**เอกสารหมายเลข 1**

**แบบประเมินคุณสมบัติของบุคคล**

|  |
| --- |
| **ชื่อ นายอัตพงศ์ นาคะปักษิณ****ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ ชำนาญการ ตำแหน่งเลขที่ 1239****กลุ่มสัตว์ทดลอง สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์****กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์****อัตราเงินเดือน 54,430** **บาท (ปีงบประมาณ 2564)****ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง****ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ ชำนาญการพิเศษ ตำแหน่งเลขที่ 1239****กลุ่มสัตว์ทดลอง สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์****กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์** |

**เอกสารหมายเลข 3/1**

**ผลงานที่จะขอรับการประเมินเพื่อเลื่อนขึ้นแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งสูงขึ้น**

**1. ชื่อผลงาน** ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาคุณภาพไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะต่อการเพาะเลี้ยงไวรัสนิวคาสเซิล **ปีที่ดำเนินการ**  2564 - 2565

**2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการศึกษา**

ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ (Specific Pathogen Free egg, SPF egg) เป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตและทดสอบวัคซีนนิวคาสเซิล (OIE, 2019a) ฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ กลุ่มสัตว์ทดลอง สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) เป็นหน่วยงานที่เป็นผู้ผลิตไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ เพื่อเป็นวัตถุดิบให้กับฝ่ายผลิตและทดสอบวัคซีนชนิดต่างๆ เช่น วัคซีนนิวคาสเซิล วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ วัคซีนฝีดาษไก่ วัคซีนกาฬโรคเป็ด เป็นต้น โดยในแต่ละสัปดาห์สามารถผลิตไข่ได้ประมาณ 4,000 – 7,000 ฟอง ซึ่งเพียงพอต่อปริมาณความต้องการของฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก และหน่วยงานอื่นๆ เช่น ศูนย์ทดสอบและวิจัยชีววัตถุสำหรับสัตว์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โดยไข่ที่เก็บจากโรงเรือนไก่จะถูกนำมาแช่เย็นในห้องเย็นที่มีอุณหภูมิ 15 - 18 ๐C (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ก) ปกติฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะจะเก็บไข่ไว้ในห้องเย็นไม่นานเกินกว่า 7 วัน ก็จะนำไปเข้าตู้ฟักที่อุณหภูมิ 37๐C นาน 7 วัน ก่อนนำไปส่องคัดให้ได้ไข่เชื้อเป็น (Embryonated egg) ส่งไปให้ฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีกใช้งาน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ข) แต่หากเก็บไข่ไก่ไว้ในห้องเย็นนานเกินไป เนื่องจากโรงงานผลิตวัคซีนไม่พร้อมใช้งาน หรือมีการหยุดรับไข่เป็นระยะเวลานาน จะทำให้ไข่ที่เก็บไว้รอการฟัก เมื่อนำไปฟักแล้วจะมีอัตราการฟักต่ำกว่า 80% (ติดต่อส่วนตัว) และเมื่อส่งไข่ไก่ฟักอายุ 7 วัน ไปให้ฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีกดำเนินการในขั้นตอนต่อไป คือ การฉีดเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัส จะพบว่ามีตัวอ่อนในไข่ตายหลังจากการฉีดเชื้อ 24 ชั่วโมง สูงกว่า 30% ซึ่งปกติไม่ควรตายเกิน 10 – 20% (ติดต่อส่วนตัว) แสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนในไข่ที่ได้รับไปนั้นไม่แข็งแรง ทำให้เกิดความสูญเสียแก่ทางราชการ จากข้อมูลเบื้องต้น ผู้วิจัยต้องการศึกษาจำนวนวันที่เหมาะสมที่สามารถเก็บไข่ไว้ในห้องเย็นโดยมีอัตราการฟักไม่ต่ำกว่า 80% (ติดต่อส่วนตัว) และเมื่อนำไข่ฟักไปฉีดเชื้อ ต้องมีอัตราการตายหลังฉีด 24 ชั่วโมง ไม่เกิน 20% (ติดต่อส่วนตัว)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาไข่ SPF ที่เหมาะสมในการนำไปผลิตไวรัสวัคซีนนิวคาสเซิล เพื่อนำไปผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลและวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ซึ่งเป็นวัคซีนที่มีปริมาณการผลิตมากที่สุด คิดเป็น 70% ของปริมาณการผลิตวัคซีนสัตว์ปีกทั้งหมด เพื่อให้สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตวัคซีนให้เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร

**3.**  **วัตถุประสงค์ในการศึกษา**

* 1. เพื่อหาปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลที่ได้จากไข่ไก่ฟัก SPF เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 15-18 ๐C ในระยะเวลาต่างๆ กัน
	2. เพื่อหาอัตราการฟักของไข่ไก่ SPF เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 15-18 ๐C ในระยะเวลาต่างๆ กัน

**4.**  **ความรู้ทางวิชาการหรือแนวคิดหรือหลักทฤษฎีที่ใช้ในการดำเนินการ**

4.1 โรคนิวคาสเซิล และวัคซีนป้องกันโรค

โรคนิวคาสเซิล เป็นโรคติดต่อในสัตว์ปีกที่แพร่ระบาดเป็นวงกว้างทั่วโลก (Farkas *et al*., 2009) ก่อให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก มีผลกระทบสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ เกิดจากเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล (Newcastle Disease Virus; NDV) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม avian paramyxoviruses (APMV) จัดอยู่ใน genus Avulavirus subfamily Paramyxoviri­nae family Paramyxoviridae order Mononegaviralesเชื้อไวรัส avian paramyxoviruses แบ่งออกได้เป็น 10 ซีโรไทป์ (APMV-1 ถึง APMV-10) (OIE, 2019a) เป็นโรคที่ติดต่อได้ง่ายทำให้สัตว์ปีกตายอย่างฉับพลันจำนวนมาก การทำวัคซีนเป็นหนึ่งในวิธีที่ช่วยลดความรุนแรงของโรคได้ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ มีบทบาทในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล เชื้อเป็น สเตรนลาโซตา เพื่อใช้ในการควบคุมป้องกันโรคนิวคาสเซิลให้กับสัตว์ปีกของเกษตรกรในประเทศไทย โดยวัคซีนนิวคาสเซิลมีวิธีการผลิตที่ได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีจาก บริษัท LOHMANN โดยมีกระบวนการ ดังนี้ 1. การฉีดเชื้อไวรัส Newcastle Disease Virus เข้าในไข่ไก่ฟัก SPF โดยใช้มือ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559ก) 2. การฟักไข่หลังจากการฉีดเชื้อไวรัส Newcastle Disease Virus (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559ข) 3. การส่องคัดไข่ภายหลังฉีดเชื้อไวรัส Newcastle Disease Virus ในไข่ไก่ฟัก SPF (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559ค) 4. การเปิดเปลือกไข่เพื่อเก็บไวรัส Newcastle Disease Virus (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559ง) 5. การเก็บไวรัส Newcastle Disease Virus โดยใช้มือ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559จ) ก่อนจะนำไปสู่กระบวนการทำวัคซีนต่อไป

4.2 ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาไข่ (Cobb-Vantress, 2013)

