บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง และแผนการทดลอง

3.1.1 สัตว์ทดลอง และการแบ่งกลุ่ม

การศึกษานี้ใช้แพะเพศเมียลูกผสมพื้นเมืองกับพันธุ์ซาเนนหรือแองโกลนูเบียน โดยมีสายเลือดแพะต่างประเทศร้อยละ 62.5-75.0 จำนวน 12 ตัว จากฟาร์มแพะ-แกะของภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สุ่มแพะเข้าสู่กลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัว โดยแต่ละกลุ่มมีอายุ และน้ำหนักเฉลี่ยใกล้เคียงกัน แพะทดลองในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีอายุเฉลี่ย 320, 310 และ 300 วัน ตามลำดับ และน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 13.76, 14.18 และ 13.90 ก.ก. ตามลำดับ กำหนดกลุ่มตามระดับการเสริมทองแดงในรูป copper sulphate ($CuSO_4.5H_2O$, feed grade ; 25 % Cu) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 เสริมทองแดง 0 ppm ในอาหารข้น (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 เสริมทองแดง 20 ppm ในอาหารข้น (+ Cu 20 ppm)

กลุ่มที่ 3 เสริมทองแดง 50 ppm ในอาหารข้น (+ Cu 50 ppm)

แพะทดลองทุกตัวได้รับการถ่ายพยาธิภายในและกำจัดพยาธิภายนอกก่อนการทดลองโดยใช้ Valbasen® และ Arsuntol 50 ® ตามลำดับ

การชั่งน้ำหนักจะชั่งตอนเช้าก่อนให้อาหาร น้ำหนักเริ่มต้นและน้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลองได้จากการชั่งน้ำหนักติดต่อกัน 3 วันแล้วใช้ค่าเฉลี่ยเป็นตัวแทน ส่วนระหว่างการทดลองในแต่ละระยะจะชั่งเพียงครั้งเดียว

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบและองค์ประกอบทางเคมีของอาหารในการทดลอง

ส่วนประกอบ (ก.ก.)	สูตรอาหารข้น		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเสริมทองแดง 20 ppm	กลุ่มเสริมทองแดง 50 ppm
ข้าวโพด	67	67	67
กากถั่วเหลือง	17	17	17
รำละเอียด	14	14	14
เกลือ	1	1	1
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	1	1	1
Copper sulphate (ก.)	0	8	20
องค์ประกอบทางเคมี			
อาหารข้น			
DM, %	89.74	90.12	89.54
CP, % น้ำหนักแห้ง	13.25	12.95	13.33
ทองแดง, ppm[a]	9.05	28.74	59.12
ฟางข้าว			
DM, %	90.8	90.8	90.8
CP, % น้ำหนักแห้ง	3.5	3.5	3.5
ทองแดง, ppm[a]	0.91	0.91	0.91

[a] ม.ก./ก.ก. อาหารที่ให้ (as fed)

3.1.2 อาหารทดลอง

สัตว์ทดลองทุกกลุ่มได้รับอาหารหยาบ คือ ฟางข้าว และอาหารข้นมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 6 ส่วนน้ำวางไว้ให้ดื่มตลอดเวลา

ชั่งน้ำหนักอาหารหยาบและอาหารข้นและผสมกันก่อนให้แพะทดลองกินในแต่ละมื้อในอัตราส่วน ฟางข้าว : อาหารข้น เท่ากับ 40 : 60 ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ที่เวลาประมาณ 9.00 น. และ 16.00 น. ปริมาณอาหารที่สัตว์แต่ละตัวได้รับจะพิจารณาตามปริมาณที่แพะแต่ละตัวกินได้เต็มที่โดยให้มีอาหารเหลือให้น้อยที่สุด

