**เอกสารหมายเลข 1**

แบบประเมินคุณสมบัติของบุคคล

**ชื่อ นางสาวอาภาพร ดอกพุฒ**

**ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ ตำแหน่งเลขที่ 827**

**กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ**

**กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**

**ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งที่สูงขึ้น**

**ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ ตำแหน่งเลขที่ 827**

**กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ**

**กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**

##### **เอกสารหมายเลข 3**

# **ผลงานที่จะขอรับการประเมินเพื่อเลื่อนขึ้นแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งสูงขึ้น**

**ผลงานเรื่องที่ 1**

1. **ชื่อผลงาน** การพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรอย่างรวดเร็ว (Development of a Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of African swine fever)

**ปีที่ดำเนินการ** พ.ศ. 2562 – 2563

1. **ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการศึกษา**

โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร เป็นโรคติดต่อร้ายแรงในสุกรที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African swine fever virus, ASFV) แม้ปัจจุบันจะยังไม่พบการระบาดของโรคนี้ในประเทศไทย แต่จากรายงานล่าสุดวันที่ 26 มีนาคม 2563 ของ World Organization for Animal Health (OIE) พบว่าเกิดการระบาดของโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรในประเทศเพื่อนบ้าน ได้แก่ เวียดนาม กัมพูชา ลาว และพม่า ดังนั้นประเทศไทยจึงมีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดการระบาดของโรคนี้ การตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว เป็นหนึ่งในมาตรการสำหรับการเฝ้าระวังโรคระบาด ซึ่งวิธีหนึ่งที่ OIE แนะนำสำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV คือ เทคนิค Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามเทคนิค Real-time PCR ต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะที่มีราคาแพง และมีขั้นตอนในการปฏิบัติงานที่ค่อนข้างยุ่งยาก ต้องอาศัยผู้ที่มีทักษะสูงในการปฏิบัติงาน ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคที่มีชื่อว่า Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีข้อดีกว่า Real-time PCR หลายประการ เช่น ใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่า เครื่องมือทดสอบมีราคาไม่แพง ขั้นตอนการปฏิบัติงานไม่ซับซ้อน สามารถวิเคราะห์และติดตามผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่า และสามารถประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้อีกด้วย นอกจากนี้ LAMP ยังเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูงเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ด้วยเหตุนี้ LAMP จึงถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคหลากหลายชนิด แต่สำหรับโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรนั้น การพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคยังมีการศึกษาอยู่อย่างจำกัด

ดังนั้นการพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ที่มีประสิทธิภาพ การทดสอบสูงเทียบเท่ากับวิธี Real-time PCR อาจนำไปสู่ทางเลือกใหม่ในการตรวจคัดกรองโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวัง ป้องกัน และควบคุมโรค

1. **วัตถุประสงค์ในการศึกษา**

เพื่อพัฒนาเทคนิค LAMP สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV เพื่อนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรอย่างรวดเร็ว

1. **ความรู้ทางวิชาการ หรือแนวคิดหรือหลักทฤษฎีที่ใช้ในการดำเนินการ**

โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African swine fever, ASF) เป็นโรคติดต่อในสุกรทุกสายพันธุ์และทุกช่วงอายุ โรคนี้สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากแก่อุตสาหกรรมการผลิตสุกร เนื่องจากก่อให้เกิดอัตราการตายที่สูงในสุกร ตั้งแต่ช่วงปี 2559 เป็นต้นมา แนวโน้มการระบาดของโรค ASF สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในทวีปแอฟริกา ยุโรป และเอเชีย โดยเฉพาะทวีปเอเชียนั้น พบว่าได้รับความเสียหายสูงสุดจากจำนวนสุกรที่ตายเพราะติดเชื้อและถูกคัดทิ้ง (OIE, 2019) สำหรับประเทศจีน พบการระบาดของโรค ASF ครั้งแรกเมื่อปี 2561 จากนั้นโรคนี้ก็ได้แพร่ระบาดไปยังประเทศอื่น ๆ ในเอเชียอย่างรวดเร็ว แม้ว่าปัจจุบันประเทศไทยจะยังไม่พบการรายงานการระบาดของโรคนี้ แต่ก็มีปัจจัยเสี่ยงหลายประการที่อาจทำให้เกิดการระบาดของโรคขึ้นมาได้ การควบคุมโรค ASF เป็นเรื่องที่ยากและท้าทายมาก เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มียารักษาโรคหรือวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสำหรับโรคนี้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคอย่างรวดเร็วจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญอย่างหนึ่งที่จะช่วยป้องกันการระบาดของโรคได้ (Gallardo et al., 2019)

โรค ASF มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African swine fever virus, ASFV) ซึ่งเป็นไวรัสที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Asfarviridea* สกุล *Asfivirus* (Alonso et al., 2018) ไวรัสชนิดนี้มีสารพันธุกรรมชนิด double stranded DNA และมีจีโนมที่ซับซ้อนและขนาดใหญ่ ประมาณ 170 – 194 kilobases เชื้อ ASFV มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูง ปัจจุบันพบว่าเชื้อ ASFV มีทั้งหมด 24 genotypes จากการวิเคราะห์ยีน VP72 (Quembo et al., 2018) อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มตามลักษณะ genotype นั้นไม่ได้มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อไวรัส (Arias et al., 2018) สำหรับยีน VP72 คือยีนที่ถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีน p72 ซึ่งเป็นโปรตีนหลักบนแคพซิด (capsid protein) ของเชื้อไวรัส เชื้อ ASFV นั้นทำให้สุกรมีอาการทางคลินิกได้หลายรูปแบบ สุกรที่ติดเชื้อ ASFV สายพันธุ์รุนแรงจะแสดงอาการป่วยแบบเฉียบพลัน มีไข้สูง ไม่กินอาหาร และมีภาวะเลือดออกตามผิวหนังและเยื่อบุของอวัยวะภายในต่าง ๆ สุกรจะตายภายใน 4-10 วัน หรือบางครั้งอาจตายก่อนแสดงอาการทางคลินิก โดยเฉพาะในสุกรเลี้ยง อาจพบอัตราการตายสูงถึง 100% และเนื่องจากโรค ASF เป็นโรคในกลุ่มอาการไข้เลือดออก (haemorrhagic fever) ที่มีลักษณะอาการทางคลินิกคล้ายกับโรคติดเชื้อ อื่น ๆ ในสุกร โดยเฉพาะโรคไข้อหิวาต์สุกร (OIE, 2020) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพิสูจน์หาสาเหตุที่แท้จริงของสุกรป่วย

