

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administrationวารสารอาหารและยา
ปีที่ 30 ฉบับที่ 2 (2566): พฤษภาคม - สิงหาคม
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 30 No. 2 (2023): May - August

การเปรียบเทียบการหาค่าปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ Wuhan-Hu-1 โดยการนับจำนวนการเกิดพลัคและการทดสอบการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง 50%

สกาลิน ไตรศิริวานิชย์¹ สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์¹ กรณิกา กุลบุตร¹ อัสมะ ยูโซะ¹ สุภาพร ภูมิอมร¹¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรีที่อยู่ติดต่อ: สกาลิน ไตรศิริวานิชย์ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
sakalin.t@dmsc.mail.go.th

Comparison of the Plaque Assay and 50% Cell Culture Infectious Dose Assay Methods for Quantification Measuring SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 Strain Infectivity

Sakalin Trisiriwanich¹, Sompong Sapsutthipas¹, Kornnika Kullabutr¹, Ashma Yuso¹, Supaporn Phumiamorn¹¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences**Contact address:** Sakalin Trisiriwanich, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health Tivanon Rd, Nonthaburi 11000, Thailand. sakalin.t@dmsc.mail.go.th**Received:** 3 January 2023, **Revised:** 16 May 2023, **Accepted:** 18 May 2023

Abstract

Background: The Corona Virus Disease 2019 (COVID-19), which causes from the Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus (SAR-CoV-2), is an emerging disease that several organizations have tried to develop vaccines against the viruses and therapeutic medicines, including specific anti-viral drugs. Therefore, viral cultivation and quantification are necessary for the laboratory testing. Most of common methods to quantify the viral titer are the Plaque and CCID₅₀ assays.

Objective: To compare the quantity of the SAR-CoV-2 and the consumption resources test between the plaque and CCID50 assays (original strain).

Methods: This study was an experimental research from March to June 2020 by comparing the quantification of the SAR-CoV-2 between both methods using the same virus set at 80 tests in the same period.

Results: The results showed that the geometric means of viral titers determined by the plaque and CCID50 assays were 5.97 log PFU/ml and 6.00 log CCID50/ml, respectively. The percentages of the coefficient of variance of the methods were 4.09 and 3.29, respectively. The statistical analysis by the Paired-t test showed no statistically significant difference between these two methods at a 95% confidence interval. In addition, the ratio of viral titers of the mean over the geometric mean ranged between 0.87 and 1.13. However, the CCID50 assay was faster by requiring only 4 days of testing and more cost-effective by using fewer materials, equipment, and medium.

Conclusions: The determination of SARS-CoV-2 virus counting by the plaque counting method and the 50% cell culture infection test showed no difference in results, but testing for 50% infection in cell cultures was faster and more cost-effective. It revealed that both methods can be used to quantify the SARS-CoV-2 titer, which can be applied to detect immune responses in COVID-19 patients as well as in COVID-19 vaccine testing further in animals and humans.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, plaque assay, CCID50 assay

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา-2019 (โควิด-19) ที่เกิดจากเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 เป็นโรคอุบัติใหม่ ที่หลายองค์กรพยายามพัฒนาวัคซีนหรือยาด้านไวรัสที่จำเพาะ จึงจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน และหาค่าปริมาณไวรัสเพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ การหาปริมาณไวรัสที่นิยม ใช้กันมากมี 2 วิธีคือ การนับจำนวนการเกิดพลาค์ และการทดสอบการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง 50%

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบและหาค่าปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ Wuhan-Hu-1 และความเปลี่ยนแปลงทรัพยากรที่ทำการทดสอบโดยวิธีการนับจำนวนการเกิดพลาค์ และการทดสอบการติดเชื้อ ในเซลล์เพาะเลี้ยง 50%

วิธีการวิจัย: เป็นการวิจัยเชิงทดลองระหว่างเดือนมีนาคม - มิถุนายน 2563 โดยเปรียบเทียบการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ Wuhan-Hu-1 ระหว่างทั้งสองวิธีโดยใช้เชื้อไวรัสชุดเดียวกัน ทดสอบในช่วงเวลาเดียวกัน จำนวน 80 การทดสอบ

ผลการศึกษา: พบว่าผลจากการนับจำนวนการเกิดพลัค และการทดสอบการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง 50% มีค่าปริมาณไวรัสเฉลี่ยเท่ากับ 5.97 log PFU/ml และ 6.00 log CCID50/ml ตามลำดับ ทั้งสองวิธีมีค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของผลการทดสอบเท่ากับ 4.09 และ 3.29 ตามลำดับ จากการทดสอบทางสถิติด้วย paired - t test พบว่าทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} > 0.5$ โดยค่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณไวรัสจากวิธีทั้งสองทั้งค่าเฉลี่ยเลขคณิตและค่าเฉลี่ยเรขาคณิตอยู่ระหว่าง 0.88 ถึง 1.14 โดยการทดสอบด้วยการทดสอบการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง 50% มีความรวดเร็วโดยใช้เวลาทดสอบเพียง 4 วันและประหยัดค่าใช้จ่ายในการใช้วัสดุ อุปกรณ์ และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่น้อยกว่า

สรุปผล: การหาค่าปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธีการนับจำนวนการเกิดพลัค และการทดสอบการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง 50% ให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่การทดสอบการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง 50% มีความรวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่ายกว่า สามารถนำวิธีทั้งสองไปใช้ในการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 และพัฒนาการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในผู้ป่วย รวมถึงเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันโรคโควิด-19 ทั้งในสัตว์ทดลองและมนุษย์ต่อไปได้

คำสำคัญ: SARS-CoV-2 โควิด-19 วิธีนับจำนวนการเกิดพลัค วิธีทดสอบการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง 50%

บทนำ

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา-2019 (Corona Virus Disease 2019: COVID-19) ที่เกิดจากเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์กลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2: SARS-CoV-2) ซึ่งเป็นเชื้ออุบัติใหม่ มีรายงานตรวจพบผู้ป่วยรายแรก

