บทที่ 5
วิจารณ์ สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

1. การประเมินสุขภาพโลมาปากขวด

โดยปกติการเลี้ยงโลมาซึ่งเป็นสัตว์ที่มีมูลค่าสูงและมีคุณค่าสูงในด้านการอนุรักษ์ เมื่อมีการป่วยมักจะไม่แสดงอาการผิดปกติ หรือแสดงอาการป่วยแต่อาจเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงจำเป็นมากที่จะต้องมีการดูแลและเฝ้าระวังในด้านสุขภาพอย่างใกล้ชิด คือ การบันทึกปริมาณอาหารที่ให้และที่กินในแต่ละมื้อ อุณหภูมิร่างกาย (rectal temperature) การตรวจค่าทางโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือดเป็นประจำ โดยเฉพาะค่าที่บ่งชี้ถึงการมีการอักเสบ (inflammation marker) ได้แก่ จำนวนเม็ดเลือดขาว เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด อัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (Erythrocyte Sedimentation Rate ; ESR) จำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีอายุน้อย (Reticulocyte count) Albumin, Alkaline Phosphatase, Serum Iron, Serum Fibrinogen (Bossart *et al.,* 2001) การเพาะเชื้อแบคทีเรียจากเลือด ช่องหายใจ อุจจาระ ปัสสาวะ อาหารในกระเพาะ และตัวอย่างอื่นๆที่สามารถเก็บได้ การตรวจทางเซลวิทยา (cytology) และปรสิตในอุจจาระ เมือกจากช่องหายใจ ปัสสาวะ น้ำนม การตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะ การตรวจเช็คคุณภาพน้ำ การสังเกตและบันทึกพฤติกรรมในระหว่างวัน พฤติกรรมระหว่างโลมาด้วยกันเอง และพฤติกรรมระหว่างโลมากับคนเลี้ยง ขณะให้อาหาร และในขณะฝึกการแสดง จะช่วยในการนำมาประกอบการประเมินสุขภาพของโลมา การดูเพียงอาการของโลมาอย่างเดียวอาจให้ผลไม่ถูกต้องนัก เนื่องจากโลมาเป็นสัตว์ที่ยังมีสัญชาติญาณของสัตว์ป่าค่อนข้างสูง จึงมักไม่ค่อยแสดงอาการป่วยให้เห็นในระยะเริ่มต้นของการป่วย และค่อนข้างไวต่อเชื้อโรคเมลิออยโดซิสและโรคติดเชื้ออื่นบางโรค ทำให้บางครั้งโลมาแสดงอาการป่วยเพียง 2 – 3 วันแล้วเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งทางเศรษฐกิจ ทางสังคม และทางด้านการอนุรักษ์

โลมาปากขวดที่เลี้ยงในประเทศไทยทั้งหมด 8 ตัว ทุกตัวมีสุขภาพปกติดี ยกเว้นโลมาตัวที่ 3 ซึ่งภายหลังจากวันที่เก็บตัวอย่างเลือดเริ่มมีอาการเบื่ออาหารและซึมลง หลังจากนั้นจึงเสียชีวิต เมื่อทำการผ่าซากพบว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียคือ *Staphylococcus aureus* ขณะที่โลมาปากขวดที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน พบว่ามีปัญหาการเกิดโรคเมลิออยโดซิสทุกปีในช่วงฤดูมรสุมที่มีฝนตกและลมพายุรุนแรง นอกจากนี้พบว่ามีการป่วยด้วยโรคอื่นๆ เช่น โรคติดเชื้อ *Staphylococcus* โรคตับอักเสบ โรคพยาธิต่างๆ เช่น พยาธิในเต้านม โรคไวรัส เช่น Pox virus เป็นต้น แต่โรคเมลิออยโดซิสเป็นโรคที่ถูกให้ความสำคัญมากที่สุดเนื่องจากโลมามักป่วยแบบเฉียบพลัน มีอัตราการตายสูง แม้จะทำการรักษาทันทีที่แสดงอาการผิดปกติ และเกิดโรคนี้ขึ้นทุกปี ดังนั้นทางโรงพยาบาลสัตว์ของ Ocean Park จึงได้มีการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในโลมาขึ้นมาเอง โดยตรวจวัดทั้งระดับ IgG และ IgM antibody โดยใช้ crude antigen ที่ได้จากการนำเชื้อ *B.*

