**เอกสารหมายเลข 1**

**แบบประเมินคุณสมบัติของบุคคล**

**ชื่อ นางสาวนลินี หงษ์ชุมพล**

**ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการ ตำแหน่งเลขที่ 1284**

**กลุ่มวิจัยและพัฒนา สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์**

**กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**

**ขอประเมินเพื่อขอรับเงินประจำตำแหน่ง**

**ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการ ตำแหน่งเลขที่ 1284**

**กลุ่มวิจัยและพัฒนา สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์**

**กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**

##### **เอกสารหมายเลข 3**

# ผลงานที่จะขอรับการประเมินเพื่อขอรับเงินประจำตำแหน่ง

**เรื่องที่ 1**

**1. ชื่อผลงาน** การพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง ในระดับต้นแบบ

**ปีที่ดำเนินการ** 2563

**2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการศึกษา**

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคติดต่อที่ร้ายแรงของสุกร เกิดจากเชื้อไวรัส Classical swine fever อยู่ใน Family Flaviviridae, Genus Pestivirus (สุพล, 2543) ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ติดต่อโดยการสัมผัสกับสัตว์ป่วย สิ่งขับถ่าย น้ำเชื้อ หรือสารคัดหลั่งจากสัตว์ที่ป่วยหรือตาย การเข้าออกฟาร์มที่เกิดโรค การใช้เครื่องมืออุปกรณ์ร่วมกันระหว่างฟาร์ม โรคอหิวาต์สุกรก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกร ประเทศไทยมีรายงานการพบโรคอหิวาต์สุกรตั้งแต่ พ.ศ. 2493 สถานการณ์ของโรคล่าสุดในปี 2560 พบการระบาด 1 ครั้ง ในเขตจังหวัดอุตรดิตถ์ (สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดอุตรดิตถ์, 2560) แม้ว่าอุบัติการณ์ของโรค จะลดลงแต่ยังมีความจำเป็นต้องควบคุม ป้องกันและเฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการป้องกันโรคที่สำคัญคือการฉีดวัคซีนและการรักษาความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) ของฟาร์ม

ปัจจุบันกรมปศุสัตว์ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส เป็นวัคซีนเชื้อเป็นชนิดผ่านกระต่าย ซึ่งเป็นวัคซีนที่ให้ความคุ้มโรคได้ดี แต่ยังคงมีข้อจำกัดในการผลิตหลายอย่าง การผลิตวัคซีนแต่ละชุดต้องใช้กระต่ายในการเพิ่มปริมาณไวรัสอย่างน้อยชุดละ 100 ตัว จึงจำเป็นต้องมีแหล่งเพาะเลี้ยงที่ผลิตกระต่ายได้อย่างต่อเนื่อง และกระต่ายต้องมีสุขภาพสมบูรณ์ ซึ่งแหล่งเพาะเลี้ยงกระต่ายเพาะพันธุ์กระต่ายไม่ทันกับความต้องการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ซึ่งต้องการปีละ 5,000 – 6,000 ตัว หรือบางแหล่งเลี้ยงกระต่ายที่สายพันธุ์ไม่ตรงตามความต้องการ เป็นกระต่ายที่เลี้ยงเพื่อความสวยงามทำให้ใช้ในงานผลิตวัคซีนค่อนข้างยาก เป็นผลให้ไม่สามารถผลิตวัคซีน ได้อย่างสม่ำเสมอและเพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ ปริมาณการใช้วัคซีนอหิวาต์สุกรของกรมปศุสัตว์ตั้งแต่ ปี 2554 – 2558 เฉลี่ยปีละ 6.26 ล้านโด๊ส เมื่อพบปัญหากระต่ายไม่เพียงพอหรือไม่ตรงกับการใช้งาน จึงทำให้ปริมาณการผลิตลดลงไม่ทันกับความต้องการของเกษตรกร เสียดุลการค้ากับต่างประเทศในการนำเข้าวัคซีน

โดยเหตุผลดังกล่าวสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ จึงมีแนวคิดพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง เพราะเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถนำมาเพิ่มปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกรแทนกระต่ายได้ สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ได้อย่างต่อเนื่องและเพิ่มปริมาณได้ตามความต้องการใช้งาน สามารถควบคุมคุณภาพของเซลล์ในระหว่างการผลิตได้ง่ายกว่าการใช้กระต่าย หากมีการเก็บรักษาที่เหมาะสมจะเก็บสต็อกเซลล์เพื่อใช้งานได้ เป็นระยะเวลานาน ซึ่งจะสามารถนำมาผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรได้ต่อเนื่องและควบคุมคุณภาพการผลิตได้อย่างสม่ำเสมอ อีกทั้งเป็นการลดปริมาณกระต่ายในกระบวนการผลิตวัคซีนด้วย โดยจะดำเนินการทดลองผลิตวัคซีนในระดับต้นแบบ (pilot scale) เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงวิธีการผลิตวัคซีนต่อไปในอนาคต

**3. วัตถุประสงค์ในการศึกษา**

เพื่อพัฒนาวิธีการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง สเตรนไชนีส ในระดับต้นแบบ (pilot scale) ให้ได้ตามมาตรฐานสากล

**4. ความรู้ทางวิชาการ หรือแนวคิดหรือหลักทฤษฎีที่ใช้ในการดำเนินการ**

วัคซีนอหิวาต์สุกรมีหลายชนิด มีทั้งชนิดผ่านกระต่าย (Lapinised vaccine) ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture) และชนิด Subunit ซึ่งวัคซีนชนิดผ่านกระต่ายเป็นหนึ่งในวัคซีนที่ดีสุด มีความปลอดภัย กระตุ้นแอนติบอดีและให้ความคุ้มโรคได้ดี สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มโรคในวันที่ 5 หลังสุกรได้รับวัคซีน และให้ความคุ้มโรคมากกว่า 1 ปี (ฉาย, 2529) วัคซีนชนิดนี้จึงยังเป็นที่นิยมใช้ (Hua-ji et al., 2006) และมีบริษัทผู้ผลิตวัคซีนยังคงดำเนินการผลิตอยู่หลายชนิด เช่น Chinese (C-strain), Lapinised Philippines Coronel (LPC) เป็นต้น

ปัจจุบันมีการผลิตวัคซีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย ซึ่งข้อดีของวัคซีนที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงคือควบคุมการผลิตได้อย่างสม่ำเสมอ ให้ความคุ้มโรคได้เช่นเดียวกันกับชนิดผ่านกระต่ายแต่ผลิตได้ปริมาณที่เพียงพอมากกว่า (Nath et al., 2016) ยี่ห้อที่มีจำหน่ายในท้องตลาด เช่น Coglapest, Green cross เป็นต้น ส่วนการพัฒนาวัคซีนชนิด Subunit ซึ่งสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรได้เช่นกัน แต่อาจใช้เวลานานกว่าและมีราคาสูง ยี่ห้อที่มีจำหน่ายในท้องตลาด เช่น Porcilis Pesti (Laughlin et al., 2019)

สำหรับในประเทศไทยการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง มีการดำเนินการอย่างต่อเนื่อง การพัฒนาไวรัสอหิวาต์สุกรในเซลล์เพาะเลี้ยง มีการศึกษาโดยใช้เซลล์หลายชนิด เช่น ไตหนูตะเภา (สละ, 2529) SK-6 (Terpstra et al., 1990) และ PK15 (Wu et al., 2013) เป็นต้น

วาสนาและคณะ (2544) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีสชนิดผ่านกระต่าย ในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด พบว่าเชื้อไวรัสสามารถเจริญได้ในเซลล์ SK6 และ FS-L3 (Sakoda and Fukusho, 1998) ซึ่งเป็นเซลล์ไตสุกร รวมทั้งเซลล์กล้ามเนื้อโค (Bovine Fetal Muscle; BFM) ทั้งนี้วาสนาและคณะ (2545) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีสชนิดผ่านกระต่ายที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ (30 องศาเซลเซียส) ในเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L3 ต่อเนื่องจำนวน 10 passages แล้วนำเชื้อไวรัสที่ได้มาทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคในสุกร พบว่าเชื้อไวรัสมีความปลอดภัยและสามารถต้านทานการฉีดเชื้อพิษทับได้ ข้อดีของเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L3 คือเพาะเลี้ยงได้โดยไม่ต้องใช้ซีรัมเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆจากซีรัม

จากข้อมูลผลการศึกษาข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยง FS-L3 มาใช้ในการวิจัยเพื่อผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรนไชนีสในระดับต้นแบบ เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีผลการศึกษาว่าเจริญเติบโตได้โดยไม่ต้องใช้ซีรัมและเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีสได้ เชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงมีความปลอดภัย มีความคุ้มโรคในสุกร สามารถนำมาทดลองผลิตเป็นวัคซีนอหิวาต์สุกรในระดับต้นแบบ และทดสอบคุณภาพของวัคซีนในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลองต่อไป

**5. วิธีการหรือขั้นตอนการศึกษา**

**5.1 สัตว์ทดลอง**

สุกรพันธุ์ผสมสามสายพันธุ์ (Large white, Landrace, Duroc) คละเพศ อายุ 6-8 สัปดาห์ เจาะเลือดตรวจแล้วไม่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสอหิวาต์สุกร จำนวน 45 ตัว

**5.2 การผลิตวัคซีน**

5.2.1 อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์และไวรัส

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (Growth medium, GM) ประกอบด้วย minimum essential medium, Tryptose phosphate broth solution 0.295%, bacto peptone 0.5%, 10mM N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulfonic acid (BES), L-glutamine 0.295 มก./มล., sodium bicarbonate 2.25 มก./มล., antibiotic 1%

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส (Maintenance medium, MM) ประกอบด้วย minimum essential medium, Tryptose phosphate broth solution 0.295%, bacto peptone 0.5%, 10mM N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulfonic acid (BES), L-glutamine 0.295 มก./มล., sodium bicarbonate 2.25 มก./มล., antibiotic 1% และ fetal bovine serum 1%

5.2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L3

นำเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L3 passages ที่ 35 ที่เก็บในถังลิควิดไนโตรเจน ปั่นล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเร็ว 1,000 รอบ 5 นาที 2 ครั้ง เลี้ยงในขวดแบนเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 225 ตารางเซนติเมตร จำนวน 20 ขวด ให้มีจำนวนเซลล์ตั้งต้นประมาณ 5x106 เซลล์ต่อขวด เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (GM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

5.2.3 การเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส

Inoculate ไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีส ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ โดยคำนวณให้ปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ (Multiply of Infection; MOI) เท่ากับ 0.1 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (MM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 30องศาเซลเซียส เก็บไวรัส (Harvest) วันที่ 7

การหาปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์สำหรับการเพาะเลี้ยงไวรัส คำนวณโดย

ปริมาณไวรัสที่ต้องใช้ (มล.) = ค่า MOI x จำนวนเซลล์ทั้งหมด (เซลล์/ขวด)

ปริมาณไวรัส (TCID50/มล.)

5.2.4 การเก็บไวรัส

เก็บอาหารเลี้ยงที่มีไวรัสวัคซีนทั้งหมดรวมแล้วผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอน 1,000 รอบต่อนาที เก็บส่วนใสซึ่งจะเป็น virus stock แบ่งใส่ขวดเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส และส่งตัวอย่างเพื่อหาปริมาณไวรัส

5.2.5 การเตรียมวัคซีนชนิดดูดแห้ง

โดยใช้เชื้อไวรัสวัคซีนจากข้อ 5.2.4 มาผสมกับ stabilizer (ประกอบด้วย Polyvinyl pyrrolidone, Lactose anhydrous, antibiotics) ในอัตราส่วน 1:1 คำนวณให้ได้ปริมาณเชื้อไวรัสวัคซีนไม่ต่ำกว่า 5 log TCID50/โด๊ส แจกน้ำไวรัสวัคซีนใส่ขวดแก้วขวดละ 1 มิลลิลิตร จำนวนชุดละ 3,000 ขวด (30,000 โด๊ส) นำไปเข้าเครื่องทำแห้ง (Lyophilize) โดยทำซ้ำตามขั้นตอนในข้อ 5.2.2 - 5.2.5 จำนวน 3 ชุดการผลิต

**5.3 การทดสอบคุณภาพวัคซีน**

5.3.1 ทดสอบคุณภาพของวัคซีนทางห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีน อหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

5.3.1.1 ทดสอบคุณลักษณะ (property test) เป็นวัคซีนชนิดแห้ง สีขาวนวล ละลายง่าย ไม่มีสิ่งแปลกปลอม (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ก; ASEAN 1998)

5.3.1.2 ทดสอบความเป็นสุญญากาศ (vacuum test) ทดสอบด้วย Vacuum tester ต้องเป็นแสงสีม่วงภายในขวด

5.3.1.3 ทดสอบความชื้น (moisture test) โดยวิธี Karl Fisher ต้องไม่เกิน 4% (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ข; ASEAN 1998)

5.3.1.4 ทดสอบการปนเปื้อน (sterility test) ต้องปราศจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ค; ASEAN 1998)