การวัดความสำเร็จของโรงฟักไข่แต่ละแห่งนั้น คือ ปริมาณของไข่ที่ผลิตออกมาอย่างมีคุณภาพ ซึ่งแสดงให้เห็นจากอัตราการฟักของไข่ทั้งหมดที่นำเข้าตู้ฟัก อัตราการฟัก (Hatchability) ได้รับอิทธิพลจากหลายๆ ปัจจัย เช่น หากเป็นปัจจัยที่มาจากฟาร์มไก่เท่านั้น ได้แก่ ความสามารถในการสืบพันธุ์ (Mating Activity) โภชนาการของพ่อแม่พันธุ์ โรคสัตว์ เป็นต้น และหากเป็นปัจจัยที่มาจากโรงฟักไข่เท่านั้น ได้แก่ การฟักไข่โดยใช้ตู้ฟักไข่ อัตราการฟัก เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามอาจจะมีปัจจัยร่วมจากทั้งสองแหล่งก็เป็นไปได้ ได้แก่ ความเสียหายของไข่ การเก็บรักษาไข่ การทำความสะอาดไข่ เป็นต้น ดังนั้น ฟาร์มพ่อแม่พันธุ์จึงมีอิทธิพลสำคัญต่อโรงฟักไข่ จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ฟาร์มและโรงฟักไข่จะต้องร่วมกันทำงานอย่างใกล้ชิด เนื่องจากโรงฟักไข่ไม่ได้มีอิทธิพลต่อการผสมติด ดังนั้น ความสำคัญต่อการที่ไข่ฟักเป็นตัว (Hatch of Fertile) จึงขึ้นอยู่กับอัตราการฟัก (Hatchability) เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวนั้น เป็นตัววัดความมีประสิทธิภาพของเครื่องจักรที่ใช้ในโรงฟักไข่ การฟักเป็นตัวจึงต้องคำนึงถึงอัตราการผสมติดของฝูงไก่เท่าๆ กับอัตราการฟักเช่นกัน

อัตราการฟักที่เหมาะสม และคุณภาพของลูกไก่ สามารถทำให้ดีขึ้นได้ เมื่อไข่ไก่ถูกจัดการด้วยเงื่อนไขที่เหมาะสมในระหว่างที่วางไข่และนำไข่ไปฟักในตู้ฟัก จงจำไว้ว่าไข่ที่มีเชื้อจะประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีชีวิตจำนวนมาก เมื่อไข่ได้ถูกวางแล้วหากไม่จัดการให้เหมาะสม จัดการไข่ฟักไม่ดีจะทำให้ผลการฟักแย่ลงอย่างรวดเร็ว เช่น ในกระบวนการเก็บไข่จากกรง คัดไข่ และเก็บไข่ในห้องเย็น ซึ่งการเก็บไข่ที่คัดแล้ว ควรแยกไปอีกห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้น จุดสำคัญในการเก็บรักษาไข่ (Key points on egg storage) ไข่ไก่จะต้องถูกเก็บจากฟาร์มและขนส่งมายังโรงฟักอย่างน้อยสัปดาห์ละสองครั้ง (ฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ จะเก็บไข่และส่งมายังโรงฟักวันละครั้ง) ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีจุดที่เก็บไข่อยู่ 3 จุด คือ ห้องเก็บไข่ที่ฟาร์ม รถขนส่งไข่ และห้องเก็บไข่ในโรงฟัก มันเป็นเรื่องสำคัญที่ต้องมีการจัดการให้ไข่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งการออกแบบสภาพการเก็บไข่ในห้องเย็นต้องช่วยให้ลดการสูญเสีย โดยจัดทำแผงใส่ไข่หรือกล่องบรรจุไข่ที่ช่วยให้อุณหภูมิของไข่ลดลงและแห้ง ป้องกันไม่ให้เกิดหยดน้ำและเชื้อราเกิดขึ้นที่ผิวเปลือกไข่ และจะต้องไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความชื้นที่กะทันหันหรือรุนแรง และต้องระมัดระวังไม่ให้เกิดความผันผวนของอุณหภูมิในขณะที่ขนส่งและเก็บไข่ในห้องเย็น ในระหว่างขนส่งไข่จากฟาร์มมาเก็บยังห้องเย็นจะต้องค่อยๆ ลดอุณหภูมิลง ในทางตรงข้าม เมื่อย้ายไข่ที่เก็บในห้องเย็นไปตู้ฟักจะต้องค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิขึ้น ดังนี้ แม่ไก่ 40-41 ๐C 🡪 ห้องเลี้ยงไก่ 24-29 ๐C 🡪 ห้องเก็บไข่ในฟาร์ม 21-24 ๐C 🡪 รถขนส่งไข่ 20-23 ๐C 🡪 ห้องเย็นเก็บไข่ในโรงฟัก 15-18 ๐C 🡪 บริเวณเพิ่มอุณหภูมิก่อนเข้าตู้ฟัก 24-27 ๐C 🡪 ตู้ฟักไข่ 37.5-37.8 ๐C หรือ 99.5-100 ๐F

ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการเก็บไข่นั้น มีความสัมพันธ์กันระหว่างระยะเวลาการเก็บไข่และอุณหภูมิกับความชื้นที่เหมาะสมสำหรับอัตราการฟัก โดยมีหลักเกณฑ์ว่าถ้าเก็บไข่ไว้ในห้องเย็นยิ่งนาน จะต้องใช้อุณหภูมิในห้องเย็นต่ำลงเท่านั้น ดังแสดงในตาราง

|  |
| --- |
| ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บไข่ไว้ในห้องเย็น |
| (Optimum temperature range for egg storage) |
| อุณหภูมิ (๐C) | ระยะเวลาการเก็บ (วัน) |
| 19 - 26 | 0 |
| 15 - 19 | 3 |
| 13 - 17 | 6 |
| 12 - 15 | 9 |
| 11 - 14 | 12 |
| 11 - 13 | 15 |
| 11 - 13 | 18 |

ที่มา : COBB Hatchery Management Guide. cobb-vantress.com, L-1030-04, November 1, 2013. Pp. 1 - 7.

ผลกระทบที่สำคัญในการเก็บไข่ ได้แก่ 1) การเก็บไข่ในห้องเย็นที่นานขึ้น จะทำให้ระยะเวลาการฟักของไข่เพิ่มขึ้น โดยเฉลี่ยการเก็บไว้นาน 1 วัน จะทำให้ระยะเวลาการฟักเพิ่มขึ้น 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเรื่องที่จะต้องคำนึงถึงเมื่อจะนำไข่เข้าฟัก ไข่สดและไข่ที่เก็บมาในระยะเวลาหนึ่ง ควรจะเข้าฟักในเวลาที่ต่างกัน 2)อัตราการฟักจะถูกกดไว้โดยการเก็บไข่ที่นานออกไป จะมีผลกระทบเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บไข่นานเกิน 6 วัน มีผลให้สูญเสียอัตราการฟัก 0.5 – 1.5% ต่อวัน ซึ่งเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการยืดอายุเก็บไข่นานออกไป 3) การเก็บไข่ในห้องเย็นเป็นระยะเวลานาน 14 วันขึ้นไป จะทำให้คุณภาพของลูกไก่ที่ได้จากไข่ชุดนี้กระทบกับน้ำหนักที่ลดลงไป และ 4) การแลกเปลี่ยนของก๊าซผ่านรูที่เปลือกไข่ที่ปรากฏขึ้นในระหว่างเก็บไว้ในห้องเย็น เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผ่านออกมาจากเปลือกไข่ และความเข้มข้นของก๊าซลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก ภายหลังการวางไข่ นอกจากนั้น ไข่ยังสูญเสียน้ำไปในขณะที่เก็บอยู่ในห้องเย็น การสูญเสียทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเป็นเหตุให้อัตราการฟักและคุณภาพของลูกไก่ลดลงหลังจากการเก็บไว้ในห้องเย็น

