#### เอกสารหมายเลข 1

**แบบประเมินคุณสมบัติของบุคคล**

**ชื่อ นางสาวฐิติกานต์ จิรกิตติสุนทร**

**ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ ตำแหน่งเลขที่ 803**

**กลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ**

**กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**

**ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง**

**ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ ตำแหน่งเลขที่ 803**

**กลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ**

**กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**

##### **เอกสารหมายเลข 3**

# **ผลงานที่จะขอรับการประเมินเพื่อเลื่อนขึ้นแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งที่สูงขึ้น**

**เรื่องที่ 1**

**1.ชื่อผลงาน** การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคโลหิตจางติดต่อในไก่ จากเนื้อเยื่อที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังด้วยพาราฟินโดยเทคนิค in situ hybridization (Development of in situ hybridization for Diagnosis of Chicken Infectious Anemia in Formalin-fixed paraffin-embedded Tissues)

**ปีที่ดำเนินการ** ตุลาคม 2559 - มิถุนายน 2562

**2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการศึกษา**

 โรคโลหิตจางติดต่อในไก่ (Chicken Infectious Anemia; CIA) เกิดจากเชื้อไวรัส Chicken anemia virus (CAV) ซึ่งอยู่ในตระกูล Circoviridae ไก่ติดเชื้อได้ทุกอายุ โดยเฉพาะลูกไก่จะแสดงอาการโลหิตจางชนิด aplastic anemia ทำให้พบจุดเลือดออกที่ชั้นใต้ผิวหนังและกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อน้ำเหลืองทั่วร่างกายฝ่อลีบและกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนตามมา (secondary infection) อาการมักพบในลูกไก่อายุประมาณ 2-3 สัปดาห์ (Fenner et al., 1993; Taniguchi et al., 1982; Yuasa et al., 1979) ส่วนในพ่อ-แม่พันธุ์การติดเชื้อเป็นแบบไม่พบอาการป่วยชัดเจน (subclinical infection) แต่เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดสู่ลูกได้ (vertical transmission) และยังทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ (Mcnulty et al., 1991) เนื่องจากติดเชื้อแทรกซ้อน เช่น Marek’s disease และ infectious bronchitis ได้ง่าย อัตราการตายในฝูงพ่อ-แม่พันธุ์สูงขึ้น อัตราการแลกเนื้อต่ำ อัตราการคัดทิ้งสูงขึ้น เกิดการปนเปื้อนของไข่ฟัก SPF ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

 ปัจจุบันการวินิจฉัยโรค CIA สามารถทำได้หลายวิธีเช่น การใช้เทคนิคทาง PCR แต่พบว่าการใช้เทคนิคดังกล่าวอาจเกิด cross contaminationได้ การตรวจทางซีรัมวิทยา เช่น indirect ELISA และ/หรือ Competitive ELISA ซึ่งในฟาร์มพ่อ-แม่พันธุ์ ใช้เทคนิคดังกล่าวในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันในปัจจุบัน แต่ข้อจำกัดของการใช้การตรวจทางซีรัมวิทยาคือ ไม่สามารถแยกสัตว์ที่ติดเชื้อ (infection) ออกจากสัตว์ที่เคยสัมผัสเชื้อ (exposure)ได้ (Owoade et al., 2004) การใช้เทคนิคทาง Immunohistochemistry (IHC) โดยวิธีการดังกล่าวสามารถนำไปใช้ได้ในทุกๆห้องปฏิบัติการที่มีการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ทำให้เป็นที่แพร่หลายในการวินิจฉัยในปัจจุบันนี้ แต่เทคนิคนี้ต้องใช้ความชำนาญ และเทคนิคในการเปิด epitopes ของ antigen และ การแช่เนื้อเยื่อในน้ำยาฟอร์มาลินที่นานเกินไป อาจทำให้ antigen retrieval ทำได้ยากขึ้น ส่งผลให้การทดสอบเกิด false positive ขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม การนำเทคนิค *in situ* hybridization (ISH) มาใช้เพื่อการวินิจฉัยโรค CIA ในฟาร์มพ่อ-แม่พันธุ์เป็นการแก้ไขข้อจำกัดของการตรวจทางซีรัมวิทยา แก้ปัญหา cross contamination จากเทคนิค PCR ไม่ต้องใช้เทคนิคในการเปิด epitopes สามารถตรวจได้จำเพาะกับโรค และสามารถตรวจหาเชื้อ CAV ในฟาร์มพ่อ-แม่พันธุ์ โดยใช้ระยะเวลาอันสั้นกว่าเมื่อเปรียบกับเทคนิคทาง IHC (Allan et al., 1993)