pseudomallei มาต้มให้เดือดใน PBS เพื่อเป็นการทำให้เชื้อตาย (heat – killed bacteria) แล้วนำ crude antigen เหล่านี้ไปใช้ในการทำ ELISA ต่อไป ซึ่งพบว่าระดับแอนติบอดี ไตเตอร์ที่วัดได้ในโลมาที่ป่วยและโลมาที่ไม่ป่วยมีค่าใกล้เคียงกัน และไม่แน่นอน คือโลมาที่ไม่ได้ป่วยบางตัวมีไตเตอร์สูง ขณะที่โลมาที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสมีไตเตอร์ต่ำ และพบว่าระดับ IgG สูงกว่า IgM เสมอ เนื่องจาก IgG เป็น immunoglobulin ชนิดที่พบได้มากที่สุดในกระแสเลือด (Sweeney *et al.*,1987)

นอกจากนี้ยังมีการนำ crude antigen นี้ไปทำเป็นวัคซีนเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในโลมาที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกง แต่ผลพบว่าวัคซีนนี้ไม่ได้ผลเนื่องจากโลมาที่ได้รับวัคซีนไม่มีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นสูงซึ่งตรวจโดยวิธี ELISA และยังมีการติดเชื้อ *B. pseudomallei* และเสียชีวิต จึงหยุดการทำวัคซีนในปี 1997

2. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *B. pseudomallei*

จากการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยชุดสำเร็จรูป API 20 NE พบว่าเชื้อทั้ง 2 ตัวอย่างมีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ส่วนลักษณะโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้ง 2 ตัวอย่างที่ศึกษาด้วยวิธี SDS – PAGE พบว่าลักษณะโปรตีนแอนติเจนเหมือนกันทุกประการ ผลการศึกษาการมี 200 kDa EPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยวิธี Western blot พบว่าเชื้อทั้ง 2 ตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาที่แถบบริเวณที่มีน้ำหนักโมเลกุล 200 kDa ดังนั้นจึงบอกได้ว่าเชื้อเหล่านี้มี 200 kDa EPS เหมือนกัน ซึ่งทั้งหมดนี้บ่งชี้ว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและโลมาปากขวด

การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง crude antigen กับซีรั่มโลมาที่ป่วยและไม่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ด้วยวิธี Western blot พบว่าตัวอย่างซีรั่มโลมาที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสสามารถทำปฏิกิริยาได้กับองค์ประกอบหลายชนิดของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งบ่งชี้ว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อทุกๆองค์ประกอบของเชื้อ ขณะที่ซีรั่มจากโลมาที่เลี้ยงในประเทศไทยไม่เกิดปฏิกิริยา โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง 200 kDa ซึ่งบ่งชี้ว่าโลมาที่เลี้ยงในประเทศไทยอาจจะไม่เคยสัมผัสกับเชื้อ *B. pseudomallei* มาก่อน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสถานที่เลี้ยงในประเทศไทยซึ่งอยู่ในกรุงเทพมหานคร โดยภาคกลางมีการพบเชื้อ *B. pseudomallei* ค่อนข้างน้อยในดินและสิ่งแวดล้อม และบริเวณบ่อโลมามีการทำพื้นเป็นปูนซีเมนต์ ล้อมรอบด้วยรั้วทึบ และแทบไม่มีบริเวณที่เป็นพื้นดินในบริเวณบ่อเลี้ยง ดังนั้นโอกาสที่โลมาจะสัมผัสเชื้อ *B. pseudomallei* จึงค่อนข้างน้อย ขณะที่โลมาปากขวดที่เลี้ยงในฮ่องกงเลี้ยงในบ่อที่ไม่มีรั้วกั้นและอยู่ติดกับริมทะเลและภูเขาซึ่งเป็นพื้นดินและจากการวิจัยสำรวจเชื้อ *B. pseudomallei* ในสิ่งแวดล้อมรอบๆบ่อโลมา (วรรณพร วุฒิเอกอนันต์, การติดต่อส่วนตัว) พบว่ามีเชื้อในดินในบริเวณภูเขาที่อยู่ติดกับบ่อโลมา นอกจากนี้เกาะฮ่องกงยังมีฤดูมรสุมบ่อยครั้งและมีลมแรง

