บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ วัสดุ/อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ และวัสดุ/อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์

1.1.1 biological safety cabinet (NUAIRE™, USA)

1.1.2 CO_2 incubator (Shel lab®, USA)

1.2 อุปกรณ์ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ

1.2.1 centrifuge (Jouan®, Japan)

1.2.2 water bath (Memmert®, Germany)

1.2.3 hemocytometer (Boeco®, Germany)

1.2.4 autoclave (TOMY, Japan)

1.2.5 microplate reader (Labsystems IEMS, Finland)

1.2.6 inverted microscope (Leica®, Germany)

1.2.7 microscope (Nikon®, USA)

1.2.8 multichannel pipette 30-300 µl (Thermo sciencetific,North America)

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute medium–1640 (RPMI-1640; PAA, Austria)

2.2 fetal bovine serum (GIBCO, South America)

2.3 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES; Hyclone, USA)

2.4 β-mercaptoethanol (BIORAD, Canada)

2.5 L-glutamine (PAA)

2.6 penicillin/streptomycin (PAA)

2.7 concanavalin A (ConA; Sigma, USA)

2.8 lipopolysaccharide (LPS; Sigma)

2.9 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma)

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

สารที่ใช้ทดสอบ

สารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ อนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน (sericin-derived oligopeptides: SDO) ขนาดประมาณ ≤ 5 kDa ได้มาจากการย่อยโปรตีนซิริซินจากรังไหมเหลืองสายพันธุ์นางน้อย ด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Stock solution ของสารละลายอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินถูกเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/ml และ 500 mg/ml ก่อน แล้วนำ stock solution ดังกล่าวมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อใช้เตรียมป้อนให้หนูที่ขนาด 50, 100 และ 500 mg/kg BW ตามลำดับ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ซึ่งสารละลายอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินที่ใช้ป้อนแก่สัตว์ทดลองถูกเตรียมใหม่ในทุกๆ สัปดาห์

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ หนูสายพันธุ์ BALB/cMlac เพศเมียอายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 100 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงที่ห้องสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยควบคุมแสง light: dark cycle เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 °C หนูทุกตัวถูกพักฟื้นเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนการทดสอบ 1 สัปดาห์ และหนูทุกตัวได้รับอาหารเม็ด (082 C.P. MICE Food, ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายามหาวิทยาลัยมหิดล) และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อตลอดระยะเวลาการศึกษา การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยมีเลขโครงการ/รหัส 52 04 0007 และผู้วิจัยได้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวรอย่างเคร่งครัด

การป้อนสารทดสอบ

หนูทดลองดังกล่าว ถูกสุ่มออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 25 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (vehicle control)
2. กลุ่มที่ได้รับอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินปริมาณ 50 mg/kg BW (SDO 50)
3. กลุ่มที่ได้รับอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินปริมาณ 100 mg/kg BW (SDO 100)
4. กลุ่มที่ได้รับอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินปริมาณ 500 mg/kg BW (SDO 500)

หนูกลุ่มดังกล่าวถูกป้อนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หรืออนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินทางปาก (oral administration) วันละหนึ่งครั้ง เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักของหนูทุกสัปดาห์ ตลอดการศึกษาในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 ภายหลังการป้อนสารทำการสุ่มหนูแต่ละ

กลุ่มๆ ละ 5 ตัว มาทำให้ตายอย่างสงบโดยการได้รับ overdose ของ thiopental sodium (THIOPENTAL, Bigpharma, Thailand) ปริมาณ 50 mg/kg BW เข้าที่ช่องท้องเพื่อนำมาศึกษาในขั้นตอนถัดไป

การศึกษาผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อน้ำหนักอวัยวะภายในของหนู

ภายหลังจากหนูตายอย่างสงบ ทำการผ่าตัดแยกอวัยวะภายในที่สำคัญ ได้แก่ ม้ามตับ ปอด ไต และไทมัส ชั่งและบันทึกน้ำหนักอวัยวะดังกล่าว และรายงานผลเป็น g/100 g BW

การศึกษาผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อค่าทางโลหิตวิทยา

ภายหลังจากหนูตายอย่างสงบ ทำการเก็บเลือดจากหัวใจใส่ใน sterile 1.5 ml- microcentrifuge tube ที่มี 1% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เพื่อนำไปศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาดังต่อไปนี้

1. **การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด** (total red blood cell (RBC) counts)

นำเลือดข้างต้น มาเจือจางด้วย 1X PBS pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:1000 ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน และนับจำนวนเม็ดเลือดแดงโดยใช้ hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดถูกบันทึกและรายงานผลเป็นจำนวน cells/µl

2. **การหาค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น** (% hematocrit)

บรรจุเลือดที่เก็บจากหัวใจลงใน heparinized hematocrit tube (NRIS, Denmark) ประมาณ 3/4 ของหลอด จากนั้นปิดปลายหลอดด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Haematokrit 24; Hettich, Germany) ที่ความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นด้วย hematocrit reader และรายงานผลเป็น % hematocrit

3. **การนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว** (differential white blood cells counts)

นำเลือดมา smear ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด และย้อมด้วยน้ำยา Dipquick solution (CLINAG, Thailand) โดยทำตามวิธีที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต หลังจากนั้นนับแยกเม็ดเลือดขาวทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil และ basophilภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 100X ทำการบันทึกและรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด

การศึกษาฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกันของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ Roswell Park Memorial Institute medium–1640 (RPMI–1640) **ซึ่งประกอบไปด้วย** 5% fetal bovine serum, 0.01 M HEPES, 5 X 10^{-5} M β-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml pennicillin **และ** 100 µg/ml streptomycin

การเตรียมเซลล์ splenic single cells

ม้ามของหนูแต่ละตัวถูกเก็บด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อใน PCM buffer ที่ประกอบไป**ด้วย** phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4,5% fetal bovine serum, 100 U/ml pennicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1.4 X 10^{-4} M Calcium Chloride (VWR, Belgium) และ 1.0 X 10^{-4} M Magnesium Chloride (VWR, Belgium) และนำมาเตรียมเป็น splenic single cell โดยกา**รบด** ผ่าน cell strainer (BD Falcon, USA) นำ splenic single cell ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว**รอบ** 1000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาเทของเหลวส่วนบนทิ้งจากนั้น**เติม** 0.17 M NH_4Cl ปริมาตร 0.5 ml เพื่อทำลายเม็ดเลือดแดง ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อล้างเซลล์อีก 2 **ครั้ง** แล้วนำ splenic single cell ที่แยกได้มาวัด % การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion (Strober, 2001) โดยใช้ hemocytometer และนำเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าหรือเท่ากับ 95% ไปใช้ในการศึกษาทางภูมิคุ้มกันต่อไป

การศึกษาผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อการทำงานของ NK **cell** (NK cell activity)

ผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อ NK cell activity ศึกษาตามวิธีของ Yuan, et al. (2009) โดยการนำ splenic single cell (effector cell) จำนวน $4x10^5$ มาเลี้ยงร่วมกับ YAC-1 cell (target cell; American Type Culture Collection (ATCC)) ใน 96-well tissue culture plate (Nunc™, Denmark) ให้ได้อัตราส่วน effector: target ดังนี้ 25:1, 50:1 และ 100:1 การศึกษานี้มี**หลุม** ควบคุม คือ หลุมที่ใส่เฉพาะ effector cell และหลุมที่ใส่ target cell เพียงอย่างเดียว บ่มเพลท**ที่** 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT (Mosmann, 1983) โดยการเติม MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml ทุกหลุมๆ ละ 20 µl บ่มเพลทดังกล่าวที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C นาน 4 ชั่วโมง จึงดูดของเหลวส่วนบนออกแล้วเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 100 µl เพื่อละลาย formazan และวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณ % NK cell activity ตามสูตร:

$$\% \text{ NK cell activity} = \left\{1 - \left[\frac{\text{ค่า OD ของ test samples - ค่า OD ของ effector cell control}}{\text{ค่า OD ของ target cell control}}\right]\right\} \times 100$$

การศึกษาผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อจำนวนประชากรย่อยของลิมโฟไซต์ (lymphocyte subpopulations)