**5. วิธีการหรือขั้นตอนการศึกษา**

 ขั้นตอนที่ 1 : การเก็บรักษาและฟักไข่

* 1. นำไข่ที่คัดและฆ่าเชื้อตามกรรมวิธีของการผลิตไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ จำนวน 100 ฟองต่อวัน ใส่แผงพลาสติกสำหรับบรรจุไข่ จำนวน 100 ฟองต่อแผง ใส่รถบรรจุไข่ที่ตั้งอยู่ในห้องเย็นอุณหภูมิ 15-18 ๐C ดำเนินการโดยวิธีนี้ จนถึงวันที่ 29 (ในวันที่ 29 ไข่ที่คัดแล้วไม่ได้แช่เย็น) จะได้ไข่ที่เก็บไว้ในห้องเย็น ระยะเวลา 0-28 วัน จำนวน 29 แผง รวมเป็นไข่ต่อชุดการทดลอง จำนวน 2,900 ฟอง แล้วนำไข่ทั้งหมดเข้าตู้ฟักพร้อมกัน
	2. เตรียมตู้ฟักไข่ โดยล้างและฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อโรค ตั้งอุณหภูมิ 37 ๐C ความชื้นสัมพัทธ์ 85% ระดับการหมุนเวียนอากาศ เท่ากับ 1 ไว้ล่วงหน้า 1 วัน และไข่แต่ละแผงที่เตรียมไว้ตามวันที่กำหนด จะต้องนำมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 ๐C ประมาณ 12 ชั่วโมงก่อนนำเข้าตู้ฟัก
	3. เมื่อไข่เข้าตู้ฟักนานครบ 7 วัน นำไข่ที่ฟักไว้มาส่องคัดเฉพาะไข่เชื้อเป็น (embryonated eggs) บรรจุบนแผงกระดาษใส่ไข่ แล้วบรรจุใส่กล่องกระดาษปิดฝาให้มิดชิด บันทึกผลการส่องคัดไข่
	4. ขนส่งไข่ฟักไปที่ฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีกโดยใช้รถขนส่งที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ๐C ทำการรมควันไข่ด้วย ฟอร์มาลดีไฮด์ แล้วนำไข่เข้าฟักที่ตู้ฟักไข่อุณหภูมิ 37 ๐C ความชื้น 66-70 % ครบอายุ 11 วัน นำไข่ไปส่องคัดไข่เป็นแล้วนำไปฉีด seed virus Newcastle วันละ 30 ฟอง บันทึกผล

ขั้นตอนที่ 2 การหาปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลในไข่ไก่ฟักที่เก็บในระยะเวลาต่างๆ กัน

* 1. ไข่ที่ผ่านการส่องคัด นำมาฉีดด้วยด้วย seed virus Newcastle strain La Sota ปริมาณ 104 EID50/0.1 มล. เข้าใน allantoic cavity แล้วนำเข้าฟักต่อในตู้ฟักไข่ที่ตั้งอุณหภูมิ 37 ๐C ความชื้นสัมพัทธ์ 66-70 %
	2. เมื่อครบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ให้นำไปส่องคัดแยกไข่ตายทิ้ง จนครบ 72 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการส่องคัด และนำไข่เป็นที่เหลือ chill ที่ 4 ๐C นาน 12 ชั่วโมง
	3. เมื่อ chill ครบ 12 ชั่วโมง ให้นำไข่ออกมา harvest เก็บ allantoic fluid และบันทึกผลการปฏิบัติงาน
	4. นำตัวอย่าง allantoic fluid ทดสอบความปลอดเชื้อของเชื้อรา และแบคทีเรียของวัคซีนในกระบวนการผลิต (sterility test) (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559ฉ) (OIE, 2019b)
		1. ดูดตัวอย่าง allantoic fluid ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงใน Fluid Thioglycollate Medium, Tryptic Soy Broth และ Sabouraud 2% Dextrose Broth และ ดูดตัวอย่าง allantoic fluid ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงใน Blood Agar Base เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ
		2. นำ Fluid Thioglycollate Medium และ Tryptic Soy Broth จำนวน 2 หลอด ต่อ ตัวอย่าง allantoic fluid 1 ตัวอย่าง นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 – 37๐C นาน 14 วัน Blood Agar Base จำนวน 2 เพลท ต่อ ตัวอย่าง allantoic fluid 1 ตัวอย่าง นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 – 37๐C นาน 2 วัน สำหรับ Sabouraud 2% Dextrose Broth, Fluid Thioglycollate Medium และ Tryptic Soy Broth จำนวน 2 หลอด ต่อ ตัวอย่าง allantoic fluid 1 ตัวอย่าง นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 20 – 25๐C นาน 14 วัน
		3. บันทึกผล (+) หมายถึง มีเชื้อเจริญ (-) หมายถึง ไม่มีการเจริญ
	5. นำตัวอย่าง allantoic fluid ทดสอบหาปริมาณไวรัส (virus titration) (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559ช) (OIE, 2019b)
		1. นำตัวอย่าง allantoic fluid มาทำ 10 fold dilution ตั้งแต่ dilution ที่ 10-1 ถึง 10-10 โดยใช้ ตัวอย่าง allantoic fluid 0.5 มิลลิลิตร และสารละลาย PBS 4.5 มิลลิลิตร
		2. นำ dilution ที่ 10-7 ถึง 10-10 มาฉีดเข้าทาง allantoic cavity ของไข่ไก่ฟัก dilution ละ 5 ฟองๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร และ ฉีดสารละลาย PBS เข้าทาง allantoic cavity ของไข่ไก่ฟัก จำนวน 5 ฟองๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร เป็นกลุ่มควบคุม นำไข่ทั้งหมดเข้าตู้ฟักที่อุณหภูมิ 37๐C เป็นเวลา 7 วัน โดยทำการส่องคัดไข่ตายทุกวันและทำการบันทึกผลจนครบกำหนด
		3. ไข่ที่ตายภายใน 24 ชั่วโมงนั้น ให้ทำการคัดทิ้ง ส่วนไข่ที่ตายในวันถัดมาให้รวบรวมเข้าตู้เย็นที่ 2 – 8๐C โดยแต่ละ dilution จะต้องเหลือไข่อย่างน้อย 4 ฟอง หลังจาก 24 ชั่วโมงแรก
		4. เมื่อครบกำหนด 7 วัน นำไข่ทั้งหมดมาตรวจหาไวรัสโดยวิธี Rapid plate haemagglutination test บันทึกผลบวกและลบในแต่ละฟอง
		5. นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไวรัสโดยวิธี Reed and Muench หรือ Spearman Karber โดยไข่ที่ตายในวันแรกจะไม่นำมาคิดคำนวณ
		6. ตัวอย่าง allantoic fluid ที่ผ่านการทดสอบจะต้องมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 106.0 EID50/dose

ขั้นตอนที่ 3 ทำการทดลองซ้ำ อีก 2 ครั้ง ตั้งแต่ข้อ 1.1–2.5 แล้วนำข้อมูลที่บันทึกไว้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ผล และสรุผล