วิธีทดสอบที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว จะช่วยป้องกันการแพร่ระบาดของโรค ASF ซึ่งหนึ่งในวิธีที่ OIE แนะนำ สำหรับการตรวจคัดกรองและการตรวจยืนยันหาเชื้อ ASFV ได้อย่างรวดเร็ว คือ เทคนิค Real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะในการทดสอบสูง เทคนิคนี้เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากโดยเฉพาะเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัส (OIE, 2020) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเทคนิค Real-time PCR ที่ใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV จากยีน VP72 มีความไวและความจำเพาะสูง (King et al., 2003; Fernández-Pinero et al., 2013) ดังนั้นปัจจุบันเทคนิค Real-time PCR จึงได้รับการยอมรับให้เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะที่มีราคาแพง ได้แก่ เครื่อง thermal cycler เพื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายภายในหลอด PCR แบบอัตโนมัติ และอาศัยคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์ผลหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังมีขั้นตอนในการปฏิบัติงานที่ค่อนข้างยุ่งยาก และต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญในการปฏิบัติงาน

หลังจากเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ถูกพัฒนาขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Notomi และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็วภายใต้อุณภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียว โดยอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรและทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 60-65 °C เทคนิค LAMP ก็ถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสและแบคทีเรียหลากหลายชนิด เนื่องจากสามารถใช้เครื่องมืออย่างง่ายและมีราคาไม่แพง เช่น heat block ในการทดสอบได้ เทคนิคนี้จะใช้ไพรเมอร์อย่างน้อยจำนวน 4 เส้น ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย 6 ตำแหน่ง LAMP จึงเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง นอกจากนี้การเพิ่ม loop primer เข้าไปจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยาให้ดียิ่งขึ้น เทคนิค LAMP ยังมีข้อดีอื่น ๆ ได้แก่ สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้มากถึง 109 – 1010 เท่า ภายในเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง มีขั้นตอนในการปฏิบัติงานที่ง่าย ไม่ซับซ้อน จึงไม่ต้องอาศัยผู้ทดสอบที่มีความชำนาญสูง รวมทั้งสามารถติดตามผลการทดสอบหลังเกิดปฏิกิริยาได้ง่ายและสะดวก สามารถประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้ และเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูงเทียบเท่ากับเทคนิค Real-time PCR ดังนั้นเทคนิค LAMP อาจเป็นทางเลือกที่จะช่วยลดจุดด้อยต่าง ๆ ที่พบในเทคนิค real-time PCR ได้

การตรวจติดตามผลการทดสอบของเทคนิค LAMP สามารถวิเคราะห์ผลได้ด้วยตาเปล่าจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย หนึ่งในสีที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับเทคนิค LAMP คือ สี Hydroxy napthol blue (HNB) ซึ่งเป็นสีที่ให้ผลชัดเจน (Zhang et al., 2019) HNB เป็น metal ion indicator จะให้สีม่วงเมื่อมีปริมาณของ Mg2+ ที่สูง ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาบวกของเทคนิค LAMP จะให้ผลผลิตออกมาเป็น magnesium pyrophosphate ซึ่งจะทำให้ปริมาณของ Mg2+ ในสารละลายลดลง จึงทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีฟ้า (sky blue) เทคนิค LAMP ที่ใช้สี HNB มีข้อดี ได้แก่ มีราคาไม่แพง ใช้งานง่าย และไม่ส่งผลต่อค่าความไวของปฏิกิริยา นอกจากนี้ HNB ยังช่วยลดการปนเปื้อนในปฏิกิริยา LAMP เนื่องจากจะมีการเติมสี HNB ก่อนปฏิกิริยา LAMP จะเริ่มต้น เทคนิค LAMP ถูกประยุกต์ใช้กับการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคหลากหลายชนิด ทั้งไวรัส แบคทีเรีย ปรสิต และเชื้อรา แต่การตรวจหาโรค ASF โดยเทคนิค LAMP นั้นยังมีอยู่อย่างจำกัด และยังไม่เคยมีการศึกษาใดที่ประยุกต์ใช้สี HNB กับเทคนิค LAMP เพื่อใช้ในการตรวจหาโรค ASF มาก่อน

