

**DEVELOPMENT OF DENGUE VIRUS PLAQUE COUNT  
READER APPARATUS**



**LERCHAI MOSIKARAT**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(BIOMEDICAL INSTRUMENTATION)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2014**

Copyright by Mahidol University

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

**DEVELOPMENT OF DENGUE VIRUS PLAQUE COUNT READER APPARATUS**

LERCHAI MOSIKARAT 5237484 MBBM/M

M.Sc. (BIOMEDICAL INSTRUMENTATION)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: SUTEE YOKSAN, M.D., Ph.D., SOMBAT THANAWAN Ph.D., KULNASAN SAIKHUN, Ph.D.

**ABSTRACT**

Dengue hemorrhagic fever, mosquito-borne disease, is caused by one of four serotypes of dengue virus. There is still no specific medication, so vaccine is urgently needed for global public health to prevent infection. However, effective dengue vaccines that provide long-term protection against most strains are still being under development.

One of the most important procedures used in dengue vaccine development is to determine the virus titers from the number of plaques in multi-well plates through the process of manual counting. Although this traditional counting produces reliable results of virus plaque count, it is time-consuming and yields subjective interpretation.

The study aimed to develop an automated viral plaque counting process of dengue virus, all four serotypes, using machine vision. This inexpensive apparatus called DVPCR is very less time-consuming with high accuracy in counting. Initially, the image of plaque inside multi-wells of a sample plate was captured by high-resolution camera and prepared with digital image processing software for segmenting spots which were plaques. The summation of classified plaques was calculated and then shown on monitor. We found that there were two simple techniques to improve accuracy of the apparatus. Firstly, adjusting some parameters in software specifically to each serotype was required. Secondly, an additional LED-beside light frame was horizontally placed around the sample plate for eliminating all undesired visual artifact.

This research, developed in the scope of FREE (Fast, Reliable, Easy and Economy) concept, revealed similar results of virus plaque count from 160 samples which were counted by DVPCR, as compared with manual counting that were 95 percent accurate. The average processing time for reading out a 24-well plate of apparatus was 15 seconds.

**KEY WORDS:** DENGUE VIRUS / VIRUS PLAQUE COUNT / MACHINE VISION /  
ILLUMINATION

การพัฒนาเครื่องนับพลาไคของไวรัสเด็งกี

DEVELOPMENT OF DENGUE VIRUS PLAQUE COUNT READER APPARATUS

เลขชาย โมสิกรัตน์ 5237484 MBBM/M

วท.ม. (อุปกรณ์ชีวการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: สุธี ยกสำน, พ.บ., ปร.ด., สมบัติ ธนะวันต์, Ph.D., กุลณสรณ์ สายขุน  
ปร.ด.

บทคัดย่อ

โรคไข้เลือดออกเกิดจากเชื้อไวรัสเด็งกีซึ่งมี 4 ซีโรทัยป์ โดยมียุงเป็นพาหะ เนื่องจากยังไม่มียา  
รักษาโรคนี้โดยเฉพาะทั่วโลกจึงต้องการวัคซีนอย่างเร่งด่วนเพื่อป้องกันโรค อย่างไรก็ตามวัคซีนโรคไข้  
เลือดออกที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องได้ยาวนานครอบคลุมมากสายพันธุ์กำลังอยู่ในระหว่างการพัฒนา

กระบวนการหนึ่งที่สำคัญในการพัฒนาวัคซีนคือ การคำนวณหาค่าความเข้มข้นของไวรัส  
ในเพลทเพาะเชื้อจากจำนวนพลาไคที่ได้จากการนับซึ่งปกติกระทำด้วยคน ถึงแม้ว่าผลการนับจากวิธีดั้งเดิม  
นี้น่าเชื่อถือแต่สิ้นเปลืองเวลามาก และการตีความยังขึ้นกับประสบการณ์ของแต่ละบุคคลอีกด้วย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเครื่องนับพลาไคของไวรัสเด็งกีได้ทั้ง 4 ซีโรทัยป์แบบ  
อัตโนมัติด้วย machine vision เครื่องอ่านราคาไม่แพงนี้ให้ชื่อว่า DVPCR ใช้เวลาในการอ่านน้อยมากมีความ  
แม่นยำสูงในการนับ ระบบเริ่มจากการถ่ายภาพพลาไคในหลุมของถาดเพาะเชื้อด้วยกล้องที่มีความละเอียด  
สูง ผ่านการประมวลผลภาพแบบดิจิทัล เพื่อแยกแยะว่าเป็นพลาไค พลาไคจะถูกนับรวมกันเพื่อแสดงเป็น  
จำนวนต่อหลุมและแสดงผลบนจอมอนิเตอร์ ผู้วิจัยพบว่ามี 2 เทคนิคที่ไม่ยุ่งยากแต่สามารถปรับปรุงความ  
แม่นยำของเครื่องให้ดีขึ้น ประการแรกค่าพารามิเตอร์บางอย่างในซอฟต์แวร์ต้องปรับแต่งให้จำเพาะแต่ละ  
ซีโรทัยป์ ประการถัดมาต้องเพิ่มชุดไฟส่องสว่างชนิดแอลอีดีวางในระนาบเดียวกันโดยรอบถาดตัวอย่าง  
เพื่อจัดการเกิดภาพวัตถุเทียม

งานวิจัยชิ้นนี้พัฒนาตามแนวคิด FREE (Fast, Reliable, Easy and Economy) ได้แสดงถึงผล  
การเปรียบเทียบการนับพลาไคของไวรัสเด็งกีด้วย DVPCR ที่คล้ายคลึงกันกับการนับด้วยคนจาก 160 ตัวอย่าง  
ว่ามีความแม่นยำ 95% เครื่องอ่านใช้เวลาในการนับและประมวลผลเฉลี่ย 15 วินาทีต่อ 1 ถาดเพาะเชื้อแบบ  
24 หลุม