

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) โดยนำปลานิล (*Oreochromis niloticus*) น้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 10 กรัม ซึ่งได้จากการเพาะพันธุ์จากฟาร์มในจังหวัดพัทลุง มาปล่อยลงเลี้ยงในกระชังขนาด 3 x 4 x 2 เมตร ในบ่อดิน กระชังละ 100 ตัว จำนวน 12 กระชัง ให้อาหารปกติ (basal diet) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้ปลาคุ้นเคยกับสภาพการเลี้ยงในกระชัง หลังจากนั้นเริ่มให้อาหารซึ่งเป็นอาหารที่มีระดับโปรตีน 30% ที่ผสม chitosan (Commercial food grade) และ Levamisole hydrochloride (Sigma, USA) ที่ระดับต่างๆ ตามสูตรในตารางที่ 1 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ประกอบด้วย

- ชุดที่ 1 (T1) ชุดควบคุม ให้อาหารปกติ (basal diet)
- ชุดที่ 2 (T2) ให้อาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1%
- ชุดที่ 3 (T3) ให้อาหารผสม levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg
- ชุดที่ 4 (T4) ให้อาหารผสม chitosan 1% และ levamisole 250 mg/kg

ตารางที่ 1 แสดงสูตรอาหารทดลอง (ระดับโปรตีน 30%)

วัตถุดิบอาหาร (เปอร์เซ็นต์)	ชุดทดลอง 1 (T1)	ชุดทดลอง 2 (T2)	ชุดทดลอง 3 (T3)	ชุดทดลอง 4 (T4)
ปลาป่น	18	18	18	18
กากถั่วเหลือง	35	35	35	35
รำละเอียด	25	25	25	25
แป้งมันสำปะหลัง	15	15	15	15
น้ำมันถั่วเหลือง	2.5	2.5	2.5	2.5
วิตามินรวม/แร่ธาตุรวม	1	1	1	1
CaH ₂ PO ₄	3.5	3.5	3.5	3.5
Chitosan*	0	1%	-	1%
Levamisole*	0	-	250 mg/kg	250 mg/kg

* หมายเหตุ น้ำหนักของ chitosan และ levamisole ที่ผสมในอาหารจะหักออกจากส่วนของแป้งมันสำปะหลัง

โดยให้อาหารปลาวันละ 2 ครั้ง ในปริมาณที่ปลากินหมดภายใน 20 นาที (ประมาณ 3-5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน) และเก็บข้อมูลปริมาณอาหารที่ปลากินต่อเนื่องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนด นำปลาทดลองมาชั่งน้ำหนัก วิเคราะห์การเจริญเติบโต และอัตราการรอด แล้วทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปลาแต่ละซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 30 ตัว เพื่อตรวจวิเคราะห์ค่าปัจจัยด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ Nitroblue tetrazolium (NBT) reduction, Lysozyme activity และ Natural haemolytic complement activity และนำปลาจากแต่ละซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 30 ตัว มาทดสอบความต้านทานโรค (challenge test) โดยการชักนำให้มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Streptococcosis ในปลานิล โดยวิธีการเช่น

2. การวิเคราะห์การเจริญเติบโต

หลังจากการทดลองให้อาหารผสมโคโตแซนและเลวามิโซลที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ วัดค่าอัตราการเจริญเติบโตของปลาในแต่ละชุดการทดลอง ประกอบด้วย น้ำหนักเริ่มต้น (Initial weight, g), น้ำหนักสุดท้าย (Final weight, g), อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; SGR, % day⁻¹), อัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion ratio) และอัตราการรอด (Survival rate, %) โดยที่

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; SGR, % day⁻¹) =

$$100 \times [\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight}] / \text{total duration of experiment}$$

อัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion ratio) = น้ำหนักอาหาร/น้ำหนักปลา

อัตราการรอด (%) = $100 \times [\text{final number of fish} / \text{initial number of fish}]$

3. การวิเคราะห์ปัจจัยทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

เก็บตัวอย่างปลาจากแต่ละชุดการทดลอง สลบด้วยสารละลาย MS-222 ความเข้มข้น 100 ppm ชั่งน้ำหนัก แล้วทำการเก็บเลือดปลาตัวละประมาณ 1 ml โดยใช้เข็มขนาด 25G และหลอดฉีดยาปริมาตร 1 ml ซึ่งหล่อภายในด้วยเฮพาริน (heparinised) เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว โดยเจาะจากเส้นเลือดบริเวณโคนหาง (caudal vein) ของปลา แล้วนำเลือด (whole blood) ไปวิเคราะห์ Nitroblue tetrazolium assay (NBT reduction) ทันที ส่วนเลือดที่เหลือทิ้งไว้ให้แข็งตัวแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนของน้ำเลือด (serum) ใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์ Lysozyme activity และ Natural haemolytic complement activity ต่อไป

