บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

1.การประเมินสุขภาพโลมา

1.1 การตรวจประวัติของโลมาปากขวดที่เลี้ยงในประเทศไทยและเกาะฮ่องกง สาธารณรัฐประชาชนจีน

จากการตรวจประวัติการป่วยและจากผลการตรวจเลือดจากอดีตจนถึงวันที่ทำการเก็บตัวอย่างของโลมาปากขวด (*Tursiops truncatus*) ทั้งที่เลี้ยงในประเทศไทย 8 ตัว โลมาปากขวดจำนวน 13 ตัว และวาฬเพชฌฆาตเทียม (*Pseudorca crassidens*) 1 ตัว ที่เลี้ยงใน Ocean Park ในเกาะฮ่องกง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน แบ่งสัตว์ทั้งหมดเป็น 4 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 คือโลมาปากขวดที่เลี้ยงในประเทศไทย ที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสและมีผลการเพาะเชื้อ *B. pseudomallei* เป็นลบ โลมากลุ่มนี้มี 8 ตัว

กลุ่มที่ 2 คือโลมาปากขวดที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกงและป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส โดยมีผลการเพาะเชื้อแบคทีเรียทั้งจากตัวอย่างทางคลินิกชนิดต่างๆ เช่น เลือด น้ำคัดหลั่งจากช่องหายใจ หรือจากรอยโรคที่พบในการผ่าชันสูตรซาก พบว่าเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* โลมากลุ่มนี้มี 4 ตัว

กลุ่มที่ 3 คือโลมาปากขวดที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกงที่สงสัยว่าป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส เนื่องจากมีอาการป่วยและทุกตัวมีระดับแอนติบอดี ไตเตอร์ ต่อ crude antigen (heat-killed bacteria) ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งเป็นวิธีที่ทางโรงพยาบาลสัตว์ของ Ocean Park ได้จัดทำขึ้นมา แต่ผลการเพาะเชื้อจากตัวอย่างทางคลินิกเป็นลบ คือไม่พบการเจริญของเชื้อ *B. pseudomallei* โลมากลุ่มนี้มี 4 ตัว

กลุ่มที่ 4 คือโลมาปากขวดที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกงที่สุขภาพปกติ 3 ตัว และโลมาที่ป่วยด้วยโรคอื่น 3 ตัว ซึ่งผลการเพาะเชื้อจากตัวอย่างทางคลินิกเป็นลบ คือไม่พบการเจริญของเชื้อ *B. pseudomallei* โลมาที่ป่วยด้วยโรคอื่นคือ ป่วยด้วยโรคตับอักเสบ2 ตัวและป่วยด้วยโรคติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* 1 ตัว

ตารางที่ 1 แสดงการจัดกลุ่มโลมาปากขวดที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่ม 1 Thai culture negative	กลุ่ม 2 HK Culture positive	กลุ่ม 3 HK suspected	กลุ่ม 4 HK culture negative
8 healthy dolphins (all adult)	3 dolphins - 2 adult,1 young 1 adult False killer whale	4 dolphins - 3 adult -1 young	3 healthy adult dolphins 3 sick with other diseases (all adult)

1.2 **การเก็บตัวอย่างเลือดโลมาปากขวด**

เก็บตัวอย่างเลือดโลมาปากขวดที่เลี้ยงในประเทศไทยจาก Caudal tail vein จำนวน 10 มิลลิลิตร โดยใช้ Butterfly เบอร์ 21G (Nipro®,Thailand) ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด10 มิลลิลิตร แบ่งเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวด Brain Heart Infusion (BHI) broth (hemoculture) โดยใช้อัตราส่วน 1 :10 แบ่งเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วที่มีสารกันการแข็งตัวของเลือดซึ่งใช้ heparin เพื่อนำไปตรวจทางโลหิตวิทยา เลือดที่เหลือปริมาณ 4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วปลอดเชื้อและวางเอียงทิ้งให้เลือดแข็งตัว เพื่อนำไปปั่นแยกซีรั่มซึ่งจะใช้ตรวจค่าชีวเคมีของเลือดต่อไป ตัวอย่างเลือดถูกเก็บในน้ำแข็งที่บรรจุในกล่องโฟม ขณะนำส่งห้องปฏิบัติการ ส่วนซีรั่มที่เหลือถูกเก็บรักษาที่ -70 องศาเซลเซียส