ก่อนเริ่มการทดลองได้ทดลองให้แพะทดลองทั้งหมดกินอาหารที่จะใช้ในการทดลอง เพื่อสร้างความคุ้นเคยกับการเปลี่ยนอาหาร โดยเปลี่ยนจากหญ้าสดมาเป็นฟางและอาหารข้นที่จะใช้ในการทดลอง โดยใช้อาหารข้นสูตรเดียวกับการทดลองที่ไม่มีการเสริมทองแดงเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าแพะทดลองทุกตัวกินอาหารและเจริญเติบโตเป็นปกติ แพะทดลองทุกตัวไม่แสดงอาการเครียดเนื่องจากการขังกรง

3.1.3 คอกทดลอง

คอกทดลองเป็นคอกคอนกรีตยกพื้นสูงจากพื้นดินประมาณ 1.20 ม. พื้นคอกเป็นพื้น slat แพะทดลองจัดให้อยู่ในคอกเดี่ยวกว้างประมาณ 80 ซ.ม. และยาวประมาณ 1.00 ม. แต่ละคอกกั้นด้วยลูกกรงเหล็กบุด้วยลวดตาข่ายสูงประมาณ 1.00 ม. มีรางอาหารและถังน้ำอยู่ภายในคอกทดลองของแต่ละตัว

3.1.4 การเก็บตัวอย่าง

3.1.4.1 ตัวอย่างเลือดและการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

เก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ในตอนเช้าหลังจากให้อาหาร เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการทำลายแบคทีเรียของ neutrophils วัดค่าโลหิตวิทยา (hematological parameters) และแยกตัวอย่างซีรั่มเพื่อวัดความเข้มข้นของทองแดงและการทำงานของ ceruloplasmin การเก็บตัวอย่างเลือดกระทำเมื่อเริ่มทดลองและทุก 30 วัน จนสิ้นสุดการทดลอง 150 วัน รวมเก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมด 6 ครั้ง

การเก็บตัวอย่างซีรั่มเพื่อทดสอบระดับของแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay (ELISA) โดยการฉีดกระตุ้นแพะทดลองด้วย Human Serum Albumin (HSA) ในน้ำเกลือ 0.9 % ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อม.ล. ปริมาตร 0.5 ม.ล. ผสมกับ Freund' s incomplete adjuvant ปริมาตร 0.5 ม.ล. (Eide *et al.*, 1992) ฉีดเข้าใต้ผิวหนังโคนขาหลังของแพะทดลองข้างละ 0.5 ม.ล. ฉีด 2 ครั้งในวันที่ 60 และ 74 ของการทดลอง เก็บตัวอย่างซีรั่มในวันที่ 60 (pre-immunized serum), วันที่ 74 (primary immunized serum) และวันที่ 88 (secondary immunized serum) ก่อนการทดลองแพะปกติ 1 ตัวในฟาร์มที่ไม่ถูกนำมาทดลองจะถูกฉีด HSA ที่ความเข้มข้นเดียวกันและด้วยวิธีเดียวกันเพื่อเก็บตัวอย่างซีรั่ม นำไปวัดระดับแอนติบอดีและเก็บตัวอย่างซีรั่มไว้เป็น positive control ในการทดลอง

3.1.4.2 ตัวอย่างอวัยวะภายใน

หลังจากสิ้นสุดการทดลอง 150 วัน แพะทดลองจะถูกฆ่าและนำไปทำการชันสูตรซากเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในส่วนของความเป็นพิษที่เกิดจากทองแดง และเก็บตัวอย่างอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ไต และม้าม เพื่อวัดความเข้มข้นของทองแดง โดยแช่ตัวอย่างสดในน้ำเกลือปราศจากประจุ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 °c เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.1.4.3 ตัวอย่างอาหาร

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารข้นหลังจากผสมทุกครั้ง เพื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีและวัดความเข้มข้นของทองแดง

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายแบคทีเรียของ neutrophils

3.2.1.1 สำหรับเก็บตัวอย่างเลือดและซีรั่ม

3.2.1.1.1 หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 20 ม.ล.