**6**.  **ผู้ดำเนินการ 100% ประกอบด้วย**

(1) (ผู้เสนอผลงาน) นายอัตพงศ์ นาคะปักษิณ สัดส่วนผลงาน 80%

(2) (ผู้ร่วมดำเนินการ) นายสุรพัฒน์ เลาหวณิช สัดส่วนผลงาน 20%

**7. ระบุรายละเอียดเฉพาะงานในส่วนที่ผู้ขอรับการประเมิน เป็นผู้ปฏิบัติ (สัดส่วนผลงาน 80%)**

 มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

* นำไข่ที่คัดและฆ่าเชื้อตามกรรมวิธีของการผลิตไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ จำนวน 100 ฟองต่อวัน ใส่แผงพลาสติกสำหรับบรรจุไข่ จำนวน 100 ฟองต่อแผง ใส่รถบรรจุไข่ที่ตั้งอยู่ในห้องเย็นอุณหภูมิ 15-18 ๐C ดำเนินการโดยวิธีนี้ จนถึงวันที่ 29 (ในวันที่ 29 ไข่ที่คัดแล้วไม่ได้แช่เย็น) จะได้ไข่ที่เก็บไว้ในห้องเย็น ระยะเวลา 0-28 วัน จำนวน 29 แผง รวมเป็นไข่ต่อชุดการทดลอง จำนวน 2,900 ฟอง แล้วนำไข่ทั้งหมดเข้าตู้ฟักพร้อมกัน
* เตรียมตู้ฟักไข่ โดยล้างและฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อโรค ตั้งอุณหภูมิ 37 ๐C ความชื้นสัมพัทธ์ 85% ระดับการหมุนเวียนอากาศ เท่ากับ 1 ไว้ล่วงหน้า 1 วัน และไข่แต่ละแผงที่เตรียมไว้ตามวันที่กำหนด จะต้องนำมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 ๐C ประมาณ 12 ชั่วโมงก่อนนำเข้าตู้ฟัก
* เมื่อไข่เข้าตู้ฟักนานครบ 7 วัน นำไข่ที่ฟักไว้มาส่องคัดเฉพาะไข่เชื้อเป็น (embryonated eggs) บรรจุบนแผงกระดาษใส่ไข่ แล้วบรรจุใส่กล่องกระดาษปิดฝาให้มิดชิด บันทึก วิเคราะห์และสรุปผลการส่องคัดไข่
* ขนส่งไข่ฟักไปที่ฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีกโดยใช้รถขนส่งที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ๐C ทำการรมควันไข่ด้วย ฟอร์มาลดีไฮด์ แล้วนำไข่เข้าฟักที่ตู้ฟักไข่อุณหภูมิ 37 ๐C ความชื้น 66-70 % ครบอายุ 11 วัน นำไข่ไปส่องคัดไข่เป็นแล้วนำไปฉีด seed virus Newcastle วันละ 30 ฟอง บันทึกผล
* ไข่ที่ผ่านการส่องคัด นำมาฉีดด้วยด้วย seed virus Newcastle strain La Sota ปริมาณ 104 EID50/0.1 มล. เข้าใน allantoic cavity แล้วนำเข้าฟักต่อในตู้ฟักไข่ที่ตั้งอุณหภูมิ 37 ๐C ความชื้นสัมพัทธ์ 66-70 %
* เมื่อครบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ให้นำไปส่องคัดแยกไข่ตายทิ้ง จนครบ 72 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการส่องคัด และนำไข่เป็นที่เหลือ chill ที่ 4 ๐C นาน 12 ชั่วโมง
* เมื่อ chill ครบ 12 ชั่วโมง ให้นำไข่ออกมา harvest เก็บ allantoic fluid และบันทึกผลการปฏิบัติงาน

**8. ประ­โยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (กรณีเป็นผลงานที่อยู่ระหว่างการศึกษา)**

* 1. หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

8.1.1 ฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ กลุ่มสัตว์ทดลอง สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

8.1.2 ฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก

8.1.3 ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก

8.1.4 ฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด

8.1.5 ผู้ที่เกี่ยวข้องนำไปใช้อ้างอิง

**9. ระบุผลสำเร็จของงานหรือผลการศึกษา (กรณีเป็นผลงานที่ดำเนินการเสร็จแล้ว)**

-

**10. ความยุ่งยากในการดำเนินการ/ปัญหา/อุปสรรค**

10.1 การเก็บไข่เพื่อทดลองเป็นจำนวนมาก ทำให้ต้องจัดเตรียมอุปกรณ์และพื้นที่ให้พอเหมาะและไม่ทำให้กระทบกับการผลิตในเวลาปกติ

10.2 การระบุไข่แต่ละกลุ่มทดลอง แต่ละชุดการผลิต ที่มีจำนวนมาก จะต้องมีความละเอียดแม่นยำ พร้อมทั้งการบันทึกข้อมูลต้องตรงกับชุดทดลองแต่ละชุด

**11. การนำไปใช้ประโยชน์หรือคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ผลผลิต (Output) | ผลลัพธ์ (Outcome) | ผลกระทบ (Impact) |
| 1. ทราบอัตราการฟักไข่ที่เก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 15-18 ๐C ในระยะเวลาต่างๆ กัน2. ทราบปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลที่ผลิตได้จากไข่ไก่ฟักที่เก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 15-18 ๐C ในระยะเวลาต่างๆ กัน | 1. นำผลการศึกษาที่ได้ไปทดแทนการผลิตไข่ SPF สำหรับการผลิตไวรัสนิวคาสเซิลได้อย่างเหมาะสม2. สามารถคำนวณปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลได้พอสังเขปจากระยะเวลาการเก็บไข่ฟักแต่ละชุดของการผลิตไข่ SPF ที่ส่งให้ฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก3. นำข้อมูลที่ได้ไปต่อยอดในการวิจัยเพิ่มเติม  | 1. ลดต้นทุนการผลิตวัคซีน2. เพิ่มปริมาณการผลิตวัคซีนได้มากขึ้น    |

ขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

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

( นายอัตพงศ์ นาคะปักษิณ )

ผู้เสนอผลงาน

...................../................................/......................

ขอรับรองว่าสัดส่วนหรือลักษณะงานในการดำเนินการของผู้เสนอข้างต้นถูกต้องตรงกับความจริงทุกประการ

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

 ( นายสุรพัฒน์ เลาหวณิช )

 ผู้ร่วมดำเนินการ

 ..................../................................/........................

ได้ตรวจสอบแล้วขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นถูกต้องตรงกับความเป็นจริงทุกประการ

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

( นายจาตุรนต์ พลราช )

ตำแหน่ง ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

.................../................................/..................

**เอกสารหมายเลข 3/2**

**ผลงานที่จะขอรับการประเมินเพื่อเลื่อนขึ้นแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งสูงขึ้น**

**1. ชื่อผลงาน** ศึกษาเปรียบเทียบเทียบปริมาณไวรัสฝีดาษไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในไข่ไก่ฟักและการเพาะเลี้ยงในเซลล์คัพภะไก่

**ปีที่ดำเนินการ**  2564

**2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการศึกษา**

วัคซีนฝีดาษไก่ที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์อยู่ในปัจจุบันเป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็น ผลิตจากการใช้ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะอายุ 9-12 วัน โดยฉีด working seed virus เข้าไปในเยื่อบุของไข่ไก่ฟักและเชื้อจะเพิ่มจำนวนทำให้สามารถสังเกตพบรอยโรคภายใน 5-7 วัน จากนั้นเก็บเอาเยื่อที่มีรอยโรคไปทำการทดสอบคุณภาพหากผ่านการทดสอบก็นำไปเตรียมเป็น Bulk Vaccine ผ่านกระบวนการทำแห้งวัคซีน ทำการทดสอบคุณภาพวัคซีนในขั้นสุดท้าย และนำส่งให้กรมปศุสัตว์กระจายให้เกษตรกรนำไปใช้ วัคซีนมีอายุการเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส 1 ปี มีความคุ้มโรคภายหลังจากการทำวัคซีน 1 ปี