การพัฒนาเทคนิค LAMP สำหรับการตรวจหาเชื้อ ASFV ครั้งแรกโดย James และคณะ (2010) โดยอาศัยยีน Topoisomerase II ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส พบว่าเทคนิคนี้มีความไวน้อยกว่าวิธี real-time PCR เพียงเล็กน้อย และไม่พบการ cross-reacting กับเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้อหิวาต์สุกร ต่อมาในปี 2014 วิธีนี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริงในภาคสนามที่มีการรายงานพบการระบาดของโรค ASF ในประเทศอูกันดา พบว่าเทคนิคนี้ให้ค่าความไวที่สูงกว่าเทคนิค conventional PCR ที่ OIE แนะนำ แต่ค่าความจำเพาะค่อนข้างต่ำเพียง 44% (Atuhaire et al., 2014) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ เทคนิค LAMP ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาเชื้อ ASFV โดยอาศัยยีน K205R ซึ่งให้ค่าความไวที่สูงกว่าเทคนิค conventional PCR (Wu et al., 2016) สำหรับการศึกษานี้ ผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะพัฒนาเทคนิคLAMP ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV โดยอาศัยยีน VP72 ร่วมกับการใช้สี HNB ในการวิเคราะห์ผลการทดสอบ ซึ่งประสิทธิภาพของเทคนิค LAMP ที่ถูกพัฒนาขึ้น จะถูกทดสอบความใช้ได้ของวิธี โดยเปรียบเทียบกับเทคนิค real-time PCR ที่ OIE แนะนำ ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวในการวิเคราะห์สูงสุด ณ ตอนนี้ ผู้วิจัยเชื่อว่าเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นจะมีความไวและความจำเพาะที่สูง สามารถใช้เป็นทางเลือกในการตรวจคัดกรองโรค ASF ได้อย่างรวดเร็ว

1. **วิธีการหรือขั้นตอนการศึกษา**

(1) ทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

(2) ออกแบบไพรเมอร์ LAMP ที่จำเพาะต่อเชื้อ ASFV ตรงบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) บนลำดับเบสของยีน VP72 โดยใช้สารพันธุกรรมต้นแบบจากฐานข้อมูล NCBI

(3) ทดสอบหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP เช่น อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ซึ่งการวิเคราะห์ผลบวกและลบของเทคนิค LAMP ดูจากการเปลี่ยนสีของ HNB ในปฏิกิริยา LAMP หากมีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีฟ้า หมายถึงปฏิกิริยาบวก หากไม่เปลี่ยนสี หมายถึง ปฏิกิริยาลบ

(4) ทดสอบความใช้ได้ของวิธี LAMP จากค่าความไวเชิงวิเคราะห์ (analytical sensitivity) โดยทำการเจือจางความเข้มข้นแบบ 10-fold dilutions ของ ASFV recombinant DNA

(5) หาค่าความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ (analytical specificity) โดยใช้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ มาทดสอบ

(6) นำตัวอย่างทดสอบทั้งหมดจำนวน 211 ตัวอย่าง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์จากสุกรที่ตรวจยึดได้ จำนวน 121 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่จำลองการติดเชื้อในเลือด และอวัยวะภายในสุกร จำนวน 90 ตัวอย่าง ของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ มาสกัดสารพันธุกรรม และทดสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR ที่ OIE แนะนำ และเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้น เพื่อหาค่าความไวและความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (diagnostic sensitivity and specificity) ในตาราง 2x2 ซึ่งจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบคำนวณได้จาก McNemar’s test โดยโปรแกรม G\*Power เวอร์ชั่น 3.1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

(7) หาความสอดคล้องของผลการทดสอบระหว่างเทคนิค LAMP กับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิง ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความสอดคล้อง (Kappa value)

(8) วิเคราะห์ผลการทดสอบ สรุปผล และเขียนรายงานผลการศึกษา

1. **ผู้ร่วมดำเนินการ**

(1) **นางสาวอาภาพร ดอกพุฒ** สัดส่วนผลงาน 80%

(2) นายประกิต บุญพรประเสริฐ สัดส่วนผลงาน 10%

(3) นายฐปณัฐ สงคสุภา สัดส่วนผลงาน 5%

(4) นางสุพรรษา ทางดี สัดส่วนผลงาน 5%

1. **ระบุรายละเอียดเฉพาะงานในส่วนที่ผู้ขอรับการประเมินเป็นผู้ปฏิบัติ**

(1) วางแผน ออกแบบการทดลอง ออกแบบ สัดส่วนผลงาน 40%

ไพรเมอร์ LAMP และทำการทดสอบทาง

ห้องปฏิบัติการโดยเทคนิค LAMP และ

Real-time PCR

(2) รวบรวมและวิเคราะห์ผลการทดสอบ สัดส่วนผลงาน 20%

(3) จัดทำรายงาน สรุป และเผยแพร่ผลงาน สัดส่วนผลงาน 20%

1. **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (กรณีเป็นผลงานที่อยู่ระหว่างศึกษา)**

เจ้าหน้าที่ทางห้องปฏิบัติการสามารถนำเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้น ไปเป็นทางเลือกสำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV ซึ่งจะช่วยลดทั้งค่าใช้จ่าย เวลา และแรงงานในการปฏิบัติงานเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ OIE แนะนำ นอกจากนี้เจ้าหน้าที่ภาคสนามยังสามารถนำเทคนิค LAMP ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรในพื้นที่ได้ ส่งผลให้การตรวจวินิจฉัยโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการควบคุม ป้องกัน และเฝ้าระวังโรคต่อไป

1. **ระบุผลสำเร็จของงาน หรือผลการศึกษา (กรณีที่เป็นผลงานที่ดำเนินการเสร็จแล้ว)**

แบบเสนอโครงการวิชาการผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาโครงการวิจัยและผลงานวิชาการ (กวช.) ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ การดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการเสร็จสิ้นแล้ว กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาผลงานฉบับเต็มโดยคณะกรรมการ

1. **ความยุ่งยากในการดำเนินการ/ ปัญหา/ อุปสรรค**

(1) การวางแผนดำเนินการศึกษา จำเป็นต้องทำอย่างรอบคอบและถูกต้องตามหลักวิชาการ เพื่อให้ผลการทดสอบเป็นไปอย่างถูกต้องและน่าเชื่อถือมากที่สุด

(2) การตรวจทางห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องใช้ชุดทดสอบเฉพาะในการทดสอบ ซึ่งผู้ปฏิบัติงานต้องใช้ความรู้และประสบการณ์ในการปฏิบัติงาน เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและเชื่อถือได้