**3.วัตถุประสงค์ในการศึกษา**

1. พัฒนาเทคนิค ISH เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรค CIAจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ

 2. เพื่อทราบอวัยวะเป้าหมายที่สามารถตรวจพบเชื้อ ในกรณีที่สงสัยว่าไก่มีการติดโรค CIA

1. **ความรู้ทางวิชาการ หรือแนวคิดหรือหลักทฤษฎีที่ใช้ในการดำเนินการ**

CAV เป็นไวรัสชนิด DNA มีขนาด 25-26.5 nm รูปร่าง icosahedral เป็น ssDNA circular virus ซึ่งมี genome ประมาณ 2300 bases ประกอบด้วย 3 open reading frames ได้แก่ VP1 gene ที่ encode โปรตีน 50 kilodaltons (kDa) ซึ่งเป็น capsid protein ของไวรัส ขณะที่ VP2 gene encode โปรตีนที่มี phosphatase activity และ กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์ ทำให้เกิด neutralizing antibody ส่วน VP3 gene encode โปรตีนสำหรับ replication ทำให้เกิด apoptosis ของเซลล์ที่ Thymus และ Bursa of Fabriciuos จึงมีชื่อเรียกว่า apoptin (Myrna et al., 2004) ซึ่ง VP3 โปรตีนสามารถ detect ได้ภายใน 6 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ ในขณะที่ VP2 โปรตีน สามารถตรวจพบได้ที่ 12 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ แต่ VP1 จะสามารถตรวจพบได้ที่ 30 ชั่วโมง หลังติดเชื้อ โดยเซลล์ที่ไวรัสเข้าไป infect คือ CD4+/ CD8+ ทำให้สัตว์เกิดการกดภูมิคุ้มกันขึ้น ในกรณีแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะไม่แสดงอาการ แต่เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดไปสู่ไข่ฟักได้ เมื่อระดับภูมิคุ้มกันจากแม่สู่ลูก ของลูกไก่ลดลง ที่ 2-3 สัปดาห์ ทำให้ลูกไก่แสดงอาการป่วย เช่น aplastic anemia, gangrenous dermatitis, pale bone marrow, atrophy of thymus (Gelderblom et al., 1989) การศึกษาโดย Allan et al. (1993) พบว่า การใช้ double-stranded DNA probe ซึ่งเตรียมโดยวิธี PCR สามารถใช้เทคนิค ISH ในการตรวจเชื้อไวรัสชนิดดังกล่าวใน formalin-fixed, paraffin-embedded section ได้ นอกจากนี้ Novak และ Ragland (1997) ได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยการนำ double-stranded DNA probe ซึ่งเตรียมโดยวิธี PCR มาตรวจหาเชื้อ CAVใช้เทคนิค ISH บนตัวอย่างเลือดป้ายสไลด์ของไก่ พบว่าสามารถตรวจได้อย่างถูกต้อง และทราบผลรวดเร็วกว่าการตรวจด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา

จากคุณสมบัติของ CAV และรายงานดังกล่าวข้างต้น ทำให้คณะผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะศึกษาการตรวจหา gene VP1, VP2 และ VP3 บนตัวอย่างเลือดป้ายสไลด์ในไก่พ่อแม่พันธุ์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบในการคัดเลือก probe ที่เหมาะสมในการวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค ISH และเป็นการเพิ่มศักยภาพการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการให้รวดเร็ว แม่นยำ สามารถลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจจากการสูญเสียลูกไก่ได้

1. **วิธีการหรือขั้นตอนการศึกษา**
2. จัดเตรียมวัสดุวิทยาศาสตร์ อุปกรณ์ และสารเคมี
3. เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อและเลือดของไก่พ่อ-แม่พันธุ์จากฟาร์มแห่งหนึ่งในเขตภาคกลางโดยเจาะบริเวณเส้นเลือดที่ปีก ปริมาณ 0.3 มล.ใส่ในขวดที่มีสารกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) จำนวน 350 ตัวอย่าง
4. ตรวจหาค่า Pack cell volume (PCV) และทำเลือดป้ายสไลด์ fixed ด้วย 4% paraformaldehyde
5. ทดสอบทาง bioinformatics เช่น in silico search, ตรวจสอบ homologous ของ gene ของ CAV กับ gene อื่นๆใน genebank database, ออกแบบ probes, primers ของทั้ง 3 gene และ whole genome
6. นำตัวอย่างเลือดไปสกัด DNA
7. สังเคราะห์ probes จาก PCR และ สกัด probes จาก agarose gel
8. ทดสอบความใช้ได้ของ probes โดยใช้ southern blot hybridization
9. ทดสอบหาปฏิกิริยาและขั้นตอนที่เหมาะสมในการทำ in situ hybridization จากตัวอย่างเนื้อเยื่อและเลือดป้ายสไลด์
10. ทดสอบ sensitivity และ specificity ของ in situ hybridization กับ PCR (Validation)
11. ใช้ probes และขั้นตอนที่ผ่านการ validation แล้ว สำรวจโรค CIA ในฟาร์มในเขตภาคกลางของ ประเทศ
12. จัดการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อถ่ายทอด ขั้นตอน วิธีการ เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค CIA
13. วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล

**6.ผู้ร่วมดำเนินการ**

1. นางสาวฐิติกานต์ จิรกิตติสุนทร สัดส่วนผลงาน 60%
2. นางนวพร วัดเดลล์ สัดส่วนผลงาน 30%
3. นายเจษฎา รัตโณภาส สัดส่วนผลงาน 5%
4. นางสนทนา มิมะพันธุ์ สัดส่วนผลงาน 5%

**7.ระบุรายละเอียดเฉพาะงานในส่วนที่ผู้ขอรับการประเมินเป็นผู้ปฏิบัติ**

1. วางแผน 5 %
2. เก็บรวบรวมข้อมูล 10 %
3. ทดลอง 30 %
4. วิเคราะห์ข้อมูล 10 %
5. สรุปและรายงาน 5 %

**8.ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. ได้วิธีการตรวจวินิจฉัยโรค CIA ที่ได้ผลรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ
2. ทราบสภาวะการติดเชื้อ CAV ในฟาร์มพ่อ-แม่พันธุ์
3. ลดการสูญเสียลูกไก่จากการติดเชื้อผ่านไข่
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาชุดทดสอบ iELISA หรือ immunochromatography test (ICT) และ พัฒนา subunit vaccine ในอนาคตซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการควบคุม และกำจัดโรค CIA

**9.ระบุผลสำเร็จของงาน หรือผลการศึกษา**

-

**10. ความยุ่งยากในการดำเนินการ/ปัญหา/อุปสรรค**

ตัวอย่างเลือดที่เก็บมา ส่วนมากเป็นตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อ CIA จึงจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อเนื้อเยื่อที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังด้วยพาราฟินแทนในการวิจัย

**11. การนำไปใช้ประโยชน์ หรือคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์**

สามารถตรวจวินิจฉัยโรค CIA ที่ได้ผลรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และทราบสภาวะการติดเชื้อ CAV ในฟาร์มพ่อ-แม่พันธุ์ นำไปสู่การลดการสูญเสียลูกไก่จากการติดเชื้อผ่านไข่

โดยผู้ใช้ประโยชน์จากงานวิจัยคือ

1. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตว์แพทย์ทั้ง 7 แห่ง
2. สำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์
3. นายสัตวแพทย์ในท้องที่
4. เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่
5. หน่วยงานอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

 ขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

 ลงชื่อ ……………………………………………………

 (นางสาวฐิติกานต์ จิรกิตติสุนทร)

 ผู้เสนอผลงาน

 …………./……………../……………..

**ขอรับรองว่าสัดส่วนหรือลักษณะงานในการดำเนินการของผู้เสนอข้างต้นถูกต้องตรงกับความจริง**

**ทุกประการ**

ลงชื่อ…………………………………………………… ลงชื่อ……………………………………………………

 (นางนางนวพร วัดเดลล์) (นายเจษฎา รัตโณภาส)

 ตำแหน่งนายสัตวแพทย์ชำนาญการ ตำแหน่งนายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ

 ผู้ร่วมดำเนินการ ผู้ร่วมดำเนินการ

 …….…../……………./………….. …….…../……………./…………..

ลงชื่อ……………………………………………………

 (นางสนทนา มิมะพันธุ์)

ตำแหน่งผู้เชี่ยวชาญด้านชีวเคมีและพิษวิทยา

 ผู้ร่วมดำเนินการ

 …….…../……………./…………..

## ได้ตรวจสอบแล้วขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นถูกต้องตรงกับความเป็นจริงทุกประการ

 ลงชื่อ…………………….…………………….. ลงชื่อ…………………..…………………………..

 (นายเจษฎา รัตโณภาส) ( )

 หัวหน้ากลุ่มพยาธิวิทยา

 …………./……………/………….. …………/……………../………...

