คู่มือการปฏิบัติงาน

(Work Manual)

กระบวนงาน เทคนิค Real-time PCR สำหรับตรวจวินิจฉัย

เชื้อ *Taylorella equigenitalis*

(ก่อโรคมดลูกอักเสบติดต่อในม้า; Contagious Equine Metritis; CEM)

กรมปศุสัตว์

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ	2567

สารบัญ

	หน้า
1. วัตถุประสงค์ของการจัดทำคู่มือ	3
2. ขอบเขต	3
3. คำจำกัดความ	3
4. หน้าที่ความรับผิดชอบ	4
5. Work flow กระบวนการ	4
6. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	5
7. มาตรฐานงาน	6
8. ระบบติดตามประเมินผล	6
9. เอกสารอ้างอิง	7
10. แบบฟอร์มที่ใช้	7

คู่มือการปฏิบัติงาน
กระบวนงาน เทคนิค Real-time PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Taylorella equigenitalis*
(ก่อโรคมดลูกอักเสบติดต่อในม้า; Contagious Equine Metritis; CEM)

1. วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อให้กรมปศุสัตว์ มีการจัดทำคู่มือการปฏิบัติงานที่แสดงถึง รายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติงานของกิจกรรม/กระบวนการต่างๆ ของหน่วยงาน และเป็นการสร้างมาตรฐานการปฏิบัติงาน ที่มุ่งไปสู่การบริหารคุณภาพทั่วทั้งองค์กรอย่างมีประสิทธิภาพ เกิดผลงานที่ได้มาตรฐานเป็นไปตามเป้าหมาย ได้ผลิตผลหรือการบริการที่มีคุณภาพ และบรรลุข้อกำหนดที่สำคัญของกระบวนการ

1.2 เพื่อใช้สำหรับการพัฒนาและเรียนรู้ของผู้เข้ามาปฏิบัติงานใหม่ รวมถึงการยกระดับการปฏิบัติงานไปสู่ความเป็นมืออาชีพ ตลอดจนใช้ประกอบการประเมินผลการปฏิบัติงานของบุคลากร

1.3 เพื่อใช้แสดงหรือเผยแพร่ให้กับบุคคลภายนอกหรือผู้รับบริการ ได้รับรู้ เข้าใจกระบวนการปฏิบัติงานและใช้ประโยชน์จากกระบวนการดังกล่าวเพื่อขอการรับบริการที่ตรงกับความต้องการ

1.4 เพื่อพัฒนาขีดความสามารถในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ ให้สอดคล้องกับความต้องการของผู้รับบริการ

2. ขอบเขต

คู่มือการปฏิบัติงานนี้ครอบคลุมขั้นตอน การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Taylorella equigenitalis* ในสัตว์ตระกูลม้า เช่น ม้า ลา ล่อ ม้าลาย และสัตว์ป่าอื่น ๆ เช่น แรด สมเสร็จ ม้าลาย ฮิปโปแคระ เป็นต้น ด้วย เทคนิค Real-time PCR ตั้งแต่การสกัดสารพันธุกรรม การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และการวิเคราะห์ผล สำหรับห้องปฏิบัติการกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

3. คำจำกัดความ

มาตรฐาน คือ สิ่งที่เอาเป็นเกณฑ์สำหรับเทียบกำหนด ทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพ (พจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2542)

มาตรฐานการปฏิบัติงาน (Performance Standard) เป็นผลการปฏิบัติงานในระดับใดระดับหนึ่ง ซึ่งถือว่าเป็นเกณฑ์ที่น่าพอใจหรืออยู่ในระดับที่ผู้ปฏิบัติงานส่วนใหญ่ทำได้ โดยจะมีกรอบในการพิจารณากำหนดมาตรฐานหลายๆ ด้าน อาทิ ด้านปริมาณ คุณภาพ ระยะเวลา ค่าใช้จ่าย หรือพฤติกรรมของผู้ปฏิบัติงาน

โรคมดลูกอักเสบติดต่อในม้า (Contagious Equine Metritis; CEM) หมายถึง โรคติดเชื้อในระบบทางเดินสืบพันธุ์ในม้า ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Taylorella equigenitalis* โดยมักก่อให้เกิดภาวะผสมไม่ติดชั่วคราว

สัตว์ตระกูลม้า หมายถึง สัตว์ที่จัดจำแนกในตระกูล Equidae เช่น ม้า ลา ล่อ เป็นต้น

สัตว์ป่า หมายถึง สัตว์ป่าที่สามารถติดเชื้อ *Taylorella equigenitalis* หรืออยู่ในข้อกำหนดที่ต้องตรวจวินิจฉัยสำหรับออกใบรับรองด้านสุขภาพสัตว์ในการนำเข้าส่งออก เช่น แรด สมเสร็จ ม้าลาย ฮิปโปแคระ เป็นต้น

