

ภาคผนวก

## การวิเคราะห์หาค่าทางชีวเคมี

### 1.การวิเคราะห์หาค่า Triiodothyronine (T<sub>3</sub>)

**เครื่องมือ** Elecsys 2010 และ E170 (Roche Diagnostics)

**ขั้นตอนการวิเคราะห์** (เป็น Competitive Method ที่ใช้เวลาทั้งหมด 18 นาที)

1. T<sub>3</sub> ในซีรัมจะถูกปล่อยออกมาโดย 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) และทำปฏิกิริยากับ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ T<sub>3</sub> ที่ติดฉลากด้วย (anti-T<sub>3</sub> polyclonal antibody-ruthenium complex) เกิดเป็น immune complex

2. เติม streptavidin-coated microparticles และ T<sub>3</sub> ที่ติดฉลากด้วย biotin ทำให้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ T<sub>3</sub> ที่เหลือจากการจับกับ T<sub>3</sub> ในสารตัวอย่าง มาจับกับ T<sub>3</sub> ที่ติดฉลากด้วย biotin, immune complex ที่เกิดขึ้นจะไปเกาะที่ streptavidin-coated microparticles (solid phase) โดยปฏิกิริยาของ biotin และ streptavidin

3. ส่วนผสมทั้งหมดจะถูกดูดเข้าไปในหลอดวัด (Photo multiplier tube) โดย microparticles ที่มี immune complex เกาะอยู่จะถูกแม่เหล็กจับไปเกาะที่แผ่น electrode สารที่ไม่เกิดปฏิกิริยาจะถูกแยกออกด้วย ProCell เมื่อกระแสไฟฟ้าผ่าน electrode จะทำให้เกิด Chemiluminescent emission

4. เครื่อง Elecsys 2010 และ E170 จะคำนวณผลให้โดยอัตโนมัติ

**เครื่องมือและนํ้ายาตรวจวิเคราะห์**

1. เครื่องมือ: Elecsys 2010 และ E170

2. เครื่องปั่นตกตะกอน

3. อุปกรณ์

- เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Elecsys 2010 และ E170
- Elecsys 2010 Assay cup (reaction vessels)
- Elecsys 2010 Assay Tip (pipette tip)
- Combi rack E170

#### 4. น้ำยาตรวจ T<sub>3</sub> ประกอบด้วย

- Streptavidin-coated microparticles; Streptavidin-coated microparticles, 0.72 mg/ml, binding capacity; 470 ng biotin/mg microparticles; preservative
- Anti-T<sub>3</sub> -Ab- Ru (bpy)<sup>2+</sup><sub>3</sub>; Polyclonal anti- T<sub>3</sub>-antibody (sheep) labeled with ruthenium complex 75 ng/ml; ANS 0.8 mg/ml; phosphate buffer 100 mmol/l pH 7.4; preservative
- T<sub>3</sub> - biotin; Biotinylated T<sub>3</sub> 3 ng/ml ANS 0.8 mg/ml; phosphate buffer 100 mmol/l, pH 7.4; preservative

#### 5. น้ำยาเป็นแบบพร้อมใช้งาน (Ready to use)

- ProCell (system buffer)
- Diluent Universal (sample diluent)
- CleanCell (measuring cell cleaning solution)
- Preclean M (Prewash)

#### 6. น้ำกลั่น

#### การคำนวณ

คำนวณตามเอกสารที่แนบมากับชุดน้ำยา โดยการคำนวณดังกล่าวเกิดขึ้นจากคอมพิวเตอร์ซอฟต์แวร์ในเครื่องตรวจอัตโนมัติ Elecsys 2010 และ E170 เครื่องวิเคราะห์จะทำ calibration 2 จุด และอ่านผลการตรวจวิเคราะห์จาก calibration curve โดยอัตโนมัติ

Conventional Units and SI Units	Alternate Units
nmol/L, ng/ml, ng/dl	$\text{nmol/L} \times 0.651 = \text{ng/ml}$ $\text{ng/ml} \div 1.536 = \text{nmol/L}$ $\text{ng/ml} \times 65.1 = \text{ng/dl}$

## 2. การวิเคราะห์หาค่าเอนไซม์ Serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) หรือ Aspartate aminotransferase (AST)