(3) การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ผู้ออกแบบจำเป็นต้องมีความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อให้ได้ไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพต่อการทดสอบ รวมทั้งจำเป็นต้องใช้โปรแกรมสำหรับออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งผู้ใช้ต้องมีความรู้และประสบการณ์ในการใช้

(4) การทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น ต้องเป็นไปตามหลักวิชาการ เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพที่แท้จริงของวิธีทดสอบ โดยปราศจากอคติและความเอนเอียงของผู้วิจัย

1. **การนำไปใช้ประโยชน์ หรือคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์**

เทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นจะถูกนำไปใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ASFV โดยเจ้าหน้าที่ทางห้องปฏิบัติการของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ หรือหน่วยงานภายใต้สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ หรือหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งสามารถนำไปใช้ตรวจคัดกรองโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกรอย่างรวดเร็วในพื้นที่โดยเจ้าหน้าที่ภาคสนาม

ขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อ…………………………………………..………

(นางสาวอาภาพร ดอกพุฒ)

ผู้เสนอผลงาน

………../…………../………….

ขอรับรองว่าสัดส่วนหรือลักษณะงานในการดำเนินการของผู้เสนอข้างต้นถูกต้องตรงกับความจริงทุกประการ

ลงชื่อ……………………………….………………….

(นายฐปณัฐ สงคสุภา)

นายสัตวแพทย์ชำนาญการ

ผู้ร่วมดำเนินการ

…………../…………../…………..

ลงชื่อ……………………………….………………….

(นายประกิต บุญพรประเสริฐ)

นายสัตวแพทย์ชำนาญการ

ผู้ร่วมดำเนินการ

…………../…………../…………..

ลงชื่อ……………………………….………………….

(นางสุพรรษา ทางดี)

นักวิทยาศาสตร์

ผู้ร่วมดำเนินการ

…………../…………../…………..

## ได้ตรวจสอบแล้วขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นถูกต้องตรงกับความเป็นจริงทุกประการ

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

(นายบัณฑิต นวลศรีฉาย) (นายเชาวฤทธิ์ บุญมาทิต)

หัวหน้ากลุ่มไวรัสวิทยา ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

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

**หมายเหตุ** หากผลงานมีลักษณะเฉพาะ เช่นแผ่นพับ หนังสือ แถบบันทึกเสียง ฯลฯ ผู้เสนอผลงานอาจส่งผลงานจริงประกอบการพิจารณาของคณะกรรมการก็ได้

##### **เอกสารหมายเลข 3**

# **ผลงานที่จะขอรับการประเมินเพื่อเลื่อนขึ้นแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งสูงขึ้น**

**ผลงานเรื่องที่ 2**

1. **ชื่อผลงาน** การสอบสวนโรคทางอณูชีววิทยาของโรคมาเร็กซ์ในฟาร์มไก่ไข่ในจังหวัดระนอง (Molecular Investigation of Marek’s Disease in a Layer Chicken Farm in Ranong Province)

**ปีที่ดำเนินการ** พ.ศ. 2557 – 2560

1. **ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการศึกษา**

โรคมาเร็กซ์ (Marek’s disease, MD) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ ซึ่งทำให้เกิดเนื้องอกและกดภูมิคุ้มกันในไก่ นับว่าเป็นโรคที่ทำความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะไก่รุ่น-สาว อายุต่ำกว่า 16 สัปดาห์ หากไก่เครียดเนื่องจากการจัดการที่ไม่ดีในฟาร์ม อาจพบอัตราการตายสูงถึง 80% การป้องกันโรคสามารถทำได้โดยการให้วัคซีน ซึ่งจะทำในลูกไก่ที่ฟักออกมาวันแรกและเพียงครั้งเดียวจากโรงฟัก ซึ่งช่วยป้องกันและลดอาการทางคลินิกของโรคได้ แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงจำเป็นต้องทำร่วมกับการสุขาภิบาลและการเลี้ยงที่ดีด้วย

การศึกษานี้ เป็นการสอบสวนการระบาดของโรคมาเร็กซ์ในฟาร์มไก่ไข่แห่งหนึ่งที่จังหวัดระนอง ในปีพ.ศ. 2557 ซึ่งเป็นฟาร์มที่รับลูกไก่ที่ทำวัคซีนป้องกันโรคมาเร็กซ์มาจากโรงฟักแล้ว พบการสูญเสียในไก่อายุมากกว่า 10 สัปดาห์ และพบสูงสุดที่อายุ 19 - 22 สัปดาห์ ไก่ป่วยจะแสดงอาการอ่อนเพลีย ขาไม่มีแรง ปีกตก กินอาหารและน้ำไม่ได้ และเป็นอัมพาต เมื่อผ่าซากพบก้อนเนื้องอกหลายขนาดกระจายทั่วไปในอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ม้าม และหัวใจ นอกจากนี้ พบการขยายใหญ่ของเส้นประสาทโคนขา (sciatic nerve) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโรคมาเร็กซ์ ผลการตรวจตัวอย่างอวัยวะภายในด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ จ. นครศรีธรรมราช พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสมาเร็กซ์ (Marek’s disease virus, MDV) และส่งตัวอย่างมายืนยันชนิดของเชื้อ MDV ด้วยการหาลำดับสารพันธุกรรม (DNA sequencing) ณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (สสช.) พบว่าเป็นเชื้อ MDV ชนิดรุนแรงมาก (very virulent MDV, vvMDV)