ในเมืองอู่ฮั่น มณฑลหูเป่ย์ สาธารณรัฐประชาชนจีน ในปลายเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 และแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) จึงประกาศเป็นการระบาดใหญ่หลังจากเชื้อลุกลามไปอย่างรวดเร็วในทุกภูมิภาคของโลก¹⁻⁴ ซึ่งการดูแลรักษาเป็นไปอย่างฉุกเฉิน

ทำให้หลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยวิจัยพัฒนาวัคซีนโควิด-19 อย่างเร่งด่วนในรูปแบบต่าง ๆ อาทิ วัคซีนเชื้อตาย DNA, mRNA, viral vector, protein subunit และ virus-like particle เป็นต้น⁵⁻⁹ ปัจจุบันมีวัคซีนที่ได้รับการอนุมัติการขึ้นทะเบียนในทั่วโลก 49 ผลิตภัณฑ์¹⁰ และอยู่ระหว่างการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองและการศึกษาวิจัยในมนุษย์อย่างน้อย 20 ชนิด¹¹ ซึ่งในการพัฒนาการผลิตวัคซีนต้องอาศัยเชื้อไวรัสต้นแบบสำหรับการพัฒนารวมถึงการใช้เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อไวรัส SARS-CoV-2 ในสัตว์หรือในคนที่ได้รับวัคซีนต้นแบบ มีความจำเป็นต้องมีการแยกเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จากผู้ป่วย ทำการเพิ่มจำนวนไวรัสให้ได้ปริมาณมากในเซลล์เพาะเลี้ยง และตรวจหาปริมาณไวรัสเพื่อใช้ศึกษาวิจัย

วิธีการทดสอบหาปริมาณไวรัสนิยมทำในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีความไวต่อเชื้อไวรัสที่ถือเป็นวิธีมาตรฐานคือการนับจำนวนการเกิดพลัค (plaque assay) และการทดสอบการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง 50% (50% Cell Culture Infectious Dose: CCID₅₀)^{6-9,12-19} ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นการทดสอบทางชีววิธี (bioassay) โดยตรวจนับปริมาณไวรัสที่มีชีวิตและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ Cytopathic Effects (CPE) ซึ่ง plaque assay อาศัยหลักการที่เชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีความจำเพาะต่อเชื้อและทำให้เซลล์ตายเมื่อเจือจางปริมาณเชื้อไวรัสใส่ไปในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็น monolayer ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ไวรัส

1 อนุภาคจะเข้าไปในเซลล์และเพิ่มจำนวนทำให้เซลล์ตาย เกิดเป็นช่องว่างใน monolayer เรียกว่า plaque นับจำนวน plaque นำมาคำนวณปริมาณไวรัส^{8-9,12-14,16,17} ส่วนวิธี CCID₅₀ เป็นการหาค่าปริมาณไวรัสในระดับการเจือจางไวรัสสุดท้าย (end point) ที่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเกิด CPE ที่ 50% โดยนับจำนวนหลุมที่เซลล์เกิด CPE นำมาคำนวณหาระดับการเจือจางไวรัสที่ทำให้ลายเซลล์ 50% (^{7,9,11-13,17}) แม้ทั้งสองวิธีการเป็นที่นิยมใช้ในการหาปริมาณไวรัส และมีการศึกษาหาความสัมพันธ์ของการทดสอบทั้งสองวิธีในเชื้อไวรัสต่าง ๆ เช่น mumps virus filovirus^{9,19} เป็นต้น แต่ยังไม่พบรายงานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ที่มีหน่วยเป็น Plaque Forming Unit (PFU)/ml และ CCID₅₀/ml มาก่อน ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ของผลการทดสอบ และความสิ้นเปลืองทรัพยากรระหว่างวิธีการทดสอบหาค่าปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 โดยวิธี Plaque Assay และวิธี CCID₅₀ Assay ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเปรียบเทียบค่าระหว่างห้องปฏิบัติการที่ใช้วิธีที่แตกต่างกัน และจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาความสัมพันธ์ของการทดสอบระดับภูมิคุ้มกันโดยวิธี plaque reduction neutralization test และ microneutralization test ในการหาระดับภูมิคุ้มกันเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน รวมถึงการคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบค่าปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ Wuhan-Hu-1 จากการทดสอบโดยวิธี plaque assay และ CCID₅₀ assay
2. เพื่อเปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลงทรัพยากรในการทดสอบโดยวิธี plaque assay และ CCID₅₀ assay

ระเบียบวิธีการวิจัย

วิธีการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลองระหว่างเดือนมีนาคม - มิถุนายน 2563 โดยทำการทดสอบหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ Wuhan-Hu-1 ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยภายในประเทศ และเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยวิธี plaque assay และวิธี CCID₅₀ assay ทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลการทดสอบทั้ง 2 วิธี และหาความสัมพันธ์ของค่าที่ได้ โดยการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงและเตรียม reagent ต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการชีวনির্যระดับ 2 ของสถาบันชีววัตถุ และทดสอบค่าปริมาณไวรัสที่ชีวনির্যระดับ 3 ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กลุ่มตัวอย่าง

ไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ Wuhan-Hu-1(hCoV-19/Thailand/74/2020) ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย

เพศหญิง อายุ 74 ปี ที่เดินทางมาจากเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีน ที่พิสูจน์คุณลักษณะแล้วด้วยวิธี Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)¹⁶ นำมาเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero และแบ่งบรรจุปริมาตร 0.12 ml ในหลอดพลาสติกขนาด 2.0 ml จำนวน 700 หลอด เก็บที่อุณหภูมิ -70 °C ในการศึกษานี้ทำการสุมไวรัสจำนวน 80 หลอดเพื่อทำการทดสอบ

เครื่องมือ

1. ตู้ชีวনির্য ระดับ 2 (biological safety cabinet class II)
2. ห้องชีวনির্য ระดับ 2 และ 3 (biosafety level 2 and 3) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
3. ตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 °C ที่มี 5% CO₂ (37 °C incubator, 5% CO₂)
4. ตู้ดูดควันสารเคมี (chemical fume hood)