1.3 **การตรวจค่าโลหิตวิทยา (hematology)**

ทำการตรวจ Complete Blood Count (CBC) ได้แก่ จำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดอัดแน่น (hematocrit) จำนวนเม็ดเลือดขาวรวมและเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด ได้แก่ Neutrophil, Band Neutrophil, Eosinophil, Basophil, Lymphocyte และ Monocyte อัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (Erythrocyte Sedimentation Rate; ESR)

1.4 **การตรวจค่าชีวเคมีของเลือด**

นำซีรั่มมาตรวจการทำงานของตับและไต โดยตรวจค่า BUN (Blood Urea Nitrogen), Creatinine, ALT (Alanine Transferase), GGT (Gamma - Glutamyltransferase) เพื่อดูการทำงานของอวัยวะและระบบต่าง ๆ ของร่างกายและภาวะการอักเสบ นอกจากนี้ยังทำการตรวจวัดระดับ glucose เพื่อวินิจฉัยภาวะเบาหวาน โดยใช้เครื่องตรวจค่าชีวเคมีของเลือดแบบอัตโนมัติ Reflovet® (Roche, Germany)

1.5 การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากช่องหายใจ

ทำการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากช่องหายใจ (blow hole) โดยให้โลมาพ่นลมหายใจลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptose soy agar (TSA) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปและ Ashdown's agar (ASH) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะกับเชื้อ *B. pseudomallei* ทำการเพาะบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 24, 48 ชั่วโมง และ 7 วัน กรณีที่พบว่ามีเชื้อขึ้นจะทำการ identify แบคทีเรียว่าเป็นการติดเชื้อ *B. pseudomallei* หรือไม่และดูการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ

1.6 การเพาะเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ใน BHI broth เพื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาทั้งสิ้น 14 วัน และทำการ subculture ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA และ ASH ที่ 24, 48 ชั่วโมง, 7 และ 14 วัน เพื่อดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทำการ identify เชื้อในกรณีมีการเจริญของเชื้อเพื่อบ่งชี้การติดเชื้อในกระแสเลือด

2. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

2.1 ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่ได้จากคนและโลมาปากขวด

โดยนำเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากเลือดของโลมาปากขวดชื่อ Wiki ที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกง 1 ตัวอย่าง และเชื้อ *B. pseudomallei* จากเลือดของผู้ป่วย (human patient) ในประเทศไทย (Bp 844) 1 ตัวอย่าง มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ API 20 NE (Biomerieux, France)

2.2 ทำการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดยวิธี SDS – PAGE

2.2.1 การเตรียมเจล

ก. การเตรียม separating gel 10% เตรียมโดยใช้ Acrylamide 30% 1.66 มิลลิลิตร separating gel buffer (1.875 M Tris – HCl, pH 8.8) 1 มิลลิลิตร 10% SDS 50 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 2.26 มิลลิลิตร 10% ammonium persulphate (APS) 60 ไมโครลิตรและ TEMED 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเทลงใน gel cast และเติมน้ำกลั่นประมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อปิดผิวบนของเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที รอให้เจลแข็งตัว

ข. การเตรียม stacking gel 3% เตรียมโดยใช้ Acrylamide 30% 500 ไมโครลิตร stacking gel buffer (1.875 M Tris – HCl, pH 6.8) 330 ไมโครลิตร 10% SDS 50 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 4.1 มิลลิลิตร และ10% APS 70 ไมโครลิตร และ TEMED 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และหลังจาก separating gel แข็งตัวดีแล้ว เทน้ำส่วนบนออกให้หมด แล้วเทส่วนผสมของ stacking gel ลงบน separating gel ใช้หวี (comb) เสียบลงทางด้านบนของชุดเตรียมเจล ทิ้งไว้นาน 30 นาที หลังจากที่เจลแข็งตัวดีแล้ว นำแผ่นเจลวางลงใน clamp assembly ตามแนวตั้งของเครื่อง electrophoresis (Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.) ทั้ง 2 ข้าง เติม electrode buffer ในช่องกลางจนท่วมแนวบนของแผ่นเจล และเติมลงในช่องด้านล่างให้สูง 1 เซนติเมตร