ดังนั้น เพื่อหาสาเหตุการระบาดของโรคมาเร็กซ์ในฟาร์มที่ได้ทำวัคซีนมาแล้วจากประวัติที่กล่าวข้างต้น สสช. จึงได้ร่วมกับสำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ (สคบ.) สำนักงานปศุสัตว์เขต และสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดในพื้นที่ที่เกี่ยวข้อง ทำการสอบสวนหาสาเหตุของการเกิดโรคในฟาร์ม โดยใช้ข้อมูลทางระบาดวิทยา และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการระดับอณูชีวโมเลกุล เพื่อเป็นแนวทาง ในการควบคุม ป้องกัน และกำจัดโรคในพื้นที่ต่อไป

1. **วัตถุประสงค์ในการศึกษา**

เพื่อหาสาเหตุการระบาดของโรคมาเร็กซ์ในฟาร์มไก่ไข่ที่มีการให้วัคซีนเชื้อเป็นในการป้องกันโรคจากโรงฟักแล้ว โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ MDV ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาและจำแนกความแตกต่างระหว่างเชื้อ MDV ที่ระบาดในพื้นที่กับข้อมูลของ seed virus vaccine ตามที่ปรากฏใน GenBank

1. **ความรู้ทางวิชาการ หรือแนวคิดหรือหลักทฤษฎีที่ใช้ในการดำเนินการ**

โรคมาเร็กซ์ (Marek’s disease) เป็นโรคสำคัญที่ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเล้ียงไก่ทั่วโลก ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากกว่า 1 พันล้านดอลลาร์สหรัฐในแต่ละปี (Kennedy et al., 2017) พบได้ ในไก่ทุกช่วงอายุ ท้ังไก่เน้ือ ไก่พ่อแม่พันธุ์ และไก่ไข่ ไก่ท่ีติดเช้ือจะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง เกิดภาวะกดภูมิคุ้มกันจึงติดเช้ือแทรกซ้อนได้ง่าย ทำให้ไก่เกิดเน้ืองอกและมีอาการป่วยทางระบบประสาท ระยะฟักตัวของเชื้อ 4-12 สัปดาห์ การเกิดโรคสามารถพบได้ในไก่อายุ 3-4 สัปดาห์ จนถึงอายุที่ให้ผลผลิตไข่ เช้ือสายพันธ์ุรุนแรงทำให้ลูกไก่อายุ 1-2 สัปดาห์ มีอัตราการตายสูง โดยเฉพาะลูกไก่ท่ีไม่มี maternal antibodies (OIE, 2017)

โรคน้ีมีสาเหตุจากการติดเช้ือไวรัสมาเร็กซ์ (Marek’s disease virus, MDV) หรือ Gallid herpes virus 2 เป็นเชื้อในวงศ์ Herpesviridae วงศ์ย่อย Alphaherpesvirinae สกุล *Mardivirus* เป็นเช้ือไวรัสท่ีมีสารพันธุกรรมชนิด DNA สายคู่ (dsDNA) มี 3 ซีโรไทป์ โดยเชื้อไวรัสมาเร็กซ์ ซีโรไทป์ 1 (MDV1) เท่านั้นที่ก่อโรคและมีความรุนแรงหลายระดับ ทำให้เกิดเนื้องอกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-cell เรียกเช้ือนี้ว่า oncogenic MDV1 ซ่ึงเชื้อชนิดนี้สามารถติดต่อได้ทางอากาศและการหายใจ แต่ไม่ติดต่อผ่านทางไข่ฟัก การตรวจวินิจฉัยโรคมาเร็กซ์มีหลายวิธี ได้แก่ การแยกเช้ือไวรัสจากเน้ือเยื่อหรืออวัยวะของสัตว์ป่วย และการตรวจหาสารพันธุกรรมของเช้ือไวรัสด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ร่วมกับการสังเกตอาการสัตว์ป่วย (OIE, 2017) ส่วนการป้องกันโรคทำได้โดยการให้วัคซีนในลูกไก่อายุ 1 วัน ด้วยวัคซีนเช้ือเป็นอ่อนฤทธ์ิที่ผลิตจากเชื้อไวรัสมาเร็กซ์ ซีโรไทป์ 1, 2 หรือ 3 ซ่ึงไก่จะใช้เวลา 7-14 วัน ในการสร้างแอนติบอดี (OIE, 2017) สำหรับประเทศไทย มีรายงานการระบาดของโรคมาเร็กซ์เป็นระยะ เช่น การระบาดในพื้นท่ีภาคใต้ในปี พ.ศ. 2540 ท่ีจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา พัทลุง และระนอง ซ่ึงตรวจโดยวิธีทางพยาธิวิทยาและการแยกเชื้อไวรัส (นพวรรณ และคณะ, 2541)

เชื้อ MDV1 มียีน Marek’s *Eco*RI-Q (*meq*) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดเนื้องอกในไก่ (oncogenic MDV1) และตรวจพบได้ในเช้ือ MDV1 เท่าน้ัน จึงใช้เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR (Chang et al., 2002a) เช้ือ MDV1 ที่ก่อโรคจะตรวจพบยีน *meq* โดดเด่นกว่ายีน long *meq* (L-*meq*) ซ่ึงไม่ทำให้เกิดเนื้องอก (non-oncogenic MDV1) และพบได้ในวัคซีนป้องกันโรคมาเร็กซ์ชนิดเช้ือเป็นอ่อนฤทธ์ิท่ีผลิตจากเช้ือ MDV1 เช่น Rispens/CVI988 โดยยีน L-*meq* เป็นยีนท่ีมี insertion ขนาด 178 bp แทรกอยู่ในบริเวณที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *meq* (transactivation domain) จึงสามารถตรวจพบด้วยการใช้ primer ชุดเดียวกันได้ (Lee et al., 2000, 2001) การศึกษาน้ี มีวัตถุประสงค์เพ่ือตรวจหายีน และศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับสารพันธุกรรมและ phylogenetic tree ของเชื้อ MDV 1 ท่ีก่อโรค เพื่อวิเคราะห์แยกความแตกต่างระหว่างเช้ือที่ระบาดในฟาร์มและเชื้อจากวัคซีน สำหรับใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการสอบสวนการระบาดของโรคมาเร็กซ์ในฟาร์ม