5.3.1.5 หาปริมาณไวรัสในวัคซีนก่อนและหลังทำแห้ง โดยวิธี Immunoperoxidase (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 2561) (สุจิรา และคณะ, 2540)

5.3.2 ทดสอบคุณภาพของวัคซีนในสุกรทดลอง ได้แก่ ความปลอดภัย (safety) และความคุ้มโรค (potency) ตามมาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

5.3.2.1 ทดสอบความปลอดภัยในสุกรทดลอง (safety test) (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ง; ASEAN 1998) ใช้สุกรทดลองจำนวน 3 ตัวต่อชุดการผลิต เจาะเลือดก่อนฉีดวัคซีนทุกตัว ฉีดวัคซีนขนาด 10 เท่าของโด๊สปกติ วัดอุณหภูมิร่างกายและสังเกตอาการทุกวันนาน 2 สัปดาห์ สุกรทุกตัวต้องปกติไม่มีไข้ ตรวจไม่พบไวรัสวัคซีนในซีรัม และในน้ำบดอวัยวะภายใน (organ suspension) และไม่พบรอยโรค

5.3.2.2 ทดสอบความคุ้มโรคในสุกรทดลอง (potency test) (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562จ ; ASEAN 1998) ใช้สุกรทดลองจำนวน 10 ตัวต่อชุดการผลิต เจาะเลือดก่อนฉีดวัคซีนทุกตัว ฉีดวัคซีนที่เจือจางขนาด 40 เท่า และ 160 เท่าของโด๊สปกติ ความเจือจางละ 5 ตัว ฉีดเข้ากล้ามเนื้อตัวละ 1 มิลลิลิตร สุกรกลุ่มควบคุมจำนวน 2 ตัวต่อชุดการผลิต วัดอุณหภูมิร่างกายและสังเกตอาการทุกวันนาน 14 วัน ฉีดพิษทับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงขนาด 105 PID50 (50% Pig Infective Dose) วัดอุณหภูมิร่างกายและสังเกตอาการทุกวันนาน 3 สัปดาห์ สุกรที่ฉีดวัคซีนต้องไม่ป่วยหรือตายด้วยโรคอหิวาต์สุกร ไม่มีไข้ ตรวจไม่พบไวรัสอหิวาต์สุกรในซีรัม และในน้ำบดอวัยวะภายใน (organ suspension) และไม่พบรอยโรค และความคุ้มโรคต้องไม่น้อยกว่า 102 PD50

1. **ผู้ร่วมดำเนินการ**
2. นางสาวนลินี หงษ์ชุมพล สัดส่วนผลงาน 80%
3. นางสาวละมูล โม้ลี สัดส่วนผลงาน 20%
4. **ระบุรายละเอียดเฉพาะงานในส่วนที่ผู้ขอรับการประเมินเป็นผู้ปฏิบัติ**
5. วางแผนการวิจัย จัดหาวัสดุอุปกรณ์ 30%
6. เพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส 20%
7. ผลิตวัคซีน ทดสอบคุณภาพวัคซีน 20%
8. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผล 10%
9. **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (กรณีเป็นผลงานที่อยู่ระหว่างศึกษา)**

8.1 ได้วิธีการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง สเตรนไชนีส ในระดับต้นแบบ (pilot scale) มีคุณภาพตามมาตรฐานสากล

8.2 ลดการใช้สัตว์ทดลองในการผลิตวัคซีน

8.3 นำไปสู่การผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง สเตรนไชนีส ในระดับอุตสาหกรรม

8.4 กรมปศุสัตว์มีศักยภาพสูงขึ้นในการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร เป็นผลให้สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตให้เพียงพอกับความต้องการใช้ภายในประเทศ

1. **ระบุผลสำเร็จของงาน หรือผลการศึกษา (กรณีที่เป็นผลงานที่ดำเนินการเสร็จแล้ว)**

…………………………………………………-……………………………………………………………………

**10. ความยุ่งยากในการดำเนินการ/ปัญหา/อุปสรรค**

10.1 เนื่องจากการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง FS-L3 ไม่พบการเกิดรอยโรคในเซลล์ จึงทำให้ประเมินการเจริญเติบโตของไวรัสได้ยาก ต้องใช้เทคนิคในการตรวจเพิ่มเติม เช่น Realtime PCR และ Immunoperoxidase

10.2 ไวรัสที่นำมาวิจัยเดิมเพาะเลี้ยงด้วยการฉีดเข้าร่างกายกระต่าย เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในเซลล์จึงต้องใช้เวลาในการปรับตัวให้เจริญเติบโตในเซลล์ ต้องทดลองซ้ำหลายๆครั้ง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของทั้งเซลล์และไวรัส เช่น ปริมาณไวรัสต่อเซลล์ในการเพาะเลี้ยง passage ของเซลล์และไวรัส

10.3 การเตรียมและคัดเลือกสัตว์ทดลอง ต้องเจาะเลือดสุกรทุกตัวและตรวจภูมิคุ้มกันต่อไวรัสอหิวาต์สุกร จึงจะคัดเลือกเข้าสู่งานวิจัยได้

10.4 การดูแลสัตว์ทดลองระหว่างการวิจัย การทำลายสัตว์หลังการใช้งาน ต้องปฏิบัติตามพรบ.การใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ และมีการดูแลควบคุมสิ่งแวดล้อมของสัตว์ระหว่างการทดสอบเพื่อไม่ให้มีผลกระทบต่อผลการทดสอบ

10.5 การหาส่วนผสมของวัคซีนสำเร็จรูป มีสัดส่วนที่แตกต่างจากวัคซีนชนิดผ่านกระต่าย ต้องทดลองผสมและผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปและทดสอบคุณภาพ

**11. การนำไปใช้ประโยชน์ หรือคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์**

นำผลการศึกษาที่ได้เป็นข้อมูลประกอบการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อทดแทนการผลิตวัคซีนด้วยวิธีเดิม (ชนิดผ่านกระต่าย) ซึ่งจะช่วยลดการใช้สัตว์ทดลองในการผลิตวัคซีน และควบคุมคุณภาพในการผลิตได้คงที่ยิ่งขึ้น

ขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อ ............................................................................

(นางสาวนลินี หงษ์ชุมพล)

ผู้เสนอผลงาน

วันที่ .............../........................../...................

ขอรับรองว่าสัดส่วนหรือลักษณะงานในการดำเนินการของผู้เสนอข้างต้นถูกต้องตรงกับความจริงทุกประการ

ลงชื่อ ............................................................................

(นางสาวละมูล โม้ลี)

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ

ผู้ร่วมดำเนินการ

วันที่ .............../........................../...................

## ได้ตรวจสอบแล้วขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นถูกต้องตรงกับความเป็นจริงทุกประการ

ลงชื่อ ......................................................................