3.2.1.1.2 เข็มฉีดยา ขนาด 18 G x 1.5 นิ้ว

3.2.1.1.3 หลอดพลาสติก ขนาด 50 ม.ล. พร้อมฝาปิด

3.2.1.1.4 หลอดพลาสติก ขนาด 12 ม.ล. พร้อมฝาปิด

3.2.1.2 สำหรับแยก neutrophils จากเลือด

3.2.1.2.1 เครื่องเหวี่ยง (centrifuge)

3.2.1.2.2 ปิเปตแก้วสำหรับดูดสารละลาย (pasteur pipette)

3.2.1.2.3 ปิเปตแก้วขนาด 10 และ 5 ม.ล.

3.2.1.2.4 Pipette gun

3.2.1.2.5 หลอดหยด (dropper)

3.2.1.2.6 ไมโครปิเปต (micro pipette) ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

3.2.1.2.7 ปิเปตทิป (pipette tip)

3.2.1.2.8 Hemacytometer

3.2.1.3 สำหรับเลี้ยงและวัดปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus*

3.2.1.3.1 หลอดแก้วขนาด 20 ม.ล.

3.2.1.3.2 ตู้อบ 37 °c

3.2.1.3.3 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1201)

3.2.1.3.4 คิวเวตชนิดแก้ว (glass cuvette) (light path 1 ซ.ม.)

3.2.1.4 สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการกินและทำลายเชื้อของ neutrophils

3.2.1.4.1 หลอดแก้วขนาด 5 ม.ล.

3.2.1.4.2 จานเลี้ยงเชื้อ (plate)

3.2.1.4.3 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath)

3.2.2 Enzyme Linked Immunosorbant Assay

3.2.2.1 สำหรับ immunization และเก็บตัวอย่างซีรั่ม

3.2.2.1.1 ไวแอล (vial) ขนาด 5 ม.ล.

3.2.2.1.2 หลอดฉีดยาชนิดแก้ว ขนาด 3 ม.ล.

3.2.2.1.3 หลอดฉีดยา ขนาด 5 ม.ล.

3.2.2.1.4 เข็มฉีดยา ขนาด 18 G x 1.5 นิ้ว

3.2.2.1.5 หลอดพลาสติก ขนาด 12 ม.ล.

3.2.2.1.6 หลอดพลาสติกขนาด 2 ม.ล.

3.2.2.1.7 เครื่องเหวี่ยง

3.2.2.1.8 ตู้เย็น (4 °c)

3.2.2.2 สำหรับทดสอบ ELISA

3.2.2.2.1 ELISA plate 96 wells

3.2.2.2.2 หลอดแก้วขนาด 5 ม.ล.

3.2.2.2.3 ไมโครปิเปต (micro pipette) ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

3.2.2.2.4 ปิเปตทิป (pipette tip)

3.2.3 การวัดความเข้มข้นของทองแดงในซีรั่ม อวัยวะภายใน และอาหาร

3.2.3.1 สำหรับเก็บตัวอย่างซีรั่ม

3.2.3.1.1 หลอดฉีดยา ขนาด 5 ม.ล.

3.2.3.1.2 เข็มฉีดยา ขนาด 18 G x 1.5 นิ้ว

3.2.3.1.3 หลอดพลาสติก ขนาด 12 ม.ล.

3.2.3.1.4 หลอดพลาสติกขนาด 2 ม.ล.

3.2.3.1.5 เครื่องเหวี่ยง

3.2.3.1.6 ตู้เย็น

3.2.3.2 สำหรับการเก็บตัวอย่างอวัยวะภายใน และอาหาร

3.2.3.2.1 ถุงพลาสติกพร้อมยางรัด

3.2.3.2.2 ตู้อบ 100 °c

3.2.3.3 สำหรับการวัดความเข้มข้นของทองแดง

3.2.3.3.1 เครื่องชั่ง

3.2.3.3.2 เตาอบ 550 °c

3.2.3.3.3 ถ้วยทนความร้อน

3.2.3.3.4 หลอดพลาสติก ขนาด 12 ม.ล.