แต่เดิมการผลิตวัคซีนฝีดาษไก่โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ มักประสพปัญหาเนื่องจากเทคนิคในการผลิตมีความยุ่งยากในการทำช่องอากาศเทียม(Artificial air sac) และมักพบการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการผลิตเกิดความสูญเสีย ทำให้การผลิตวัคซีนไม่ทันกับความต้องการใช้ในพื้นที่อีกทั้งยังมีการใช้สัตว์ทดลองในการผลิตจำนวนมาก (ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะอายุ 9 วัน)

ในช่วงเวลาที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการผลิตวัคซีนฝีดาษไก่โดยการเพาะบนเนื้อเยื่อ พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตและตรวจพบ Cytopathic Effect (CPE) ตั้งแด่วันที่ 3 และพบถึง 100% ในวันที่ 5 และสามารถนำไปผลิตเป็นวัคซีนในระดับห้องทดลอง (Lab scale) ผ่านการทดสอบคุณภาพ โดย นันทนา และคณะ (2535) ดังนั้นจึงมีโอกาสในการพัฒนาต่อยอดในการผลิตในระดับ Pilot scale และในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้ในภารกิจของกรมปศุสัตว์ต่อไป

**3.**  **วัตถุประสงค์ในการศึกษา**

3.1 เพื่อหาปริมาณไวรัสฝีดาษไก่ที่ได้จากการผลิตด้วยไข่ไก่ฟัก เปรียบเทียบกับการผลิตจากเซลล์ตัวอ่อนไข่ไก่ฟัก

3.2 เพื่อทดลองผลิตวัคซีนฝีดาษไก่จากเซลล์ตัวอ่อนไข่ไก่ฟักในระดับ Lab scaleและ Industrial scale

**4.**  **ความรู้ทางวิชาการหรือแนวคิดหรือหลักทฤษฎีที่ใช้ในการดำเนินการ**

โรคฝีดาษไก่เป็นโรคติดต่อในไก่และไก่งวง เกิดจากเชื้อไวรัสชนิด DNA virus genus Avipoxvirus family Poxviridae สามารถแพร่ระบาดได้ทั่วไป จากการสัมผัสโดยตรงกับบาดแผลหรือผ่านจากยุงที่สัมผัสไก่ที่เป็นโรค อาการที่พบโดยทั่วไปทำให้เกิดรอยโรคได้ที่บริเวณผิวหนัง (Cutaneous form) รอยโรคที่เกิดบริเวณระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินหายใจ (Diphtheritic form) ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อตัวไก่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลงจนกระทั่งติดเชื้อแทรกซ้อนตายได้ระยะฟักตัวของโรคประมาณ 4-10 วัน การแยกเชื้อสามารถทำได้จากการขูดผิวหนังที่มีรอยโรคหรือดูจากการเกิด epithelial hyperplasia with intracytoplasmic inclusions bodies จากการใช้วิธี Gimenez method การควบคุมและป้องกันโรคทำได้โดยการให้วัคซีนโดยการแทงปีก

เชื้อไวรัสฝีดาษไก่ เป็น DNA virus มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายก้อนอิฐ มีขนาดประมาณ 330 x 280 x 200 nm. พบการระบาดได้ทั่วไป ในประเทศไทยมักพบในฟาร์มเลี้ยงไก่ที่มีการจัดการไม่ดี มีการเลี้ยงที่แออัดและมีสัตว์ที่เป็นพาหะชุกชุม สามารถทดสอบทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี virus neutralization, agar gel immunodiffusion, immunofiuorescence, หรือ enzyme-linked immunosorbent assayสามารถแยกเชื้อได้จากการขูดผิวหนังที่มีวิการของฝีที่เกิดขึ้นโดยเตรียมเป็น suspension ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะที่มีปริมาณเหมาะสม แล้วฉีดเข้าใน chorioallantoic membranes (CAMs) ของไข่ไก่ฟักอายุ 9-12 วัน หรือ ใน cell culture และต้องมีการทดสอบความปราศจากเชื้อของ suspension ที่นำมาฉีดเพื่อป้องกันความผิดพลาด จากนั้นนำไข่เข้าฟักต่อที่อุณหภูมิ 37๐C เป็นเวลา 5-7 วัน ทำการทดสอบดูความหนาของ CAMs หรือทำการย้อมสีเพื่อดู intracytoplasmic inclusion bodies

กระบวนการผลิตวัคซีนจะต้องผลิตจาก master seed virus ที่มีการทดสอบการปราศจากเชื้อปนเปื้อน และผลิตจากไข่ปราศจากเชื้อเฉพาะ (specific pathogens free, SPF) โดยจะใช้ไข่หรือ cell culture เช่น primary chicken embryo fibroblasts, chicken embryo kidney หรือ chicken embryo dermis วัคซีนที่ผลิตจะต้องผ่านการทดสอบ sterility, identity, safety และ potency การขอขึ้นทะเบียนวัคซีนจะต้องมีข้อมูลการทดสอบครบทุกรายการ จำนวน 3 ชุดการผลิตต่อเนื่อง จำนวนการผลิตต้องไม่น้อยกว่า 1 ใน 3 ของชุดการผลิตจริง

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาการผลิตวัคซีนฝีดาษไก่โดยการเพาะบนเนื้อเยื่อ โดยนันทนาและคณะ(2535) ได้เพาะไวรัสบนเซลล์ตัวอ่อนไข่ไก่ฟักที่ได้จากฟาร์มเอกชน โดยใช้ความเข้มข้นของไวรัสฝีดาษไก่ 106EID50/ml. พบว่าเกิดCytopathic Effect (CPE) ตั้งแด่วันที่ 3 และพบถึง 100% ในวันที่ 5 และสามารถนำไปผลิตเป็นวัคซีนในระดับห้องทดลอง (Lab scale) และผ่านการทดสอบคุณภาพ

**5. วิธีการหรือขั้นตอนการศึกษา**

สัตว์ทดลอง

 ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ (specific pathogens free, SPF) อายุ 9-12 วัน

เชื้อไวรัส

 Working seed Fowl Pox 1 passage Local strain ความเข้มข้น 106EID50/ml.

Primary cell culture

 เตรียมจากไข่ไก่ฟัก SPF อายุ 10 วัน ตามวิธีชอง “Youngner” ใช้สารประกอบ M199 with Earle’s salt 9% เป็น growth medium และ M199 4.7% เป็น maintenance medium

5.1 การเพาะในไข่ไก่ฟัก SPF

 5.1.1 เตรียม working seed virus (WSV) โดยใช้ seed virus จากฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก

 5.1.2 เตรียมไข่ไก่ฟัก SPF อายุ 9 วัน ส่องคัดไข่ตายออก นำไข่ฟักที่อุณหภูมิ 370C

 5.1.3 เมื่อฟักไข่ครบ 12 วัน ส่องคัดไข่ตายออก ไข่เป็นฉีด WSV เข้าในช่องอากาศเทียมที่สร้างขึ้น ปริมาณ 0.1 ml.

 5.1.4 ส่องคัดไข่ตายออกตามเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

 5.1.5 เก็บเยื่อ CAMs จากไข่

 5.1.6 ทำการ homogenization เยื่อ CAMs แล้วนำไปปั่นแยกตะกอน เอาแต่น้ำ supernatant ส่งเพื่อทดสอบ sterility และ virus titer

5.2 การเพาะเชื้อใน Chicken embryo fibroblasts

 5.2.1เตรียม Chicken embryo fibroblasts จากไข่ไก่ฟัก SPF อายุ 10 วัน ตามวิธีการของ “Youngner” (1954).