(นายไชยา สง่าประโคน)

หัวหน้ากลุ่มวิจัยและพัฒนา

วันที่ .............../........................../...................

ลงชื่อ ......................................................................

(นายจาตุรนต์ พลราช)

ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

วันที่ .............../........................../...................

**หมายเหตุ** หากผลงานมีลักษณะเฉพาะ เช่นแผ่นพับ หนังสือ แถบบันทึกเสียง ฯลฯ ผู้เสนอผลงานอาจส่งผลงานจริงประกอบการพิจารณาของคณะกรรมการก็ได้

##### **เอกสารหมายเลข 3**

# ผลงานที่จะขอรับการประเมินเพื่อขอรับเงินประจำตำแหน่ง

**เรื่องที่ 2**

**1.** **ชื่อผลงาน** เปรียบเทียบผลการวัดระหว่างห้องปฏิบัติการของเทคนิค Immunoperoxidase และ Neutralizing peroxidase-linked assay ในการตรวจหาไวรัสและแอนติบอดีของโรค อหิวาต์สุกร

**ปีที่ดำเนินการ** 2563

**2.** **ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการศึกษา**

ปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ได้ร่วมวิจัยและพัฒนาการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรให้เพียงพอกับความต้องการใช้ภายในประเทศ แต่เดิมกรมปศุสัตว์มีกำลังการผลิตวัคซีนชนิดผ่านกระต่ายได้ประมาณ 6 ล้านโด๊สต่อปี ในขณะที่การเลี้ยงสุกรในประเทศเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากข้อมูลของสำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร เรื่อง สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2561 ข้อมูลการผลิตสุกรในปี 2556-2560 การผลิตสุกรของไทยเพิ่มขึ้นในอัตราร้อยละ 9.42 ต่อปี ในปี 2560 มีปริมาณการผลิตสุกร 19.252 ล้านตัว เพิ่มขึ้นจาก 18.870 ล้านตัวของปี 2559 คิดเป็นร้อยละ 2.02 จากข้อมูลดังกล่าวจึงมีความจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณการผลิตวัคซีนให้เพียงพอในการป้องกันโรค เนื่องจากไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ที่ใช้ผลิตวัคซีนไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) จำเป็นต้องใช้เทคนิค Immunoperoxidase (IP) ในการตรวจหาปริมาณไวรัส รวมทั้งใช้เทคนิค Neutralizing peroxidase-linked assay (NPLA) ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสอหิวาต์สุกรในการตรวจสอบภูมิคุ้มกันหลังฉีดวัคซีน จึงจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคดังกล่าวให้เป็นมาตรฐานเดียวกันระหว่างสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเพื่อให้ระบบการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรทางห้องปฏิบัติการเป็นมาตรฐานเดียวกันทั้งประเทศ

การเตรียมความพร้อมของบุคลากรที่จะทำการทดสอบ การเตรียมตัวอย่าง (ลักษณะความคงตัวและมีความเป็นเนื้อเดียวกัน) วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี สภาวะห้องปฏิบัติการในช่วงเวลาการทดสอบ และระยะเวลาในการทดสอบเดียวกัน จึงเป็นส่วนสำคัญสำหรับเตรียมพร้อมในการทำ inter lab (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2559; ISO/IEC 17025:2005) สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติจึงจัดทำโครงการเพื่อควบคุมคุณภาพระหว่างห้องปฏิบัติการ (external quality control) โดยการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison, interlab) ซึ่งตัวอย่างที่เตรียมนั้นจะต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenecity) และมีความเสถียร (stability) เมื่อห้องปฏิบัติการได้รับตัวอย่างจะดำเนินการทดสอบตัวอย่างภายในระยะเวลาที่กำหนด และรายงานผลการทดสอบหลังจากนั้นทั้ง 2 หน่วยงานจะทำการประเมินผล (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2559; ISO/IEC Guide 43-1. 1997. 4) หรือการทดสอบความชํานาญ (proficiency testing, PT) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2559; ISO/IEC Guide 43-1. 1997. 4; ILAC – G 13: 2000) เพื่อประเมินผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการดังกล่าว ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้เป็นวิธีการประกันคุณภาพสําหรับห้องปฏิบัติการ เป็นผลให้การทดสอบมีความถูกต้องเชื่อถือได้ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2559) สร้างความมั่นใจในกระบวนการและเทคนิคการทดสอบของห้องปฏิบัติการทั้ง 2 แห่ง รวมถึงสร้างความมั่นใจในกระบวนการและเทคนิคการทดสอบของผู้ทำการทดสอบเอง ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงปัญหาที่อาจมีของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม และดำเนินการแก้ไขหากเกิดความผิดพลาดในการประเมินผลการทดสอบ (สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ, 2555)

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาบุคลากรและห้องปฏิบัติการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติในการตรวจหาปริมาณไวรัสและแอนติบอดีของโรคอหิวาต์สุกรที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน

**3. วัตถุประสงค์ในการศึกษา**

เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค IP และการหาระดับภูมิคุ้มกันของโรคอหิวาต์สุกรด้วยเทคนิค NPLA ระหว่างห้องปฏิบัติการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

**4. ความรู้ทางวิชาการ หรือแนวคิดหรือหลักทฤษฎีที่ใช้ในการดำเนินการ**

ไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรเป็นเชื้อไวรัสที่สามารถเจริญเติบโตได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด เช่น SK6 (Hulst et al., 2000; Terpstra et al., 1990) และ FS-L3 (Sakoda and Fukusho, 1996; วาสนาและคณะ, 2544) ซึ่งเป็นเซลล์ไตสุกร นอกจากนี้ยังสามารถเพาะเลี้ยงได้ในเซลล์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่เซลล์สุกร (Sasahara and Kumagai, 1966) เช่น BEK (เซลล์ไตโค), MARC-145 (เซลล์ไตลิง), HL (เซลล์ปอดแฮมสเตอร์) เป็นต้น แต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ดังนั้นในการตรวจหาปริมาณไวรัสจึงต้องย้อมเซลล์ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี และสังเกตการติดสีของไวรัส โดยใช้เทคนิค Immunoperoxidase (IP) หรือเทคนิค fluorescent antibody technique (FAT) (NIAH, 1998; OIE, 2018) รวมทั้งใช้เทคนิค Neutralizing peroxidase-linked assay (NPLA) ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสอหิวาต์สุกรและการตรวจระดับภูมิคุ้มกันหลังฉีดวัคซีน ซึ่งเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้น OIE ได้กำหนดไว้ในมาตรฐานการตรวจ และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติซึ่งเป็นหน่วยงานกลางในการตรวจวินิจฉัยได้ใช้เทคนิค IP ในการตรวจหาปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกรและการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรตามวิธีมาตรฐานที่กำหนดไว้ใน OIE 2018 นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเทคนิค IP ยังสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสอื่นๆ ในสุกรได้ เช่น African swine fever virus, โรคโรต้าไวรัส (ROTAVIRUS) ในสุกร เป็นต้น (Barman *et al*., 2014; Pan *et al*., 1982) สำหรับการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรนั้น สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติใช้วิธี NPLA ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังสุกรได้รับวัคซีน (NIAH, 1998) อีกทั้งวิธี NPLA ยังสามารถตรวจวินิจฉัยแยกระหว่างการติดเชื้อ bovine viral diarrhea virus (BVD) กับ การติดเชื้อจากไวรัสอหิวาต์สุกรได้อีกด้วย (Terpstra *et al*., 1984)

การตรวจหาปริมาณไวรัสของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติได้ใช้เทคนิค Immunoperoxidase (IP) ในการตรวจหาปริมาณไวรัส เนื่องจากเทคนิค fluorescent antibody technique (FAT) นั้น ต้องทดสอบในเซลล์หรือเนื้อเยื่อสดจึงทำให้เห็นขอบเขตและรายละเอียดของเซลล์หรือเนื้อเยื่อสดไม่ชัดเจน เมื่อย้อมแล้วไม่สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้เนื่องจากสีฟลูออเรสซีนจะเสื่อมเมื่อถูกแสงสว่าง รวมทั้งกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการอ่านผลเนื้อเยื่อจะต้องเป็น Fluorescent microscopy หรือ Confocal laser scanning microscopy (CLSM) เท่านั้น (Van der Loos, 1999) แต่เทคนิค Immunoperoxidase (IP) สามารถใช้ได้ทั้งตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อสด เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาในฟอร์มาลิน เป็นปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีในเนื้อเยื่อโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับซับสเตรตที่จำเพาะเกิดสีขึ้น โดยสีนี้จะมีความคงทนและสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Nakane and Pierce, 1967) และสำหรับการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรนั้น สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติได้ใช้วิธี NPLA ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังสุกรได้รับวัคซีน ซึ่งวิธี NPLA เป็นวิธีการทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์

(Neutralization) โดยอาศัยคุณสมบัติของแอนติบอดีของซีรั่มที่เจือจางในอัตราส่วนเป็นลำดับ และอาศัยการย้อมติดสีของไวรัสเพื่อดูการคงเหลือของไวรัส หากในซีรั่มที่เจือจางนั้นมีภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อไวรัสในปริมาณที่เพียงพอที่จะยับยั้งไวรัสได้ ไวรัสจะไม่ติดสีเมื่อทำการย้อม

การทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison, interlab) ช่วยให้ห้องปฏิบัติการสามารถทวนสอบได้ว่าเทคนิคการทดสอบที่ดำเนินการยังคงความเหมาะสมและผลการทดสอบยังคงความน่าเชื่อถือเป็นหนึ่งในหลักประกันคุณภาพผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการตามข้อกำหนด 4.9 ของมาตรฐานว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ISO/IEC17025 ซึ่งจะดำเนินการทดสอบและส่งให้ห้องปฏิบัติการดำเนินการทดสอบภายในระยะเวลาที่กำหนด ภายใต้เงื่อนไขที่ตกลงกัน ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวจะต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความเสถียรตลอดช่วงเวลาของการดำเนินกิจกรรมเพื่อไม่ให้มีผลกระทบต่อผลการทดสอบที่วิเคราะห์ได้ จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการมาเปรียบเทียบกับค่ากำหนด (assigned value) และประเมินสมรรถนะของแต่ละห้องปฏิบัติการ ซึ่งวิธีนี้มักพบในห้องปฏิบัติการทดสอบ (รัชดา และ หนึ่งฤทัย, 2546) โดยสถิติที่ใช้ในการประเมินสมรรถนะของห้องปฏิบัติการจะใช้ค่า robus Z-score และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน robust เพื่อประเมินว่าผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการเบี่ยงเบนไปจากกลุ่มมากน้อยเพียงใด ซึ่งการประเมินผลสอบเทียบความชำนาญจะปฏิบัติตามมาตรฐาน ISO 13528:2015 และ ISO/IEC 17043:2010

**5. วิธีการหรือขั้นตอนการศึกษา**

5.1 ตัวอย่างไวรัสและซีรัม (ตัวอย่างไวรัสและซีรัมจะเก็บที่อุณหภูมิ -80๐C เพื่อรอการทดสอบต่อไป)

ตัวอย่างไวรัส คือ ตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชน่า (classical swine fever, strain china) ที่เพาะเลี้ยงด้วยเซลล์ FS-L3 เป็นตัวอย่างไวรัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงของโครงการวิจัยย่อที่ 1 และ 2 จำนวน 20 ตัวอย่าง

ตัวอย่างซีรัม คือ ตัวอย่างซีรัมสุกรก่อนและหลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร จำนวน 45 ตัวอย่าง ซึ่งได้ถูกนำไป inactivate ที่ 56๐C เป็นเวลา 30 นาที และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็น

5.2 เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ชนิด SK6 passage 25 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันสุขภาพสัตว์ ปี 2560 เพาะเลี้ยงเซลล์ ในขวดพลาสติกแบนขนาด 75 ตร.ซม.2 จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 2x106 เซลล์ต่อขวด เติม 5% GM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร/ขวด บ่มในตู้ 37๐C 5% CO2 นาน 5 วัน

5.3 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

SK6 (Growth medium, GM) ประกอบด้วย minimal essential medium(Eagle’s MEM Nissui), Tryptose phosphate broth solution 1%, L-glutamine 1%, sodium bicarbonate 1%, antibiotic 1%, และ calf serum 5%

5.4 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส

Minimal essential medium (Eagle’s MEM Nissui), Tryptose phosphate broth solution 1%, L-glutamine 1%, sodium bicarbonate 1%, antibiotic 1%, และ calf serum 1%

5.5 การเตรียมเซลล์

5.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ ในขวด Flask

นำเซลล์ SK6 ที่เก็บไว้มาล้างด้วย 5% GM จำนวน 5 มล.ต่อหลอด จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 rpm นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใส เหลือไว้แต่เซลล์ที่ก้นหลอด จากนั้นล้างด้วย 5% GM จำนวน 5 มล. และปั่นที่ความเร็ว 1,000 rpm นาน 5 นาที ทำวิธีการนี้ 3 ครั้ง นับจำนวนเซลล์หลังผ่านการล้าง 3 ครั้ง ละลายด้วย GM ให้ได้จำนวน 3×105 เซลล์/มล. แบ่งใส่ขวด Flask ขนาด 75 ตร.ซม.2 ปริมาตร 20 มล./ขวด บ่มที่ 37๐C 5% CO2 นาน 3-4 วัน หรือจนกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจะเต็มพื้นที่ประมาณ 80-100%