และพายุฝน ซึ่งทำให้เกิดการชะเอาดินจากภูเขาลงมายังบ่อเลี้ยงโลมาและการพัดพาโดยลมที่มีความเร็วสูง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าโลมาติดเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการหายใจเอาเชื้อเข้าไป เนื่องจากเมื่อทำการผ่าซากจะพบรอยโรคคือ ก้อนฝีขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก โดยพบที่ปอดมากที่สุด รองลงมาคือตับและม้าม ซึ่งแสดงถึงภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ปัจจุบันนี้ทาง Ocean Park ได้ทำการก่อสร้างผนังปิดทึบทุกด้านล้อมรอบบ่อเลี้ยงโลมาพร้อมทั้งทำระบบระบายอากาศที่เหมาะสม และมีการปิดผนังตลอดช่วงฤดูมรสุม ซึ่งเป็นฤดูที่พบการป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสมากที่สุด ข้อมูลที่เก็บได้ในปีที่ผ่านมาพบว่าไม่มีโลมาที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* เพิ่มขึ้นเลย

3. การสกัด 200 kDa EPS และการศึกษาลักษณะของแอนติเจนที่สกัดได้

เมื่อทำการสกัด 200 kDa EPS โดยใช้ MAb 5F8 เปรียบเทียบกับ MAb 4B11 พบว่าได้ปริมาณแอนติเจนใกล้เคียงกัน และลักษณะของแอนติเจนที่สกัดได้มีลักษณะเหมือนกัน ทั้งจากการย้อมด้วย Silver stain เพื่อดูการมีคาร์โบไฮเดรต ซึ่งในที่นี้พบแถบของ 200 kDa EPS และ lipopolysaccharide ด้วยเนื่องจากแอนติเจนทั้ง 2 ชนิดนี้มีความใกล้ชิดกันมากและมักพบด้วยกันเสมอในการสกัดแยกแอนติเจนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากโครงสร้างของ LPS และ EPS ยึดเกาะแน่นอยู่ด้วยกัน ดังนั้น จึงแยกจากกันได้ยากมาก ดังนั้นการตรวจหาแอนติบอดีในครั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่านอกจากจะเป็นการวัดระดับ IgG ต่อ 200 kDa EPS แล้วยังมี IgG ต่อ LPS ปนมาด้วย หรืออาจทำให้ค่า O.D. สูงกว่าที่เป็นจริง ทั้งนี้เนื่องจากแอนติบอดีต่อ LPS อาจไม่จำเพาะต่อ *B. pseudomallei* เท่านั้น อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม LPS ก็นับเป็นแอนติเจนชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสด้วยวิธี ELISA ได้ดี มีความไวและความจำเพาะค่อนข้างสูง (Petkanjanapong *et al.*, 1992) ส่วนผลการย้อมสี Comassie blue เพื่อดูว่ามีโปรตีนปนเปื้อนหรือไม่ซึ่งก็ไม่พบโปรตีนแอนติเจนปนเปื้อนมาในขบวนการสกัด 200 kDa EPS

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี indirect ELISA

ความรู้และการศึกษาทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในทะเลมีค่อนข้างน้อย ทั้งนี้เนื่องจากการหาตัวอย่างสัตว์ที่จะมาทำการศึกษาได้ไม่มากนัก การเจาะเก็บตัวอย่างเลือดทำได้ค่อนข้างลำบากและก่อให้เกิดความเครียดแก่ตัวสัตว์ได้มาก รูปแบบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ไม่เกี่ยวกับเซลล์ (Humoral immunity ; HI) ของ immunoglobulin ชนิดต่างๆ ยังขาดความรู้ความเข้าใจอยู่มาก จากข้อมูลในปัจจุบัน พบว่า IgG จะพบได้มากที่สุดในกระแสเลือด โดยมีความเข้มข้นประมาณ 22 – 27.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตรของเลือด (Sweeney *et al.*, 1987) แต่ระยะเวลาในการคงอยู่ยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัด นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เหล่านี้ก็ยังไม่มีการศึกษาที่ชัดเจน ดังนั้น ข้อมูลที่ใช้ในการอ้างอิงจึงต้องนำข้อมูลใน

มนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆมาประกอบด้วย จากการศึกษาของ Nash และ Mach (1971) พบว่าในซีรั่มของโลมาปากขวดมี immunoglobulin 3 ชนิด คือ IgM, IgA และ IgG มี 2 class ซึ่งมีบางส่วนคล้ายคลึงกับ immunoglobulin ของมนุษย์และโค และจากการศึกษาของ Travis และ Sanders (1972) โดยวิธี Precipitation ตามด้วย Gel filtration chromatography ในการสกัด immunoglobulin ของมนุษย์และวาฬ พบว่า heavy และ light chain ของมนุษย์และวาฬมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่วาฬมี lampda light chain มากถึง 70% ซึ่งคล้ายกับในสัตว์กีบ (Artiodactylas) ขณะที่มนุษย์มี kappa light chain มากกว่า คือ 60% ทั้งนี้อาจเนื่องจากความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการที่มากกว่าของสัตว์พวกโลมาและวาฬ (Cetacea) และสัตว์กีบ Dalton และคณะ (1993) พบว่า immunoglobulin ในวาฬ Beluga ไม่สามารถผ่านรกได้ ทำให้ลูกวาฬไม่สามารถได้รับภูมิคุ้มกันจากแม่ ซึ่งลูกวาฬสามารถสร้างแอนติบอดีได้เองเมื่ออายุระหว่าง 24 – 44 วันหลังคลอด

เมื่อทำการศึกษาทดลองใช้เงื่อนไขต่างๆในการทำ indirect ELISA จนได้ภาวะเงื่อนไขที่เหมาะสม และเมื่อทำการทดลองตรวจวัดระดับแอนติบอดี ในตัวอย่างซีรั่มโลมาทั้งหมด พบว่ากลุ่มโลมาที่เลี้ยงในประเทศไทยมีระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ต่ำ ส่วนโลมาที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกงกลุ่มที่ 1 ซึ่งป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส พบว่ามีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นสูงสุดภายหลังแสดงอาการประมาณ 2 – 3 สัปดาห์ ยกเว้น Dona ที่แสดงอาการป่วยอย่างเฉียบพลันและตายภายใน 2 วันหลังแสดงอาการ ซึ่งเมื่อทำการผ่าซากพบฝีขนาดเล็กกระจายทั่วปอด ตับ และม้าม แต่มีระดับแอนติบอดีไม่เพิ่มสูงขึ้นเลยแม้จะเคยได้รับการฉีดวัคซีนแล้วก็ตาม ซีรั่มของ Dona ให้ผลเหมือนกันไม่ว่าจะใช้แอนติเจนที่สกัดโดย MAb 5F8 หรือ MAb 4B11 ซึ่งโลมาตัวนี้แสดงอาการป่วยเฉียบพลัน คือ ซึมลงมาก มีไข้ หายใจลำบาก และเสียชีวิตหลังจากแสดงอาการได้เพียง 2 วัน เมื่อทำการผ่าชันสูตรซากพบฝีกระจายทั่วปอด ตับ ม้าม และผลการเพาะเชื้อพบว่าเป็น *B. pseudomallei* ในโลมารายนี้อาจเป็นไปได้ว่าเคยมีการได้รับเชื้อมาก่อนแต่ยังไม่แสดงอาการป่วยโดยเชื้อแฝงอยู่ในร่างกายและมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งพาเซลล์ (CMI) คือเกิดเป็นฝีตามอวัยวะต่างๆ แต่ที่ระดับแอนติบอดีไม่สูงขึ้นอาจเนื่องจากไม่มีการสร้างแอนติบอดีหรือมีการสร้างและลดต่ำลงในภายหลัง และเมื่อเชื้อเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว (relapse) ร่างกายอาจไม่สามารถสร้างแอนติบอดีขึ้นมาใหม่ได้ทัน การเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีชนิด IgG จะเริ่มขึ้นสูงภายหลังการแสดงอาการป่วย 1 สัปดาห์ขึ้นไป และเพิ่มสูงขึ้นต่อเนื่องในสัปดาห์ที่ 2 แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่เป็นโลมาที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสมีน้อย คือ 4 ตัว ซึ่ง 1 ตัวที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดี อีก 2 ตัวป่วยและเสียชีวิตภายใน 2 และ 3 สัปดาห์หลังแสดงอาการ และระดับแอนติบอดีสูงขึ้น แต่เมื่อโลมาเสียชีวิตก่อนจึงขาดข้อมูลต่อเนื่องระยะยาว มีโลมาในกลุ่มนี้เพียงตัวเดียวที่รอดชีวิตจนปัจจุบันและสามารถศึกษาข้อมูลการเปลี่ยนแปลงระดับแอนติบอดีในระยะยาว คือโลมา Hoi Kei ซึ่งเป็นโลมาที่มีอายุเพียง 1 ปี พบว่าระดับแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นช้ากว่าโลมาตัวอื่น และเพิ่มสูงสุดที่ 2 เดือนหลังแสดงอาการป่วย จากนั้นลดลง

