วารสารอาหารและยา THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
ปีที่ 28 ฉบับที่ 3 (2564): กันยายน - ธันวาคม Vol. 28 No. 3 (2021): September - December
https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี Plaque Assay ในการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2

กรณิกา กุลบุตร[1] **อัสมะ ยูโซะ**[1] **สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์**[1] **สุภาภรณ์ ชุมพล**[1] **กนกพร ฤทธิธรรม**[1] **สุภาพร ภูมิอมร**[1]

[1]สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี
ที่อยู่ติดต่อ: กรณิกา กุลบุตร สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี 11000
kornnika.k@dmsc.mail.go.th

Method validation of the Plaque Assay for SARS-CoV-2 Titration

Kornnika Kullabutr[1], **Asmah Yusho**[1], **Sompong Sapsutthipas**[1], **Supaporn Chumpol**[1], **Kanokphon Ritthitham**[1], **Supaporn Phumiamorn**[1]

[1]Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand
Contact address: Kornnika Kullabutr, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, kornnika.k@dmsc.mail.go.th

Received: 15 October 2020, **Revised:** 4 August 2021, **Accepted:** 10 August 2021

Abstract

Background: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has been spreading around the world. Therefore, efforts have been made to develop a vaccine to stimulate neutralizing antibody responses against the virus. Plaque assay is used for the SARS-CoV-2 titration. Plaque assay is a quantitative method of measuring infectious SARS-CoV-2 by quantifying the plaques formed in cell culture upon infection with serial dilutions of a virus specimen. The plaque is developed from a particle of virus which infects and damages cells.

Objectives: The objective of this research was to study method validation of plaque assay for SARS-CoV-2 titration from clinical specimen of a patient infected with SARS-CoV-2 (hCoV-19/Thailand_59/2020 strain).

Methods: The virus was cultured and propagated, the virus-containing supernatant were aliquoted into 700 cyo tubes, then 60 cryo tubes were randomised and taken to study by using the plaque assay. The assay has been confirmed with such parameters as accuracy, precision (repeatability and reproducibility), robustness, and specificity. The study period started from June 2020 to June 2021.

Results: The results showed that the difference between maximum and minimum titre values of the virus in the accuracy study was less than 0.5 logPFU, so the assay was accurate. The geometric mean (GM) of virus titre in the repeatability study was 5.76 logPFU (standard deviation,

or SD, 0.05; 95% confidence interval, or 95%CI, 5.65-5.87), and the percent coefficient of variations (%CV) of repeatability was 0.94%. The GM of the virus titre in the reproducibility study was 5.76 logPFU (SD, 0.18; 95%CI, 5.40-6.12), and %CV was 3.12%. The GM of the virus titre in the robustness study was 5.74 logPFU (SD 0.19; 95%CI, 5.35-6.13), and %CV was 3.38. The assay was considered to be repeatable, reproducible, and robust. The Sig (2-tailed) value in the specificity study was 0.038 (being less than 0.05); and the number of plaques in negative serum mixed with SARS-CoV-2 was significantly greater than in positive serum mixed with SARS-CoV-2; thus, the specificity was good.

Conclusions: The plaque assay can be used as a standard method to test for SARS-CoV-2 and to detect neutralizing antibody responses in COVID-19 patients and animals as well as humans after being immunised with any COVID-19 vaccines at biosafety level 3.

Keywords: method validation, plaque assay, SARS-CoV-2, COVID-19

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: จากการแพร่ระบาดของไวรัส SARS-CoV-2 ทั่วโลก จึงมีการวิจัยพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคขึ้น เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อดังกล่าว ซึ่งจำเป็นต้องใช้ไวรัสในการทดสอบ ดังนั้นการหาปริมาณไวรัสจึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยที่ plaque assay ถูกนำมาใช้ในการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ซึ่งเป็นวิธีการเชิงปริมาณในการวัดการติดเชื้อ SARS-CoV-2 โดยการหาปริมาณของ plaques ที่ก่อตัวขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยทำการเจือจางไวรัสที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ plaque forming unit (PFU) คือ กลุ่มเซลล์ที่ถูกไวรัส 1 อนุภาคทำลาย

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี plaque assay โดยทำการหาปริมาณไวรัสจาก clinical specimen จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสโควิด 19 สายพันธุ์ hCoV-19/Thailand_59/2020

วิธีการวิจัย: เพิ่มจำนวน SARS-CoV-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณไวรัสที่เพิ่มขึ้น และทำการ aliquot จำนวน 700 cryo tubes จากนั้นทำการสุ่มเพื่อนำมาศึกษาจำนวน 60 cryo tubes โดยวิธี plaque assay พร้อมตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ได้แก่ การตรวจสอบความแม่น ความเที่ยง ทั้งแบบ repeatability และ reproducibility ความคงทน และความจำเพาะของวิธี ระยะเวลาศึกษา มิถุนายน 2563 - มิถุนายน 2564

ผลการศึกษา: พารามิเตอร์ความแม่นพบว่าค่าความแตกต่างของปริมาณไวรัสสูงสุดและต่ำสุดไม่เกิน 0.5 logPFU แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความแม่น มีความเที่ยงทั้งแบบ repeatability ได้ค่า geometric mean (GM) เท่ากับ 5.76 logPFU standard deviation (SD) เท่ากับ 0.05 ค่า 95% confidence interval (95%CI) เท่ากับ 5.65-5.87 logPFU ค่า%CV เท่ากับ 0.94 และการศึกษา reproducibility ได้ค่า GM เท่ากับ 5.76 SD เท่ากับ 0.18 95%CI เท่ากับ 5.40-6.12 logPFU %CV เท่ากับ 3.12 วิธีมีความคงทน โดยได้ค่า GM เท่ากับ 5.74 logPFU SD เท่ากับ 0.19 95%CI เท่ากับ 5.35-6.13 logPFU ค่า%CV เท่ากับ 3.38 และในการศึกษาความจำเพาะ ได้ค่า Sig (2-tailed) เท่ากับ 0.038 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าปริมาณไวรัสที่ได้จาก negative serum ผสมกับ SARS-CoV-2 มีมากกว่าใน positive serum ผสมกับ SARS-CoV-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งบอกได้ว่าวิธีมีความจำเพาะที่ดี