2.2.2 การเตรียม crude antigen

นำเชื้อ *B. pseudomallei* มาเพาะลงบน TSA โดยเพาะบ่มเชื้อใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นขูดเชื้อมา 1 loop ใส่ลงใน lysis buffer 250 ไมโครลิตร นำมาต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้จนกระทั่งเย็น นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เก็บส่วนใสด้านบน (supernatant) เพื่อนำมาศึกษาด้วยวิธี SDS – PAGE

2.2.3 การศึกษาแอนติเจนของเชื้อ *B. pseudomallei*

ก. การแยกโปรตีนแอนติเจน โดยใช้โปรตีนมาตรฐานที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 4 – 250 kDa จำนวน 1 ตัวอย่าง และใช้ crude antigen ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.2 แต่ละตัวอย่าง นำมาหยอดลงในหลุมบนแผ่นเจลที่ติดตั้งอยู่บนเครื่อง electrophoresis ตัวอย่างละ 2 ไมโครลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์ต่อ 1 แผ่นเจล จนกระทั่ง dry front เคลื่อนที่มาถึงตรงปลายสุดของเจล

ข. การศึกษาแถบโปรตีนแอนติเจน โดยนำแผ่นเจลที่แยกโปรตีนไว้ (จากข้อ ก) มาย้อมสี Comassie blue บนเครื่องเขย่า (rotator) ด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทสีออกและเติมสารละลาย destaining solution เพื่อล้างสีส่วนเกินออก โดยแช่บนเครื่องเขย่า ทำการเปลี่ยน destaining solution ทุก 15 นาที จนกว่าสารละลายจะใสและแถบโปรตีนปรากฏขึ้นชัดเจนและเห็นพื้นหลังใส ทำให้เจลแห้ง วัดขนาดและน้ำหนักของแถบโปรตีนของ crude antigen โดยหาระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่อยู่ในเจลเดียวกัน

สูตรการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุล

$$\text{Relative mobility} = \frac{\text{Distance of protein migration}}{\text{Gel length after destaining}} \times \frac{\text{Gel length before staining}}{\text{Distance of the dye migration}}$$

2.3 การศึกษาการมี 200 kDa Exopolysaccharide (EPS) ของเชื้อโดยวิธี Western blot

นำแผ่นเจลที่แยกโปรตีนไว้แต่ยังไม่ย้อมสีมา blot ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ด้วยชุด blot (Mighty small transphor, Amersham Biosciences, U.S.A.) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้มาย้อมสี Fast green เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วย PBS เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสใน blocking solution (5% skim milk ใน PBS) ปริมาณ 15 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขณะเดียวกันทำการเตรียม primary antibody ซึ่งในที่นี้ใช้ Monoclonal Antibody (MAb) 5F8 เจือจางด้วย 5% blocking reagent ใน PBS ในอัตราส่วน 1 : 20 เท blocking solution ทิ้ง ใส่ MAb ที่เจือจางไว้ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ทิ้งไว้บนเครื่องเขย่าข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย 1%PBST 3 – 5 ครั้ง ครั้งละ 10 นาทีบนเครื่องเขย่า ใส่secondary antibody ซึ่งในที่นี้ใช้ Horseraddish peroxidase conjugated rabbit anti - mouse immunoglobulin (DAKO, Denmark) ที่เจือจางด้วย 5% blocking reagent ใน PBS ในอัตราส่วน 1 : 1000 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย 0.1%PBST 4 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที เตรียม cassette เพื่อใช้ในการประกบฟิล์ม(Hyperfilm™ ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, England) เพื่อดูปฏิกิริยา ใส่ chemiluminescence substrate (BM Chemiluminescence Blotting substrate, Roche Diagnostics, U.S.A.) ที่เจือจางใน PBS อัตราส่วน 1 : 2.5 เป็นเวลาประมาณ 2 นาที จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสวางลงบน cassette และนำไปประกบฟิล์ม และล้างฟิล์ม ซึ่งขั้นตอนนี้ต้องทำในห้องมืดหลังจากนั้นนำฟิล์มมาตรวจหาว่ามี 200 kDa EPS ซึ่งเป็นแอนติเจนจำเพาะของเชื้อ *B. pseudomallei* หรือไม่

2.4 การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง crude antigen กับซีรั่มโลมาปากขวดที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสและโลมาปากขวดปกติ ด้วยวิธี Western blot