3.1 Nitroblue tetrazolium assay (NBT reduction)

Nitroblue tetrazolium assay (NBT reduction) เป็นวิธีการตรวจวัดผลผลิตจากการหายใจระดับเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (respiratory burst of phagocytic cells) ได้แก่ superoxide

anions (O_2^-) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาจำเพาะและทำให้ปริมาณของ Nitroblue tetrazolium (NBT) ลดลง โดยเปลี่ยนแปลงไปเป็น formazan การวิเคราะห์ NBT reduction ใช้วิธีการของ Secombes (1990) และ Stasiak and Bauman (1996) โดยใช้เลือดตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมนลงในหลุมของ microtitre plate ซึ่งมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Acid Citrate Dextrose, ACD) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บรรจุอยู่ แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดเกาะกับพื้นผิวกันหลุม หลังจากนั้นดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2) 3 ครั้ง เติม 0.2% NBT (ในสารละลาย 0.85% NaCl) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่ม (incubate) ไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตรึง (fix) เซลล์เม็ดเลือดโดยการเติมสารละลาย 100% methanol ลงไป ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วล้างด้วย 70% methanol 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง (air dry) จากนั้นเติม สารละลาย 2N potassium hydroxide (KOH) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และ dimethyl sulphoxide (DMSO) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เพื่อละลาย formazan วัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA reader

3.2 Lysozyme activity assay

Lysozyme activity assay เป็นการวัดความว่องไวของปฏิกิริยาของ lysozyme ในน้ำเลือด ในการย่อยสลาย (lysis) เซลล์แบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Micrococcus lysodeikticus* ตามวิธีการซึ่งดัดแปลง จากวิธีของ Parry และคณะ (1965) โดยเตรียมสารละลายเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย sodium phosphate buffer, pH 6 เติมน้ำเลือดของปลา ตัวอย่างลงใน microtitre plate ปริมาตรหลุมละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติมสารละลายเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ ลดลงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง ELISA reader หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องภายในเวลา 0.5 ถึง 6.5 นาที คำนวณหน่วยของ lysozyme activity โดยหนึ่งหน่วยของปฏิกิริยาคือปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลง 0.001 ต่อนาที

3.3 Natural haemolytic complement activity

Natural haemolytic complement activity เป็นการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีน complement ในน้ำเลือด (Alternative complement pathway) ในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของ ไก่ (Chicken red blood cells; ChRBC) ตามวิธีการของ Ortuno และคณะ (1998) เริ่มต้นจากขั้นตอนการ เตรียม 3% ChRBC ในสารละลาย PBS โดยการเจาะเลือดไก่ 3 ml ผสมกับสารละลาย Acid Citrate Dextrose (ACD) 1 ml ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง 3 ครั้ง โดยเติมสารละลาย PBS ลงในหลอดประมาณ 20 ml นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 500 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งไป หลังจากการ ล้างครั้งสุดท้าย และเติมสารละลาย PBS ลงในหลอดแล้ว วัดความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดโดยใช้ micro-

haematocrit method แล้วปรับให้สารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความเข้มข้นที่ระดับ 3% สำหรับใช้เพื่อ การวิเคราะห์ Natural haemolytic complement activity ต่อไป

การวิเคราะห์ Natural haemolytic complement activity ทำใน microtitre plate โดย เจือจางซีรัมตัวอย่างลงทีละ 2 เท่า ด้วยสารละลาย PBS โดยเริ่มต้นด้วยการเติมซีรัมที่ไม่ได้เจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรก แล้วตามด้วยการเติมซีรัมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่มี PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม 3% ChRBC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ซึ่งจะทำให้ซีรัมในแต่ละหลุมมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.5625% และ 0.78125% ตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ microtitre plate มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 500 x g ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแดงตกตะกอน ดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ในแต่ละหลุมออก นำมาเติมลงใน microtitre plate อันใหม่ หาปริมาณฮีโมโกลบินใน สารละลายส่วนใสซึ่งเกิดจากการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ค่าการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) สูงสุด วัดได้จากการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมที่มี ChRBC 100 ไมโครลิตร จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ การแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (เปรียบเทียบกับค่าการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง สูงสุด) กับส่วนกลับของสัดส่วน การเจือจางซีรัม (serum dilution) โดยใช้สเกลกราฟ $\log_{10}$ - $\log_{10}$ เพื่อหาสัดส่วนการเจือจางของซีรัมที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50 เปอร์เซ็นต์ (Alternative Complement Pathway Hemolytic Activity, ACH50)

4. การทดสอบความต้านทานโรค (challenge test)

หลังจากการทดลองให้อาหารผสมโคโตแซนและเลวามิโซลที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ นำปลาทดลองในแต่ละชุดการทดลองจำนวน 30 ตัว มาทดสอบความต้านทานโรค โดยชักนำให้เกิด การติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญของปลานิล โดยวิธีการแช่เชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^8 CFU/ml แล้วบันทึกอัตราการตายสะสมของปลาทดลองทุกวันเป็น เวลา 10 วัน

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกัน และอัตราการรอดจากการทดสอบความต้านทานโรคของปลาในแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way Analysis of Variance; ANOVA) และ Duncan's new multiple range test (MRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)