สรุป: จากข้อมูลข้างต้นจึงสรุปได้ว่าสามารถนำวิธี plaque assay มาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำวิธีนี้มาปรับใช้กับการตรวจ neutralizing antibody ในคนไข้โควิด-19 รวมทั้งในสัตว์และคนที่ได้รับวัคซีนโควิด-19 ใน biosafety level 3

คำสำคัญ: ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี วิธี plaque assay ไวรัส SARS-CoV-2 โควิด-19

บทนำ

เชื้อไวรัส Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ (Coronavirus disease 2019: COVID-19) หรือโควิด-19 โดยมีการติดต่อจากประเทศจีนและขยายไปในหลายประเทศทั่วโลก ซึ่งองค์การอนามัยโลกประกาศให้เป็นโรคระบาดใหญ่ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2563[1] เนื่องจากอัตราการติดเชื้อรวมทั้งอัตราผู้เสียชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้หลายประเทศพยายามวิจัยพัฒนายาที่ใช้ในการรักษาและวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคโควิด-19 จึงมีการหาลำดับยีนของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 พร้อมกับแยกเชื้อไวรัสและหาปริมาณไวรัส ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากในการนำไปใช้ในการวิจัยพัฒนาวัคซีน[2] และการทดสอบหาระดับภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อโควิด 19 เป็นต้น การตรวจหาปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงมีวิธีหลักทางชีววิธี (bioassay) ที่นิยมใช้โดยทั่วไปคือ plaque assay[3-8] และวิธี 50% Cell Culture Infectious Dose ($CCID_{50}$)[8-11] ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นการตรวจนับปริมาณไวรัสที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เรียกว่า Cytopathic Effects (CPE) นิยมนำมาใช้ในการหาปริมาณไวรัสในวัคซีนไวรัสเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ เช่น วัคซีนป้องกันโรคไข้สมองอักเสบ (JE) วัคซีนป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน คางทูม (MMR) วัคซีนป้องกันโรคโปลิโอ (OPV) และวัคซีนป้องกันโรคอีสุกอีใส (varicella) เป็นต้น[4-11] อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque assay นั้น ให้ค่าที่แน่นอนกว่าวิธี 50% Cell Culture Infectious Dose ($CCID_{50}$) และยังไม่เคยมีการนำวิธี plaque assay มาใช้ในการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ในประเทศไทย ดังนั้น การศึกษานี้จึงเลือกวิธี plaque assay เพื่อพัฒนาการตรวจหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันทั่วไปในการแยกไวรัสและหาปริมาณไวรัสเชิงปริมาณ โดยเป็นการตรวจนับไวรัสที่สามารถแสดงการเกิด plaque โดยหนึ่งอนุภาคของไวรัสที่ติดเชื้อในเซลล์และเพิ่มจำนวนในเซลล์ข้างเคียงทำให้เซลล์ตายเกิดเป็น plaque ขึ้น และนับจำนวนเป็น plaque forming unit (PFU) การนำวิธีดังกล่าวมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 นั้น จำเป็นต้องทดสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นของผลการทดสอบ โดยทำการศึกษาในพารามิเตอร์ที่สำคัญคือ ความเที่ยง ความแม่น ความจำเพาะ และความคงทนของวิธี เมื่อได้ความถูกต้องของวิธีแล้ว สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สามารถนำวิธีดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ต่อการนำไปปรับใช้ในการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ต่าง ๆ ในผู้ติดเชื้อ และตรวจหาระดับ neutralizing antibody โดยใช้ plaque reduction neutralization test ในผู้ที่ติดเชื้อ COVID-19 รวมทั้งในคนและสัตว์ที่ได้รับวัคซีน COVID-19 ต้นแบบ ซึ่งหลายหน่วยงานของประเทศไทยอยู่ระหว่างการวิจัยพัฒนาวัคซีนในหลายรูปแบบเพื่อผลิตวัคซีนและนำมาใช้ในการป้องกันโรค COVID-19 ในประเทศ

วัตถุประสงค์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธี plaque assay เพื่อดูว่าวิธีมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 หากวิธีมีความเหมาะสมจะสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2

ระเบียบวิธีการวิจัย

วิธีการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลองโดยทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี plaque assay ในการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ที่ได้จาก clinical specimen ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อจำนวน 10 ราย แล้วคัดเลือกมา 1 ตัวอย่างเพื่อนำไปเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จากนั้นนำ virus-containing supernatant แบ่งใส่ cryo tube จำนวน 700 cryo tubes และสุ่มไวรัส SARS-CoV-2 จำนวน 60 cryo tubes เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบ โดยดำเนินการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงและเตรียม reagents ต่าง ๆ ที่ห้องปฏิบัติการ Biosafety level 2 ของสถาบันชีววัตถุ และดำเนินการทดสอบ plaque assay ที่ Biosafety level 3 ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ใช้ระยะเวลาในการศึกษา 12 เดือน (มิถุนายน 2563 - มิถุนายน 2564) และการศึกษานี้ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เลขที่ EC192/2563