ขั้นตอนการศึกษา

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ Vero ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 225 cm² ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์สำเร็จรูป Minimum Essential Medium (MEM) โดยเติม 1% L-glutamine (Gibco) และ 10% fetal bovine serum (HyClone) ที่ถูก inactivated ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 30 นาที ในตู้บอุณหภูมิ 37 °C แบบใช้ 5% CO₂ เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนเป็น monolayer มากกว่าร้อยละ 90 ของพื้นที่ขวดเพาะเลี้ยง ทำการ passage ในอัตราส่วน 1:10 ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ขนาดเท่าเดิม เพาะเลี้ยง

เซลล์เป็นเวลา 3 วัน จะได้เซลล์เป็น monolayer พร้อมใช้ทดสอบ และทำการ passage โดยสุ่มตรวจ การปนเปื้อนเชื้อไมโครพลาสมาเป็นระยะ 18-22 และจำกัดการใช้เซลล์ไม่เกิน 20 passages นับจากการเริ่มใช้ครั้งแรกที่ได้รับเซลล์มา

2. เพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในขวดพลาสติกขนาด 25 cm² ที่อุณหภูมิ 37 °C แบบใช้ 5% CO₂ นาน 20-24 ชั่วโมง จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติมไวรัส SARS-CoV-2 ลงในเซลล์ Vero อบที่ 37 °C นาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นเติม MEM 7 ml ที่มี 2% FBS อบที่อุณหภูมิ 37 °C แบบใช้ 5% CO₂ นาน 4-5 วัน สังเกต Cytopathic Effect (CPE) ที่เกิดขึ้นหลังการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เทียบกับขวดที่เลี้ยงเซลล์ Vero โดยไม่มีไวรัส เมื่อเกิด CPE ในเซลล์ประมาณ 80-90% เก็บไวรัสโดยการดูดเป่าเซลล์ขึ้นลงหลายครั้ง และทำการ freeze-thaw 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ -70 °C และ 37 °C จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อปั่นแยกเซลล์กับไวรัสที่ระดับความเร็ว (relative centrifuge force) 500 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำส่วนใสที่มีไวรัสมาขยายเพิ่มจำนวนในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 175 cm² ด้วยวิธีการเดียวกัน จัดเก็บส่วนใสที่มีไวรัสไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C เพื่อสำหรับการใช้ในการศึกษา

3. ทดสอบหาปริมาณไวรัส โดยผู้วิเคราะห์ 3 คนทำการทดสอบขั้นตอนที่เหมือนกัน โดยวิธี Plaque Assay และ CCID₅₀ Assay ที่เป็นอิสระต่อกัน (independent test) ทดสอบวิธีละ 10-20 ครั้ง รวมวิธีละ 40 ครั้ง

3.1 ทดสอบหาปริมาณไวรัส ด้วยวิธี plaque assay โดยเติมเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จำนวน 2 x 10⁵ เซลล์/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี 10% FBS ปริมาตร 3 ml/หลุม ลงในเพลท 6 หลุม บ่มนาน 1 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี 5% CO₂ จากนั้นเติมไวรัส SARS-CoV-2 ที่ระดับความเจือจาง 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ และ 10⁻⁶ ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี 2% FBS ปริมาตร 200 ml/หลุม ทำอย่างน้อย 2 ซ้ำในแต่ละความเจือจาง นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูดเอาไวรัสส่วนเกินออกจากเซลล์ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 1% L-glutamine, 2% FBS และ 1.2 % carboxy methyl cellulose ลงไปปริมาตร 3 ml/หลุม นำไปบ่มที่ 37 °C ที่มี 5% CO₂ นาน 6-7 วัน ตรวจนับจำนวน plaque ในแต่ละหลุม เพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณไวรัส ในรูป PFU/ml โดยจำนวน plaque ที่นำมาคำนวณ ต้องมีค่าระหว่าง 10-150 plaque /หลุม^{6,13,23}

3.2 ทดสอบหาปริมาณไวรัส ด้วยวิธี CCID₅₀ Assay โดยนำไวรัส SARS-CoV-2 มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี 2% FBS ที่ระดับความเจือจาง 10⁻¹, 10^{-1.5}, 10⁻², ..., 10⁻⁶ เติมแต่ละความเจือจางลงในเพลท 96 หลุม ปริมาตร 50 µl/หลุม ความเจือจางละ 8 หลุม จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 50 µl/หลุม และเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จำนวน 2 x 10⁵ เซลล์/ml ปริมาตร 100 µl/หลุม โดยมีหลุมควบคุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มที่ 37 °C, 5% CO₂ นาน 4 วัน ตรวจนับจำนวน CPE ที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุม และ

นำมาคำนวณหาปริมาณไวรัสในรูป CCID₅₀/ml โดยช่วงระดับความเงาของไวรัสที่ทดสอบ ต้องแสดงการเกิด CPE 0-100% จึงจะเหมาะสม ในการคำนวณหาปริมาณไวรัส¹⁵

4. อ่านผลการทดสอบ โดยนำเพลท 6 หลุม และเพลท 96 หลุม มาทำการยิดเซลล์ให้ติดกันหลุม ด้วยการเติม 10% formaldehyde ปริมาตร 3 ml และ 100 µl/หลุม นาน 30 นาที จากนั้นเท formaldehyde ออก และเติม 0.5% crystal violet ใน PBS pH 7.2-7.4 ลงไปปริมาตร 1 ml และ 100 µl/หลุม ทิ้งไว้นาน 30 นาที ภายใต้อุณหภูมิห้อง แล้วล้างเอาสีออกด้วยน้ำเปล่า เซลล์ที่มีชีวิตที่ไม่ถูกไวรัสทำลายจะติดสีม่วง เหมือนเซลล์ควบคุม ส่วนเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยไวรัส จะเห็นเป็นช่องว่างไม่ติดสีม่วงของ crystal violet