ทำ Western blot เหมือนในข้อ 2.2 แต่เปลี่ยน primary antibody เป็นซีรั่มโลมาที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสหรือซีรั่มโลมาปากขวดที่มีสุขภาพปกติ ซึ่งเจือจางด้วย PBS ที่มี Tween 1% ในอัตราส่วน 1 : 2,000 และ secondary antibody ใช้ Horseraddish peroxidase conjugated rabbit anti – bottlenose dolphin Immunoglobulin G (Bethyl, U.S.A.) ที่เจือจางใน 3% skim milk ใน PBS ที่มี Tween 1% ในอัตราส่วน 1 : 10,000 และล้างด้วย PBS ที่มี Tween 1% จากนั้นนำมาย้อมสี DAB แล้วนำมาศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีในซีรั่มโลมาที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสกับแอนติเจนของเชื้อ *B. pseudomallei*

3. การสกัด 200 kDa EPS และการศึกษาลักษณะของแอนติเจนที่สกัดได้

3.1 การสกัด 200 kDa EPS ด้วยวิธี Affinity – purified chromatogtraphy

3.1.1 เตรียม crude antigen

เตรียม crude antigen โดยเพาะเชื้อบน TSA โดยวิธี spread plate technique เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ เป็นจำนวน 50 plate เพาะบ่มใน incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อใส่ใน PBS ในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อ ทำการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatant) ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.1.2 เตรียม Sepharose gel ที่ต้องการให้มี MAb จับอยู่ (conjugate)

นำเจล CNBr – activated Sepharose 4B ปริมาณ 1 กรัม มาทำให้พองตัว (swell) ใน 1 mM HCl 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที จะได้เจล 3.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการล้างด้วย coupling buffer 200 มิลลิลิตร และบรรจุเจลใน Sintered glass filter (G3) เพื่อให้เจลพองตัวอีกครั้ง (reswell) ผสม purified MAb 5F8 และ purified MAb 4B11 ที่ละลายอยู่ใน coupling buffer ($NaHCO_3$) ให้เข้ากับ gel suspension ในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อ โดยทำแยกเป็น 2 ชุด ใช้เครื่องหมุน (rotor) (Stuart Scientific, U.K.) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งข้ามคืน จากนั้นนำมา block ด้วย 0.2 M glycine pH 8 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างโปรตีนที่มากเกินออกด้วย coupling buffer ปริมาณ 5 มิลลิลิตร โดยนำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างด้วย 0.1 M acetate buffer pH 4 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนใสทิ้ง ล้าง blocking agent ที่มากเกินออกด้วย coupling buffer ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนใสทิ้ง จะได้ Sepharose gel ที่มี MAb 5F8 และ MAb 4B11 จับอยู่ ทำการเก็บรักษาใน PBS ที่มี 0.1% Sodium aside ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.1.3 Affinity chromatography

บรรจุเจลที่ได้จากข้อ 3.1.2 ลงใน column ล้าง column ด้วย PBS 5 มิลลิลิตร ใส่ crude antigen ครั้งละ 3 มิลลิลิตร ให้ไหลผ่าน column ทำซ้ำจน crude Ag หมด 30 มิลลิลิตร ล้าง column ด้วย PBS 15 มิลลิลิตร จากนั้นชะ (elute) antigen ที่ต้องการที่ถูกจับโดย MAb ออกด้วย eluting buffer (3 M NaSCN) ครั้งละ 3 มิลลิลิตร โดยใช้ eluting buffer ปริมาณทั้งหมด 250 มิลลิลิตร แล้วล้าง column ด้วย PBS สามารถเก็บเจลไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และนำมาใช้อีกได้ นำ eluting buffer ที่มี 200 kDa EPS ไปทำการ dialysis เพื่อเปลี่ยนสารละลายจาก NaSCN ให้ 200 kDa EPS อยู่ใน NH_4HCO_3 โดยใส่สารละลายใน dialysis bag ครั้งละ 10 มิลลิลิตร แช่ใน dialysis buffer (25 mM NH_4HCO_3) ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ทำการคนบนเครื่อง stirrer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยน

buffer 3 ครั้ง ทิ้งข้ามคืน จากนั้นนำ antigen ใส่หลอดพลาสติกปลอดเชื้อเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส โดยวางเอียงให้มีพื้นที่ผิวมากที่สุด จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง lyophilizer (Taitec, Japan) จะได้ 200 kDa Ag ที่แห้งเป็นผง