ขั้นตอนดำเนินการ

1. เมื่อได้รับเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ hCoV-19/Thailand_59/2020 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข (สวส.) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งโรงพยาบาลในประเทศไทยเก็บ clinical specimen (nasolpharyngeal and throat swab) จากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าอาจติดเชื้อโควิด-19 จากนั้นนำส่ง clinical specimen ให้ สวส. ตรวจโดยทำการตรวจยืนยันสายพันธุ์ด้วยวิธี whole genome sequencing[12] และเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero เพื่อให้ได้ปริมาณไวรัสที่เพิ่มขึ้นเพื่อนำไปใช้ในการศึกษา โดยทำการเก็บไวรัส SARS-CoV-2 ใน cryo tube ขนาด 2 ml จำนวน 700 vials (120 µl/cryo tube) ไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70ºC ในการศึกษานี้ทำการสุ่มไวรัส SARS-CoV-2 จำนวน 60 cryo tubes เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบ

2. เมื่อได้รับซีรัมผู้ป่วยจากสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ (สวพ.) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งได้จากการเจาะเลือดจากผู้ที่ได้รับการยืนยันการติดเชื้อ SARS-CoV-19 จำนวน 10 ราย โดยใช้วิธี whole genome sequencing จากนั้นปั่นแยกซีรัม pool ซีรัมรวมกัน แล้วบ่มที่ 56ºC นาน 30 นาที เก็บใส่หลอด cryo tube จำนวน 100 cryo tubes แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20ºC เพื่อนำไปใช้เป็นซีรัมที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ SARS-CoV-2 (positive serum) และได้รับซีรัมคนปกติ (negative serum) จำนวน 20 cryo tubes จาก สวพ. โดยทำการสุ่ม positive serum และ negative มาศึกษาอย่างละ 3 cryo tubes

3. เพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง Vero (ATCC® CCL81) ในขวดพลาสติกขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (cm^2) (corning costar, USA) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์สำเร็จรูป Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma, USA) โดยเติม L-glutamine (Gibco, USA) 1% และ fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, ประเทศสหรัฐอเมริกา) 10% นำเซลล์ Vero ไปบ่มที่ 37ºC, 5% CO_2 ใช้เวลา 3-4 วัน เซลล์เพิ่มจำนวนเต็มพื้นผิวขวดพลาสติก ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการทดสอบต่อไปได้

4. เตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ ได้แก่ ปิเปตอัตโนมัติ ตู้ชีวนิรภัย เครื่องอบเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37ºC แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ เครื่องชั่งสาร ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8ºC ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -20ºC ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -70ºC อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ Biosafety level 2 และ Biosafety level 3 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ

5. เพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ Vero ในขวดพลาสติกขนาด 25 cm^2 บ่มที่ 37ºC, 5% CO_2 นาน 20-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติมไวรัสที่แยกได้ลงในเซลล์ Vero บ่มที่ 37ºC, 5% CO_2 นาน 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 7 ml ที่มี 2% FBS บ่มที่ 37ºC, 5% CO_2

นาน 4-5 วัน ให้สังเกตการเกิด CPE ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เทียบกับขวดที่เลี้ยงเซลล์โดยไม่มีไวรัส จากนั้นเก็บไวรัสเมื่อมี CPE ในเซลล์ประมาณ 80-90% โดยการดูดเป่าเซลล์หลายครั้ง และทำการ freeze-thaw 2-3 ครั้ง ที่ -70ºC จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 500 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4ºC แบ่งเก็บส่วนใสที่มีไวรัสใน cryo tube ไว้ที่ -70ºC เพื่อนำมาขยายเพิ่มจำนวนในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 175 cm^2 สำหรับใช้ศึกษาต่อไป

6. หาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Plaque assay โดยเติมเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จำนวน 2 x 10^5 cells/ml ลงในเพลท 6 หลุม ปริมาตร 3 ml/well บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC, 5% CO_2 นาน 1 วัน เจือจางไวรัสด้วย maintenance medium ที่มี FBS 2% ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6} ตามลำดับ ซึ่งจะมีปริมาตร เหลือ 900 µl ในแต่ละ tube จากนั้นเติม maintenance medium ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ mixture (ปริมาตรรวม 1,800 µl ต่อ 1 ความเจือจาง) นำทุก tubes ไปบ่มที่ 37ºC, 5% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลา นำ mixtures ของแต่ละความเจือจางใส่ลงในเซลล์ Vero ในเพลท 6 หลุม ปริมาตรหลุมละ 0.2 ml/well ใส่ความเจือจางละอย่างน้อย 2-3 หลุม จากนั้นนำเพลท 6 หลุม บ่มที่ 37ºC, 5% CO_2 นาน 1 ชั่วโมง ทำการ rocking ทุก 15 นาที จนกว่าจะครบเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 1.2% methylcellulose ปริมาตร 3 ml/well (การเตรียม 1.2% methylcellulose ทำได้โดยชั่ง methylcellulose 12 กรัม ใส่ในขวดขนาด 1,000 ml แล้วนำไป autoclave จากนั้นเติม MEM ปริมาตร 1,000 ml ผสมให้เข้ากันภายใต้อุณหภูมิ 2-8ºC ด้วย magnetic stirrer ทิ้งไว้ข้ามคืน เติม 10% FBS 1% L-glutamine และ 1% pen-strep ผสมให้เข้ากัน) นำเพลทไปบ่มที่ 37ºC, 5% CO_2 นาน 6 วัน เมื่อครบกำหนด ทำการ fix เซลล์ด้วย 10% formaldehyde ปริมาตร 3 ml/well นาน 15-30 นาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า และย้อมเซลล์ด้วย 0.5% crystal violet ใน PBS (-) pH 7.2-7.4 ปริมาตร 0.5 ml/well นาน 15-30 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกให้หมดด้วยน้ำเปล่า ซับให้เพลทแห้ง เซลล์ที่มีชีวิตที่ไม่ถูกไวรัสทำลายจะติดสีน้ำเงินเข้มเหมือนเซลล์ควบคุม ส่วนเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยไวรัสจะเห็นเป็นจุดช่องวางสีขาวเรียกว่า plaque จากนั้นนับจำนวน plaque บน light box นำไปคำนวณหาปริมาณไวรัสในรูป log10 PFU/ml ซึ่งมี acceptance criteria ดังนี้ (1) ความเจือจางแต่ละระดับที่ใช้ในการทดสอบต้องครอบคลุมการเกิด plaques จำนวนระหว่าง 10-200 plaques ต่อหลุม (2) จำนวน plaques ในแต่ละค่าความเจือจางมีค่า %CV ไม่เกิน 40% (3) หลุมควบคุมต้องไม่เกิด plaques[13] และ (4) ค่า min-max ของปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 lot. No. 05/05/2020 อยู่ในช่วง 4.46-7.32 log PFU/ml