### หลักการ

Multiple-Point Rate Test (Aspartate + Alpha Ketoglutarate Oxaloacetate Leuco Dye)

ข้อกำหนดของวิธีการ ช่วงความยาวคลื่นที่ตรวจวิเคราะห์ (detection limit) ที่ 670 nm

ชนิดของตัวอย่าง Serum, heparin plasma

- ตัวอย่างที่ห้ามใช้ คือ Potassium Oxalate/sodium fluoride, Citrates และ EDTA plasma อาจก่อให้เกิดผลลบมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์, Hemolyzed specimens

- เก็บตัวอย่างตามมาตรฐานการปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการ (Standard Laboratory Procedure) ปั่นแยกซีรัมออกจากหลอดเก็บตัวอย่างภายใน 3 วันหลังการเก็บ

- เก็บตัวอย่างตรวจในภาชนะปิดสนิทเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน และการระเหย เพื่อให้ตัวอย่างตรวจเป็นเนื้อเดียวกัน ควรกลับหลอดตัวอย่างไปมาอย่างระมัดระวัง (gentle inversion) และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์

เก็บรักษาตัวอย่าง	อุณหภูมิ	Stability
Room Temperature	18 – 28 <sup>0</sup> C ( 64 – 82 <sup>0</sup> F)	≤ 3 วัน
Refrigerated	2 – 8 <sup>0</sup> C (36 – 46 <sup>0</sup> F)	≤ 7 วัน
Frozen	≤ -18 <sup>0</sup> C ( ≤ 0 <sup>0</sup> F)	3 เดือน

### เครื่องมือ

1. เครื่องตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือด Vitros 950 แบบอัตโนมัติ

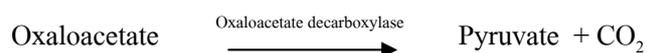
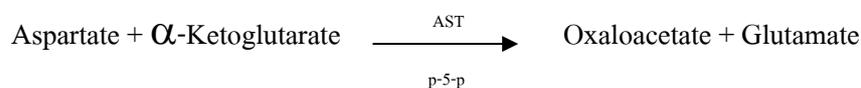
2. น้ำยา (Slide) แผ่น Slide น้ำยา AST เป็นน้ำยาแห้ง ส่วนประกอบของน้ำยา จะถูกเคลือบแบบหลายชั้น (Multi-coated) บนแผ่น Polyester ประกอบด้วย

- Spreading layer (BaSO<sub>4</sub>) ประกอบด้วย Sodium α -Ketoglutarate, Sodium Aspartate

- Reagent layer ประกอบด้วย buffer, pH 7.5, Leuco Dye, Pyruvate oxidase, Oxaloacetate decarboxylase, peroxidase, Sodium pyridoxal -5- phosphaste, Sodium phosphate

- Filter Low wavelength light cut off

### ขั้นตอนการทำงาน



1. เมื่อสารตัวอย่างหยดลงบนแผ่นทดสอบจะกระจายตัวบน Spreading layer, Aspartate aminotransferase (AST) ในสารตัวอย่าง ร่วมกับ P-5-P จะ catalyze สาร amino group ของ L-aspartate ไปยัง  $\alpha$ -Ketoglutarate เกิดเป็น Oxaloacetate และ Glutamate
2. Oxaloacetate จะรวมกับ L-aspartate ที่ไม่มีสาร amino group เปลี่ยนเป็น Pyruvate และ Carbon dioxide
3. Pyruvate จะถูก Oxidise โดย Pyruvate oxidase เกิดเป็น Hydrogen peroxide และ Acetylphosphate
4. ปฏิกริยาสุดท้าย peroxidase จะ oxidation Leuco Dye เกิดเป็นสี และสีที่เปลี่ยนแปลงจะถูกวัดและคำนวณกลับเป็นค่าของ AST ใช้เวลาในการตรวจวัด 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C และวัดค่าที่ 670 nm