3.2.3.3.5 Volumetric flask ขนาด 100 ม.ล.

3.2.3.3.6 Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) (Perkin elmer 3100)

3.2.4 การวัดการทำงานของ ceruloplasmin

3.2.4.1 หลอดพลาสติก ขนาด 2 ม.ล.

3.2.4.2 หลอดแก้ว ขนาด 5 ม.ล.

3.2.4.3 ไมโครปิเปต ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

3.2.4.4 ปิเปตทิป

3.2.4.5 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ

3.2.4.6 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu, UV-1201)

3.2.4.7 คิวเวตชนิดแก้ว (light path 1 ซ.ม.)

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (วิธีการเตรียมสารต่าง ๆ แสดงที่ภาคผนวก ก.)

3.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายแบคทีเรียของ neutrophils

3.3.1.1 Acid citrate dextrose solution (ACD) (pH 5.4)

3.3.1.2 Ammonium Chloride solution (pH 7.2)

3.3.1.3 0.15 M Phosphate buffer saline solution (PBSS) (0.9 % NaCl, pH 7.4)

3.3.1.4 0.15 M Phosphate buffer saline solution (PBSS) (2.7 % NaCl, pH 7.4)

3.3.1.5 Turk solution

3.3.1.6 Hank balance salt solution (HBSS) (GIBCO)

3.3.1.7 HBSS ที่มี 10 % goat serum (HBSS 9 ม.ล., goat serum 1 ม.ล.)

3.3.1.8 HBSS ที่มี 10 % fetal calf serum (FCS) และ 2.8 % miramycin

3.3.1.9 Nutrient broth (DIFCO)

3.3.1.10 Nutrient agar (DIFCO)

3.3.2 Enzyme linked immunosorbant assay

3.3.2.1 Human serum albumin (HSA)

3.3.2.2 Rabbit antigoat IgG conjugated horse-radish peroxidase (HRP) (H+L) (ZYMED)

3.3.2.3 1-2-Phenylenediamine (OPD) substrate (SIGMA)

3.3.2.4 0.9 % Phosphate buffer saline (PBS)

3.3.2.5 0.9 % PBS + 0.05 % Tween 20

3.3.2.6 Carbonate buffer

3.3.2.7 1 N sulfuric acid

3.3.3 การวัดความเข้มข้นของทองแดงในซีรั่ม อวัยวะภายใน และอาหาร

3.3.3.1 Standard copper (Titrisol® Merck)

3.3.3.2 น้ำกลั่นไร้ประจุ (deionized water)

3.3.3.3 2 N HCl

3.3.4 การวัดการทำงานของ ceruloplasmin

3.3.4.1 Acetate buffer solution (1.09 mol/l) (ionic strength 1.2, pH 6.2)

3.3.4.2 0.02 % sodium azide (NaN_3) solution

3.3.4.3 0.1 % buffered p-phenylenediamine dihydrochloride solution

3.3.4.4 Brandowski 's Base

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายแบคทีเรียของ neutrophils

3.4.1.1 การแยก neutrophils ออกจากเลือด

(ดัดแปลงจากวิธีของ Maddux and Keeton,1987)

3.4.1.1.1 เจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอปริมาตร 20 ม.ล. ใส่ลงในหลอดพลาสติก ที่มี ACD solution (2x) 2.5 ม.ล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

3.4.1.1.2 ดูดพลาสมา, buffy coat และเม็ดเลือดแดงครึ่งหนึ่งทิ้ง ทำให้เม็ดเลือดแดงส่วนที่เหลือแตกด้วย ammonium chloride (4 °c) ปริมาตร 2 เท่าของเม็ดเลือดแดงที่เหลือ ดูดขึ้นลงด้วยปิเปตเป็นเวลา 60 วินาที หยุดการ lysis ด้วย 0.15 M PBSS (2.7 % NaCl, 4 °c) ปริมาตรเท่ากับเม็ดเลือดแดงที่เหลือ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