คำนวณหาปริมาณไวรัสจากค่าเฉลี่ยของจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นของแต่ละความเจือจาง[13]

$$\text{PFU/ml} = \frac{(\text{average number of plaques per well}) \times (\text{dilution factor})}{\text{Volume of inoculum per well}}$$

7. ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยทำการทดสอบความเที่ยง ความแม่น ความคงทน และความจำเพาะของวิธี[14-15] ดังนี้

การศึกษาความเที่ยงของวิธี (precision) โดยทำการศึกษาใน 2 พารามิเตอร์คือ repeatability (within-day variation หรือ intra-assay variation) และ reproducibility การศึกษา repeatability ทำโดยนักวิเคราะห์ 1 คน ทำการทดสอบหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque assay จำนวน 6 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกันในวันเดียวกัน โดยใช้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1}-10^{-6} (ความเจือจางละ 900 µl) ผสมกับ maintenance medium ปริมาตร 900 µl รายละเอียดวิธีการทดสอบตามที่ระบุไว้ในหัวข้อการหาปริมาณไวรัสโดยวิธี Plaque assay และ 2) reproducibility ทำการทดสอบโดยนักวิเคราะห์ 2 คน คนละ 6 ชุดการทดสอบที่เป็นอิสระต่อกันต่างวันกัน หาค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean, G.M.) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) และค่า %CV โดย %CV ต้องมีค่า ≤25%[14]

การทดสอบความแม่นของวิธี (accuracy)

เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐานสากลที่รู้ค่า จึงทำการศึกษาความแม่นโดยเจือจางซีรัมคนปกติที่ไม่ติดเชื้อ SARS-CoV-2[16] (negative serum control) ที่ 1:100, 1:200, 1:400 และ 1:800 (900 µl ในแต่ละความเจือจาง) ตามลำดับ แล้วนำมาผสมกับ SARS-CoV-2 ปริมาตร 900 µl (เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่ระดับความเจือจาง $10^{-3.5}$ ปริมาตร 900 µl) ลงในแต่ละความเจือจางของ negative serum control ได้ mixtures ของแต่ละความเจือจาง พร้อมทั้งนำ negative serum control และ positive serum control ที่ 1:100, 1:200, 1:400 และ 1:800 ปริมาตร 900 µl ในแต่ละความเจือจาง ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 900 µl โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ตามวิธี Plaque assay ซึ่งความเจือจางของไวรัสที่ $10^{-3.5}$ ผสมกับ maintenance medium ได้ mixture (virus control) ทำให้เกิด plaques เฉลี่ยอยู่ในช่วง 10-200 plaques/หลุม ซึ่งสามารถนับได้ด้วยตาเปล่า เนื่องจากวิธี plaque assay เป็น bioassay ซึ่งมี variation สูง ดังนั้นการกำหนดช่วงการเกิด plaques ดังกล่าว ถือว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเกณฑ์สำหรับการคำนวณหาปริมาณไวรัส โดยวิธี plaque assay ค่า min-max ของปริมาณไวรัสในพารามิเตอร์นี้นี้ไม่ควรเกิน 0.5 PFU/ml

การทดสอบความคงทนของวิธี (robustness)

การศึกษาความคงทนของวิธี ในการให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงที่ตั้งใจให้เกิดขึ้น โดยการหาปริมาณไวรัสตามวิธี plaque assay ที่ incubation period ของ mixture และ absorption period ระยะเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 3 การทดสอบ และมีการเปลี่ยน incubation period ของ mixture และ absorption period เป็น 1.10 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบ 3 การทดสอบ นำผลการทดสอบมาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) โดย %CV ต้องมีค่า ≤25%[14]

การศึกษาความจำเพาะของวิธี (specificity)