จำนวน plaque (PFU/ ml) =
$$\frac{[\sum(\text{ค่าเฉลี่ยจำนวน plaque แต่ละการเจือจาง} \times \text{dilution factor} \times 1000/300)]}{\text{จำนวนระดับความเจือจาง}}$$

2. คำนวณปริมาณไวรัสโดยวิธี CCID₅₀ โดยนับจำนวนหลุมที่เกิด CPE ในทุกค่าความเจือจางรวมกัน ทารด้วย 8 หลุมที่ทำซ้ำในแต่ละ

$$\log \text{CCID}_{50}/50 \mu\text{l} = \frac{-\log \text{ส่วนกลับของความเจือจางต่ำสุดที่ใช้} + [(\sum \text{จำนวน CPE ทั้งหมด}/8) - 0.5] \times 0.5}{\text{คำนวณหาปริมาณไวรัสจากแอนติลอกกาลิทิ้ม และปรับเป็นหน่วย CCID}_{50}/\text{ml}}$$

3. หาค่าความสัมพันธ์ของค่าปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ระหว่างวิธี plaque assay และ CCID₅₀ assay โดยนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ ข้อมูลเชิงปริมาณเปรียบเทียบกัน ใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ได้แก่ ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด

5. เปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลงทรัพยากร ในการทดสอบโดยวิธี Plaque Assay และ วิธี CCID₅₀ Assay จากปริมาณการใช้วัสดุอุปกรณ์ เซลล์เพาะเลี้ยง อาหารเลี้ยงเซลล์ สารเคมี ขั้นตอน และระยะเวลาในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. คำนวณปริมาณไวรัสโดยวิธี Plaque Assay จากค่าเฉลี่ยของจำนวน plaque ที่เกิดขึ้น ในแต่ละหลุมของแต่ละความเจือจาง คำนวณปริมาณไวรัสเป็นหน่วย PFU/ml จากค่าเฉลี่ยจำนวน plaque คูณระดับการเจือจาง (dilution factor) ทารด้วย ปริมาตรของ virus inoculum (300 µl) คูณด้วย 1000 โดยจำนวน plaque ที่นำมาคำนวณต้องมีค่า ระหว่าง 10 ถึง 100 PFU /หลุม ดังนี้

จำนวนระดับความเจือจาง

ความเจือจาง คำนวณไวรัสเป็น CCID₅₀ จากสูตร ที่ดัดแปลงมาจาก Spearman & Karber²⁴ ดังนี้

ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (mean) ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean: GM) ค่ามัธยฐาน (median) ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (percent of Coefficient of Variance: %CV) หาค่าอัตราส่วน ผลการทดสอบระหว่างวิธี และ paired t-test²⁵

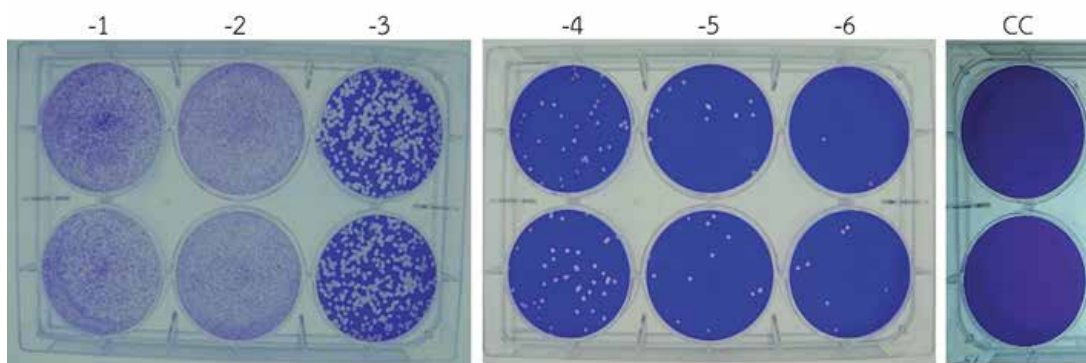
3. หาค่าความสัมพันธ์ของค่าปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ระหว่างวิธี plaque assay และ CCID50 assay โดยนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ ข้อมูลเชิงปริมาณเปรียบเทียบกัน ใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ได้แก่ ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (mean) ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean: GM) ค่ามัธยฐาน (median) ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (percent of Coefficient of Variance: %CV) หาอัตราส่วน ผลการทดสอบระหว่างวิธี และ paired t-test²⁵

ผลการศึกษา

1. การทดสอบหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 โดยวิธี Plaque Assay

การเกิด plaque ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero หลังการติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 นาน 6 วัน ภายหลังจากยัดเซลล์ให้ติดกันหลุมด้วย 10% formaldehyde และย้อมเซลล์ด้วย 0.5% crystal violet จำนวน plaque ลดลงตามลำดับการเจือจาง ดังแสดงในรูปที่ 1

ไวรัสถูกเจือจางตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-6} (เรียงลำดับภาพจากซ้ายมือมาขวามือ ตามลำดับ) โดยเซลล์ควบคุมปกติ (cell control: CC) ไม่เกิด plaque



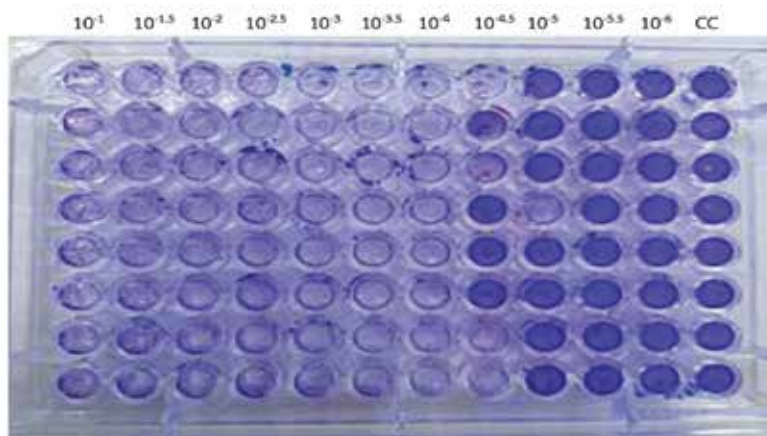
รูปที่ 1 ผลการทดสอบปริมาณ plaque ของไวรัส SARS-CoV-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยวิธี Plaque Assay

2. การทดสอบหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 โดยวิธี CCID₅₀ Assay

การเกิด CPE ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero หลังการติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 นาน 4 วัน ภายหลังจาก fix ย้อมด้วย 10% formaldehyde

และย้อมเซลล์ด้วย 0.5% crystal violet ทำให้เห็น เซลล์หลุดลอกจากเพลทชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 2

ไวรัสถูกเจือจางตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-6} (เรียงลำดับภาพจากซ้ายมือมาขวามือ ตามลำดับ) โดยเซลล์ควบคุมปกติ (CC) ไม่เกิด plaque



รูปที่ 2 ผลการทดสอบปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 โดย CCID₅₀ assay ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero

3. ค่าความสัมพันธ์ของค่าปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ระหว่างวิธี Plaque Assay และ CCID₅₀ Assay

การทดสอบโดยวิธี plaque assay และ CCID₅₀ assay จำนวนวิธีละ 40 ครั้ง จากนักวิเคราะห์

3 คน ให้ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (GM) เท่ากับ 5.97 log PFU/ml และ 6.00 log CCID₅₀/ml โดยให้ค่า %CV ของ plaque assay และ CCID₅₀ assay เท่ากับ 4.09 และ 3.29 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการทดสอบปริมาณไวรัสระหว่างวิธี Plaque Assay และ CCID₅₀ Assay

log PFU/ml		log CCID ₅₀ /ml	
5.77	5.48	5.99	6.18
5.92	6.22	5.93	6.18
5.92	6.14	6.18	5.99
5.70	6.05	5.55	5.93
5.77	6.03	5.55	6.18
5.94	6.42	5.61	5.92
6.04	6.28	5.86	6.07
5.69	6.21	6.11	6.07
5.97	6.43	5.99	5.86
5.87	6.23	6.24	5.92
5.70	6.03	5.99	6.09
5.67	6.01	6.43	6.19
5.82	6.08	6.18	5.84
5.68	6.35	6.05	6.12
5.93	6.24	5.99	6.03
GM	5.98	6.00	
S.D.	0.24	0.20	
%CV	4.09	3.29	

หมายเหตุ log log PFU หมายถึง ลอการิทึมของ plaque performing unit

log CCID₅₀ หมายถึง ลอการิทึมของ 50% cell culture infectious dose

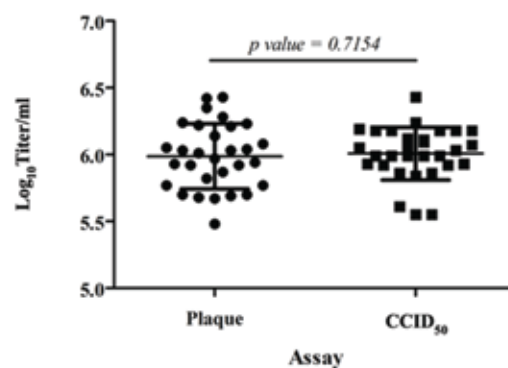
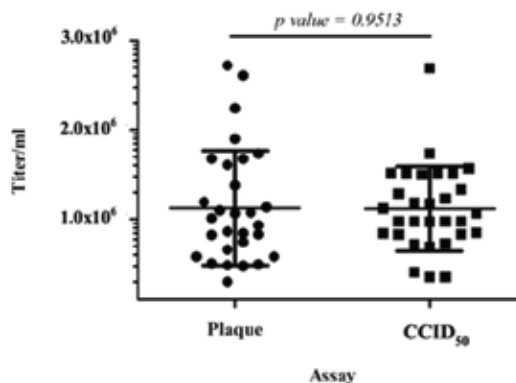
การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณเปรียบเทียบ พบว่าวิธี plaque assay มีค่าสูงสุดและต่ำสุดที่ 23.00×10^5 และ 4.05×10^5 PFU/ml ค่าเฉลี่ยเลขคณิต เท่ากับ 10.26×10^5 PFU/ml ค่า GM เท่ากับ 8.92×10^5 PFU/ml และค่ามัธยฐาน เท่ากับ 9.35×10^5 PFU/ml ส่วนโดยวิธี CCID₅₀ Assay มีค่าสูงสุดและต่ำสุดที่ 26.92×10^5 และ 3.56×10^5 CCID₅₀/ml ค่าเฉลี่ยเลขคณิต เท่ากับ 11.39×10^5 CCID₅₀/ml ค่า GM เท่ากับ 10.16×10^5 CCID₅₀/ml และค่ามัธยฐาน เท่ากับ 10.22×10^5 CCID₅₀/ml เมื่อวิเคราะห์อัตราส่วนความสัมพันธ์ของค่า PFU/ml ต่อค่า CCID₅₀/ml ของค่าเฉลี่ยเลขคณิต เท่ากับ 0.90 และค่า GM เท่ากับ 0.88 ในทำนองเดียวกันค่าอัตราส่วนความสัมพันธ์ของค่า

CCID₅₀/ml ต่อค่า PFU/ml ของค่าเฉลี่ยเลขคณิต เท่ากับ 1.11 และ ค่า GM เท่ากับ 1.14 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณไวรัสที่เป็นค่าลอการิทึม (logarithm) อัตราส่วนความสัมพันธ์ของค่า log PFU/ml ต่อ ค่า log CCID₅₀/ml ของค่าเฉลี่ยเลขคณิต และค่า GM เท่ากับ 0.99 ส่วนอัตราส่วนความสัมพันธ์ของค่า log CCID₅₀/ml ต่อค่า log PFU/ml ของค่าเฉลี่ยเลขคณิต และค่า GM เท่ากับ 1.01 ซึ่งผลการทดสอบของทั้ง 2 หน่วยทดสอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นที่ 95% ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และเมื่อดูค่าการกระจายตัวของข้อมูลของทั้ง 2 วิธี พบว่าทั้ง 2 วิธีมีการกระจายของข้อมูลไม่แตกต่างกัน ($p\text{-value} > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 3