 **เอกสารหมายเลข 3**

# **ผลงานที่จะขอรับการประเมินเพื่อเลื่อนขึ้นแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งที่สูงขึ้น**

**เรื่องที่ 2**

**1.ชื่อผลงาน** การพัฒนาวิธีอิมมูนโนฮิสโตเค็มมิสตรีในการวินิจฉัยโรคไข้คิวจากการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีชนิดที่จำเพาะกับ epitope หนึ่งตำแหน่งจากเปปไทด์สังเคราะห์ (Development of Q Fever Diagnosis by Immunohistochemistry Using Monospecific Polyclonal Antibody Derived from a New Synthetic Peptide)

**ปีที่ดำเนินการ** ตุลาคม 2559 - มิถุนายน 2562

**2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการศึกษา**

 *Coxiella burnetii* เป็น obligate intracellular pathogen และเป็นสาเหตุของโรคไข้คิว (Q fever) ในคน มีรายงานการเกิดโรคไข้คิวครั้งแรกในไทยเมื่อปี พ ศ 2509 ที่จังหวัด สมุทรสาคร และรายงานล่าสุด ในเดือนมกราคม 2554 มีผู้ป่วยติดเชื้อดังกล่าว ก่อให้เกิดเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบจำนวน 4 ราย (คู่มือการป้องกันควบคุมโรคติดต่ออุบัติใหม่ สำหรับบุคลากรทางการแพทย์และสาธารณสุข, 2554) นอกจากนั้นมีรายงานว่าอุบัติการณ์ของโรคชนิดนี้ 2.3-6.1 เปอร์เซ็นต์ ใน แพะ แกะ โค และกระบือ (คู่มือการป้องกันควบคุมโรคติดต่ออุบัติใหม่ สำหรับบุคลากรทางการแพทย์และสาธารณสุข, 2554) จากข้อมูลและแหล่งที่มาดังกล่าวและอีกหลายรายงานที่บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อติดต่อระหว่างสัตว์และคน (Angelakis and Raoult, 2010) โดยมีสัตว์ดังกล่าวข้างต้นเป็นแหล่งรังโรค (reservoir) ทำให้ปัจจุบันนี้มีการพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยโรคที่หลากหลาย อาทิ การใช้เทคนิคทางซีรัมวิทยา ยังคงใช้ตัวเชื้อเพื่อการ coat plate ในการตรวจทางซีรัมวิทยา (iELISA) โดยใช้ *Coxiella burnetii* strain Nine Mile ซึ่งก่อให้เกิดการให้ภูมิคุ้มกันข้ามกัน (cross reaction) กับเชื้อก่อโรค ชนิดอื่นๆได้ง่าย เช่น ทุกวันนี้มีการใช้ ELISACoxLS®, LSI, Lissieu, France เป็น ชุดทดสอบ (commercial test kit) นอกจากนั้นยังมีวิธีการตรวจโดย Immunofluorescence technique ซึ่งต้องใช้แอนติซีรัมซึ่งเตรียมจากตัวเชื้อและฉีดเข้าสัตว์ทดลอง ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดผลบวกลวง และการแปลผลยากลำบาก (Muskens et al., 2011) สำหรับ เทคนิค real time PCR มีความถูกต้อง รวดเร็วแต่ที่มีความจำเพาะสูง จนบางครั้งอาจทำให้ขาดข้อมูลบางส่วนของปัญหาการแท้งภายในฟาร์ม เพราะการแท้งลูกอาจจะไม่ได้เกิดจาก C. *burnetii* เพียงสาเหตุเดียว (Muskens et al., 2011) นอกจากนั้นในหลายๆกรณีพบว่าตัวอย่างที่ส่งมาเพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติถูกแช่ในน้ำยาฟอร์มาลีนซึ่งไม่สามารถตรวจ PCR ได้

 การใช้ *in situ* hybridization (Yanaihara et al.) เพื่อการวินิจฉัยโรค Q fever เป็นอีกเทคนิคการตรวจโรคอีกวิธีที่สามารถตรวจได้จากตัวอย่างแช่ในฟอร์มาลีน (Svendsen et al., 2009) โดยการใช้ hybridization probe ที่จำเพาะกับ 16S ribosomal RNA ของ *C. burnetii* (Jensen et al., 2007) ซึ่งการจะใช้วิธีการดังกล่าวเพื่อการวินิจฉัยแบบ routine diagnosis สามารถทำได้ แต่ค่าใช้จ่ายที่สูง บวกกับความชำนาญเฉพาะด้าน ไม่น่าจะเหมาะกับสัตว์ที่เลี้ยงเป็นฝูงที่มีจำนวนมาก อย่างไรก็ตามปัจจุบันการพัฒนาเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ที่มีความรุดหน้าอย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถทราบลำดับสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อก่อโรค(Thompson and Suhan, 1996) ทำให้สามารถหา outer membrane protein ซึ่งนำไปใช้กระตุ้นให้สัตว์ทดลองสำหรับผลิต antiserum ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อและใช้ในการตรวจโรคทางซีรัมวิทยาได้ (Redd and Thompson, 1995) อีกทั้งแอนติเจน