การศึกษาความจำเพาะของวิธี/ความสามารถของวิธีในการแยกความแตกต่างของสารที่ต้องการวัด โดยนำ positive serum control และ negative serum control มาทดสอบกับเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งปริมาณไวรัสที่ได้จาก negative serum control ผสมกับ SARS-CoV-2 ต้องมีมากกว่า positive serum ผสมกับ SARS-CoV-2 และสามารถดูได้จากจำนวน plaques ที่ลดลงใน positive serum control ผสมกับ SARS-CoV-2 เมื่อเทียบกับ negative serum control ผสมกับ SARS-CoV-2 และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ผสมกับ maintenance medium ซึ่งเป็น positive virus control (เกิด plaque เฉลี่ยอยู่ในช่วง 10-200 plaque/หลุม[13]) ผลการทดสอบต้องแสดงให้เห็นว่าปริมาณไวรัสที่ได้จาก positive serum control ผสมกับ SARS-CoV-2 และ negative serum control ผสมกับ SARS-CoV-2 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงถือได้ว่าวิธีมีความจำเพาะ

การรวบรวมข้อมูล

ระยะเวลาดำเนินการศึกษาและรวบรวมข้อมูล 12 เดือน (มิถุนายน 2563 - มิถุนายน 2564) โดยผู้ทดสอบทำการตรวจสอบความถูกต้องของ plaque assay ตามพารามิเตอร์ที่กำหนดไว้ ได้แก่ ความเที่ยง ความแม่น ความคงทน และความจำเพาะของวิธี

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. คำนวณหาความเที่ยง ความแม่น ความคงทน และความจำเพาะของวิธี โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ GM SD %CV 95%CI และ T-test

2. เกณฑ์ที่ยอมรับได้ (acceptance criteria) ได้แก่

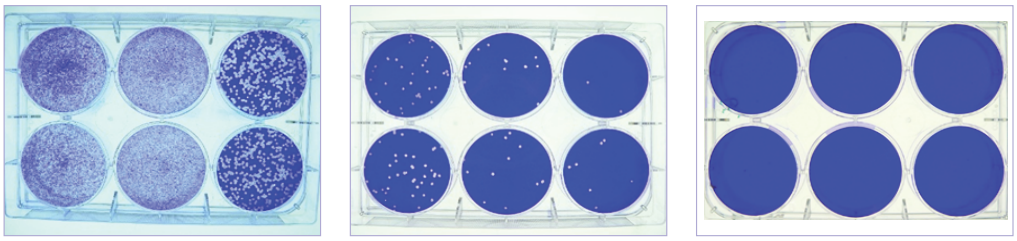
- ปริมาณไวรัสอยู่ในช่วง mean±3SD (4.46-7.32 logPFU/ml)
- ความเที่ยงของวิธี (precision) %CV ต้องมีค่า ≤25%
- ความแม่นของวิธี (accuracy) ค่า min-max ของปริมาณไวรัสในพารามิเตอร์นี้ไม่เกิน 0.5 PFU/ml
- ความคงทนของวิธี (robustness) %CV ต้องมีค่า ≤25%
- ความจำเพาะของวิธี (specificity)

เปรียบเทียบปริมาณไวรัสที่ได้จาก positive serum control และ negative serum control ที่ผสมกับ SARS-CoV-2 ต้องมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

1. การเกิด plaque และการคำนวณปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 โดยวิธี plaque assay

การเกิด plaques ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero หลังติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 นาน 6 วัน ภายหลัง fix ด้วย 10% formaldehyde และย้อมเซลล์ด้วย 0.5% crystal violet ทำให้เห็นเซลล์หลุดออกจากเพลทอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ไวรัสจะทำลายเซลล์ โดยจำนวน plaques เป็นไปตามความเจือจางของไวรัสที่ลดลง พร้อมทั้งแสดงเซลล์ Vero ควบคุม ที่ไม่เกิด plaque ความเจือจางดังรูปที่ 1 (ไวรัสถูกเจือจางตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-6} (เรียงลำดับภาพจากซ้ายมือมาขวามือตามลำดับ)) โดยเซลล์ควบคุมปกติ (cell control) ไม่เกิด plaques จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณไวรัสความเจือจางละอย่างน้อย 2 หลุม หากค่าเฉลี่ยของจำนวน plaque น้อยกว่า 10 หรือสูงกว่า 200 plaques จะไม่นำมาคำนวณผล ไวรัสที่ 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ทำลายเซลล์จนไม่สามารถนับ plaque ได้ โดยสามารถนับได้ 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากค่าเฉลี่ยของจำนวน plaque ที่ 10^{-6} น้อยกว่า 10 plaques จึงไม่นำมาคำนวณ จึงนำจำนวน plaque ของไวรัสที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} และ 10^{-5} มาคำนวณ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 41.5 (37, 46) และ 11.5 (12, 11) ซึ่งมีปริมาณ SARS-CoV-2 เท่ากับ 6.54 $\log_{10}$PFU/ml ดังตารางที่ 1



รูปที่ 1 การเกิด plaque ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ และ cell control

ตารางที่ 1 การเกิด plaques และการคำนวณปริมาณไวรัส SARS-CoV-2

Dilution	Well 1	Well 2	G.M.	SD	CV	PFU/ml	Log PFU/ml
*10^{-1}	ไม่สามารถนับ plaque ได้	ไม่สามารถนับ plaque ได้	-	-	-	-	-
*10^{-2}	ไม่สามารถนับ plaque ได้	ไม่สามารถนับ plaque ได้	-	-	-	-	-
*10^{-3}	>200	>200	-	-	-	-	-
10^{-4}	37	46	41.5	4.5	10.8	2075000.00	-
10^{-5}	12	11	11.5	0.5	4.3	5750000.00	-
*10^{-6}	7	2	4.5	3.5	78.6	-	-
-	-	-	-	-	G.M	3454164.15	6.54

เนื่องจากไม่เป็นไปตาม acceptance criteria จึงไม่นำจำนวน plaque มาคำนวณหาปริมาณไวรัส

จากตาราง เมื่อนำจำนวน plaque ของ 10^{-4} และ 10^{-5} คำนวณปริมาณไวรัสได้เท่ากับ 6.54 $\log_{10}$pfu/ml.