3.4.1.1.3 ดูดส่วนของเหลวออก ทำให้เม็ดเลือดแดงที่เหลือแตกอีกครั้งตามข้อ 3.4.1.1.2

3.4.1.1.4 ดูดส่วนของเหลวออก ปั่นล้าง cell pellet ด้วย 10 ม.ล. ของ 0.15 M PBSS (0.9 % NaCl, RT) ที่ 1000 x g 10 นาที

3.4.1.1.5 ดูดส่วนของเหลวออก และ resuspend ส่วนของ cell pellet ด้วย 5 ม.ล. ของ 0.15 M PBSS (0.9 % NaCl, RT)

3.4.1.1.6 นับจำนวน neutrophils ด้วย hemacytometer โดยใช้ Turk solution และปรับจำนวนให้ได้ 3.0×10^6 เซลล์/ม.ล. ด้วย 0.15 M PBSS (0.9 % NaCl, RT)

3.4.1.2 การเตรียมเชื้อ *Staphylococcus aureus*

3.4.1.2.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus* ใน nutrient broth 10 ม.ล. ในตู้อบ 37 °c นาน 18 ชั่วโมง

3.4.1.2.2 นำเชื้อไปวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer (Shimadzu, UV-120) ในคิวเวต ที่ความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตร บันทึกค่าดูดกลืนแสงไว้เพื่อคำนวณ

3.4.1.2.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนของเหลวทิ้ง

3.4.1.2.4 ปั่นล้างด้วย 0.85 % NaCl 10 ม.ล. ที่ 1500 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนของเหลวทิ้ง

3.4.1.2.5 เจือจางเชื้อด้วย HBSS โดยคำนวณปริมาณของ HBSS ที่จะใช้จากค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากข้อ 3.4.1.2.2 เพื่อปรับค่าความขุ่นให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.6

3.4.1.2.6 เจือจางเชื้ออีก 50 เท่า ด้วย HBSS + 10 % serum (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 2.5×10^8 เซลล์/ม.ล.)

3.4.1.3 การทดสอบการกินและทำลายเชื้อแบคทีเรียของ neutrophils

3.4.1.3.1 เตรียมหลอดแก้วจำนวน 6 หลอดแบ่งเป็น 3 ชุด ๆ ละ 2 หลอด ใส่สารต่าง ๆ ดังนี้

ชุดที่	1	2	3
Neutrophils (ม.ล.)(3.0×10^6 เซลล์/ม.ล.)	-	0.5	0.5
S. aureus ใน HBSS + 10 % serum (ม.ล.)	0.5	0.5	0.5
HBSS + 10 % serum (ม.ล.)	0.5	-	-

3.4.1.3.2 นำหลอดชุดที่ 1 ไปเจือจางให้เป็น 1 : 100,000 และ 1 : 1,000,000 ใน nutrient broth นำทั้ง 2 หลอดไปเพาะเชื้อบนอาหารวุ้น (nutrient agar) ด้วยวิธี pour plating

3.4.1.3.3 นำหลอดชุดที่ 2 และ 3 ไป incubate ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 37 °c เป็นเวลา 30 นาที

3.4.1.3.4 หลอดชุดที่ 2 และ 3 เมื่อ incubate ครบเวลา นำทั้ง 2 ชุดไปปั่นเหวี่ยงที่ 400 x g เป็นเวลา 5 นาที neutrophils จะตกลงสู่ก้นหลอดแต่เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ถูกกินจะลอยอยู่

3.4.1.3.5 หลอดชุดที่ 2 ดูดสารละลายส่วนบน ซึ่งเป็นส่วนของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ถูกกินนำไปเจือจางให้เป็น 1 : 1,000 และ 1 : 10,000 ใน nutrient broth นำทั้ง 2 หลอดไปเพาะเชื้อบนอาหารวุ้น

3.4.1.3.6 หลอดชุดที่ 3 เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม HBSS + 10 % FCS + 2.8 % miramycin ปริมาตร 0.5 ม.ล. เขย่าให้เซลล์กระจายตัว นำไป incubate ต่ออีก 30 นาที เพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรียที่อยู่นอก neutrophils