ทำการหาประชากรย่อยของลิมโฟไซต์ตามวิธีของ Saint, et al. (2008) โดยปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ซึ่งทำได้โดยย้อม splenic single cell จำนวน 4 x10^5 เซลล์ด้วย fluorescein-labelled monoclonal antibodies ที่จำเพาะกับ CD antigen บนผิวเซลล์ ซึ่ง fluorescein-labelled monoclonal antibodies (eBioscience, USA) ที่ใช้ ได้แก่ Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-CD 3 (total T cell), Phycoerythrin (PE) anti-CD 4 (helper T cell), PE anti-CD 8a (cytotoxic T cell) และ PE anti-CD 21/35 (B cell) การศึกษาครั้งนี้มี negative controls โดยใช้ FITC Glutathione S Transferase (GSH) IgG Isotype control และ PE rat IgG2a Isotype control เพื่อให้ทราบ background fluorescence บ่มเซลล์ที่ย้อมไว้ที่ 4 °C ในที่มืดนาน 30 นาที จากนั้น ปั่นล้างเซลล์ด้วย 2% heat inactivated fetal bovine (HI-FBS) ใน 1X PBS pH 7.4 ที่ความเร็วรอบ 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และตรึงเซลล์ที่ย้อมแล้วไว้ด้วย 1% paraformaldehyde ใน 1X PBS pH 7.4 ปริมาตร 200 µl จำนวนประชากรย่อยของลิมโฟไซต์ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer (Becton Dickinson) โดยใช้โปรแกรม CellQuest ซึ่งทำได้โดยการ gate ลิมโฟไซต์ และเก็บลิมโฟไซต์ให้ได้จำนวนเซลล์เท่ากับ 5000 เซลล์ (total events) แล้ววิเคราะห์หาจำนวนประชากรย่อยของลิมโฟไซต์ ซึ่งแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ (%)

การศึกษาผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซต์ (mitogen-induced lymphocyte proliferation)

ศึกษาผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อ mitogen-induced lymphocyte proliferation โดยนำ splenic single cell จำนวน4 x10^5 เซลล์มาเลี้ยงร่วมกับไมโตเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ConA ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 และ 5 µg/ml, LPS ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 และ 10 µg/ml และ PWM ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 และ 50 µg/ml ซึ่งการศึกษาครั้งนี้มีหลุมควบคุมคือหลุมที่ใส่เฉพาะ splenic single cells เพลทดังกล่าวถูกบ่มที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง การเจริญของลิมโฟไซต์ถูกวัดด้วยวิธี MTT assay (Mosmann, 1983) โดยเติม MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 40 µl ทุกหลุม จากนั้น บ่มเพลทที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบ 3 ชั่วโมงดูด supernatant ทิ้ง และละลาย formazan ด้วยการเติม DMSO ปริมาตร 100 µl หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

ป
QP
551
ศ๓๘๑๑
๒๕๕๖

i1409346

- 9 ต.ค. 2556
สำนักหอสมุด

การศึกษาผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อการสร้างไซโตไคน์ (cytokine production)

ศึกษาผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อการสร้างไซโตไคน์โดยนำ splenic single cell จำนวน 4 x10^5 เซลล์ มาเลี้ยงร่วมกับ Con A ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5µg/ml โดยมีหลุมควบคุม คือ หลุมที่ใส่เฉพาะ splenic single cell ทำการบ่มเพลทดังกล่าวที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บ supernatant ลงใน sterile 1.5 ml-micr°Centrifuge tube และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C หากยังไม่ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไซโตไคน์โดยทันที การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาหาปริมาณไซโตไคน์ชนิด interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN-γ), IL- 4 และ IL-10 โดยไซโตไคน์แต่ละชนิดถูกวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี sandwichELISA จากชุดตรวจสำเร็จรูป (eBioscience) โดยทำตามขั้นตอนที่ระบุในคำแนะนำจากบริษัทผู้ผลิตมีขั้นตอนดังนี้ ทำการ coat plate ด้วย capture antibody (anti-IL-2, anti-IFN-γ, anti-IL-4 หรือ anti-IL-10) ปริมาตร 100 µl ลงใน 96-wellELISA microplate (Costar®, USA) บ่มเพลทดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 18 ชั่วโมงหลังจากล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย wash bufferที่เตรียมได้จาก 0.05% Tween-20ใน 1X PBS pH 7.4 ทั้งหมด 5 ครั้งจึงทำการเติม 1X diluent ปริมาตร 200 µl และบ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย wash buffer อีก 5 ครั้ง แล้วเติม standard IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-10 หรือ culture supernatant สำหรับหลุมควบคุมเติมเฉพาะ 1X diluent ปริมาตร 100 µl บ่มเพลทดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 18 ชั่วโมงหลังจากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้งแล้วเติม detection antibody (biotin-conjugate anti-mouse IL-2, biotin-conjugate anti-mouse IFN-γ, biotin-conjugate anti-mouse IL-4 หรือ biotin-conjugate anti-mouse IL-10) ที่จำเพาะต่อไซโตไคน์แต่ละชนิด ปริมาตร 100 µl บ่มเพลทที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมงทำการล้างด้วย wash buffer อีก 5 ครั้ง แล้วเติม avidin-horseradish peroxidase (HRP) ปริมาตร 100 µl ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย wash Buffer ซึ่งในขั้นตอนการล้างนี้ จำนวนครั้งในการล้างขึ้นอยู่กับไซโตไคน์แต่ละชนิดตามที่บริษัทแนะนำ จากนั้นเติม 1X 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB) solution (eBioscience) ปริมาตร 100 µl แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาทีจึงเติม 2N H_2SO_4 ปริมาตร 50 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยา และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรคำนวณปริมาณไซโตไคน์ใน culture supernatant ได้จากกราฟมาตรฐานของไซโตไคน์แต่ละชนิดซึ่ง detection limit ของไซโตไคน์ชนิด IL-2, IFN-γ, IL- 4 และ IL-10 มีค่าเท่ากับ 2, 15, 4 และ 30 pg/ml ตามลำดับ

การศึกษาผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อการสร้างแอนติบอดี

ภายหลังจากหนูได้รับอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินครบ 4 สัปดาห์ หนูถูกนำมาศึกษาผลของอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซินต่อการสร้างแอนติบอดีดังต่อไปนี้

1. **การกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู (immunization)**

หนูแต่ละกลุ่มถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดเม็ดเลือดแดงแกะ (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม) จำนวน 2×10^8 เซลล์ เข้าทางช่องท้อง โดยทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูดังกล่าว 2 ครั้งในวันที่ 0 และ 14 และเก็บเลือดจากหัวใจหนูในวันที่ 21 หลังการกระตุ้นครั้งแรก นำเลือดไปปั่นที่ 3000 rpm นาน 10 นาทีและเก็บพลาสมาที่แยกได้ที่อุณหภูมิ – 20 °C เพื่อนำไปหาปริมาณแอนติบอดีต่อไป

2. **การหาปริมาณแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเม็ดเลือดแดงแกะด้วยวิธี** hemagglutination

พลาสมาของหนูแต่ละตัวที่เก็บได้ ถูกนำมาหาปริมาณแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเม็ดเลือดแดงแกะด้วยวิธี Hemagglutination ตามวิธีของ Ali, et al. (2008) โดยการปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ซึ่งทำได้โดยเจือจางพลาสมาแบบ two-fold serial dilution (1:2 – 1:2048) ส่วนหลุม negative control ใส่เฉพาะ 0.85% NaCl เท่านั้นจากนั้นเติมเม็ดเลือดแดงแกะที่ความเข้มข้น 1% ลงไปทุกหลุม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงบันทึกผลการทดลองที่ค่าระดับความเจือจางของพลาสมาสุดท้ายหรือสูงสุดที่แสดงปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (Hemagglutination) ซึ่งจะพบการแผ่สานเป็นร่างแหที่ก้นหลุมมากกว่า 50% และรายงานผลเป็น Hemagglutination titer

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลที่ได้จากการศึกษาถูกแสดงในรูป mean ±SEM ซึ่งทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciencesversion 17 (SPSS (Thailand) Co., Ltd.; Bangkok, Thailand) โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Turkey's post hoc ซึ่งค่า $p<0.05$ จะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