 5.2.2 เพาะเซลล์ในขวดขนาด 75 cm2เพื่อเตรียมเป็น monolayer เพื่อลงเชื้อที่อุณหภูมิ 37๐C ใช้เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะของเซลล์โดยกล้องจุลทรรศน์

 5.2.3 เตรียม working seed virus (WSV) โดยใช้ seed virus จากฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก

 5.2.4 เท growth medium ออก แล้วใส่เชื้อ ลงในเซลล์ monolayer ที่เตรียมไว้ เติม maintenance medium

 5.2.5 บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37๐C 5% CO2 ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ทุกวันจนครบ incubation period 96 ชั่วโมง ขวดที่พบการเปลี่ยนแปลง 95-100 % ให้นำไปเก็บที่ตู้แช่ -400C

 5.2.6 เก็บไวรัสจากขวด โดยนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลาย เทน้ำออกมารวบรวมทำการปั่นแยกตะกอนใช้ความเร็ว 2,000 รอบ เอาแต่น้ำ supernatant ส่งเพื่อทดสอบ sterility และ virus titer

5.3 การทดสอบคุณภาพวัคซีน

5.3.1 Sterility test ตามมาตรฐานวิธีการทดสอบของฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก SOP-QCP-102 หน้า 1-4

5.3.2 Safety test ตามวิธีการของ ตามมาตรฐานวิธีการทดสอบของฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก SOP-QCP-092 หน้า 1-4

5.3.3 Potency test ตามวิธีการของ OIE (2019) ตามมาตรฐานวิธีการทดสอบของฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก SOP-QCP-096 หน้า 1-4

5.3.4 Moisture Test ตามมาตรฐานวิธีการทดสอบของฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด SOP-QCSD-004 หน้า 1-3

5.3.5 Physical property ตามมาตรฐานวิธีการทดสอบของฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก SOP-QCR-022 หน้า 1-4

5.3.6 Mycoplasma test ตามมาตรฐานวิธีการทดสอบของฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก SOP-QCR-019 หน้า 1-10

5.3.7 Virus titration ตามมาตรฐานวิธีการทดสอบของฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก SOP-QCP-089 หน้า 1-4

5.4 การทดลองผลิตวัคซีนในระดับ Pilot scale โดยใช้สูตรผสม Bulk Vaccine 1 ส่วน ต่อ Stabilizer (0.3% PVP และ 10% Lactose) 1 ส่วน ใช้เวลา 30 ชั่วโมงในการทำแห้งวัคซีน ตามมาตรฐานวิธีปฏิบัติงานของฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก SOP-FD/006 หน้า 1 SOP-FD/007 หน้า 1 SOP-FD/008 หน้า 1

5.5 การวิเคราะห์ข้อมูล เปรียบเทียบเทียบปริมาณไวรัสฝีดาษไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในไข่ไก่ฟักและการเพาะเลี้ยงในเซลล์คัพภะไก่การทดสอบคุณภาพวัคซีน

**6**.  **ผู้ดำเนินการ 100% ประกอบด้วย**

(1) (ผู้เสนอผลงาน) นายสุรพัฒน์ เลาหวณิช สัดส่วนผลงาน 80%

(2) (ผู้ร่วมดำเนินการ) นายอัตพงศ์ นาคะปักษิณ สัดส่วนผลงาน 20%

**7. ระบุรายละเอียดเฉพาะงานในส่วนที่ผู้ขอรับการประเมิน เป็นผู้ปฏิบัติ (สัดส่วนผลงาน 20%)**

 7.1 เตรียมไข่ไก่ฟัก SPF อายุ 9 วัน

7.2 เตรียม Chicken embryo fibroblasts ให้มีปริมาณเซลล์ 1.0X106 cell/ml.

7.3 ร่วมกันวิเคราะห์ข้อมูล เปรียบเทียบปริมาณไวรัสฝีดาษไก่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในไข่ไก่ฟักและการเพาะเลี้ยงในเซลล์คัพภะไก่

**8. ประ­โยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (กรณีเป็นผลงานที่อยู่ระหว่างการศึกษา)**

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก
2. ผู้ที่เกี่ยวข้องนำไปใช้อ้างอิง
3. เกษตรกร
4. ผู้ใช้วัคซีนของกรมปศุสัตว์

**9. ระบุผลสำเร็จของงานหรือผลการศึกษา (กรณีเป็นผลงานที่ดำเนินการเสร็จแล้ว)**

เผยแพร่ผลงานทาง วารสารชีวผลิตภัณฑ์

**10. ความยุ่งยากในการดำเนินการ/ปัญหา/อุปสรรค**

ในระหว่างการทดลอง อาจไปทำให้การปฏิบัติงานประจำติดขัดและไม่สะดวก แต่ก็สามารถแก้ไขปัญหาได้

**11. การนำไปใช้ประโยชน์หรือคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์**

สามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการให้คำแนะนำแก่ผู้ใช้วัคซีนของกรมปศุสัตว์

ขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

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

 ( นายอัตพงศ์ นาคะปักษิณ )

 ผู้เสนอผลงาน

 ...................../................................/......................

ขอรับรองว่าสัดส่วนหรือลักษณะงานในการดำเนินการของผู้เสนอข้างต้นถูกต้องตรงกับความจริงทุกประการ

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

 ( นายสุรพัฒน์ เลาหวณิช )

 ผู้ร่วมดำเนินการ

 ..................../................................/........................

ได้ตรวจสอบแล้วขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นถูกต้องตรงกับความเป็นจริงทุกประการ

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

 ( นายกังวาน จึงธีรพานิช ) ( นายจาตุรนต์ พลราช )

ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ ตำแหน่ง ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

วันที่…............../............................/..................... วันที่…............../............................/.....................

**เอกสารหมายเลข 4**

**ข้อเสนอแนวคิด/วิธีการ เพื่อพัฒนางานหรือปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น**

**ชื่อ** นายอัตพงศ์ นาคะปักษิณ

**เพื่อประกอบการแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง** นายสัตวแพทย์ ชำนาญการพิเศษ **ตำแหน่งเลขที่** 1239

**สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์**

**เรื่อง** การปรับปรุงอัตราส่วนพ่อแม่พันธุ์ของไก่ปลอดเชื้อเฉพาะให้เหมาะสม

**หลักการและเหตุผล**

 ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ (Specific pathogen free, SPF) เป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตวัคซีนนิวคาสเซิล และวัคซีนชนิดอื่นๆ ฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะเป็นผู้ผลิตไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะเพื่อเป็นวัตถุดิบ ให้กับฝ่ายผลิตวัคซีนต่างๆ ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โดยในแต่ละสัปดาห์ผลิตไข่ได้ประมาณ 4,000–7,000 ฟอง กระบวนการผลิตไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ เริ่มต้นจากการนำเข้าไข่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะสายพันธุ์ตัวผู้ จำนวน 1,000 ฟองต่อรุ่น และสายพันธุ์ตัวเมีย จำนวน 5,000 ฟองต่อรุ่น คิดเป็นราคาไข่ทั้งหมด 3,120,000 บาทต่อรุ่น นำมาฟักในตู้ฟักยี่ห้อ PETERSIME รุ่น 8400 ทั้ง 6,000 ฟอง ที่โรงฟักของฝ่ายฯ เมื่อครบ 18 วัน จะย้ายไข่ไปเข้าตู้เกิด ยี่ห้อ PETERSIME รุ่น 8400 ในโรงเรือนไก่ เป็นเวลา 3 วัน รวมเป็น 21 วัน ลูกไก่จะออกจากไข่ โดยเฉลี่ยแล้วไข่สายพันธุ์ตัวผู้ จะเกิดเป็นลูกไก่ประมาณ 90% คือ 900 ตัว สายพันธุ์ตัวเมียจะเกิดเป็นลูกไก่ประมาณ 85% คือ 4,250 ตัว ที่เหลือทั้งหมดเป็นจำนวน 850 ฟอง เป็นไข่ลม ไข่ตาย ไข่ตายโคม ไข่ร้าวหรือแตก จะคัดทิ้งไป จากนั้น เลี้ยงลูกไก่ไปตามโปรแกรมและช่วงอายุ เมื่อไก่อายุได้ประมาณ 4 สัปดาห์ขึ้นไป พนักงานเลี้ยงไก่จะเริ่มคัดเพศไก่ คือ ไก่ตัวเมียที่เกิดจากไข่สายพันธุ์ตัวผู้ให้คัดทิ้ง ส่วนไก่ตัวผู้ที่เกิดจากไข่สายพันธุ์ตัวเมียให้คัดทิ้ง เมื่อไก่อายุได้ 16 สัปดาห์ พนักงานเลี้ยงไก่จะแยกพ่อแม่พันธุ์ดังนี้คือ ไก่ตัวผู้ กรงละ 2 ตัว ไก่ตัวเมีย กรงละ 14 ตัว มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:7 ทั้งหมด 117 กรง และเลี้ยงไก่ตัวผู้ สำรองไว้ 10 ตัวต่อกรง จำนวน 3 กรง รวม 30 ตัว ในโรงเรือนไก่จะมีกรงรวมทั้งสิ้น 120 กรง (ตามรายละเอียดการดำเนินการเลี้ยงไก่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ถูกถ่ายทอดโดย บริษัท LOHMANN ประเทศเยอรมัน ผ่านบริษัท เบ็ทเทอร์ฟาร์ม่า จำกัด)

จะเห็นว่า มีการคัดไก่ที่เกิดจากแต่ละสายพันธุ์ออกไปจำนวนหนึ่ง หากนำมาใช้เป็นไก่พ่อแม่พันธุ์ได้ เช่น ใช้อัตราส่วนไก่พ่อแม่พันธุ์ที่ 1:8 ผลผลิตจะเพิ่มขึ้น ทำให้ลดต้นทุนของการผลิตไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ แต่จะต้องมีการวิจัยว่ามีผลต่ออัตราการฟักของไข่หรือไม่ ในขณะเดียวกัน การผลิตวัคซีนก็อาจมีปัญหา เช่น ความต้องการวัคซีนที่ไม่แน่นอน การชำรุดเสียหายของเครื่องจักร และการปรับปรุงระบบให้เข้ามาตรฐาน GMP เป็นต้น อาจจะทำให้ไข่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ผลิตได้มีค้างสต็อก และต้องคัดทิ้งเนื่องจากการเก็บไข่ไว้ในห้องเย็นนาน ทำให้ไข่ไม่สามารถนำไปใช้ผลิตวัคซีนต่อไปได้ หากการนำเข้าไข่พ่อแม่พันธุ์มาในจำนวนที่เหมาะสม จะไม่ทำให้ราชการต้องสูญเสียผลผลิตไข่ที่ได้ไปโดยเปล่าประโยชน์ เช่น ใช้อัตราส่วนพ่อแม่พันธุ์ที่น้อยลง คือ 1:6 หรือ 1:5 เป็นต้น ถ้านำหลักการมาใช้ในการผลิตไก่พ่อแม่พันธุ์ปลอดเชื้อเฉพาะ จะทำให้การนำเข้าไข่พ่อแม่พันธุ์จากเยอรมันจำนวนน้อยลง ต้นทุนการผลิตก็จะลดลง

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

 นำเข้าไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะสายพันธุ์ตัวผู้ จำนวน 1,000 ฟองและสายพันธุ์ตัวเมีย จำนวน 5,000 ฟอง ฟักเป็นลูกไก่ตามขั้นตอนการปฏิบัติงานโดยปกติ เมื่อไก่อายุได้ 16 สัปดาห์ ให้แบ่งพ่อแม่พันธุ์เป็น 4 อัตราส่วน คือ 1:5, 1:6, 1:7 และ 1:8 โดยแบ่งเป็นอัตราส่วนละ 3 กรง ส่วนกรงที่เหลือให้ใช้อัตราส่วน 1:7 แล้วเลี้ยงไปตามปกติ เมื่อไก่เริ่มให้ผลผลิตเมื่ออายุ 23 สัปดาห์ ให้บันทึกผลผลิตไข่และการคัดทิ้งทุกวัน และบันทึกผลอัตราการฟักที่ได้จากการนำไปฟักเพื่อนำไปผลิตวัคซีน ทำเช่นนี้จนกระทั่งไก่อายุได้ 60 สัปดาห์ (ปลด)

**วิธีการดำเนินการ**

* เตรียมโรงเรือนไก่และโรงฟักไข่ให้พร้อม โดยทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรค ตรวจสอบความปนเปื้อนเชื้อ และทดสอบระบบต่างๆ ให้พร้อมใช้งาน
* นำเข้าไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะสายพันธุ์ตัวผู้ จำนวน 1,000 ฟอง และสายพันธุ์ตัวเมีย 5,000 ฟอง จากประเทศเยอรมัน
* นำไข่ทั้งหมดตั้งไว้ในโรงฟัก ที่อุณหภูมิห้อง (25 ๐C) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไข่เข้าฟักในตู้ฟัก ยี่ห้อ PETERSIME ที่เตรียมไว้ (ตั้งอุณหภูมิที่ 99.75 ๐F ความชื้นสัมพัทธ์ 80%)
* เมื่อครบ 12 วัน นำมาส่องคัดไข่เชื้อตายและไข่ลมทิ้ง (เฉลี่ยไม่เกิน 5%) แล้วนำไข่เข้าตู้ฟักต่อ
* เมื่อครบ 18 วัน นำไข่ทั้งหมดบรรจุลงในกล่องกระดาษที่สะอาด ส่งไปยังโรงเรือนไก่ แล้วนำไข่เข้าตู้เกิด ยี่ห้อ PETERSIME ที่เตรียมไว้ (ตั้งอุณหภูมิที่ 98.75 ๐F ความชื้นสัมพัทธ์ 80%)
* เมื่ออยู่ในตู้เกิดครบ 3 วัน ลูกไก่เกิดออกมา โดยคิดเป็นค่าประมาณการว่า ไก่สายพันธุ์ตัวผู้มีจำนวน 800 ตัว และสายพันธุ์ตัวเมียมีจำนวน 4,000 ตัว
* โรงเรือนไก่ มีกรงขนาด 1x1x1 ลบ.ม. จำนวน 4 แถวๆ ละ 2 ชั้นๆ ละ 15 กรง รวมทั้งสิ้นมีจำนวน 120 กรง นำไก่สายพันธุ์ตัวผู้จำนวน 800 ตัว ใส่ในกรงแถวบน 10 กรงๆ ละ 80 ตัว และนำไก่สายพันธุ์ตัวเมียจำนวน 4,000 ตัว ใส่ในกรงแถวบน 50 กรงๆ ละ 80 ตัว แล้วให้น้ำให้อาหารตามโปรแกรมต่อไป
* จัดการดูแลไก่ตามระเบียบวิธีปฏิบัติ (Standard Operating Procedure : SOP) ที่ได้รับถ่ายทอดเทคโนโลยีมาจาก LOHMANN ผู้เชี่ยวชาญด้านไก่ปลอดเชื้อเฉพาะระดับสากล จากประเทศเยอรมัน
* ในระหว่างที่ไก่เจริญเติบโต จะมีการคัดเพศไก่ตลอดเวลา คือ คัดไก่ตัวผู้จากสายพันธุ์ตัวผู้ไว้ ส่วนตัวเมียคัดทิ้ง จำนวนประมาณครึ่งต่อครึ่ง คงเหลือไก่ตัวผู้ประมาณ 400 ตัว และคัดไก่ตัวเมียจากสายพันธุ์ตัวเมียไว้ ส่วนตัวผู้คัดทิ้ง จำนวนประมาณครึ่งต่อครึ่ง คงเหลือไก่ตัวเมียประมาณ 2,000 ตัว
* เมื่อไก่อายุได้ประมาณ 16 สัปดาห์ จะนำไก่ตัวผู้ไปไว้ในกรงไก่ตัวเมียตามงานวิจัย ดังนี้