 (antigen) ดังกล่าวสามารถใช้เพื่อการวินิจฉัยได้ทั้ง phase 1 และ 2 ของตัวเชื้อ (Hendrix et al., 1991) โดยทางซีรัมวิทยา เพราะการที่จะเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจะต้องทำในระบบความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสูง (biosafty level 3) เท่านั้น (Jensen et al., 2007) ด้วยเหตุผลดังกล่าว ทำให้ยากต่อการจัดการ และก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อผู้ปฏิบัติงานดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยฉบับนี้เพื่อต้องการพัฒนาเทคนิค immunohistochemistry (IHC) มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค Q fever จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ formalin fixed paraffin embedding blocks โดยใช้ primary antibody ที่ถูกผลิตจากโปรตีนสังเคราะห์ (synthetic peptide) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวสามารถนำไปสู่การการพัฒนาชุดทดสอบ iELISA เพื่อการวินิจฉัยโรคในสัตว์และการพัฒนาวัคซีนสำหรับโรค Q feverในสัตว์ต่อไป

**3.วัตถุประสงค์ในการศึกษา**

เพื่อพัฒนาเทคนิค IHC เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรค Q fever ในสัตว์เคี้ยวเอื้องจากตัวอย่างรกใน formalin-fixed paraffin embedding tissues

**4. ความรู้ทางวิชาการ หรือแนวคิดหรือหลักทฤษฎีที่ใช้ในการดำเนินการ**

Q fever เกิดจาก *Coxiella burnetii* เป็น obligate intracellular แบคทีเรีย ในวงศ์ Legionellales ชั้น Gammaproteobacteria สัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเฉพาะ วัว แพะ แกะ เป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของเชื้อดังกล่าว และพบว่าสัตว์ที่ติดเชื้อจะขับ pathogen ทาง รก สิ่งคัดหลั่งจากทางระบบสืบพันธุ์ อุจจาระ และ นม (Jones et al., 2010) แม้ว่าสัตว์ที่ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการ (asymptomatic) แต่สัตว์ที่ติดเชื้อจะแท้งลูกในระยะท้ายของการตั้งท้อง (Muskens et al., 2011) ตายคลอด ลูกเกิดมาแล้วอ่อนแอ (Hansen et al., 2011) แม้ว่าสามารถพบเชื้อได้ที่รกแต่เชื้อทำให้เกิดพยาธิสภาพเล็กน้อยที่ cotyledon เท่านั้นและแทบจะไม่พบเชลล์ อักเสบเกิดขึ้นที่ อวัยวะดังกล่าว (Hansen et al., 2011) ทำให้ยากต่อการตรวจจากการใช้จุลพยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่า ทำไมสัตว์ที่ติดเชื้อถึงมักจะไม่แสดงอาการ ซึ่งทำให้สัตว์ที่ติดเชื้อดังกล่าวสามารถแพร่เชื้อไปยังสัตว์ตัวอื่น รวมทั้งคนสามารถติดเชื้อดังกล่าวได้ด้วยเช่นกัน ทำให้เกิดอาการ ปอดบวม ตับอักเสบ ลักษณะอาการที่แสดงออกคล้ายคนเป็นหวัด (influenza-like symptom) ปวดหัว (Arricau Bouvery et al., 2003) ทำให้ในระยะหลายๆปีที่ผ่านมามีความพยายามเพื่อหาวิธีการเพื่อวินิจจฉัยโรคดังกล่าวอย่างมาก และจากการศึกษาทางด้านโปรตีนวิทยาพบว่า โปรตีนที่ถูกแสดงออกดังต่อไปนี้ เช่น hsp60, Com-1, RecA, EF-TU, OmpA และ F-tsZ สามารถกระตุ้นให้ร่างกายของหนูทดลองสร้าง antibody ตอบสนองได้ (Kowalczewska et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าเมมเบรนโปรตีนขนาด 27-kDa สามารถให้ผลบวกจากการทดลองโดย western blotting เทคนิค ซึ่งบ่งชี้ว่า โปรตีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ (Hendrix et al., 1991) และจากการทดลองของ Sekeyova et al. (2009) เพื่อที่จะหา diagnostic antigen ของเชื้อ *Coxiella burnetii* พบว่า Com1 ให้ผลบวก (reaction) กับ ซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อดังกล่าว ทำให้ทราบว่า โปรตีนดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น strong antigen ได้ และอาจนำมาซึ่งการวินิจฉัยโรคโดยเทคนิค iELISA และอาจก่อให้เกิดการการพัฒนาวัคซีนตามมา ซึ่งธรรมชาติของการเกิดโรคในสัตว์เคี้ยวเอื้อง จะตรงกับการเกิดโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบในคน เพราะอยู่ในระยะเรื้อรัง นอกจากนี้การทดลองของ (Ha et al., 2005) พบว่าการใช้โปรตีนสังเคราะห์เพื่อผลิต primary antibody เพื่อวินิจฉัยโรค postweaning multisystemic wasting syndrome ในสุกรโดยใช้ในเทคนิค IHC นั้นให้ผลที่ดีสามารถทดแทน native protein ได้ และ (Swinkels et al., 2013) ใช้ โปรตีนสังเคราะห์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไก่ จาก M2 protein ซึ่งปัจจุบันการใช้ โปรตีนสังเคราะห์เพื่อผลิต แอนติบอดี้มีการใช้มาก เช่น ในกรณีของการผลิต primary antibody ของ prion protein เพื่อใช้เป็นการค้า (Meloen et al., 1997) เพื่อเป็นการลดอุบัติการณ์ของโรค Q fever ทั้งในคนและในสัตว์ จึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาการวินิจฉัยโรคชนิดนี้และในการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวผู้ทำการทดลองจะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยเช่นกัน ดังนั้นการใช้ โปรตีนสังเคราะห์จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยในงานทางด้านพยาธิวิทยาสาขา immunohistochemistry