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ข้อมูล

พารามิเตอร์	PFU (P)/ml	log PFU/ ml	CCID ₅₀ (C)/ml	log CCID ₅₀ /ml
1. ค่าต่ำสุด	3.01×10^5	5.48	3.56×10^5	5.55
2. ค่าสูงสุด	27.21×10^5	6.22	26.92×10^5	6.43
3. ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (mean)	11.24×10^5	5.86	11.16×10^5	6.01
4. ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (GM)	9.67×10^5	5.86	10.18×10^5	6.00
5. ค่ามัธยฐาน	9.72×10^5	5.89	10.22×10^5	5.99
6. อัตราส่วนค่าเฉลี่ยเลขคณิต	P/C = 1.01	P/C = 1.00	C/P = 1.00	C/P = 1.02
7. อัตราส่วนค่าเฉลี่ยเรขาคณิต	P/C = 0.95	P/C = 0.98	C/P = 1.00	C/P = 1.02
8. Paired-t-test (p=0.05)	PFU-CCID ₅₀ = 0.95		log PFU - log CCID ₅₀ = 0.72	

หมายเหตุ log log PFU หมายถึง ลอการิทึมของ plaque performing unit
log CCID₅₀ หมายถึง ลอการิทึมของ 50% cell culture infectious dose



การกระจายข้อมูลในหน่วย PFU และ CCID₅₀

การกระจายข้อมูลในหน่วย log PFU และ log CCID₅₀

รูปที่ 3 การกระจายของข้อมูลจากผลการทดสอบโดยวิธี plaque assay และ CCID₅₀ assay

3. ความสิ้นเปลืองทรัพยากรในการทดสอบด้วยวิธี Plaque Assay และ CCID50 Assay

เมื่อนำวิธีทั้ง 2 มาเปรียบเทียบขั้นตอนวัสดุและความสิ้นเปลืองในการวิเคราะห์ พบว่าทั้ง 2 วิธีมีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกัน มีความแตกต่างตรงปริมาณและปริมาตร

การใช้ มีวิธีการทดสอบที่แตกต่างกันทำให้ระยะเวลาของการทดสอบและการอ่านผลแตกต่างกัน ซึ่งวิธี CCID₅₀ assay เป็นการทดสอบที่รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่ายและในเวลาที่เท่ากันสามารถทำการทดสอบได้หลายตัวอย่างกว่าวิธี plaque assay ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบขั้นตอน วัสดุ และความสิ้นเปลืองระหว่างวิธี Plaque Assay และ CCID₅₀ Assay

พารามิเตอร์	Plaque assay	CCID ₅₀ assay
เพลทเพาะเลี้ยงเซลล์	6-หลุม	96-หลุม
ปริมาณเซลล์	2 X 10 ⁵ เซลล์/ml	2 X 10 ⁵ เซลล์/ml
ปริมาตรเซลล์ต่อหลุม	3.0 ml	0.1 ml
อาหารเลี้ยงเซลล์	MEM + 10% FBS	MEM + 2% FBS
การลงเซลล์ก่อนทดสอบ	24 ชั่วโมง	0
ปริมาณไวรัส	0.1 ml/หลุม	0.05 ml/หลุม
จำนวนซ้ำของการทดสอบ	2 หรือ 3 หลุม/ความเจือจาง	8-10 หลุม/ความเจือจาง
ความเจือจางต่อ 1 เพลท	2 - 3 ความเจือจาง	7 - 11 ความเจือจาง
จำนวนเพลทต่อ 1 ตัวอย่าง	3 เพลท	1 เพลท
ระยะเวลาบ่มให้ไวรัสเข้าเซลล์	1 ชั่วโมง	0
Semisolid medium	1% carboxy methyl cellulose ใน MEM + 2% FBS	0

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบขั้นตอน วัสดุ และความเปลี่ยนแปลงระหว่างวิธี Plaque Assay และ CCID₅₀ Assay (ต่อ)

พารามิเตอร์	Plaque assay	CCID ₅₀ assay
การบ่ม	37 °C, 5% CO ₂	37 °C, 5% CO ₂
ระยะเวลาการทดสอบ	6-7 วัน	4-5 วัน
ขั้นตอนการย้อมสี	Fix เซลล์ ด้วย 10% formaldehyde	Fix เซลล์ ด้วย 10% formaldehyde
	ปริมาตร 3.0 ml/หลุม 30 นาที	ปริมาตร 0.1 ml/หลุม 30 นาที
	สี crystal violet	สี crystal violet
	ปริมาตร 1.0 ml/หลุม 30 นาที	ปริมาตร 0.1 ml/หลุม 30 นาที
การอ่านผล	นับจำนวน plaque/well/dilution	นับจำนวน well ที่เกิด CPE ทั้งหมด
ระยะเวลาการอ่านผล	5 นาที/เพลท	1 นาที/เพลท

อภิปรายผล

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าทั้งวิธี plaque assay และ CCID₅₀ assay มีความสม่ำเสมอ มีการกระจายของผลการทดสอบต่ำ ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้อมูลทั้ง 80 ผลการทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน (independent test) จากผู้วิเคราะห์ 3 คน มีค่า %CV 3.48 และ 3.61 ตามลำดับ โดยต่ำกว่าค่าที่กำหนดไว้ที่ 5% แสดงถึงความเที่ยงของการทดสอบซ้ำในคนเดียว และระหว่างคนของทั้ง 2 วิธี จากผลการศึกษาหาปริมาณไวรัส พบว่า plaque assay มีการกระจายตัวของผลการทดสอบใกล้เคียงกับ CCID₅₀ assay แต่มีแนวโน้มการกระจายตัวมากกว่า ทั้งสองวิธีมีค่าต่ำสุดและสูงสุดรวมทั้งค่า mean ที่ใกล้เคียงกัน แต่ค่า GM และค่ามัธยฐานของ CCID₅₀ assay สูงกว่าเล็กน้อย จึงมีแนวโน้มว่าค่า CCID₅₀ สูงกว่า PFU จากผลการเปรียบเทียบค่า GM ของ plaque assay ต่อ CCID₅₀ assay ได้ประมาณ 0.88 แต่ทั้งนี้ในภาพรวมของการเปรียบเทียบทั้งค่า mean และค่า GM