 แถวที่ 1 ชั้นบน : ใส่ไก่ตัวผู้กรงละ 2 ตัว ไก่ตัวเมียกรงละ 16 ตัว (อัตราส่วน 1:8) จำนวน 3 กรง เพราะฉะนั้น จะมีไก่ตัวผู้ทั้งหมด 6 ตัว ไก่ตัวเมียทั้งหมด 48 ตัว

 แถวที่ 2 ชั้นบน : ใส่ไก่ตัวผู้กรงละ 2 ตัว ไก่ตัวเมียกรงละ 14 ตัว (อัตราส่วน 1:7) จำนวน 3 กรง เพราะฉะนั้น จะมีไก่ตัวผู้ทั้งหมด 6 ตัว ไก่ตัวเมียทั้งหมด 42 ตัว

 แถวที่ 3 ชั้นบน : ใส่ไก่ตัวผู้กรงละ 2 ตัว ไก่ตัวเมียกรงละ 12 ตัว (อัตราส่วน 1:6) จำนวน 3 กรง เพราะฉะนั้น จะมีไก่ตัวผู้ทั้งหมด 6 ตัว ไก่ตัวเมียทั้งหมด 36 ตัว

 แถวที่ 4 ชั้นบน : ใส่ไก่ตัวผู้กรงละ 2 ตัว ไก่ตัวเมียกรงละ 10 ตัว (อัตราส่วน 1:5) จำนวน 3 กรง เพราะฉะนั้น จะมีไก่ตัวผู้ทั้งหมด 6 ตัว ไก่ตัวเมียทั้งหมด 30 ตัว

* ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้ จะมีการใช้ไก่ตัวผู้รวมทั้งสิ้น 24 ตัว และใช้ไก่ตัวเมียทั้งสิ้น 156 ตัว ส่วนไก่ที่ไม่ได้ใช้ในงานวิจัยให้จัดอัตราส่วนที่เลี้ยงตามปกติ คือ ใส่ไก่ตัวผู้ จำนวนกรงละ 2 ตัว ต่อ ไก่ตัวเมีย 14 ตัว (อัตราส่วน 1:7) จำนวน 105 กรง และ สำรองไก่พ่อพันธุ์กรงละ 10 ตัว จำนวน 3 กรง
* งานวิจัยจะดำเนินงานควบคู่ไปกับการปฏิบัติงานประจำ ดังนี้
* เมื่อไก่มีอายุได้ประมาณ 23 สัปดาห์ พนักงานจะเก็บผลผลิตไข่ โดยแยกนับ แยกคัด จำนวนไข่ปกติ กับไข่คัดทิ้ง แล้วนำส่งโรงฟัก
* พนักงานที่โรงฟักจะคัดและฆ่าเชื้อโรคไข่ที่ส่งมาจากโรงเรือนไก่ แยกเป็นแถว และเก็บไว้ในห้องเย็นเก็บไข่ อุณหภูมิ 15-18 ๐C เพื่อรอโปรแกรมการนำไปฟักเพื่อนำไปผลิตวัคซีนต่อไป
* เมื่อมีโปรแกรมให้นำไข่เข้าตู้ฟักจำนวนหนึ่ง ระยะเวลาหนึ่ง ก็จะนำไข่ที่แยกไว้ในแต่ละแถวและแต่ละวันมาฟัก ให้นำไข่ที่เก็บได้จากกรงที่ทำงานวิจัย แยกใส่แผงไข่เป็นชุดตัวอย่าง 4 ชุดอัตราส่วน โดยมีการใส่หมายเลขเพื่อแบ่งแยกชุดงานวิจัยให้ชัดเจน ส่วนไข่ที่เหลือให้เข้าฟักในตู้ฟักเดียวกัน นาน 7 วัน
* นำไข่ทั้งหมดออกมาส่องคัดไข่เชื้อเป็น ไข่เชื้อตาย และไข่ลม แล้วบันทึกผล
* ทำการฟักไข่เช่นนี้ตั้งแต่ไก่อายุ 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 และ 60 สัปดาห์ๆ ละครั้ง รวม 19 ครั้ง
* นำผลที่ได้ทั้ง 19 ครั้ง มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบทางสถิติ

**ผลที่คาดว่าจะได้รับ**

* ได้อัตราการส่วนของไก่พ่อแม่พันธุ์ปลอดเชื้อเฉพาะที่ให้ผลผลิตไข่เหมาะสมทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ
* ลดปริมาณนำเข้าไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะสายพันธุ์ตัวผู้และสายพันธุ์ตัวเมีย

**ตัวชี้วัด**

* ลดการนำเข้าไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะสายพันธุ์ตัวผู้และสายพันธุ์ตัวเมีย ได้ไม่ต่ำกว่า 10%
* อัตราส่วนของไก่พ่อแม่พันธุ์ปลอดเชื้อเฉพาะที่เหมาะสม มีปริมาณไข่ฟักไม่ต่ำกว่าอัตราส่วนเดิม 5%

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

 (นายอัตพงศ์ นาคะปักษิณ)

 ผู้เสนอแนวคิด

 ................../..................../..................

## **การพิจารณาประเมินข้าราชการเพื่อคัดเลือกให้ส่งผลงานทางวิชาการ**

ชื่อ นายอัตพงศ์ นาคะปักษิณ

ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ ชำนาญการ ตำแหน่งเลขที่ 1239

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ ชำนาญการพิเศษ ตำแหน่งเลขที่ 1239

ส่วน/กลุ่ม/ฝ่าย กลุ่มสัตว์ทดลอง กอง/สำนัก/จังหวัด สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

### การพิจารณา **คะแนนเต็ม 100 คะแนน (ต้องได้คะแนนรวมไม่น้อยกว่าร้อยละ 80)**

 ๑.ผลงาน/ผลการปฏิบัติงานย้อนหลัง 3 ปี (50 คะแนน) ได้รับ คะแนน

 ๒.ข้อเสนอแนวคิด/วิธีการเพื่อพัฒนางานหรือปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

 (50 คะแนน) ได้รับ คะแนน

 **รวม** คะแนน

 ลงชื่อ……………………………………………………

 ( นายจาตุรนต์ พลราช )

 ตำแหน่ง ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

 วันที่…............../............................/.....................