3.4.1.3.7 หลอดชุดที่ 3 เมื่อ incubate ครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 400 x g เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม HBSS ลงไป 5 ม.ล. เขย่าให้เซลล์กระจายตัว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 400 x g เป็นเวลา 5 นาที

3.4.1.3.8 ทำข้อ 3.4.1.3.7 ซ้ำอีกครั้ง

3.4.1.3.9 เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมน้ำกลั่นลงไป 1 ม.ล. เขย่าแรง ๆ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ neutrophils แตก

3.4.1.3.10 นำไปเจือจางให้เป็น 1 : 1,000 และ 1 : 10,000 ใน nutrient broth นำทั้ง 2 หลอดไปเพาะเชื้อบนอาหารวุ้น

3.4.1.4 การเพาะเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Pour plating

3.4.1.4.1 นำ nutrient agar 20 ม.ล. ที่อุ่นไว้ที่ 50 °c เทใส่จานเลี้ยงเชื้อ

3.4.1.4.2 ดูดสารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรียในแต่ละ dilution 1.0 ม.ล. ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ตามลงไปทันที

3.4.1.4.3 หมุนจานเลี้ยงเชื้อเป็นวงกลม ทั้งทวนและตามเข็มนาฬิกาด้านละ 4-5 รอบ ให้เชื้อและ nutrient agar กระจายตัวทั่วทั้งจาน ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

3.4.1.4.4 Incubate ที่ 37 °c เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

3.4.1.4.5 นำแต่ละจานมานับจำนวน colony ของเชื้อแบคทีเรีย

3.4.2 Indirect Enzyme Linked Immunosorbant Assay

การสร้างแอนติบอดีชนิด IgG ของแพะเมื่อถูกกระตุ้นด้วย Human Serum Albumin (HSA) ตรวจวัดโดยวิธี Indirect ELISA และรายงานเป็นค่า titers เฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม และแผนภูมิที่ได้จากการเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของแต่ละกลุ่ม ซึ่งแสดงถึงระดับของแอนติบอดี การเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงทำโดยการนำค่าการดูดกลืนแสงจากหลุมของ positive control ที่ได้จากการทดสอบของแพะทุกตัวมาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำไปปรับค่าการดูดกลืนแสงทุกหลุมของแพะแต่ละตัว เพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสงของทุกตัวมีค่าการดูดกลืนแสงของ positive control เท่ากัน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของแพะแต่ละตัวที่ปรับค่าแล้วในกลุ่มเดียวกันมาเฉลี่ยเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม

3.4.2.1 การเตรียมแอนติเจน (Eide *et al.*, 1992)

3.4.2.1.1 ชั่ง HSA 0.1 ก. ใส่ในไวแอลที่มี 2 ม.ล. 0.9 % PBS เป็น stock HSA solution เข้มข้น 50 ม.ก./ม.ล.

3.4.2.1.2 เจือจาง stock HSA solution ให้เป็น 200 ไมโครกรัม/ม.ล. ด้วย carbonate buffer

3.4.2.1.3 ดูด stock HSA solution ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/ม.ล. ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ ELISA plate ดังรูปที่ 6

3.4.2.1.4 นำ ELISA plate ใส่กล่องปิดฝา และ incubate ที่ 4 °c 18 ชั่วโมง

3.4.2.2 การเตรียมชุดเจือจาง (dilutions) ของซีรั่ม

3.4.2.2.1 Pre-immunized serum : เจือจางซีรั่มในหลอดแก้วด้วย PBS-tween 200 เท่า เป็น dilution เริ่มต้น ทำ 2-fold dilution ในแต่ละหลอดถัดไป

3.4.2.2.2 Primary immunized serum : เจือจางซีรั่มในหลอดแก้วด้วย PBS-tween 200 เท่า เป็น dilution เริ่มต้น ทำ 2-fold dilution ในแต่ละหลอดถัดไป

3.4.2.2.3 Secondary immunized serum : เจือจางซีรั่มในหลอดแก้วด้วย PBS-tween 200 เท่า เป็น dilution เริ่มต้น ทำ 2-fold dilution ในแต่ละหลอดถัดไป