**5. วิธีการหรือขั้นตอนการศึกษา**

1. เตรียมโปรตีนสังเคราะห์ โดยสายนิวคลีโอไทด์ที่ถูกแปลงรหัสและถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ทำการทดสอบแล้วจากห้องปฏิบัติการ (characterize) และมีใน Genebank นำมาหา antigenicity โดยโปรแกรมทาง bioinformatic
2. ผลิตแอนติซีรัมจากกระต่ายและหาความจำเพาะของ primary antibody ดังกล่าว จาก immunoblotting technique
3. ทดสอบความใช้ได้ของวิธี IHC เปรียบเทียบกับ ISH
4. ทดสอบวิธี IHC กับตัวอย่างรกของสัตว์ จำนวน 250 ตัวอย่าง จากทั่วประเทศที่นำมาตรวจโรคในโครงการ สำรวจโรค Q fever

**6.ผู้ร่วมดำเนินการ**

1. นางสาวฐิติกานต์ จิรกิตติสุนทร สัดส่วนผลงาน 60%
2. นางนวพร วัดเดลล์ สัดส่วนผลงาน 30%
3. นางสาวภัทริน โอภาสชัยทัตต์ สัดส่วนผลงาน 5%
4. นายเจษฎา รัตโณภาส สัดส่วนผลงาน 5%

**7.ระบุรายละเอียดเฉพาะงานในส่วนที่ผู้ขอรับการประเมินเป็นผู้ปฏิบัติ**

1. วางแผน 10 %
2. เก็บรวบรวมข้อมูล 10 %
3. ทดลอง 30 %
4. วิเคราะห์ข้อมูล 5 %
5. สรุปและรายงาน 5 %

**8.ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. สามารนำลำดับของกรดอะมิโน ที่ค้นพบจดสิทธิบัตรได้
2. ผลิต primary antibody เพื่อการวินิจฉัยโรค Q fever ทั้งในคนและสัตว์
3. สามารถพัฒนาเทคนิค IHC เพื่อการวินิจฉัยโรคในสัตว์เคี้ยวเอื้อง
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาชุดทดสอบ iELISA เพื่อการวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา
5. สามารถพัฒนาวัคซีนของโรค Q fever
6. ส่งเสริมการกำจัดโรค zoonosis

**9. ระบุผลสำเร็จของงาน หรือผลการศึกษา -**

**10. ความยุ่งยากในการดำเนินการ/ปัญหา/อุปสรรค**

 แอนติบอดีจับกับแอนติเจนเพียง 1 ตำแหน่ง ทำให้มีความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดผลลบ จึงต้องทำการคัดเลือกโปรตีนสังเคราะห์จากตำแหน่งที่มั่นใจได้ว่าเป็นตำแหน่งที่เป็นตัวแทนที่ดีและมีคุณสมบัติของการเป็น immunogenicity ที่สูง

**11. การนำไปใช้ประโยชน์ หรือคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์**

1. มี primary antibody ไว้ใช้สำหรับการวินิจฉัยโรค Q fever ด้วยวิธี IHC ในตัวอย่างเนื้อเยื่อดองฟอร์มาลิน
2. ส่งเสริมการกำจัดโรค zoonosis

ผู้ใช้ประโยชน์จากงานวิจัย

1. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตว์แพทย์ทั้ง 7 แห่ง
2. สำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์
3. นายสัตวแพทย์ในท้องที่
4. เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์
5. หน่วยงานอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

 ขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

 ลงชื่อ ……………………………………………………

 (นางสาวฐิติกานต์ จิรกิตติสุนทร)

 ผู้เสนอผลงาน

 …………./……………../……………..