2. การศึกษาความเที่ยงของวิธี (Precision)

ผลการทดสอบ repeatability พบว่าได้ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean: G.M.) เท่ากับ 5.76 $\log_{10}$PFU/ml ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.05 ค่า %CV เท่ากับ 0.94% ดังตารางที่ 2

ผลการทดสอบ reproducibility พบว่า ค่า G.M. เท่ากับ 5.76 log_{10}PFU/ml ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) เท่ากับ 0.18 ค่า %CV เท่ากับ 3.12% โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 6.08 log_{10} PFU/ml และค่าต่ำสุดเท่ากับ 5.47 log_{10}PFU/ml ดังตารางที่ 3 จากข้อมูลข้างต้น แสดงให้เห็นว่ามีความแปรปรวนของผลการทดสอบน้อย วิธีมีความเที่ยงตรงดี

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ repeatability

การทดสอบ	จำนวนไวรัส SARS-CoV-2
1	5.67
2	5.74
3	5.83
4	5.74
5	5.77
6	5.82
G.M.[a]	5.76
SD[b]	0.05
G.M.±2SD/95%CI[c]	5.65-5.87
%CV[d]	0.94

[a]ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric mean: G.M.) [b]ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) [c]ช่วงความเชื่อมั่นที่ระดับ 95% (95% confidence interval/95%CI) และ [d]ค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV)

3. การทดสอบความแม่นของวิธี (accuracy)

ผลการทดสอบความแม่นที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ของซีรัมคนปกติ (negative serum) ที่นำมาผสมกับไวรัสที่ระดับความเจือจาง $10^{-3.5}$

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ reproducibility

นักวิเคราะห์	การทดสอบ	จำนวนไวรัส SARS-CoV-2
คนที่ 1	1	5.58
	2	5.47
	3	5.67
	4	5.77
	5	6
	6	6.08
คนที่ 2	7	5.76
	8	5.89
	9	5.86
	10	5.9
	11	5.98
	12	6.01
G.M.		5.76
SD		0.18
G.M.±2SD/95%CI		5.40-6.12
%CV		3.12

ให้ปริมาณไวรัสไม่แตกต่างกัน และได้ค่าใกล้เคียงกับปริมาณไวรัสที่ $10^{-3.5}$ ผสมกับ maintenance medium ซึ่งใช้เป็นไวรัสควบคุม (virus control) ซึ่งปริมาณไวรัสที่ได้ค่าสูงสุดเท่ากับ 5.65 log_{10} PFU/ml และค่าต่ำสุดเท่ากับ 5.43 log_{10} PFU/ml ซึ่งค่าความแตกต่างไม่เกิน 0.5 log_{10} นอกจากนี้ซีรัม negative และ positive ไม่มีผลต่อการทำลายเซลล์ นั่นคือตรวจไม่พบ plaque เหมือนกับหลุมของเซลล์ควบคุม ดังตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความแม่น

ตารางที่ 4 ความแม่นของวิธี (accuracy)

ระดับความเจือจางของซีรัม	จำนวนไวรัส SARS-COV-2 (log_{10} PFU/ml) ในแต่ละสภาวะ (n=3)											
	อาหารเลี้ยงเซลล์ + ไวรัส (SARS-Cov-2) = virus control			ซีรั่มผลลบ + ไวรัส (SARS-Cov-2)			ซีรั่มผลลบ +อาหารเลี้ยงเซลล์			ซีรั่มผลบวก +อาหารเลี้ยงเซลล์		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1:100	5.52	5.48	5.47	5.43	5.53	5.49	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1:200	5.53	5.51	5.6	5.59	5.60	5.60	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1:400	5.45	5.58	5.43	5.50	5.65	5.48	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1:800	5.48	5.47	5.49	5.49	5.57	5.54	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. = ไม่ปรากฏ plaque

4. การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

ผลการทดสอบ Robustness พบว่า เมื่อมีการปรับเปลี่ยน incubation period และ adsorption time ใน plaque assay จากเดิม 1 ชั่วโมง เป็น 1.10 ชั่วโมง ได้ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean, G.M.) เท่ากับ 5.74 log_{10}PFU/ml ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) เท่ากับ 0.19 ค่า %CV เท่ากับ 3.38% ซึ่งค่า %CV น้อยกว่า 25%[14] เมื่อมีการปรับเปลี่ยน incubation period และ adsorption time ใน plaque assay จากเดิม 1 ชั่วโมง เป็น 1.10 ชั่วโมง ไม่มีผลกระทบต่อผลการทดสอบ ดังตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความคงทนในการให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือ

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความคงทนของวิธี (robustness)

Condition	การทดสอบ	ปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 (log PFU/ml)
1 hr for incubation	1	5.75
period&adsorption	2	5.47
	3	5.59
1.10 hrs for incubation	1	5.74
period&adsorption	2	5.9
	3	6.00
G.M.		5.74
SD		0.19
G.M.±2SD/95%CI		5.35-6.13
%CV		3.38

5. การศึกษาความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ผลการทดสอบความจำเพาะ จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ T-test พบว่า ปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 จาก negative serum ผสมกับ SARS-CoV-2 เปรียบเทียบกับ positive serum ผสมกับ SARS-CoV-2 พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย Sig (2-tailed) = 0.038 ซึ่งปริมาณไวรัสที่ได้จาก negative serum ผสมกับ SARS-CoV-2 มีมากกว่าใน positive ผสมกับ SARS-CoV-2 ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าเมื่อผสม positive serum กับ SARS-CoV-2 ทำให้สามารถลดปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ลงได้ ดังตารางที่ 6 จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าวิธีมีความจำเพาะ