3.2 การวัดปริมาณ 200 kDa EPS ด้วยวิธี Orcinol – sulphuric acid assay

การวัดปริมาณ 200 kDa EPS นี้ใช้วิธีวัดปริมาณ total carbohydrate โดยอาศัยหลักการคือใส่กรดซัลฟูริกเพื่อทำปฏิกิริยา hydrolysis ที่ glycosidic linkage และดึงน้ำออกจาก monosaccharide ทำให้เกิดอนุพันธ์ของ furfural เช่น hexose จะสร้าง 5 – hydroxymethyl furfuraldehyde ซึ่งสารที่ถูกดึงน้ำออกนี้จะทำปฏิกิริยากับ orcinol ได้สารที่มีสี ดังนั้นจึงสามารถคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตได้จากค่า O.D. เทียบกับ glucose standard

3.2.1 เตรียม Orcinol ที่แช่เย็น นำมาละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น ในอัตราส่วน 2 กรัม / ลิตร ในการทดลองแต่ละครั้งต้องเตรียมใหม่เสมอ

3.2.2 นำตัวอย่าง 200 kDa EPS ที่สกัดได้ละลายใน PBS และเจือจางในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 9 เตรียม glucose standard คือ glucose ที่ความเข้มข้นต่างๆได้แก่ 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร อย่างละ 200 ไมโครลิตร ให้มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผสมกับ Orcinol 800 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน

3.2.3 อุ่นสารที่ผสมไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยใส่ลงใน ice bath

3.2.4 อ่านผลด้วย spectrophotometer (Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาคำนวณปริมาณ 200 kDa EPS ที่สกัดได้

3.3 การตรวจดูความบริสุทธิ์ของแอนติเจนที่สกัดได้โดยวิธี SDS – PAGE

นำแอนติเจนที่สกัดได้และทำเป็นผงแห้งแล้วมาศึกษาโดยวิธี SDS – PAGE แล้วย้อมสี Silver stain ซึ่งเป็นการย้อมดูคาร์โบไฮเดรต โดยนำแผ่นเจลมาทำปฏิกิริยากับ fixative reagent (ซึ่งประกอบด้วย 0.7%periodic acid ใน 40%ethanol ผสมกับ 5%acetic acid) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น ครั้งละ 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ย้อมแผ่นเจลด้วย staining solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น (deionized distilled water) ครั้งละ 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ทำปฏิกิริยา reduction ใน formaldehyde developer เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย destain I แล้วหยด glycerol 2 หยด จากนั้นทำแผ่นเจลให้แห้งบนกระดาษ cellophane นำแผ่นเจลอีกแผ่นมาย้อมด้วยสี Comassie blue เพื่อย้อมดูโปรตีน ตามวิธีในข้อ 2.2.3

4. การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี Indirect ELISA

หลักการทำ indirect ELISA

นำ Ag ที่ทำให้แห้งเป็นผง 1 มิลลิกรัม มาละลายใน PBS 1 มิลลิลิตร ผสมกันด้วยเครื่อง Vortex (Scientific Industries, U.S.A.) จะได้สารละลายของ 200 – kDa EPS ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร เก็บเป็น stock นำสารละลาย Ag ที่ได้มาเจือจางใน coating buffer (0.05 M Carbonate buffer pH 9.6) โดยเตรียม Ag ที่ได้มาเคลือบบน U – bottom ELISA plate (Nuch, U.S.A.) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร / หลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำ plate มาล้างด้วยเครื่องล้าง plate (ETL Testing Laboratory, U.S.A.) ที่มี washing buffer 3 ครั้ง จากนั้น block non specific reaction ด้วย 5 % skim milk ใน PBS ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง plate อีก 3 ครั้ง ใส่ตัวอย่างซีรั่มสัตว์ป่วย (primary antibody) ที่เจือจางใน incubating buffer (PBS ที่มี Tween 0.05 %) ที่ dilution ที่เหมาะสม ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate 6 ครั้ง ใส่ HRP (Horseraddish peroxidase) – conjugated anti – bottlenose dolphin immunoglobulin G (Bethyl, U.S.A.) (secondary antibody) ที่ dilution ที่เหมาะสม ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate 6 ครั้ง จากนั้นเติม substrate ซึ่งประกอบด้วย OPD (Dako, Denmark) 2 มิลลิกรัม + 35% H_2O_2 5 ไมโครลิตร + น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตร / หลุม ทำปฏิกิริยาในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 5 N H_2SO_4 25 ไมโครลิตร นำ plate ไปอ่านค่า O.D.ที่ 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Minireader (Labsystems, U.S.A.)