อย่างรวดเร็วในเดือนที่ 3 และลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้การตอบสนองที่ช้าของระบบภูมิคุ้มกันอาจเนื่องจากโลมาอายุน้อยระบบภูมิคุ้มกันยังทำงานได้ไม่สมบูรณ์เต็มที่เหมือนโลมาที่โตเต็มที่ ทำให้ระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นช้ากว่า นอกจากนี้ยังทำให้การสร้างสารต่างๆ ยังไม่สมบูรณ์ เช่น cytokine, interleukin ชนิดต่างๆซึ่งส่งผลให้เกิด septic shock ได้ ดังนั้นอาจเป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้รอดชีวิต ทั้งนี้ในมนุษย์ก็พบว่าในเด็กจะมีอัตราการตายต่ำกว่าผู้ใหญ่ เนื่องจากสาเหตุนี้ ส่วน Barney ซึ่งเป็น False killer whale (*Pseudorca crassidens)* กลับทำปฏิกิริยาได้ดีกับ secondary antibody ที่เป็น HRP – conjugated rabbit anti – bottlenose dolphin IgG โดยพบว่ามีระดับแอนติบอดีเพิ่มสูง แต่ทั้งนี้ข้อมูลเกี่ยวกับแอนติบอดีของ False killer whale ยังไม่มีการศึกษามาก่อน ดังนั้นจึงเป็นจุดหนึ่งที่น่าสนใจยิ่งในการศึกษาชนิด ความคล้ายหรือแตกต่างของแอนติบอดี หรือ อิมมูโนกลอบูลินชนิดต่างๆ การเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติบอดีของ cetacean ชนิดต่างๆ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์อย่างมากในการอนุรักษ์สัตว์กลุ่มโลมาและวาฬในระดับนานาชาติ

กลุ่ม 2 โลมาที่สงสัยว่าป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส คือ Ester และ Popeye โลมาทั้งคู่มีระดับแอนติบอดีเพิ่มสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ตามลำดับ หลังแสดงอาการป่วย จากนั้นระดับแอนติบอดีลดลง ขณะที่โลมา Pinky มีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นสูงสุดในเดือนที่ 3 หลังแสดงอาการป่วย ส่วนโลมา Maya ซึ่งอายุเพียง 1 ปี พบว่าระดับแอนติบอดีไม่เพิ่มขึ้นสูงมากนักตลอดช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษาทั้งนี้อาจเนื่องจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันยังไม่สมบูรณ์เต็มที่เหมือนโลมาที่โตเต็มที่ ระดับแอนติบอดีที่สูงขึ้นในกลุ่มนี้ อาจเป็นประโยชน์ในการใช้วินิจฉัยแยกโรคได้ในกรณีที่ผลการเพาะเชื้อแบคทีเรียเป็นลบ

กลุ่มโลมาที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ที่มีสุขภาพปกติ ได้แก่ Jessie, Max และ Molly มีระดับแอนติบอดีต่ำตลอดช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เป็นที่น่าสังเกตว่า Jessie และ Molly ซึ่งเคยได้รับวัคซีนมาก่อน ขณะที่กลุ่มโลมาที่ป่วยด้วยโรคอื่น ได้แก่ Angel ซึ่งติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเคยได้รับวัคซีนมาก่อน มีระดับแอนติบอดีค่อนข้างสูงกว่าโลมาตัวอื่นๆ ในภาวะปกติ ส่วน Perky และ Leo ซึ่งป่วยด้วยโรคตับอักเสบมีระดับแอนติบอดีค่อนข้างต่ำตลอดช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษาเช่นกัน