ทั้งสองมีความใกล้เคียงกันมาก เมื่อแปลงหน่วยเป็นลอการิทึม โดยอัตราความสัมพันธ์ค่า log PFU/ml ต่อ log CCID₅₀/ml และค่า log CCID₅₀/ml ต่อ log PFU/ml ใกล้เคียง 1.00 เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบทั้งสองวิธีโดยสถิติ paired-t-test พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน (p>0.05) สามารถกล่าวได้ว่า 1 PFU/ml เท่ากับ 1 CCID₅₀/ml ปัจจุบันวิธี plaque assay เป็นวิธีมาตรฐานและใช้กันโดยกว้างขวางกว่า CCID₅₀ assay มีการศึกษาเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธีนี้ในการหาปริมาณไวรัสหลายชนิด และมีอัตราส่วนความสัมพันธ์ต่างกันไป ในไวรัสแต่ละชนิด โดยบางรายงานพบว่า CCID₅₀ assay ให้ค่าที่สูงกว่า เช่น Smither S.J และคณะ พบว่าในการหาปริมาณ Filovirus ค่าจาก CCID₅₀ assay สูงกว่า plaque assay ประมาณ 10 เท่า¹⁹ หรือ Forcic D. และคณะ พบว่าอัตราส่วนปริมาณไวรัส Mumps ระหว่าง CCID₅₀ และ plaque assay อยู่ระหว่าง 0.66 ถึง 10⁹ ซึ่งหากพิจารณาตามลักษณะผลการเกิด CPE ใน CCID₅₀ assay นั้นเป็นการ

วัดเชิงคุณภาพ หากมีไวรัส 1 อนุภาคเมื่อเกิด CPE จะนับเป็น 1 positive well ส่วน plaque assay เป็นการนับ plaque ของไวรัสแต่ละอนุภาค จึงเป็นการนับเชิงปริมาณโดยตรง และเมื่อจำกัด การเคลื่อนที่โดยการเติม semi-solid medium อาจมีไวรัสถูกจำกัดการเคลื่อนที่ทำให้โอกาสเห็น plaque เพิ่มขึ้นได้ยาก จึงเป็นไปได้ที่ค่า CCID₅₀ จะสูงกว่า

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นข้อบ่งชี้ว่า การหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 โดยวิธี plaque และวิธี CCID₅₀ assay สามารถนำมาใช้ได้ในห้อง ปฏิบัติการ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ห้วงข้อประกอบ ความคุ้มค่าของทั้งสองวิธี เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการตัดสินใจเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมแต่ละห้อง ปฏิบัติการ การทดสอบโดย plaque assay ต้องใช้ เซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณมาก ทำการทดสอบ ได้ช่วงการเจือจางน้อยกว่า อาจต้องใช้เวลาที่ต่อหา ระดับการเจือจางที่เหมาะสมที่ครอบคลุมการเกิด plaque 10-100 PFU/well เพื่อให้การนับจำนวน plaque ที่แม่นยำขึ้น¹³ ใช้จำนวนเพลทมากกว่า ในหนึ่งการทดสอบ และใช้เวลาในการทดสอบ นานกว่า CCID₅₀ assay ดังนั้น CCID₅₀ assay อาจเหมาะสมในกรณีที่ต้องการผลการทดสอบ ที่เร่งด่วน มีปริมาณตัวอย่างจำนวนมาก อีกทั้ง มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่า ทั้งนี้หากทำการทดสอบกับไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์อื่นผลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ระหว่าง 2 วิธีอาจมีค่าแตกต่างไปจากการศึกษานี้ เนื่องด้วยคุณลักษณะเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์

ที่จะมีผลทำให้ระยะเวลาการเจริญเพิ่มจำนวนของ ไวรัสและขนาด plaque ที่แตกต่างกัน

ปัจจุบันการทดสอบเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 มีวิธีที่หลากหลาย มีเทคโนโลยีการวิเคราะห์ปริมาณ เชื้อไวรัสที่จำเพาะ สะดวกและรวดเร็วขึ้น เช่น การทดสอบ plaque assay โดยใช้ไวรัสเทียม (pseudo virion) การทำ microtitration ด้วยการ ย้อม fluorescent การวิเคราะห์ด้วย Quantitative Real time PCR, Sandwich ELISA, mass spectrometry หรือ flow cytometer เป็นต้น ที่สามารถทำการทดสอบในห้องชีวโมเลกุลระดับ 2 ได้²⁶⁻²⁷ แต่ทั้งนี้ยังไม่พบการศึกษาเปรียบเทียบ ผลการทดสอบระหว่างวิธีต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม วิธีที่ทั่วโลกใช้อ้างอิงเป็นมาตรฐานยังคงเป็นวิธี plaque assay โดยไวรัสเชื้อเป็นอยู่ การศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีและเลือกใช้วิธีที่มีความ สิ้นเปลืองต่ำกว่าจะสามารถลดค่าใช้จ่าย ในห้องปฏิบัติการได้

สรุปผล

ผลการทดสอบปริมาณไวรัสระหว่างวิธี Plaque assay และ CCID₅₀ assay มีข้อมูล ไปในทิศทางเดียวกัน และผลจากการวิเคราะห์ ข้อมูลพบว่าทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกัน ของค่าปริมาณไวรัส อีกทั้งมีความแม่นยำที่มีค่า ใกล้เคียงกันที่แสดงโดยค่า %CV จากผลการศึกษา สามารถนำวิธีทั้งสองไปใช้ในการหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 และการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส

SARS-CoV-2 ในผู้ป่วย รวมถึงเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันโรค COVID-19 ต่อไปนี้ การทดสอบโดย CCID₅₀ assay มีความเสี่ยงต่อทรัพยากรน้อยกว่าทั้งอาหาร เพาะเลี้ยงเซลล์ จำนวนเพลท และระยะเวลา การทดสอบ จึงเป็นวิธีที่ควรนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ

ข้อเสนอแนะ

ตลอดระยะเวลาการระบาดตั้งแต่ปลายปี 2562 จนถึงปัจจุบัน ไวรัส SARS-CoV-2 เปลี่ยนแปลงสายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ควรมีการศึกษา เปรียบเทียบการหาปริมาณไวรัสทั้งสองวิธีเพิ่มเติม ในแต่ละสายพันธุ์ รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ ของการทดสอบระดับภูมิคุ้มกันโดยวิธี plaque reduction neutralization test และ micro neutralization test ต่อไปเพื่อเป็นวิธีทางเลือก และสามารถลดต้นทุนค่าใช้จ่ายได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ ไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ hCoV-19/Thailand/ 47/2020 และสถาบันวัคซีน ที่สนับสนุนทุนวิจัย ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า

เอกสารอ้างอิง

1. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, Ippolito G, Mchugh TD,

Memish ZA, Drosten C, Zumla A, Petersen E. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health-The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis* 2020;91:264-66.

2. Wong ACP, Li X, Lau SKP, Woo PCY. Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. *Viruses* 2019;11(2):174.

3. Sexton NR, Smith EC, Blanc H, Vignuzzi M, Peersen OB, Denison MR. Homology-Based Identification of a Mutation in the Coronavirus RNA-Dependent RNA Polymerase That Confers Resistance to Multiple Mutagens. *J Virol* 2016;90(16): 7415-7428.

4. World Health Organization. WHO announces COVID-19 outbreak a pandemic [Internet].

WHO; 2020 [cited 2020 Jun 12]. 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>

5. Steenhuisen, Julie; Kelland, Kate. "With Wuhan virus genetic code in hand, scientists begin work on a vaccine". Thomson 25 January 2020). [cited 12 June 20]; [screens]. Available from:

- URL: Available from: <https://www.reuters.com/article/us-china-health-vaccines/with-wuhan-virus-genetic-code-in-hand-scientists-begin-work-on-a-vaccine-idUSKBN1ZN2J8>
6. Fukuda A, Sengün F, Sarpay HE, Konobe T, Saito S, Umino Y, Kohama T. Parameters for plaque formation in the potency assay of Japanese measles vaccines. *J Virol Methods* 1996;61(1-2):1-6.
 7. World Health Organization. WHO. Requirements for varicella vaccine (live). Technical Report Series No. 848. 1994; Annex 1.
 8. 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.
 9. Forcic D, Kosutić-Gulija T, Santak M, Jug R, Ivancic-Jelecki J, Markusic M, Mazuran R. Comparisons of mumps virus potency estimates obtained by 50% cell culture infective dose assay and plaque assay. *Vaccine* 2010;17;28(7):1887-92.
 10. Covid 19 Vaccine tracker. Approved Vaccines; [update 2022 Oct 28; cite 2022 Oct 30]. Available from: <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/approved/#vaccine-list>
 11. กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม. อว. เผยความก้าวหน้าของการวิจัยวัคซีนโควิด 19 โดยนักวิจัยไทยความคาดหวังของประเทศ [อินเทอร์เน็ต]. 2564 [วันที่ปรับปรุง 15 เม.ย. 2564; เข้าถึงเมื่อ 30 ต.ค. 2565]. เข้าถึงได้จาก: https://www.mhesi.go.th/index.php/en/content_page/item/4228-168641.html
 12. Recommendation for Japanese encephalitis vaccine (inactivated) for human use (revised 2007). WHO Expert Committee on Biological Standardization. 2007; Annex 1
 13. Guidelines for the production and control of Japanese Encephalitis vaccine (live) for human use. Technical Report Series No. 910. 2002; Annex 3.
 14. Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccines (live). In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series No. 840. 1994; 102-201.
 15. Requirements for poliomyelitis vaccine (Oral). In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series No. 800. 1990.
 16. Cooper PD. The plaque assay of animal viruses. *Adv Virus Res* 1961;8:319-78.

17. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(6):773-779.
18. Shurtleff AC, Bloomfield HA, Mort S, Orr SA, Audet B, Whitaker T, et al. Validation of the Filovirus Plaque Assay for Use in Preclinical Studies [Internet]. 2016 [cited 12 Jun 2020]; [screens]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848606/>
19. Smither SJ, Lear-Rooney C, Biggins J, Pettitt J, Lever MS, Olinger GG Jr. Comparison of the plaque assay and 50% tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity. *J Virol Methods*. 2013 Nov;193(2):565-71.
20. Freshey RI. Culture of animal cells: A Manual of Basic Technology (4th ed), Wiley-Liss, Inc 1994;290-96.
21. Low IE. Mycoplasma in tissue culture: Overview of detection methods. *Health Lab Sci* 1976; 13(2):129-36.
22. Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res* 1977;104(2): 255-62.
23. Shurtleff AC, Biggins JE, Keeney AE, Zumbrun EE, Bloomfield HA, Kuehne A, et al. Standardization of the Filovirus Plaque Assay for Use in Preclinical Studies. *Viruses* 6;4(12):3511-30.
24. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol* 2016;5(2):85-6.
25. Niroumand H, Zain MFM, Jamil M. Statistical methods for comparison of data sets of construction methods and building evaluation. *Procedia Soc Behav Sci* 2013;89:218-21.
26. Onen EA, Sonmez k, Yildirim F, Demirci EK, Gurel A. Development, analysis, and preclinical evaluation of inactivated vaccine candidate for prevention of Covid-19 disease. *All Life* 2022; 15(1): 771-93.
27. Saadi J, Oueslati S, Bellanger L, Gallais F, Dortet L, Roque – Afonso AM, et al. Quantitative Assessment of SARS-CoV-2 Virus in Nasopharyngeal Swabs Stored in Transport Medium by a Straightforward LC-MS/MS Assay Targeting Nucleocapsid, Membrane, and Spike Proteins. *J Proteome Res*. 2021;20(2):1434–443.