### **3. การวิเคราะห์หาค่าเอนไซม์ Creatine kinase (CK)**

**หลักการ** Multiple-Point Rate Test (Creatine PO<sub>4</sub>/Peroxidase)

**ข้อกำหนดของวิธีการ** ช่วงความยาวคลื่นที่ตรวจวิเคราะห์ (detection limit) ที่ 670 nm

**ชนิดของตัวอย่าง** Serum หรือ Heparin Plasma

- ตัวอย่างที่ห้ามใช้ คือ grossly hemolyzed specimens
- เก็บตัวอย่างตามมาตรฐานการปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการ (Standard Laboratory Procedure)
- ข้อควรระวังพิเศษ คือ ปั่นแยกสิ่งส่งตรวจภายใน 4 ชั่วโมงหลังการเก็บสิ่งส่งตรวจ การเก็บรักษาตัวอย่าง
- เก็บตัวอย่างตรวจในภาชนะปิดสนิทเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน และการระเหย

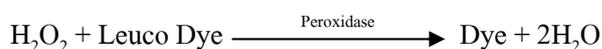
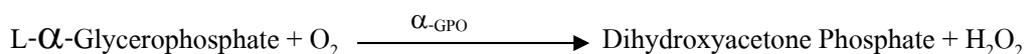
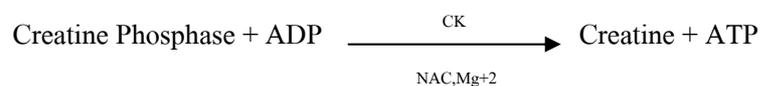
เพื่อให้ตัวอย่างตรวจเป็นเนื้อเดียวกัน ควรกลับหลอดตัวอย่างไปมาอย่างระมัดระวัง (gentle inversion) และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์

เก็บรักษาตัวอย่าง	อุณหภูมิ	Stability
Room Temperature	18 – 28 <sup>0</sup> C ( 64 – 82 <sup>0</sup> F)	≤ 4 ชั่วโมง
Refrigerated	2 – 8 <sup>0</sup> C (36 – 46 <sup>0</sup> F)	≤ 5 วัน
Frozen	≤ -18 <sup>0</sup> C ( ≤ 0 <sup>0</sup> F)	≤ 1 เดือน

### เครื่องมือ

1. เครื่องตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือด Vitros 950 แบบอัตโนมัติ
2. น้ำยา (Slide) แผ่น Slide น้ำยา Creatine kinase เป็นน้ำยาแห้ง ส่วนประกอบของน้ำยา จะถูกเคลือบแบบหลายชั้น (Multi-coated) บนแผ่น Polyester ประกอบด้วย
  - Spreading layer (TiO<sub>2</sub>) ประกอบด้วย N-acetylcysteine
  - Reagent layer ประกอบด้วย buffer pH 7.0, Adenosine diphosphate, Glycerol, magnesium acetate, Glycerol kinase, Leuco dye, Peroxidase, Glycerophosphate oxidase, Creatine phosphate
  - Supporting layer

