรัสตั้งก็มาเป็นระยะเวลา6เดือน สามารถพัฒนาให้  
 แมชชีนวิชั่นทำงานร่วมกับซอฟต์แวร์ประมวลผลภาพ  
 วิเคราะห์ภาพถ่ายทางการแพทย์ (Biomedical image  
 analysis) ในที่นี้คือภาพพลาทได้ผลลัพธ์เป็นค่าจำนวน  
 พลาทของไวรัส (Virus plaque count; VPC) ถูกต้อง  
 ใกล้เคียงกับการนับด้วยสายตาคน จากการทดลองได้ค่า  
 ความถูกต้อง (Accuracy) ของเครื่องนับพลาทของ  
 ไวรัสตั้งก็ ในการคำนวณแบบGeometric Mean Titerมี  
 ค่าbias -4.42% ค่าความเที่ยงตรง(Precision) 100%  
 เพราะเมื่อวัดซ้ำหลาย ๆ ครั้งกับตัวอย่างเดิม  
 สภาพแวดล้อมเดิมจะได้ผลลัพธ์เหมือนกันทุกครั้ง

6.2 การเพิ่มชุดไฟ LED เพื่อเพิ่มความสว่างอย่าง  
 เหมาะสมและการปรับแต่งค่าพารามิเตอร์ของฟังก์ชัน  
 ในซอฟต์แวร์ให้จำเพาะแต่ละซีโรทัยป์ช่วยให้เครื่อง  
 นับพลาทของไวรัสตั้งก็สามารถนำไปใช้งานได้จริง

6.3 โปรโตคอลหาค่าจำนวนพลาทของไวรัสแบบที่2คือ  
 การปรับค่าครั้งเดียวให้สอดคล้องกับเพลทอ้างอิงมี  
 ความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นมาตรฐานได้

6.4 การพัฒนางานวิจัยชิ้นนี้สอดคล้องกับแนวคิด  
 'FREE' (Fast, Reliable, Easy, and Economy) คือ

6.4.1 รวดเร็ว: เครื่องนับพลาซของไวรัสตั้งที่ใช้เวลาในการนับ 15 วินาทีต่อ 1 เพลท ในขณะที่คนจะใช้เวลานับประมาณ 5 นาที ฉะนั้นจึงทำงานได้เร็วกว่าคน  $(5 \times 60) / 15 = 20$  เท่า

6.4.2 เชื่อถือได้: มีความถูกต้อง  $-4.42\% < 5\%$

6.4.3 ใช้งานง่าย: ผู้ใช้เครื่องนับใช้เวลาเรียนรู้ไม่นาน

6.4.4 ประหยัด: เพราะใช้งบประมาณในการสร้างเครื่องนับนี้ 350,000 บาทถูกกว่าซื้อเครื่องนับพลาซของไวรัสจากต่างประเทศซึ่งมีราคาประมาณ 65,000 USD (VIROCYT, 2015) รว ๆ 6 เท่า

6.5 ควรปรับปรุงในส่วนต่าง ๆ ดังนี้

6.5.1 ตำแหน่งแสดงค่าจำนวนพลาซของไวรัสแต่ละหลุมควรย้ายจากตรงกลางวงกลมไปยังตำแหน่งอื่นนอกกรอบวงกลมจะทำให้อ่านตัวเลขง่ายขึ้น

6.5.2 ทำให้สามารถสั่งงานด้วยการคลิกเพียง 1 ครั้งเพื่อเพิ่มความรวดเร็วในการนับ

6.5.3 เปลี่ยนเครื่องหมายบอกจุดบนพานελซึ่งใช้บอกตำแหน่งการวางเพลทตัวอย่างให้ตรงตำแหน่งเดิมเป็นวัสดุชนิดที่มีมุมฉากจะวางเพลทเข้าที่ได้เร็วขึ้น

6.5.4 เพิ่มมิเตอร์แสดงค่าแรงดันไฟฟ้าและค่าความเข้มของแสงที่แหล่งจ่ายไฟฟ้า

6.6 การพัฒนาเครื่องนับพลาซของไวรัสตั้งที่ในอนาคตควรเน้นเรื่องต่อไปนี้

6.6.1 วิจัยด้านแสงส่องสว่างที่กระทำต่อผิวตัวอย่างเพราะส่งผลต่อประสิทธิภาพและประสิทธิภาพในการอ่านพลาซโดยตรง

6.6.3 ศึกษาการกำหนดค่าพารามิเตอร์จำเพาะเพื่อรองรับไวรัสตั้งที่ซีโรทัยปีใหม่ ๆ เช่น ซีโรทัยปีรวมทั้งสายพันธุ์อื่น ๆ นอกท้องถิ่นของอาเซียน

## 7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนศาสตราจารย์เกียรติคุณนายแพทย์ชูศักดิ์ เวชแพศย์ ประจำปีการศึกษา 2/2557 ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร.นพ.สุธิชกส์ สัน ศศ.สุเมธี ธีนังกุลและอาจารย์สมนึก พลาบดีวัฒน์ แห่งสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดลที่ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## 8. เอกสารอ้างอิง

- สุธิชกส์ สัน. (2556). การสร้างนวัตกรรมวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกตั้งที่, วารสารวงการแพทย์, 398, 17-19.
- Heider, S., Metzner, C. (2014). Quantitative real-time single particle analysis of virions. *Virology*, 462-463:199-206.
- SOLIMAC. (2014). HALCON Machine Vision and Image Processing Software. Available from: [http://www.solimacautomation.com/product\\_subcatelist.php?category\\_id=198](http://www.solimacautomation.com/product_subcatelist.php?category_id=198).
- ADLINK Technology. (2012). Solution for machine vision.(Online). Available from: [http://www.adlinktech.com/PD/web/PD\\_detail.php?pid=976](http://www.adlinktech.com/PD/web/PD_detail.php?pid=976).
- VIROCYT. (2015) Virus Counter 3100; A Powerful Tool For Virus Quantification Available from: <http://virocyt.com/virus-counter/>.