Real-time PCR หมายถึง เทคนิคการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งต้องการตรวจวัดได้และสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน

4. หน้าที่ความรับผิดชอบ

ผู้ส่งตัวอย่างหรือผู้รับบริการ ยื่นแบบฟอร์มการรับตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ ผ่านระบบบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ (Laboratory Information Management Systems; LIMS) และนำส่งตัวอย่างที่ห้องรับตัวอย่าง กลุ่มระบาดวิทยาทางห้องปฏิบัติการ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

เจ้าหน้าที่รับตัวอย่าง กลุ่มระบาดวิทยาทางห้องปฏิบัติการ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ตรวจสอบรายละเอียดตัวอย่าง รายการทดสอบ จำนวนและสภาพของตัวอย่างส่งตรวจ จัดเก็บตัวอย่างระหว่างรอส่งต่อห้องปฏิบัติการ ประสานห้องปฏิบัติการเพื่อรับตัวอย่าง

ผู้ปฏิบัติการทดสอบ ตรวจสอบตัวอย่างว่าตรงกับรายละเอียดนำส่ง และมีลักษณะเหมาะสมในการทดสอบหรือไม่ แล้วทำการปฏิบัติการทดสอบ บันทึกผลการทดสอบ สรุปผลการทดสอบ และยืนยันผลการทดสอบ เพื่อส่งผ่านระบบบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ (LIMS) ให้กลุ่มระบาดวิทยาทางห้องปฏิบัติการ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ทำการรายงานผลการทดสอบ

5. Work flow กระบวนการ

ลำดับ	ผังกระบวนการ	รายละเอียด	ผู้รับผิดชอบ	ระยะเวลา	แบบฟอร์ม/เอกสารอ้างอิง
1	Sample submission	รับตัวอย่างจากกลุ่มระบาดวิทยา ฯ	ผู้ปฏิบัติการทดสอบ	10 นาที	แบบฟอร์ม LIMS-7.1-002
2	DNA extraction	การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ ***Taylorella equigenitalis***	ผู้ปฏิบัติการทดสอบ	2 ชั่วโมง	QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook (QIAGEN, 2024)
3	DNA amplification	การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ ***Taylorella equigenitalis*** ด้วยวิธี Real-time PCR	ผู้ปฏิบัติการทดสอบ	2 ชั่วโมง	Wakeley *et al*., 2006
4	Result Analysis Inconclusive	วิเคราะห์ผลจากเครื่อง สรุป บันทึกและยืนยันผลการทดสอบ	ผู้ปฏิบัติการทดสอบ	1 ชั่วโมง	แบบฟอร์ม LIMS-7.2-026
5	Detect / Not detect Report	รายงานผลในระบบ LIMS	กลุ่มระบาดวิทยาฯ	10 นาที	

<u>หมายเหตุ</u> หากการทดสอบให้ผลวิเคราะห์ Inconclusive จะทำการทดสอบซ้ำโดยเริ่มในลำดับขั้นตอนที่ 2

6. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

6.1 รับตัวอย่างจากกลุ่มระบาดวิทยาทางห้องปฏิบัติการ ตรวจสอบตัวอย่างว่าตรงกับรายละเอียดนำส่งตามแบบฟอร์ม LIMS-7.1-002

6.2 สกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN®, Germany)

6.2.1 นำตัวอย่างก้านสวอป (Transport swab with Amies with charcoal) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL เติม Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.2 ปริมาตร 400 µL

6.2.2 เติม AL buffer 400 µL และ Proteinase K 20 µL ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 10 นาที ใน heat block

6.2.3 เติม 96-100% ethanol 400 µL ผสมให้เข้ากัน แล้วปิเปตสารละลายใส่หลอด QIAamp Mini spin column ปริมาตร 700 µL นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

6.2.4 ย้าย QIAamp Mini spin column ใส่ collection tube หลอดใหม่ แล้วปิเปตสารละลายที่เหลือจากข้อ 6.2.3 ปริมาตรสูงสุด 700 µL ใส่หลอด QIAamp Mini spin column นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

6.2.5 เปิดหลอด QIAamp Mini spin column แล้วเติม AW1 buffer 500 µL นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง Collection tube หลอดเก่า

6.2.6 เปลี่ยน collection tube หลอดใหม่ แล้วเติม AW2 buffer 500 µL นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ทิ้ง Collection tube หลอดเก่า

6.2.7 เปลี่ยน collection tube หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

6.2.8 ย้าย QIAamp Mini spin column มาใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL หลอดใหม่ แล้วเติม Buffer AE ปริมาตร 80 µL บ่มอุณหภูมิห้อง (15-25 °C) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ก็จะได้ Purified template DNA สำหรับนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในขั้นตอนต่อไป

6.3 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *T. equigenitalis* ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ Primer Probe และ Condition ตามวิธีของ Wakeley และคณะ (2006)