3.4.2.2.4 เจือจาง secondary immunized serum ของ positive control ด้วย PBS-tween 3200 เท่า

3.4.2.2.5 นำ ELISA plate ที่ incubate ครบเวลามาล้างด้วย PBS-tween 3 ครั้ง

3.4.2.2.6 เติมแต่ละ dilution ของแต่ละซีรั่ม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ตามรูปที่ 6

3.4.2.2.7 นำ ELISA plate ใส่กล่องปิดฝา และ incubate ที่ 37 °c 1 ชั่วโมง

3.4.2.3 การเตรียมชุดเจือจาง (dilutions) ของ conjugate

3.4.2.3.1 เจือจาง rabbit anti goat IgG conjugated HRP ด้วย PBS-tween 4000 เท่า

3.4.2.3.2 นำ ELISA plate ที่ incubate ครบเวลามาล้างด้วย PBS-tween 3 ครั้ง

3.4.2.3.3 เติม conjugate ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม

3.4.2.3.4 นำ ELISA plate ใส่กล่องปิดฝา และ incubate ที่ 37 °c 1 ชั่วโมง

3.4.2.3.5 นำ ELISA plate ที่ incubate ครบเวลามาล้างด้วย PBS-tween 3 ครั้ง

3.4.2.3.6 เติม substrate OPD ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม (รูปที่ 6)

3.4.2.3.7 นำ ELISA plate ใส่กล่องปิดฝา และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

3.4.2.3.8 เมื่อครบเวลา เติม 1 N sulfuric acid ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม

3.4.2.3.9 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 490 นาโนเมตร

3.4.2.4 การวิเคราะห์ผล

3.4.2.4.1 คำนวนค่า O.D. cut off จาก O.D. ของหลุม control (Ag+conj) ด้วยสูตร

$$\text{O.D. cut off} = \text{O.D.} + 0.2$$

3.4.2.4.2 นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับแต่ละแถวเพื่อหา titer ของซีรั่มแต่ละชุด

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Pre-immunized serum 2-fold dilutions											
B	Pre-immunized serum 2-fold dilutions											
C	Primary-immunized serum 2-fold dilutions											
D	Primary-immunized serum 2-fold dilutions											
E	Secondary-immunized serum 2-fold dilutions											
F	Secondary-immunized serum 2-fold dilutions											
G	a	b	c	d								
H												

a = negative control (antigen + serum)

b = negative control (antigen + conjugate)

c = negative control (substrate)

d = positive control (จาก secondary immunized serum) (antigen + positive serum + conjugated + substrate)

รูปที่ 6 รูปแบบการทดสอบ Indirect ELISA ที่ใช้ในการทดลอง

3.4.3 การวัดความเข้มข้นของทองแดงในซีรั่ม อวัยวะภายใน และอาหาร (AOAC , 1984)

3.4.3.1 การวัดความเข้มข้นของทองแดงในซีรั่ม

3.4.3.1.1 นำซีรั่มของแพะจำนวน 1.0 ม.ล. ใส่ลงในหลอดพลาสติกที่ล้างด้วย 2 N HCl

3.4.3.1.2 เจือจางซีรั่มด้วยน้ำกลั่นไร้ประจุ 2.0 ม.ล. เขย่าให้ผสมกันดีด้วย เครื่องเขย่า (vortex)

3.4.3.1.3 นำไปวัดความเข้มข้นของทองแดงด้วย atomic absorption spectro-photometer (AAS) (Perkin elmer 3100) ที่ความยาวคลื่นแสง 324.7 นาโนเมตร (slit 0.7 นาโนเมตร)

3.4.3.2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 1 ก. น้ำหนักสด หรือตัวอย่างอวัยวะภายใน 1 ก. วัตถุแห้ง ใส่ในถ้วยทนความร้อน

3.4.3.2.2 นำไปเผาที่ 550 °c เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

3.4.3.2.3 ใส่ 3 N HCl ลงไป 10 ม.ล. ปิดด้วย wash glass ต้มอ่อน ๆ 10 นาที

3.4.3.2.4 นำไปกรองลงใน volumetric flask ขนาด 100 ม.ล. เติมน้ำกลั่นไร้ประจุให้ครบ 100 ม.ล.