4.1 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นของ 200-kDa Ag ที่เหมาะสม

นำ MAb 5F8 – purified Ag และ MAb 4B11 – purified Ag มาเจือจางใน coating buffer ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 2.4 ถึง 0.15 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร และ 3 ถึง 0.1875 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ นำ Ag ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ มา coat plate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งข้ามคืน จากนั้นนำ plate มาล้าง 3 ครั้ง ใส่ primary (1^{o}) antibody คือ เลือดของโลมาชื่อ Wiki ที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกงหลังแสดงอาการป่วย 2 สัปดาห์ ใช้เป็น positive control และโลมาชื่อ Berkley ที่เลี้ยงในประเทศไทยซึ่งใช้เป็น negative control เนื่องจากเป็นโลมาที่เจริญเต็มที่และจากการทำการทดลองเบื้องต้น (preliminary study) มีระดับแอนติบอดีต่อ *B. pseudomallei* ต่ำ โดยใช้ primary antibody ที่ความเข้มข้น 1:1,000 และ secondary (2^{o}) antibody (HRP – conjugated rabbit anti – bottlenose dolphin IgG) ที่ความเข้มข้น 1:10,000 incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

block non specific ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เลือกดูผลจากค่า O.D. ที่เหมาะสมที่สุด เพื่อเลือกระดับความเข้มข้นของ Ag ที่ได้จากการจับด้วย MAb 5F8 และ 4B11 เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป ในการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ primary และ secondary antibody และปัจจัยอื่น ๆ ที่ศึกษา คือระยะเวลาบ่มและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป

4.2 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมของซีรั่มตัวอย่าง

เมื่อได้ระดับความเข้มข้นของ Ag ที่เหมาะสมแล้ว ทำการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ primary antibody ที่เหมาะสม คือตัวอย่างซีรั่มโลมาปากขวดตัวที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* (positive control) คือ Wiki และตัวไม่ติดเชื้อ (negative control) คือ Berkley โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 1 : 100, 1 : 250, 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000, 1 : 16000, 1 : 24000 และ 1 : 32000 และศึกษาระยะเวลาการบ่มที่ 30 นาทีและ 1 ชั่วโมง เพื่อหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อไป

4.3 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของ secondary antibody

เมื่อได้ระดับความเข้มข้นของ Ag และ primary antibody ที่เหมาะสมแล้ว ทำการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ secondary antibody ที่เหมาะสม โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 1 : 250, 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 5000, 1 : 8000, 1 : 10000, 1 : 16000 และ 1 : 20000 และศึกษาระยะเวลาการบ่มที่ 30 นาทีและ 1 ชั่วโมง เพื่อหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อไป

4.4 การหาค่า cut off ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA

การกำหนดค่า cut off ของการทดสอบคำนวณโดยใช้ T – test ในโปรแกรมสำเร็จรูปSPSS โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % ($p < 0.05$) สำหรับการกำหนดค่าบวกและค่าลบประเมินได้จากค่า cut off โดยการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ให้ผลบวกต้องมีค่า O.D.มากกว่าหรือเท่ากับค่า cut off และถ้าค่า O.D.ที่ได้ต่ำกว่า cut off แสดงว่าผลการทดสอบเป็นลบ

4.5 การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในซีรั่มโลมาปากขวด

ทำการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในซีรั่มโลมาปากขวดทุกตัวทั้งหมด 22 ตัวเป็น ซึ่งใช้ตัวอย่างเลือดที่เจาะเก็บในระยะต่างๆกัน จำนวนทั้งหมด 100 ตัวอย่าง โดยวิธี indirect ELISA ตามเงื่อนไข (condition) ที่เหมาะสมตามที่ทดลองในเบื้องต้น โดยต้องมีซีรั่มโลมาที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวกและลบ (positive and negative control) ทุกครั้งเพื่อควบคุมความถูกต้องของการทดสอบ