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาความจำเพาะของวิธี (specificity)

ปริมาณไวรัส SARS-COV-2 (log_{10} PFU/ml) ในแต่ละสภาวะ					
ระดับความเจือจางของอาหารเลี้ยงเซลล์	อาหารเลี้ยงเซลล์ + SARS-Cov-2 = virus control	ระดับความเจือจางของซีรั่มคนปกติ	ซีรั่มคนปกติ (negative serum) + SARS-CoV-2	ระดับความเจือจางของซีรั่มผู้ป่วยติดเชื้อ SARS-CoV-2	ซีรั่มผู้ป่วยติดเชื้อ SARS-CoV-2 (positive serum) + SARS-CoV-2
-	5.52	1:100	5.43	1:200	3.69
-	5.53	1:200	5.59	1:400	4.09
-	5.45	1:400	5.50	1:800	4.58
-	5.48	1:800	5.49	1:1600	5.16
Geomean	5.49	-	5.50	-	4.35

อภิปรายผล

การศึกษานี้ต้องทำการทดสอบในห้องชีวนิรภัยระดับความปลอดภัย 3 (Biosafety Level 3) เนื่องจากไวรัส SARS-CoV-2 เป็นเชื้อก่อโรคใหม่และเกิดการติดเชื้อได้ง่าย ทำให้เกิดการระบาดไปทั่วโลก ทำให้ผู้วิจัยต้องสวมใส่ชุดป้องกันการปนเปื้อนเชื้อที่เรียกว่า Personal Protective Equipment (PPE) และเครื่อง Powered Air Purifying respirator (PAPR) ตามมาตรฐานการสวมใส่ที่ถูกต้อง โดยต้องปฏิบัติตัวอย่างเคร่งครัดในการใช้ห้องปฏิบัติการพิเศษที่มีความดันเป็นลบ เพื่อไม่ให้เชื้อกระจายออกจาก

ห้องปฏิบัติการ และผู้ปฏิบัติงานไม่สามารถทำงานในห้องความดันลบนานเกิน 3-4 ชั่วโมง เพราะจะส่งผลต่อสภาพร่างกายทำให้ร่างกายอ่อนเพลีย อย่างไรก็ตามการทดลองนี้เป็นการศึกษาในเบื้องต้น เพื่อดูว่าเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 สามารถติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงและเกิด plaque ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ได้หรือไม่ เซลล์เพาะเลี้ยง Vero มีลักษณะรูปร่างกลมรีและเป็นเหลี่ยมเล็กน้อย สามารถเลี้ยงได้โดยไม่จำกัด เนื่องจากเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (continuous cell line) มีโครโมโซมที่ผิดปกติไปจากเดิม ดังนั้นการศึกษานี้จึงจำกัดการใช้เซลล์ไม่เกิน 20 passages เพื่อควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ซึ่งอาจส่งผลต่อความไวของเซลล์ Vero ต่อไวรัส SARS-CoV-2 และลดโอกาสการเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์[11] โดยเฉพาะเชื้อมัยโคพลาสมาที่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนในเซลล์ได้ตลอดเวลา[17-19] ดังนั้น จึงมีการควบคุมคุณภาพของเซลล์ Vero นอกจากการกำหนด passage การใช้งานแล้ว ได้มีการตรวจสอบหาการปนเปื้อนมัยโคพลาสมาในเซลล์ Vero ก่อนนำมาใช้งาน[20-21] ผลการศึกษาเมื่อเซลล์ Vero ติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ไวรัสจะทำลายเซลล์จนเกิดเป็นช่องว่าง (plaque) ในวันที่ 6 จึงสามารถนับจำนวน plaque และนำมาคำนวณหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ได้ ซึ่งการคำนวณหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 โดยวิธี plaque assay นั้น ถ้าหากใช้ความเจือจางละ 2 หลุม ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือน้อยกว่า 3 หลุม ดังนั้น ในการหาปริมาณไวรัสควรใช้อย่างน้อย 3 หลุมต่อความเจือจาง เพื่อให้ข้อมูลมีความน่าเชื่อถือทางสถิติมากขึ้น นอกจากนี้แล้ว เนื่องจากยังไม่มี International reference standard ที่ทราบค่ามาตรฐาน จึงทำการศึกษาในพารามิเตอร์ accuracy โดยการเจือจางซีรัมของคนที่ไม่ติดเชื้อ SARS-CoV-2 ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ[16] แทนการใช้ international reference standard อย่างไรก็ตาม ในอนาคตหากมี International reference standard ควรมีการศึกษาในพารามิเตอร์ accuracy เพิ่มเติม เพื่อให้ข้อมูลการศึกษามีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น ในส่วนของการกำหนดจำนวน plaque ที่เหมาะสมนั้น ในบางการศึกษามีการกำหนดค่าเฉลี่ยของจำนวน plaque ไว้ที่ 40-120 plaques/หลุม[15] แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจาก plaque assay เป็น bioassay ซึ่งมีความแปรปรวนของผลการทดสอบสูง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงกำหนดค่าเฉลี่ยของจำนวน plaques ที่เหมาะสมอยู่ที่ 10-200 plaques[13] ซึ่งได้จากการทดสอบหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 จำนวน 34 ค่า โดย mean±3SD (ค่าเฉลี่ย ±3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) คือ 4.46-7.32 logPFU/ml และเนื่องจากวิธี plaque assay เป็น bioassay การกำหนดค่าเฉลี่ยของจำนวน plaque ต่อหลุมให้กว้างขึ้น จะทำให้ลดผลการทดสอบที่ไม่เป็นไปตาม acceptance criteria