### ขั้นตอนการทำงาน

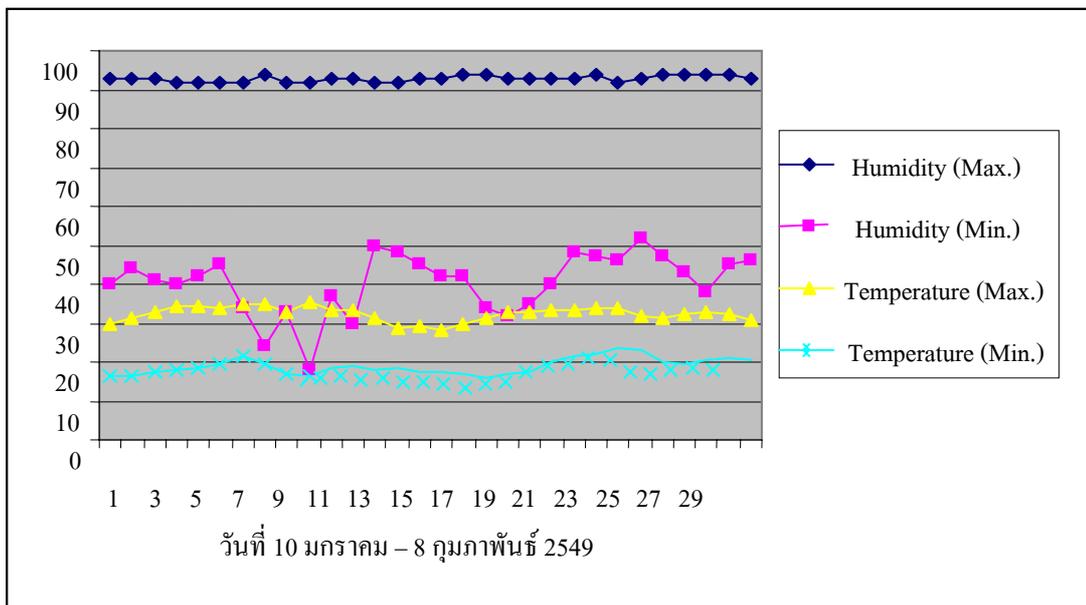


1. เมื่อสารตัวอย่างหยดลงบนแผ่นทดสอบจะกระจายตัวบน Spreading layer, CK จะถูก activate โดย N-acetylcysteine (NAC) และซึมผ่านลงสู่ชั้น Reagent layer, CK ในสารตัวอย่างจะ catalyze สาร creatine และ ADP เป็น ATP และ creatine

2. ATP จะเข้าทำปฏิกิริยากับ glycerol เป็น L- $\alpha$ -glycero- phosphate ซึ่งเกิดปฏิกิริยา oxidation ต่อได้เป็น hydrogen peroxide และ dihydroxyacetone phosphate

3. hydrogen peroxide จะ oxidize สาร leuco dye เกิดสีขึ้น อัตราการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าของ CK ในสารตัวอย่าง ใช้เวลาในการตรวจวัด 5 นาที อุณหภูมิ 37 °C และวัดค่าที่ 670 nm

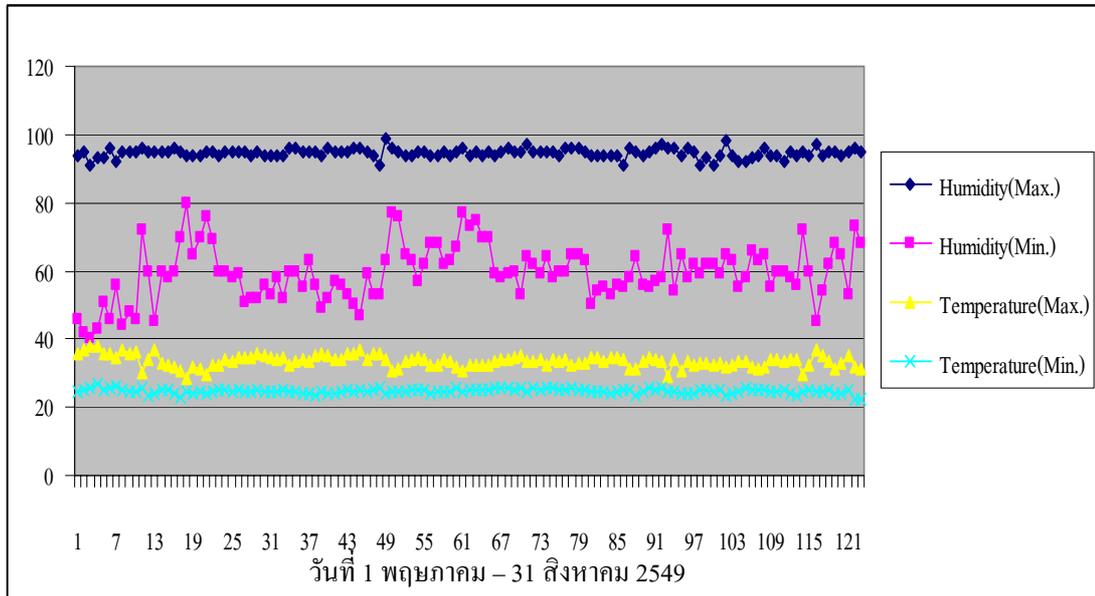
อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)/ ความชื้นสัมพัทธ์ (%)



ภาพภาคผนวกที่ 1 ค่าสูงสุด-ต่ำสุด ของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ ในช่วงการทดลองที่ 1 (ระหว่างวันที่ 10 มกราคม – 8 กุมภาพันธ์ 2549)

ที่มา: สถานีอุตุนิยมวิทยานครปฐม

อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)/ ความชื้นสัมพัทธ์ (%)