3.4.3.2.5 เจือจางสารละลายของแต่ละตัวอย่างดังนี้

- อาหารเจือจาง 20 เท่า
- ตับเจือจาง 100 เท่า
- ไตเจือจาง 50 เท่า
- ม้ามเจือจาง 30 เท่า

3.4.3.2.6 นำไปวัดความเข้มข้นของทองแดงด้วย atomic absorption spectrophotometer (AAS) (Perkin elmer 3100) ที่ความยาวคลื่นแสง 324.7 นาโนเมตร (slit 0.7 นาโนเมตร)

การทำ standard curve ใช้ standard copper (Titrisol® Merck) เจือจางด้วยน้ำกลั่นไร้ประจุที่มี 10 % 3 N HCl ให้ได้ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 ppm

3.4.4 การวัดการทำงานของ ceruloplasmin (ดัดแปลงจากวิธีของ Sunderman and Nomoto, 1970 และ วีกูลและคนกนารถ, 2525)

3.4.4.1 เจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอของแพะจำนวน 5 ม.ล. นำไปปั่นเหวี่ยงแยกซีรั่ม ที่ความเร็ว 600 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °c

3.4.4.2 เตรียมหลอดทดลอง 3 หลอด หลอดหนึ่งติดฉลากเป็น blank และอีก 2 หลอดเป็น reaction 2 ซ้ำ จากนั้นเติม 5.0 ม.ล. ของ 0.02 % sodium azide ลงไปในหลอด blank

3.4.4.3 เติมซีรั่มจำนวน 0.1 ม.ล. ลงในหลอดทดลองทั้ง 3 หลอด แช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ ที่ 37 °c ทิ้งไว้สักครู่เพื่อปรับอุณหภูมิของซีรั่ม

3.4.4.4 เติม 1.0 ม.ล. ของ 0.1 % buffered PPD solution (pH 6.2, ionic strength 1.2) ลงไปทุกหลอด (buffered PPD solution ต้องแช่ไว้ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 37 °c ตลอดเวลา)

3.4.4.5 Incubate เป็นเวลา 30 นาที ปิดฝาอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ ป้องกันไม่ให้ถูกแสง

3.4.4.6 เมื่อครบกำหนด 30 นาทีเติม 5.0 ม.ล. ของ 0.02 % sodium azide ลงไปในหลอด reaction ทั้ง 2 หลอด เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอน ไซม์

3.4.4.7 นำทั้งสามหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร และคำนวณ PPD oxidase activity ของ ceruloplasmin ในซีรั่มโดยใช้สูตร

$$\text{PPD oxidase activity} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}}{E} \times \frac{\text{ปริมาณซีรั่ม (l)}}{\text{เวลาในการincubate}} \quad \text{(IU/l)}$$

วิธีการคำนวณค่า E ดูที่ภาคผนวก

3.4.5 การวัดค่าโลหิตวิทยา (Benjamin, 1961)

3.5.1 นับปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวด้วย hemacytometer

3.5.2 วัดปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น โดยวิธี micro-hematocrit

3.5.3 วัดค่าฮีโมโกลบินด้วยวิธี cyanomethemoglobin

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan ,s New Multiple Range Test หรือเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธีของ Tamhane ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลในแต่ละกลุ่มพบว่าไม่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Levene test ตามวิธีของ กัลยา (2541)

3.6 ระยะเวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ทดลองกับสัตว์เป็นระยะเวลา 150 วัน

สถานที่ทำการทดลอง ได้แก่

3.7.1 ฟาร์มแพะ-แกะ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.7.2 ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.7.3 ห้องปฏิบัติการภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.7.4 ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.7.5 ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์ภาคเหนือ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University