5.5.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ ใน Multiwell plate ขนาด 96 well

นำขวด Flask ที่เพาะเลี้ยงเซลล์จากข้อ 5.5.1 มาดูดอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง จากนั้นล้างด้วย PBS 2 ครั้งๆละ 5 มล. ดูด PBS ทิ้ง ย่อยเซลล์ด้วย typsin – versens (TV) ปริมาตร 1.5 มล. บ่มที่ 37๐C ประมาณ 3 นาที เมื่อเคาะเบาๆ เซลล์จะหลุด หยุดปฏิกิริยาของ TV โดยเติม 5% GM 5 มล. ใช้ไปเปตดูด-ปล่อย GM ให้เซลล์หลุดจากผิวทั้งหมดและแยกเป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นดูดใส่ Centrifuge tube ปั่นที่ความเร็ว 1,000 rpm นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใส เหลือไว้แต่เซลล์ที่ก้นหลอด เติม 5% serum-GM 5 มล. ใช้ไปเปตดูด – ปล่อย GM ให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยว นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 rpm นาน 5 นาที ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ทิ้งส่วนใส จากนั้นคำนวณเซลล์เริ่มต้นให้ได้จำนวน 2×105 เซลล์/มล. นำไปเติมใน Multiwell plate ขนาด 96 well (แบบ Flat bottom COSTAR®) ทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C 5% CO2 นาน 24 ชั่วโมง

5.6 การตรวจหาปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี Immunoperoxidase

นำตัวอย่างไวรัสจากข้อ 5.1 มาเจือจางแบบ 10 fold dilution ด้วย 1% serum–GM ที่ 10-1 - 10-10 จากนั้นเติมไวรัสที่เจือจางแล้วลง Multiwell plate ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.5.2 ความเจือจางๆ ละ 4 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร (1 plate ทำได้ 2 ตัวอย่าง) โดยมีกลุ่มควบคุมบวก (positive control; เติมstandard virus จำนวน 4 หลุม) กลุ่มควบคุมลบ (negative control; เติม MM จำนวน 4 หลุม) และกลุ่มควบคุมเซลล์ (cell control; เติม GM จำนวน 8 หลุม) บ่มที่ 37๐C 5% CO2 นาน 6 วัน เมื่อครบกำหนด เทอาหารเพาะเลี้ยงเก่าทิ้งในน้ำยาฆ่าเชื้อไวรัส ตรึงไวรัสและเซลล์ด้วย 4% Formalin หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างด้วย 0.5% PBS-T หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม Polyclonal Antibody ที่เจือจางเป็น 1:500 ในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง plate เช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วเติม Anti-PIG Ig/HPR Conjugate ที่เจือจางเป็น 1:1000 ในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง plate เช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วเติม Substrate ทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกและคำนวณปริมาณไวรัสด้วยวิธี Reed and Muench

5.7 ตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้ออหิวาต์สุกรด้วยวิธี Neutralizing peroxidase-linked assay

นำตัวอย่างซีรัมสุกรไป inactivate ที่ 56๐C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็น เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 5% GM 50 ไมโครลิตร ลงใน culture plate ขนาด 96 well ที่เตรียมไว้ทุกหลุม จากนั้นเติมตัวอย่างซีรัมสุกร 50 ไมโครลิตร ลงในแถวแรก (A-H) ของ culture plate และในตัวอย่างควบคุมบวกและลบ จากนั้นผสมซีรัมกับ 5% GM แบบ 2 fold dilution โดยผสมขึ้นลง 5 ครั้งแล้วดูดถ่ายไปหลุมถัดไป 50 ไมโครลิตรจนถึงหลุมสุดท้ายแล้วดูดทิ้ง 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมไวรัสมาตรฐานที่มีปริมาณไวรัส 102 TCID50/50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละความเจือจางของซีรัม หลุมละ 50 ไมโครลิตรทุกหลุม ทำ back titration เพื่อตรวจสอบกลับว่าปริมาณไวรัสที่ได้มีค่า 102 TCID50/50ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C 5% CO2 60 นาที เติม เซลล์ SK6 (2×105 เซลล์ต่อมล.) หลุมละ 100 ไมโครลิตรทุกหลุม และทำ Cell control โดยบ่มที่ 37๐C 5% CO2 นาน 4-5 วัน จากนั้นนำมา

ตรวจหาระดับภูมิคุ้มกัน NPLA สะบัดอาหารเพาะเลี้ยงเก่าทิ้งในน้ำยาฆ่าเชื้อ ตรึงไวรัสด้วย 4% Formalin หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างด้วย 0.5% PBS-T หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม Monoclonal Antibody ที่เจือจางเป็น 1:10 ในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C 60 นาที ล้าง plate เช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วเติม Anti- Mouse Ig/HPR Conjugate ที่เจือจางเป็น 1:300 ในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C นาน 60 นาที ล้าง plate เช่นเดียวกับครั้งแรกแล้วเติม Substrate ทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C นาน 25-30 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกและคำนวณปริมาณไวรัสด้วยวิธี Reed and Muench

5.8 Plate ตัวอย่าง

เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 5% serum-GM ลงใน Multiwell plate ขนาด 96 well ทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร แล้วเติมตัวอย่างซีรัมจากข้อ 5.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแถว A1-H1 ของ culture plate เจือจางซีรัมแบบ 2 fold dilution จนถึงหลุมสุดท้าย แล้วดูดทิ้ง 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมไวรัส 100 TCID50 ทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C 5% CO2 นาน 1 ชั่วโมง แล้วเติมเซลล์ SK6 ที่เตรียมจากข้อ 5.5.1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร (2×105 เซลล์ต่อมล.) บ่มที่ 37๐C 5% CO2 นาน 4-5 วัน เทอาหารเพาะเลี้ยงเก่าทิ้งในภาชนะที่มีน้ำยาฆ่าเชื้อไวรัส ตรึงไวรัสและเซลล์ด้วย 4% Formalin หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างด้วย 0.5% PBS-T หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม Monoclonal Antibody ที่เจือจางเป็น 1:10 ในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง plate เช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วเติม Anti-Mouse Ig/HPR Conjugate ที่เจือจางเป็น 1:300 ในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง plate เช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วเติม Substrate ทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37๐C นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกและคำนวณหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Reed and Muench