สรุปผล

จากข้อมูลผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี plaque assay ในการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero พบว่าวิธีให้ความเที่ยงความแม่น และมีความคงทนของวิธี โดยมีค่า %CV ต่ำกว่า 25% และมีปริมาณไวรัสอยู่ในช่วง mean±3SD นอกจากนี้วิธียังมีความจำเพาะให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือได้ ดังนั้น จึงถือได้ว่าวิธี plaque assay มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 และสามารถนำเชื้อไวรัสดังกล่าวไปใช้ในการตรวจหาระดับ neutralizing antibody responses ในคนติดเชื้อโควิด-19 รวมทั้งการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันในสัตว์/คนที่ได้รับวัคซีน COVID-19 ต้นแบบในประเทศ รวมถึงวัคซีน COVID-19 จากต่างประเทศที่นำมาขอขึ้นทะเบียนในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ hCoV-19/Thailand/47/2020 ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. WHO announces COVID-19 outbreak a pandemic [Internet]. Geneva: WHO; 2020 [cited 2020 Nov 18]. Available from: http://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/news/news/2020/3/who-announces-covid-19-outbreak-a-pandemic
2. World Health Organization. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines [Internet]. Geneva: WHO; 2020 [cited 2020 Dec 20]. Available from: https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines
3. Fukuda A, Sengun F, Sarpay HE, Konobe T, Saito S, Umino Y et al. Parameters for plaque formation in the potency assay of Japanese measles vaccines. J Virol Methods 1996;61: 1-6.
4. World Health Organization. Requirements for varicella vaccine (live), technical Report Annex 1 [Internet]. Geneva: WHO; 1994 [cited 2020 Dec 22]. Available from:https://www.who.int/publications/m/item/varicella-vaccine-(live)-annex-1-trs-no-848
5. Husson Van Vliet J. Colinet G, Yane F, Lemoine P. A simplified plaque assay for varicella vaccine. J Virol Methods 1987;18(2-3):113-20.
6. World Health Organization.Recommendation for Japanese encephalitis vaccine (inactivated) for human use (revised 2007). [Internet]. Geneva: WHO; 2020 [cited 2020 Dec 29]. Available from: https://www.who.int/biologicals/vaccines/Annex_1_WHO_TRS_963.pdf?ua=1
7. World Health Organization.Guidelines for the production and control of Japanese Encephalitis vaccine (live) for human use. Technical Report Series No. 910. 2002; Annex 3 [Internet]. Geneva: WHO; 2020 [cited 2020 Dec 29]. Available from: https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/jap_encephalitis/WHO_TRS_910_A3.pdf
8. Forcic D, Kosutic-Gulija T, Santak M, Jug R, Ivancic-Jelecki J, Markusic M, et al. Comparisons of mumps virus potency estimates obtained by 50% cell culture infective dose assay and plaque assay. Vaccine 2010;28(7):1887-92.
9. World Health Organization. Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccines (live) [Internet]. Geneva: WHO; 1994 [cited 2020 Dec 29]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39048/WHO_TRS_840_(part2).pdf;jsessionid=DEAC76A6984EEDF96AB7E2DB2BA54114?sequence=2
10. World Health Organization. Requirements for poliomyelitis vaccine (Oral) [Internet]. Geneva: WHO; 1990 [cited 2020 Dec 29]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39526/WHO_TRS_800_(part1).pdf?sequence=1
11. World Health Organization. Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO expanded programme on immunization [Internet]. Geneva: WHO; 1997 [cited 2020 Dec 30]. Available from: https://apps.who.int/iris/handle/10665/63576
12. Wang J, Feng H, Zhang S, Ni Z, Ni L, Chen Y, et al. SARS-CoV-2 RNA detection of hospital isolation wards hygiene monitoring during the Coronavirus Disease 2019 outbreak in a Chinese hospital. International Journal of Infectious Diseases 2020;94:103-106.
13. การตรวจสอบความแรงและความคงตัวของวัคซีนป้องกันโรคไข้สมองอักเสบเจอีชนิดเชื้อเป็นลูกผสมโดยเซลล์เพาะเลี้ยง Vero. นนทบุรี: สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2018. หน้า 11.

14. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, สถาบันชีววัตถุ. การตรวจสอบความถูกต้องทางชีววิธี (Bioassay Validation). นนทบุรี: สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2020. หน้า 1-8.
15. Darling A, Boose J, Spaltro J. Virus Assay Methods: Accuracy and Validation. Biologicals 1998;26(2):105-110.
16. Thomas S, Jarman R, Endy T, Kalayanarooj S, Vaughn D, Nisalak A et al. Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance.The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2009;81(5):825-833.
17. Freshey RI. Culture of animal cells: a manual of basic technology (4th ed), Wiley-Liss 1994; 290-96.
18. Low IE. Mycoplasma in tissue culture: Overview of detection methods. Health Lab Sci 1976;13:129-36.
19. Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. Exp. Cell.Res 1997;104: 255-62.
20. สุกัลยาณี ไชยมี, สุภาพร ภูมิอมร. การประเมินความถูกต้องของวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อมัยโคพลาสมาในเซลล์เพาะเลี้ยง. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2551;50(2):87-102.
21. Phumiamorn S, Kullabutr K, Tepbhuthorn S, Jivapaisarnpong T. Detection of mycoplasma contamination in cell culture: comparison between DNA fluorochom staining and PCR amplification methods. Thai J. Pharm Sci 2006;30:82-92.