6.3.1 เตรียม 0.2 mL strip tubes ตามจำนวนตัวอย่างที่จะนำมาทดสอบ ซึ่งรวมถึงตัวอย่างควบคุมบวกและควบคุมลบ

6.3.2 เตรียมน้ำยา Mastermix โดยใช้องค์ประกอบและสัดส่วนดังแสดงในตาราง ซึ่งในแต่ละหลอดจะมีปริมาตร 18 µL ผสมน้ำยา mastermix ให้เข้ากันด้วย vortex mixer และ spin down

องค์ประกอบ	1 reaction (µL)	X reactions (µL)
LightCycler® 480 Probes Master, 2x conc.	10	
10 µM Forward primer (Tay377-F)	1	
10 µM Reverse primer (Tay488-R)	1	
10 µM Tequi FAMprobe	0.5	
Nuclease-free water	5.5	

6.3.3 เติม DNA template ของตัวอย่างทดสอบที่ได้จากข้อ 6.2.8 ลงในหลอดบรรจุน้ำยา mastermix ปริมาตร 2 µL ในแต่ละตัวอย่าง

6.3.4 ปิดหลอด strip tubes ด้วย strip caps แล้ว spin down

6.3.5 เปิดเครื่อง LightCycler®480 Real-Time PCR กดปุ่ม เพื่อนำตัวอย่าง strip tube เข้าสู่ถาดบรรจุตัวอย่าง กดปุ่ม อีกครั้งเพื่อนำถาดบรรจุตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง

6.3.6 เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์และเข้าซอฟแวร์ LightCycler®480 ตั้งโปรแกรมสำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมดังนี้

Pre-incubation 1 cycle

95°C 10 minutes ramp rate = 4.40 °C/s

Amplification 45 cycles

95°C 15 seconds ramp rate = 4.40 °C/s

60°C 40 seconds ramp rate = 2.20 °C/s Acquisition mode=single

Cooling 1 cycle

40°C 30 seconds ramp rate = 2.20 °C/s

6.3.7 คลิกปุ่ม Start Run เพื่อเริ่มโปรแกรมเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

6.3.8 หลังจากโปรแกรมเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมเสร็จสิ้น ซอฟแวร์จะแจ้งว่า Run Complete ให้คลิกแท็บ Analysis ซ้ายมือ และคลิกเลือกโปรแกรม Abs Quant/2nd Derivative Max เพื่อแสดงผล Amplification Curve

6.3.9 คลิกเลือกตัวอย่างในการทดสอบ แล้วคลิกปุ่ม Calculate ซอฟแวร์จะคำนวณค่า Crossing point value (Cp) และตีความว่าแต่ละตัวอย่างให้ผลเป็น Positive Negative หรือ Late CP call has higher uncertainty หรือ Detected call uncertain

6.4 วิเคราะห์ผลการทดสอบว่าพบหรือไม่พบเชื้อ *T. equigenitalis* หากผลการทดสอบเป็น Late CP call has higher uncertainty หรือ Detected call uncertain ให้ทำการทดสอบซ้ำโดยเริ่มตั้งแต่ ข้อ 6.2 เป็นต้นไป

6.5 บันทึกผลการทดสอบ สรุปผลการทดสอบ และยืนยันผลการทดสอบ เพื่อส่งผ่านระบบบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ (LIMS) ให้กลุ่มระบาดวิทยาทางห้องปฏิบัติการ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ทำการรายงานผลการทดสอบ

7. มาตรฐานงาน

ตอบผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการภายใน 1-2 วันทำการ

8. ระบบติดตามประเมินผล

กลุ่มระบาดวิทยาทางห้องปฏิบัติการ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เป็นผู้รับผิดชอบติดตามการปฏิบัติงานผ่านระบบบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ (LIMS) เป็นประจำทุกสัปดาห์

9. เอกสารอ้างอิง

9.1 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2558. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม ตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 ราชกิจจานุเบกษาเล่ม 132/ตอนพิเศษ 347 ง/หน้า 10-15/29 ธันวาคม 2558.

9.2 The Infectious Diseases of Horses Order, No.790 Article 2 (1987). https://www.legislation.gov.uk/uksi/1987/790/contents/made.

9.3 Wakeley, P. R., Errington, J., Hannon, S., Roest, H. I. J., Carson, T., Hunt, B. and Heath, P. 2006. Development of a real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *Taylorella asinigenitalis*. Veterinary microbiology: 118(3-4), 247-254.

9.4 World Organisation for Animal Health (WOAH), 2023. “Chapter 3.6.2 Contagious Equine Metritis version adopted in May 2022” In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. [online]. Available: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.02_CEM.pdf [Accessed March 21, 2024].

10. แบบฟอร์มที่ใช้

10.1 แบบฟอร์มรับตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ LIMS-7.1-002

10.2 แบบฟอร์มทบทวนและสรุปผล real-time PCR LIMS-7.2-026