โลมาที่เคยได้รับวัคซีนที่ทำจากเชื้อ *B. pseudomallei* คือ โลมาชื่อ Angel, Barney, Jessie, Molly และ Wiki พบว่าไม่มีการเพิ่มสูงขึ้นของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* มากนักและอาจไม่มีระดับภูมิคุ้มกันสูงพอที่จะมีผลในการป้องกันโรคเมลิออยโดซิส เนื่องจากโลมาที่เสียชีวิตด้วยโรคเมลิออยโดซิส คือ Barney และ Wiki ล้วนแต่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคเมลิออยโดซิสมาก่อน ซึ่งเหตุผลหนึ่งที่เป็นไปได้อาจเนื่องจากการที่ระดับแอนติบอดีในโลมามีการคงอยู่ไม่นาน จากการศึกษาของ Gilmartin และคณะ (1971) เกี่ยวกับการสร้างภูมิคุ้มกันของโลมาปากขวดที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรค Erysipelas จะมีการสร้างแอนติบอดีภายใน 6 เดือนหลังการฉีด แต่ภายหลังฉีด 1 ปีจะพบ

แอนติบอดีน้อยมากหรือไม่พบเลยในกระแสเลือด ดังนั้นอาจต้องฉีดซ้ำทุกๆ 6 เดือน Colgrove (1975) พบว่าจำนวนครั้งที่ฉีดวัคซีนโรค Erysipelas ซ้ำให้กับโลมาปากขวด ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับแอนติบอดี

จากการศึกษาและประเมินประสิทธิภาพของวิธี indirect ELISA ที่ใช้ 200kDa EPS เป็นแอนติเจน ที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้วินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในคนป่วยและนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในโลมา พบว่าวิธีนี้สามารถใช้ร่วมกับวิธีอื่นในการวินิจฉัย โดยมีความไวในการทดสอบเท่ากับ 41.30 และ 43.48 ตามลำดับ และมีความจำเพาะเท่ากับ 88.89 และ 90.74 ตามลำดับ

ในทางปฏิบัติจริง การวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสยังเป็นปัญหาที่ยังไม่มีทางออกที่สมบูรณ์แบบที่สุด เนื่องจากโรคนี้มักจะทำให้คนป่วยและโลมาที่ป่วยเสียชีวิตลงอย่างรวดเร็ว แต่ปัญหาในการวินิจฉัยคือ การเพาะเชื้อแบคทีเรียใช้เวลานาน การตรวจหาแอนติเจน มีโอกาสตรวจไม่พบสูงเนื่องจากมีเชื้อปริมาณน้อย การตรวจวัดระดับแอนติบอดี ซึ่งจะสูงขึ้นเมื่อได้รับเชื้อมาระยะหนึ่งแล้ว คือประมาณ 1 – 2 สัปดาห์ และปัญหาในคนที่เคยสัมผัสเชื้อมาก่อนจะมีระดับแอนติบอดีสูงคงอยู่ปีระยะเวลานาน แต่ในโลมาปากขวดที่ทำการศึกษาพบว่าระดับแอนติบอดีจะลดต่ำลงในระยะ 1 ปี แต่ทั้งนี้เป็นเพียงผลการศึกษาจากตัวอย่างที่มีจำนวนจำกัด ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในช่วงระยะเวลาที่กว้างขึ้นและติดตามระดับแอนติบอดีนานมากขึ้น

วิธี indirect ELISA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ นับว่ามีประโยชน์ในการติดตามเฝ้าระวังการติดเชื้อ *B. pseudomallei* โดยมีการตรวจวัดระดับแอนติบอดีเป็นประจำ และการวินิจฉัยโรคในกรณีเกิดโรคแบบกึ่งเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ซึ่งมีประโยชน์มากในการจัดการ การวางแผนรักษา การควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของโรคระหว่างสัตว์ชนิดเดียวกัน สัตว์ต่างชนิด และระหว่างสัตว์สู่คน ส่วนในกรณีเกิดโรคแบบเฉียบพลัน ต้องใช้หลายวิธีร่วมกันในการวินิจฉัย คือการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างทางคลินิกหลายๆชนิดร่วมกับการใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น Latex Agglutination ที่อาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่าง MAb ที่จำเพาะกับเชื้อ*B. pseudomallei* หรือ Fluorescence test เป็นต้น การดูจากอาการและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เช่น ผลเลือด ผลการวิเคราะห์ปัสสาวะ ผลการ X – ray เพื่อดูรอยโรคหรือความผิดปกติที่ปอดและอวัยวะภายในอื่นๆ ผลการ Ultrasound เพื่อดูรอยโรคและความผิดปกติของอวัยวะภายใน และวิธีทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ การตรวจหาแอนติเจนโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาหรืออณูชีววิทยา เช่น PCRและการตรวจวัดระดับแอนติบอดี ในกรณีสงสัยว่าโลมาป่วยควรทำการให้ยาที่ได้ผลดีในการรักษาโรคเมลิออยโดซิส เช่น Ceftazidime ทั้งนี้เนื่องจากโลมาเป็นสัตว์ที่มีความไวกับโรคเมลิออยโดซิสมาก และเป็นสัตว์ที่มีราคาแพง รวมถึงมีคุณค่ามาก แม้ทำการรักษาทันทีก็ยังมีอัตราการตายสูง ดังนั้นในการเลี้ยงโลมาในสถานที่ที่เคยมีการเกิดโรคนี้ขึ้น ควรทำการเฝ้าระวังโรคอย่างใกล้ชิดและสม่ำเสมอ รวมถึงการเข้มงวดเรื่องความสะอาดและสุขอนามัยของผู้ที่