ภาพภาคผนวกที่ 2 ค่าสูงสุด-ต่ำสุด ของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ ในช่วงการทดลองที่ 2  
(ระหว่างวันที่ 1 พฤษภาคม – 31 สิงหาคม 2549)

ที่มา: สถานีอุตุนิยมวิทยานครปฐม

### แผ่นยางรองพื้นคอก (Rubber mat)

การทดลองครั้งนี้ อยู่ภายใต้โครงการพัฒนาแผ่นยางปูพื้นจากยางธรรมชาติเพื่อใช้ในงานปศุสัตว์ ได้รับการอนุเคราะห์แผ่นยางที่ใช้ในการทดลองจาก บริษัทสยามยูไนเต็ดรีบเบอร์ จำกัด ซึ่งลักษณะของแผ่นยางมีขนาด กว้าง 120 ซม. ยาว 180 ซม. และหนา 3 ซม. น้ำหนักประมาณแผ่นละ 80 กิโลกรัม ผิวหน้ายางเรียบหนึ่งด้าน ส่วนอีกหนึ่งด้านเป็นร่องตามแนวยาวของแผ่นยาง

ตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบของแผ่นยางรองพื้นคอกแต่ละสูตร  
(หน่วยเป็น part per hundred of resin: phr.)

สูตรแผ่นยาง	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5
ส่วนประกอบ	RHA(30wt % silica)	Zeolite	Zeolite	CaCO <sub>3</sub> (สูตรโรงงาน)	CaCO <sub>3</sub>
ยางธรรมชาติ	100	100	100	100	100
Carbon Black	61	61	61	61	61
สารตัวเติม	200	159	200	159	250
ZnO	7	7	7	7	7
Stearic acid	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Antioxidant	3	3	3	3	3
เศษยางวัลคาไนซ์	285	285	285	285	285
Rubber Oil	100	100	100	100	100
CBS	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Sulphur	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
ราคา/แผ่น (80 kg)	1,254	1,305	1,254	1,308	1,204

หมายเหตุ RHA = Rice husk ash (ขี้เถ้าแกลบ)

CBS = N-Cyclohexyl-2-Benzothiazole Sulfonamide (ตัวเร่งปฏิกิริยา)

ที่มา: ธีรนนท์ และคณะ (2550)



ภาพภาคผนวกที่ 3 ลักษณะของแผ่นยางรองพื้นคอกโค (Rubber mat) ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 2 คุณสมบัติบางประการของแผ่นยางรองพื้นคอกแต่ละสูตร

สูตรที่	ค่าความแข็ง Hardness (shore A)	ความต้านทานต่อการขัดถู Abrasion (mm <sup>2</sup> )	การคืนตัวของยาง Compression set (%)	การทนต่อการฉีกขาด Tear Strength
1	58.0	415.00	41.20	24.13
2	51.5	455.20	34.71	30.50
3	57.3	364.00	51.71	26.27
4	53.3	680.61	24.52	30.99
5	52.4	357.00	40.84	22.49

ที่มา: ธีรนนท์ และคณะ (2550)



ภาพภาคผนวกที่ 4 โรงเรือนที่ใช้ในการทดลองที่ 1



ภาพภาคผนวกที่ 5 โคนเคื่อยืนบนพื้นคอกส่วนที่เป็นพื้นยางในการทดลองที่ 1



ภาพภาคผนวกที่ 6 โรงเรือนที่ใช้ในการทดลองที่ 2



ภาพภาคผนวกที่ 7 ลักษณะพฤติกรรมการนอนหลับของโคที่พบในคอกที่เป็นพื้นยาง



ภาพภาคผนวกที่ 8 การใช้ของบังคับโคแบบเคลื่อนที่เพื่อเก็บข้อมูลกิบและขาของโค



ภาพภาคผนวกที่ 9 ลักษณะของแผลบริเวณหัวเข่าของโคที่อยู่ในคอกที่เป็นพื้นคอนกรีต



ภาพภาคผนวกที่ 10 ลักษณะของกีบที่ยาวเกินไปของโคที่อยู่ในคอกที่เป็นพื้นยาง



ภาพภาคผนวกที่ 11 ลักษณะของพื้นกีบของโคที่อยู่ในคอกที่เป็นพื้นยาง