5.9 Control plate

เตรียม positive control เพื่อทำ virus black โดยเจือจาง standard virus แบบ 10 fold dilution ตรวจสอบกลับว่าปริมาณไวรัสที่ได้มีค่า 100 TCID50

5.10 เกณฑ์ประเมินการยอมรับผลการทดสอบ

นำผลการทดสอบหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี IP และหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสอหิวาต์สุกร ด้วยวิธี NPLA เทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณไวรัสและระดับแอนติบอดี ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเป็นมาตรฐานเดียวกัน โดยใช้การประเมินทางสถิติ Z-score ซึ่งกำหนดใน ISO/IEC 17043 : 2010 Annex B: Statistical methods for proficiency testing. (B.4.1.1.C) ค่า Z-score ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับดังนี้

≤ 2 ผลเป็นที่พอใจและยอมรับ (Satisfactory)

2 < < 3 ผลเป็นที่สงสัย (Questionable)

≥3 ผลไม่เป็นที่พอใจและไม่ยอมรับ (Un Satisfactory)

5.11 การวิเคราะห์ผล

การทดสอบหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี IP และหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี NPLA เทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณไวรัสและระดับแอนติบอดีของฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์) และหน่วยตรวจวินิจฉัยโรค (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ) เป็นมาตรฐานเดียวกัน

5.12 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

5.12.1 สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

5.12.2 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

**6. ผู้ร่วมดำเนินการ** (ถ้ามี)

1. นายดิถี ประเสริฐสุวรรณ สัดส่วนผลงาน 40%
2. นางสาวนลินี หงษ์ชุมพล สัดส่วนผลงาน 20%
3. นางอารีรัตน์ สุดโต สัดส่วนผลงาน 20%
4. นางสาวละมูล โม้ลี สัดส่วนผลงาน 20%

**7. ระบุรายละเอียดเฉพาะงานในส่วนที่ผู้ขอรับการประเมินเป็นผู้ปฏิบัติ**

* 1. เพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส 10%
  2. เตรียมและส่งตัวอย่างไวรัส 5%
  3. วิเคราะห์ข้อมูล 5%

**8. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (กรณีเป็นผลงานที่อยู่ระหว่างศึกษา)**

* 1. ได้วิธีการทดสอบในการตรวจหาปริมาณไวรัสและแอนติบอดีของโรคอหิวาต์สุกรโดยใช้เซลล์ SK6
  2. ได้ผลการวัดระหว่างห้องปฏิบัติการของเทคนิค Immunoperoxidase และ Neutralizing peroxidase-linked assay ในการตรวจหาไวรัสและแอนติบอดีของโรคอหิวาต์สุกร

**9.ระบุผลสำเร็จของงาน หรือผลการศึกษา (กรณีที่เป็นผลงานที่ดำเนินการเสร็จแล้ว)**

…………………………………-…………………………………………………………………………………………………………………………

………………………………….…………………………………………………………………………………………………………………………

………………………………….…………………………………………………………………………………………………………………………

………………………………….…………………………………………………………………………………………………………………………

………………………………….…………………………………………………………………………………………………………………………

………………………………….…………………………………………………………………………………………………………………………

**10. ความยุ่งยากในการดำเนินการ/ปัญหา/อุปสรรค**

* 1. ต้องควบคุมปัจจัยในการเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัสให้คงที่และเหมาะสม
  2. การเก็บตัวอย่างและจัดเตรียมสำหรับห้องปฏิบัติการต้องระบุหมายเลข และบันทึกข้อมูลของตัวอย่างที่ชัดเจน ไม่ให้ปะปนหรือเกิดความสับสนต่อผู้ทดสอบ
  3. การนำส่งตัวอย่างจากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ไปสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 2-8๐C เพื่อป้องกันการสูญเสียไวรัสของตัวอย่าง
  4. การคำนวณค่าทางสถิติเพื่อประเมินผลการทดสอบ จะต้องเลือกใช้วิธีคำนวณค่าสถิติที่เหมาะสมกับขนาดกลุ่มตัวอย่าง

**11. การนำไปใช้ประโยชน์ หรือคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์**

* 1. สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติได้วิธีการทดสอบในการตรวจหาไวรัสและแอนติบอดีของโรคอหิวาต์สุกร โดยใช้เซลล์ SK6 ที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน

ขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อ ............................................................................

(นางสาวนลินี หงษ์ชุมพล)

ผู้เสนอผลงาน

วันที่ .............../........................../...................

ขอรับรองว่าสัดส่วนหรือลักษณะงานในการดำเนินการของผู้เสนอข้างต้นถูกต้องตรงกับความจริงทุกประการ

ลงชื่อ ......................................................................

(นายดิถี ประเสริฐสุวรรณ)

นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ

ผู้ร่วมดำเนินการ

วันที่ .............../........................../...................

ลงชื่อ ......................................................................

(นางอารีรัตน์ สุดโต)

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ

ผู้ร่วมดำเนินการ

วันที่ .............../........................../...................

ลงชื่อ ............................................................................

(นางสาวละมูล โม้ลี)

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ

ผู้ร่วมดำเนินการ

วันที่ .............../........................../...................

## ได้ตรวจสอบแล้วขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นถูกต้องตรงกับความเป็นจริงทุกประการ

ลงชื่อ ......................................................................

(นายไชยา สง่าประโคน)

หัวหน้ากลุ่มวิจัยและพัฒนา

วันที่ .............../........................../...................

ลงชื่อ ......................................................................

(นายจาตุรนต์ พลราช)

ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

วันที่ .............../........................../...................

**หมายเหตุ** หากผลงานมีลักษณะเฉพาะ เช่นแผ่นพับ หนังสือ แถบบันทึกเสียง ฯลฯ ผู้เสนอผลงานอาจส่งผลงานจริงประกอบการพิจารณาของคณะกรรมการก็ได้