ทำงานกับสัตว์ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ การสร้างผนังทึบล้อมรอบบ่อเลี้ยงโลมานับว่าเป็นวิธีป้องกันการติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อมที่ดี

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้วิธี indirect ELISA สำหรับการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในโลมาปากขวด โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากคนป่วย (Bp 844) และโลมาปากขวดที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส (Wiki) พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากทั้งคนและโลมาที่ป่วยมีคุณสมบัติทางชีวเคมี ลักษณะโปรตีนแอนติเจน และมี 200 kDa EPS เหมือนกัน การเกิดปฏิกิริยากับซีรั่มของโลมาปากขวดที่ป่วยและที่ไม่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน เมื่อทำการตรวจวัดระดับแอนติบอดี (IgG) ต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ในโลมาปากขวดด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 5F8 เปรียบเทียบกับ MAb 4B11 พบว่าวิธีนี้อาจยังมีความไวไม่สูงพอสำหรับโลมาปากขวดในกรณีการป่วยแบบเฉียบพลัน แต่มีความจำเพาะค่อนข้างสูง คือสามารถตรวจแยกโลมาที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสได้ดี เมื่อเปรียบเทียบการใช้ MAb 2 ชนิดคือ 5F8 และ 4B11 พบว่า MAb 4B11 ให้ผลที่ดีกว่าในทุกค่าที่ใช้ในการประเมินวิธีการวินิจฉัยนี้ วิธี indirect ELISA ที่ใช้ 200 kDa EPS เป็นแอนติเจนจำเพาะเพื่อตรวจหาแอนติบอดี สามารถใช้ในการวินิจฉัยร่วมกับวิธีอื่นๆและมีประโยชน์มากในการใช้เฝ้าระวังโรคในพื้นที่ที่มีโรคชุกชุมหรือใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากความรู้พื้นฐานทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาของโลมายังมีอยู่น้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยที่ควรทำต่อไปคืองานวิจัยพื้นฐาน ร่วมกับงานวิจัยเชิงประยุกต์ควบคู่กันไป รวมถึงการศึกษาทางระบาดวิทยา เช่น การศึกษารูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบพึ่งพาเซลล์ (Cell – mediated immunity) และแบบไม่พึ่งพาเซลล์ (Humoral immunity) กลไกและปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแอนติบอดี ระยะเวลาในการคงอยู่ของแอนติบอดีชนิดต่างๆ พยาธิกำเนิดและกลไกการก่อโรคของการติดเชื้อ *B. pseudomallei* การทดสอบประสิทธิภาพวิธีต่างๆในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส รวมถึงการพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรค เป็นต้น แม้อาจมีปัญหาเรื่องจำนวนตัวอย่างสัตว์ที่มีค่อนข้างน้อย แต่ถ้ามีการร่วมมือกับประเทศต่างๆที่มีสัตว์ประเภทนี้ในสถานที่เลี้ยง และมีการสร้างงานวิจัยที่มีประโยชน์ร่วมกันก็มีโอกาสที่จะเกิดงานวิจัยและเพิ่มพูนความรู้ทางด้านนี้ให้มากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากทั้งทางด้านวิทยาศาสตร์และสังคม