**ขอรับรองว่าสัดส่วนหรือลักษณะงานในการดำเนินการของผู้เสนอข้างต้นถูกต้องตรงกับความจริง**

**ทุกประการ**

ลงชื่อ…………………………………………………… ลงชื่อ……………………………………………………

 (นางนวพร วัดเดลล์) (นางสาวภัทริน โอภาสชัยทัตต์)

 ตำแหน่งนายสัตวแพทย์ชำนาญการ ตำแหน่งนายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ

 ผู้ร่วมดำเนินการ ผู้ร่วมดำเนินการ

 …….…../……………./………….. …….…../……………./…………..

ลงชื่อ……………………………………………………

 (นายเจษฎา รัตโณภาส)

 ตำแหน่งนายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ

 ผู้ร่วมดำเนินการ

 …….…../……………./…………..

## ได้ตรวจสอบแล้วขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นถูกต้องตรงกับความเป็นจริงทุกประการ

 ลงชื่อ…………………….…………………….. ลงชื่อ…………………..…………………………..

 (นายเจษฎา รัตโณภาส) ( )

 หัวหน้ากลุ่มพยาธิวิทยา

 …………./……………/………….. …………/……………../………...

#### เอกสารหมายเลข 4

### **ข้อเสนอแนวคิด/วิธีการ เพื่อพัฒนางานหรือปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น**

**ชื่อ** นางสาวฐิติกานต์ จิรกิตติสุนทร

**เพื่อประกอบการแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งที่สูงขึ้นในตำแหน่ง** นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ ตำแหน่งเลขที่ 803 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

**เรื่อง** การเปรียบเทียบวิธี Antigen Retrieval ระหว่างการใช้ความร้อนและเอนไซม์ในเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสตรี ของเชื้อ Caprine Arthritis Encephalitis Virus

**หลักการและเหตุผล**

Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) เป็นเชื้อที่ก่อให้แพะเกิดความผิดปกติจากการอักเสบทั่วร่างกายและเป็นโรคที่ทำให้เกิด persistent infection และไม่มีวัคซีนในการป้องกันโรค แพะที่ติดเชื้อจะมีคุณภาพและปริมาณน้ำนมลด อัตราการเจริญเติบโตที่ลดลง การมีวิธีในการวินิจฉัยยืนยันการติดโรคจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการควบคุมโรค เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสตรี (Immunohistochemistry; IHC) เป็นการตรวจหาแอนติเจนจากตัวอย่างสไลด์ที่ได้จากเนื้อเยื่อที่ผ่านการเก็บดองฟอร์มาลีนและฝังในพาราฟิน โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนคือการตรวจการวินิจฉัยโรค เนื่องจากขั้นตอนการเก็บชิ้นเนื้อในการเก็บรักษาทำให้เกิด crosslink ของโปรตีน ซึ่งลดความสามารถในการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ส่งผลให้มีความไวในการตรวจพบเชื้อลดลงหรือไม่พบ การลดปัญหาดังกล่าวจำเป็นจะต้องอาศัยขั้นตอน Antigen Retrieval (AR) ซึ่งแต่ละเชื้อ ชนิดสัตว์ จะมีวิธีที่เหมาะสมแตกต่างกัน การมีวิธี Antigen Retrieval ที่ดีที่สุด ส่งผลให้มีการวินิจฉัยโรคนั้นๆได้อย่างแม่นยำ