**5. วิธีการหรือขั้นตอนการศึกษา**

(1) ทบทวนเอกสารและรวบรวมข้อมูลท่ีเกี่ยวข้อง

(2) รวบรวมตัวอย่าง whole blood และซีรัม ซึ่งดำเนินการเก็บโดยเจ้าหน้าที่สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ สำนักงานปศุสัตว์เขต และสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดในพื้นที่ท่ีเก่ียวข้อง

(3) ดำเนินการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ โดยตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ MDV จากตัวอย่างซีรัม ด้วยวิธี ELISA และสกัด DNA จากตัวอย่าง whole blood เพ่ือตรวจหาเช้ือ MDV ด้วยวิธี PCR โดยตัวอย่างควบคุมบวกเป็น DNA ของเชื้อ MDV จากอวัยวะภายในของไก่จากเคสชันสูตรท่ีให้ผลบวกด้วยวิธี PCR และยืนยันด้วย sequencing และตัวอย่างควบคุมลบเป็น nuclease-free water

(4) ตรวจยืนยันสารพันธุกรรมของเชื้อ MDV ที่พบจากตัวอย่าง โดยการทำ DNA sequencing

(5) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MDV โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป และสร้าง phylogenetic tree เพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างเชื้อ MDV ที่ระบาดในพื้นที่กับ seed virus vaccine จากข้อมูลใน GenBank

(6) สรุปและรายงานผล

**6. ผู้ร่วมดำเนินการ**

(1) นางสาวนันทพร วันดี สัดส่วนผลงาน 60%

(2) นางสาวใกล้รุ่ง ทนสระน้อย สัดส่วนผลงาน 20%

(3) **นางสาวอาภาพร ดอกพุฒ** สัดส่วนผลงาน 20%

**7. ระบุรายละเอียดเฉพาะงานในส่วนที่ผู้รับการประเมินเป็นผู้ปฏิบัติ** (สัดส่วนผลงาน 20%)

(1) ดำเนินการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ สัดส่วนผลงาน 10%

(2) รวบรวมและวิเคราะห์ผลการทดสอบ สัดส่วนผลงาน 5%

(3) จัดทำรายงานสรุป และเผยแพร่ สัดส่วนผลงาน 5%

**8. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ** (กรณีเป็นผลงานที่อยู่ระหว่างศึกษา)

-

**9. ระบุผลสำเร็จของงาน หรือผลการศึกษา** (กรณีที่เป็นผลงานที่ดำเนินการเสร็จแล้ว)

ผลการศึกษาพบว่าเช้ือ MDV จากฟาร์มในจังหวัดระนองจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ MDV ชนิดก่อโรครุนแรงจากประเทศจีน ส่วนเช้ือ MDV ท่ีพบในตัวอย่างจากฟาร์มอ่ืนเป็นเช้ือกลุ่มวัคซีน นอกจากนี้ การตรวจพบผลบวกของแอนติบอดีต่อเช้ือ MDV ในซีรัมไก่ทุกตัวอย่างจากฟาร์มที่มีการติดเช้ือและไม่ติดเช้ือ MDV น้ันมีความเป็นไปได้ว่าแอนติบอดีของไก่ในฟาร์มอาจเกิดจากการทำวัคซีนป้องกันโรคมาเร็กซ์ การศึกษาน้ีสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพ่ือเป็นแนวทางในการสอบสวนการระบาดโรคมาเร็กซ์ในฟาร์มไก่ได้ในอนาคต

**10. ความยุ่งยากในการดำเนินการ/ ปัญหา/ อุปสรรค**

(1) การวางแผนสอบสวนโรคระบาด จำเป็นต้องดำเนินการอย่างรอบคอบและระมัดระวัง โดยต้อง คำนึงถึงความถูกต้องตามหลักทางวิชาการ ปราศจากอคติ เพื่อให้ผลการศึกษาเป็นไปอย่างถูกต้องและเชื่อถือได้มากท่ีสุด เนื่องจากมีผลกระทบต่อหลายฝ่ายทั้งสาเหตุของการระบาดและฟาร์มเกษตรกรโดยตรง

(2) การทดสอบทางห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องใช้ชุดทดสอบที่จำเพาะต่อโรคมาเร็กซ์ ในการตรวจหา แอนติบอดีด้วยวิธี ELISA การตรวจหาเช้ือด้วยวิธี PCR และยืนยันผลการทดสอบด้วยวิธี DNA sequencing ซ่ึงผู้ทดสอบต้องผ่านการฝึกอบรมการปฏิบัติงานด้วยเทคนิคดังกล่าวและปฏิบัติงานอย่างระมัดระวัง เพ่ือให้ ได้ผลการทดสอบท่ีถูกต้องและแม่นยำ

(3) การวิเคราะห์ผลและสรุปข้อมูล ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้และเข้าใจเกี่ยวกับธรรมชาติของเชื้อ ไวรัส ยีนท่ีศึกษา เทคนิคการตรวจด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุล และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเช้ือไวรัสโดยใช้โปรแกรมเฉพาะสำหรับวิเคราะห์ผลการทดสอบ

**11. การนำไปใช้ประโยชน์ หรือคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์**

ข้อมูลท่ีได้จากการศึกษาน้ี สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการสอบสวนการระบาดของโรคมาเร็กซ์ในฟาร์มไก่ และใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการควบคุม ป้องกัน และเฝ้าระวังโรคมาเร็กซ์ เพ่ือแก้ไขปัญหาด้านสุขภาพสัตว์และลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของเกษตรกร รวมท้ัง สามารถนำข้อมูลมาใช้อบรมถ่ายทอดความรู้ให้แก่เจ้าหน้าท่ีกรมปศุสัตว์ เกษตรกร นักวิชาการ และต่อยอดในการทำวิจัยต่อไป

ขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อ…………………………………………..………

(นางสาวอาภาพร ดอกพุฒ)

ผู้เสนอผลงาน

………../…………../………….