#### **เอกสารหมายเลข 4**

### **ข้อเสนอแนวคิด/วิธีการ เพื่อพัฒนางานหรือปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น**

**ชื่อ** นางสาวนลินี หงษ์ชุมพล

**เพื่อประกอบการขอรับเงินประจำตำแหน่ง** นายสัตวแพทย์ชำนาญการ **ตำแหน่งเลขที่** 1284

**สำนัก/กอง** สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

**เรื่อง** พัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม ให้ได้รับทะเบียนตำรับยาแผนปัจจุบันที่เป็นชีววัตถุ

**หลักการและเหตุผล**

ฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ มีหน้าที่ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและวัคซีนกาฬโรคเป็ด ซึ่งวัคซีนอหิวาต์สุกรเป็นวัคซีนที่มีความสำคัญใช้สำหรับป้องกันโรคอหิวาต์สุกร เพื่อควบคุมการระบาดและลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศไทย ซึ่งประเทศไทยได้ใช้วัคซีนในการป้องกันควบคุมโรคมาเป็นเวลานานแต่ยังคงพบการระบาดของโรคอยู่ในบางพื้นที่ กรมปศุสัตว์ได้ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชนีส เพื่อจำหน่ายให้กับเกษตรกรรายย่อยและผู้ประกอบการฟาร์มสุกร แต่เนื่องจากการผลิตวัคซีนชนิดผ่านกระต่ายมีข้อจำกัดหลายด้าน สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์จึงมีการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในระดับต้นแบบ (Pilot scale) เพื่อทดแทนการใช้กระต่าย เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ในเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งปกติแล้วไวรัสที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์มีอยู่นั้นจะเพิ่มจำนวนได้ในสัตว์ทดลอง ซึ่งผลการทดลองสามารถเพิ่มจำนวนไวรัสชนิดนี้ ในเซลล์เพาะเลี้ยงและผลิตออกมาเป็นวัคซีนสำเร็จรูปได้

การผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อนำไปใช้ในระดับประเทศนั้นจะต้องมีการปรับปรุงวิธีการผลิตจากระดับต้นแบบ เพื่อให้ทราบปัญหา อุปสรรคและความเป็นไปได้ในการผลิต และให้มีความสอดคล้องกับความต้องการของเกษตรกร รวมถึงการทดสอบคุณภาพวัคซีนในระดับฟาร์ม การทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนกับสุกรในรุ่นอายุที่แตกต่างกัน เช่น ลูกสุกร สุกรขุน และแม่สุกรอุ้มท้อง เป็นต้น เพื่อทำให้เกษตรกรมีความมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยของวัคซีน ก่อนที่จะนำไปผลิตใช้จริง

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เป็นองค์กรหลักด้านคุ้มครองผู้บริโภคและส่งเสริมผู้ประกอบการด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อประชาชนสุขภาพดี ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ทำหน้าที่โดยตรง ในการควบคุมกำกับดูแลเฝ้าระวังทั้งก่อนและหลังผลิตภัณฑ์ออกสู่ตลาดให้เป็นไปตามที่กฎหมายกำหนด และเตรียมความพร้อมให้ผู้ประกอบการให้สามารถประกอบการได้มาตรฐานที่กฎหมายกำหนดรวมถึงยกระดับมาตรฐานการประกอบการให้สามารถแข่งขันได้ และผู้บริโภคมีความปลอดภัย ทั้งนี้รวมไปถึงวัคซีนหรือชีววัตถุสำหรับสัตว์อีกด้วย

**บทวิเคราะห์ / แนวคิด / ข้อเสนอ (แผนงาน / โครงการ ) ที่ผู้ประเมินจะพัฒนางาน**

วัคซีนสำหรับสัตว์เป็นตำรับยาแผนปัจจุบันที่เป็นชีววัตถุ ซึ่งอยู่ในความควบคุมของสำนักยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ผู้ผลิตต้องยื่นคำขอขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนปัจจุบันที่เป็นชีววัตถุ โดยจะต้องจัดทำเอกสารที่จำเป็นตามแบบ ขทย.3 ให้กับเจ้าหน้าที่ผู้ตรวจสอบ ซึ่งประกอบด้วยเอกสารที่สำคัญ ดังต่อไปนี้

- แบบคำขอขึ้นทะเบียนตำรับยา (ทย.1)

- คำขออนุญาตผลิตยาตัวอย่างเพื่อขอขึ้นทะเบียนตำรับยา (ผย.8)

- คำรับรองผู้ยื่นคำขอขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนปัจจุบันที่เป็นชีววัตถุ (ขทย.3)

- รูปถ่ายยาที่ขอขึ้นทะเบียนตำรับยาซึ่งแสดงลักษณะและสีของยาที่ชัดเจน

- เอกสารกำกับยาภาษาไทย และภาษาอังกฤษ (ถ้ามี)

- ฉลากยาทุกขนาดบรรจุ

- เอกสารแสดงข้อมูล Master formula จากผู้ผลิต

- เอกสาร Certificate of analysis Lot Release จากผู้ผลิต

- เอกสารการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานของยา เช่น Stability studies of finished product

- เอกสารแสดงสรรพคุณและความปลอดภัยของยา

เมื่อเจ้าหน้าที่ของสำนักยาได้รับเอกสารแล้วจะนำเข้าระบบตรวจสอบ และประสานกับหน่วยงานหรือบริษัทผู้ผลิต เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนสมบูรณ์ และนำเข้าสู่กระบวนการขึ้นทะเบียนต่อไป

**ผลที่คาดว่าจะได้รับ**

1. วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรม ได้รับทะเบียนตำรับยาแผนปัจจุบันที่เป็นชีววัตถุ
2. สร้างความมั่นใจให้กับเกษตรกรในการเลือกใช้วัคซีนชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงของกรมปศุสัตว์
3. เพิ่มยอดจำหน่ายจากการส่งออกสู่ตลาดต่างประเทศในอนาคต
4. มีวัคซีนเพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร ทำให้การควบคุมป้องกันโรคมีประสิทธิภาพ
5. ลดความสูญเสียในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร
6. ผู้บริโภคมีความปลอดภัยจากยาปฏิชีวนะตกค้างจากการรักษาสุกรที่เป็นโรค

**ตัวชี้วัดความสำเร็จ**

ได้รับทะเบียนตำรับยาแผนปัจจุบันที่เป็นชีววัตถุ จากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ลงชื่อ…………………………………………………..

(นางสาวนลินี หงษ์ชุมพล)

ผู้เสนอผลงาน

วันที่…..…./…………….../….……

## **การพิจารณาประเมินข้าราชการเพื่อคัดเลือกให้ส่งผลงานทางวิชาการ**

ชื่อ นางสาวนลินี หงษ์ชุมพล

ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการ ตำแหน่งเลขที่ 1284

ขอประเมินเพื่อขอรับเงินประจำตำแหน่ง

กลุ่มวิจัยและพัฒนา สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

### **การพิจารณา (คะแนนเต็ม 100 คะแนน)**

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

2. ข้อเสนอแนวคิด/วิธีการเพื่อพัฒนางานหรือปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

50 คะแนน ได้รับ ….......…คะแนน

**รวม** ….......…คะแนน

ลงชื่อ ............................................................................

(นายจาตุรนต์ พลราช)

ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

วันที่ .............../........................../...................

**หมายเหตุ** ผู้ที่ผ่านการประเมินต้องได้รับคะแนนไม่ต่ำกว่า 80 คะแนน