**บทวิเคราะห์/แนวความคิดหรือความรู้ทางวิชาการ**

CAEV เป็น RNA ไวรัสชนิด RNA สายบวกเดี่ยว ในตระกูล *Retroviridae* ความยาว 7 – 11 kbs ก่อโรคในแพะ เมื่อเชื้อชนิดนี้เข้าสู่ร่างกายสัตว์จะทำการเพิ่มจำนวนโดยการเปลี่ยนตัวเองเป็น proviral DNA แล้วทำการ integrate เข้าสู่ DNA ของ host cells (Ramirez et al., 2013) ในเซลล์เป้าหมายคือเซลล์ในกลุ่ม monocyte และ macrophage จึงส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันสัตว์ทั้งชนิด innate และชนิด adaptive ตลอดจน precursor cells ของเซลล์เหล่านี้ในไขกระดูกยังเป็นเซลล์ที่สำคัญที่เมื่อมีการติดเชื้อแล้วทำให้เกิดการติดเชื้อแบบแอบแฝง (latent infection) เมื่อเซลล์เหล่านี้พัฒนาและไหลเวียนอยู่ในระบบหมุนเวียนเลือดจึงทำให้มีการติดเชื้อในอวัยวะต่างๆตามมา

การวินิจฉัยโรคสามารถทำได้หลายวิธีทั้งจากการตรวจหาเชื้อ การตรวจหาลำดับสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction; PCR) หรือการตรวจทางซีรัมวิทยา อย่างไรก็ตามการใช้วิธี IHC จะเป็นวิธีที่สามารถบอกพยาธิสภาพที่เปลี่ยนแปลงไป อวัยวะเป้าหมาย ตำแหน่งของเชื้อว่าอยู่ในเซลล์ใด ซึ่งเป็นวิธีในการยืนยันการติดเชื้อพร้อมทั้งสามารถบ่งบอกรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาได้ อย่างไรก็ตามการใช้วิธี IHC จากตัวอย่างเนื้อเยื่อดองฟอร์มาลินจำเป็นจะต้องมีขั้นตอนของการนำแอนติเจนออกมา (AR) จาก crosslink ของโปรตีน ซึ่งเป็นวิธีที่เพิ่มความสามารถในการตรวจ IHC ซึ่งปัจจุบันมี 2 วิธีการหลักๆคือ 1 การใช้ความร้อน และ 2 การใช้เอนไซม์ (Warford et al., 2014) การศึกษาโดย Grossi และคณะ (2005) พบว่าการใช้ความร้อนสามารถนำแอนติเจนออกมาในตัวอย่างสไลด์จากแพะที่ติดเชื้อ CAEV ได้ ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Rong Shi และคณะ (1997) แม้ว่าการใช้ความร้อนจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือและระยะเวลาในการปฏิบัติงานหรือแม้กระทั้งก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้ปฏิบัติงาน หากแต่การใช้เอนไซม์จะมีความง่ายและรวดเร็ว ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติ แต่ยังไม่มีผลการศึกษาที่ชัดเจนในการใช้เอนไซม์สำหรับการทำ AR สำหรับการตรวจจับ 28 kDa capsid protein โดยโปรตีนชนิดนี้เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อของ CAEV จึงนำมาใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายในการทดสอบ

**ข้อเสนอ**

เนื่องด้วยการวินิจฉัยโรค CAE ด้วยวิธี IHC จำเป็นต้องมีความมั่นใจในขั้นตอนการปฏิบัติงานว่าเหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งขั้นตอนการเปิดหน้าแอนติเจน เพื่อให้มีวิธีการวินิจฉัยโรค CAE ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงเสนอให้มีการเปรียบเทียบวิธี AR ของ IHC เพื่อใช้ในการตรวจโรค Caprine Arthritis Encephalitis ในแพะ

**ผลที่คาดว่าจะได้รับ**

ได้วิธี AR ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค CAE ด้วยวิธี IHC

 **ตัวชี้วัดความสำเร็จ**

 ห้องปฏิบัติการมีวิธี AR ในการวินิจฉัยโรค CAE ด้วยวิธี IHC ที่เหมาะสม

 ลงชื่อ……………………..…………………….

 (นางสาวฐิติกานต์ จิรกิตติสุนทร)

 ผู้เสนอแนวคิด

 …….…../…………../…….…..

## การพิจารณาประเมินข้าราชการเพื่อคัดเลือกให้ส่งผลงานทางวิชาการ

ชื่อ นางสาวฐิติกานต์ จิรกิตติสุนทร ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ เลขที่ 803

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งที่สูงขึ้นในตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ เลขที่ 803

กลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

### การพิจารณา (คะแนนเต็ม 100 คะแนน)

 1.ผลงาน/ผลการปฏิบัติงานย้อนหลัง 3 ปี 50 คะแนน ได้รับ …………………….…คะแนน

 2.ข้อเสนอแนวคิด/วิธีการเพื่อพัฒนางานหรือปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

 50 คะแนน ได้รับ …………………….…คะแนน

 **รวม** ……………………..…คะแนน

 ลงชื่อ………….……………………………………..

 ( )

 ตำแหน่ง…………………....…………………………….

 วันที่…………………..…………………………….