ขอรับรองว่าสัดส่วนหรือลักษณะงานในการดำเนินการของผู้เสนอข้างต้นถูกต้องตรงกับความจริงทุกประการ

ลงชื่อ……………………………….………………….

(นางสาวนันทพร วันดี)

นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ

ผู้ร่วมดำเนินการ

…………../…………../…………..

ลงชื่อ……………………………….………………….

(นางสาวใกล้รุ่ง ทนสระน้อย)

นายสัตวแพทย์ชำนาญการ

ผู้ร่วมดำเนินการ

…………../…………../…………..

## ได้ตรวจสอบแล้วขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวข้างต้นถูกต้องตรงกับความเป็นจริงทุกประการ

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

(นายบัณฑิต นวลศรีฉาย) (นายเชาวฤทธิ์ บุญมาทิต)

หัวหน้ากลุ่มไวรัสวิทยา ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

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

**หมายเหตุ** หากผลงานมีลักษณะเฉพาะ เช่นแผ่นพับ หนังสือ แถบบันทึกเสียง ฯลฯ ผู้เสนอผลงานอาจส่งผลงานจริงประกอบการพิจารณาของคณะกรรมการก็ได้

**เอกสารหมายเลข 4**

**ข้อเสนอแนวคิด/วิธีการเพื่อพัฒนางานหรือปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น**

**ชื่อ** นางสาวอาภาพร ดอกพุฒ

เพื่อประกอบการแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ ตำแหน่งเลขที่ 827

กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

**เรื่อง** การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยวิธี Real-time RT-PCR เพื่อสนับสนุนการขอรับรองมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025:2017

**หลักการและเหตุผล**

หนึ่งในโรคระบาดสัตว์ที่เคยส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อเศรษฐกิจ และอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกในประเทศไทย คือ โรคไข้หวัดนก หรือโรคไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีก โดยเฉพาะในช่วงปี พ.ศ. 2547 ที่มีสัตว์ปีกติดเชื้อไข้หวัดนกป่วยตายเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะไก่และเป็ด ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรไทยเป็นอย่างมาก รวมทั้งโรคนี้ยังส่งผลให้มีผู้เสียชีวิต เนื่องจากเชื้อไข้หวัดนกบางสายพันธุ์สามารถติดต่อสู่คนและก่อโรครุนแรงถึงชีวิตได้ โรคไข้หวัดนกจึงส่งผลกระทบต่อด้านสาธารณสุขของประเทศอีกด้วย แม้ว่าปัจจุบันประเทศไทยจะไม่มีรายงานการพบการระบาดของโรคนี้มาเป็นระยะเวลานานหลายปีแล้ว แต่ยังคงมีการระบาดของโรคไข้หวัดนกในประเทศเพื่อนบ้านหรือประเทศในภูมิภาคเดียวกันอย่างต่อเนื่องตลอดมา กรมปศุสัตว์จึงมีโครงการเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนก รวมทั้งมาตรการต่าง ๆ ที่เข้มงวด เพื่อป้องกันและเตรียมรับมือกับการระบาดของโรคที่อาจเกิดขึ้นได้อีกในอนาคต

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (สสช.) เป็นองค์กรหลักทางวิชาการด้านสุขภาพสัตว์ของประเทศไทยที่มีพันธกิจหลักที่สำคัญคือ ศึกษา ค้นคว้า และวิจัยทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับโรคที่เป็นปัญหาต่อสุขภาพสัตว์ และโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน ชันสูตรหาสาเหตุของโรคในสัตว์เพื่อนำไปสู่การควบคุม ป้องกัน และเฝ้าระวังโรคระบาด และดำเนินการพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยและชันสูตรโรคสัตว์ให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล นับได้ว่าสสช. เป็นหนึ่งในหน่วยงานที่มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการควบคุม และเฝ้าระวังการระบาดของโรคไข้หวัดนกในประเทศไทยเป็นอย่างมาก เพราะนอกจากจะตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกในตัวอย่างส่งตรวจจากเจ้าหน้าที่รัฐ หน่วยงานเอกชน หรือเกษตรกรเจ้าของฟาร์มสัตว์แล้ว สสช. ยังเป็นห้องปฏิบัติการกลางที่ทำหน้าที่ให้คำปรึกษา แนะนำ และถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับหน่วยงานภายใต้สังกัดสสช. และหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง เพื่อสนับสนุนการปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการเหล่านั้นในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน

การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกทางห้องปฏิบัติการ สามารถแบ่งออกเป็น 3 อย่าง ได้แก่ การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสโดยวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) แล้วทดสอบด้วยวิธี Haemagglutination (HA) การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโดยวิธี Haemagglutination Inhibition (HI) และการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ซึ่งวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัส และวิธี HI นั้น ถูกยกให้เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard method) ในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนก ซึ่งทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สสช. สามารถตรวจวินิจฉัยโรคโดยสองวิธีดังกล่าวได้ และได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 เรียบร้อยแล้ว ส่วนการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสนั้น ถือว่าเป็นวิธีทางเลือกในการทดสอบหาเชื้อไวรัส เนื่องจากสามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ (subtype) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก และช่วยยืนยันผลการทดสอบของวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัสได้ ปัจจุบันทางห้องปฏิบัติการกำลังอยู่ในช่วงพัฒนาวิธี Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR) เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนก เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง มีข้อดีอยู่หลายประการ ได้แก่ มีความไวสูง (high sensitivity) สามารถให้ผลการทดสอบภายในเวลา 2 – 3 ชั่วโมง ไม่ต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตในการทดสอบเหมือนกับวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัส และที่สำคัญสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคได้ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ซึ่งต่างจากวิธีเพาะแยกเชื้อที่สามารถตรวจสอบหาได้เฉพาะเชื้อไวรัสที่มีชีวิตเท่านั้น และเพื่อเป็นการยกระดับมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ จึงมีความจำเป็นที่ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สสช. จะต้องพัฒนาและดำเนินการให้วิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO เพื่อให้วิธีทดสอบมีมาตรฐาน และมีความน่าเชื่อถือ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธี (test validation) เป็นหนึ่งในข้อกำหนดที่สำคัญในการขอรับรองมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025:2017 เนื่องจากเมื่อใดก็ตามที่ห้องปฏิบัติการต้องการใช้วิธีทดสอบที่มีการดัดแปลง หรือพัฒนาขึ้นมาใหม่ แตกต่างจากวิธีที่ได้รับการยอมรับให้เป็นวิธีมาตรฐาน จะต้องดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีนั้นก่อน เพื่อให้ทราบถึงความสามารถหรือประสิทธิภาพของการทดสอบนั้น ๆ เช่น ความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำ และความคลาดเคลื่อนของการทดสอบ เป็นต้น ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการตัดสินใจเลือกใช้วิธีทดสอบให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งาน ในกรณีนี้ วิธี Real-time RT-PCR เป็นวิธีทางเลือกที่ไม่ใช่วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนก ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นมาโดยห้องปฏิบัติการอื่น และหากสสช. จะนำวิธีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ เพื่อให้การวินิจฉัยโรคมีความแม่นยำและถูกต้องยิ่งขึ้น ดังนั้นการทดสอบความใช้ได้ของวิธี จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและสมควรดำเนินการเป็นอย่างยิ่ง เพื่อช่วยผลักดันให้วิธีการทดสอบนี้สามารถผ่านการรับรองมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025:2017

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

1. ทบทวนเอกสารเกี่ยวกับการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเชิงปริมาณ
2. วางแผนและกำหนดผู้รับผิดชอบในการดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ
3. ดำเนินการนำเชื้อไวรัสไข้หวัดนกอ้างอิง ที่เก็บรักษาไว้ ของกลุ่มไวรัสวิทยา สสช. มาทำให้มีชีวิตอีกครั้ง (refresh) และเพิ่มจำนวนโดยการฉีดเชื้อลงในไข่ไก่ฟัก
4. เตรียมตัวอย่าง artificial positive control RNA จากกระบวนการ *in vitro* transcription โดยเริ่มจากการสกัดสารพันธุกรรมชนิด RNA ของเชื้อไวรัสอ้างอิง แล้วเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย (target gene) ที่จำเพาะของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยเทคนิค DNA cloning จากนั้นทำการเปลี่ยน DNA ให้เป็น RNA โดยเทคนิค transcription
5. วัดปริมาณ RNA ตั้งต้นด้วยเครื่อง NanoDrop spectrophotometer และคำนวณหาค่า RNA copy number ก่อนนำไปใช้งาน
6. ดำเนินการหาค่าของ parameters ต่าง ๆ ที่เป็นข้อกำหนดของการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ
7. บันทึกข้อมูลของผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยวิธี Real-time RT-PCR ในแฟ้มจัดเก็บข้อมูล เพื่อใช้เป็นข้อมูลส่วนหนึ่งของการยื่นขอรับรองมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025:2017 ในขั้นตอนต่อไป

**ผลที่คาดว่าจะได้รับ**

1. ได้ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยวิธี Real-time RT-PCR ของกลุ่มไวรัสวิทยา สสช.
2. สามารถนำผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีนี้ไปใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการขอรับรองมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025:2017
3. สามารถใช้วิธี Real-time RT-PCR เป็นวิธีทางเลือกสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนก และจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส ได้อย่างถูกต้องตามการประกันคุณภาพทางห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017
4. สามารถเพิ่มความมั่นใจให้กับผู้รับบริการที่ส่งตัวอย่างเข้ามาตรวจโรคไข้หวัดนก ที่สสช.
5. สามารถใช้ผลงานนี้เป็นแนวทางในการดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีเชิงปริมาณให้กับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคนอื่น ๆ ของสสช. หน่วยงานภายใต้สังกัดสสช. หรือหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง เพื่อควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการของวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคอื่น ๆ

**ตัวชี้วัดความสำเร็จ**

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยวิธี Real-time RT-PCR ของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สสช.

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

(นางสาวอาภาพร ดอกพุฒ)

ผู้เสนอแนวคิด

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

## **การพิจารณาประเมินข้าราชการเพื่อคัดเลือกให้ส่งผลงานทางวิชาการ**

ชื่อ นางสาวอาภาพร ดอกพุฒ

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ ตำแหน่งเลขที่ 827

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ ตำแหน่งเลขที่ 827

ส่วน/กลุ่ม/ฝ่าย กลุ่มไวรัสวิทยา

กอง/สำนัก/จังหวัด สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

### การพิจารณา (คะแนนเต็ม 100 คะแนน)

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

2. ข้อเสนอแนวคิด/วิธีการเพื่อพัฒนางานหรือปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

50 คะแนน ได้รับ …………….คะแนน

**รวม** ………………คะแนน

ลงชื่อ……………………………………………..

(นายเชาวฤทธิ์ บุญมาทิต)

ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

วันที่……………………………….

**หมายเหตุ** ผู้ที่ผ่านการประเมินต้องได้รับคะแนนไม่ต่ำกว่า 80 คะแนน