บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การประเมินสุขภาพโลมาปากขวด

จากประวัติและผลการตรวจสุขภาพของโลมาปากขวดในสถานที่เลี้ยง โลมาปากขวด 8 ตัวที่เลี้ยงในประเทศไทยมีอายุตั้งแต่ 2 ปีขึ้นไป โดยเป็นโลมาที่เกิดในสถานที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย 2 ตัว และได้จากการจับจากธรรมชาติในน่านน้ำแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 6 ตัว และจาก ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือดในอดีตจนถึงปัจจุบัน พบว่าโลมาทุกตัวมีสุขภาพปกติและแข็งแรงดี ค่าทางโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือดอยู่ในช่วงปกติ โดยอ้างอิงจาก Bossart และคณะ (2001) ผลแสดงในตารางที่ 2 – 3

ตารางที่ 2 แสดงค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือดของโลมาปากขวดที่เลี้ยงในประเทศไทยตัวที่1-4

ลำดับที่ Parameter	โลมาตัวที่ 1	โลมาตัวที่ 2	โลมาตัวที่ 3	โลมาตัวที่ 4
Hematology				
RBC	4.88×10^6	4.50×10^6	3.51×10^6	4×10^6
Hb	18.6	14.6	19.7	17
PCV	44	43	38	46
WBC (total)	5200	4100	4150	8850
- Neutrophil	60 %	41 %	59 %	76 %
- Band neutrophil	2 %	0 %	1 %	0 %
- Eosinophil	17 %	9 %	10 %	5 %
- Basophil	0 %	0 %	0 %	0 %
- Lymphocyte	19 %	45 %	28 %	16 %
- Monocyte	2 %	5 %	2 %	3 %
Blood chemistry				
Creatinine	0.946 mg. / dl	1.21 mg. / dl	1.03 mg. / dl	0.778mg./ dl
Blood Urea Nitrogen	113 mg. / dl	102 mg. / dl	78.8 mg. / dl	121 mg. / dl
ALT	80.2 U / l	54.5 U / l	19.6 U / l	35.3 U / l
GGT	25.6 U / l	21.1 U / l	37.3 U / l	25 U / l
Glucose	74.9 mg. / dl	86.9 mg. / dl	88.9 mg. / dl	77.4 mg. / dl
ESR	34 mm / hr	40 mm / hr	52 mm / hr	45 mm / hr

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือดของโลมาปากขวดที่เลี้ยงในประเทศไทยตัวที่5-8

Parameter	โลมาตัวที่ 5	โลมาตัวที่ 6	โลมาตัวที่ 7	โลมาตัวที่ 8	Reference
Hematology					
RBC	4.71×10^6	5.98×10^6	4.37×10^6	4.78×10^6	$4 - 5 \times 10^6$
Hb	16.1	17.9	18.3	17.3	14 – 19
PCV	38	44	43	43	35 – 45
WBC (total)	4300	5900	5550	5850	5000 – 9000
- Neutrophil	52 %	55 %	46 %	42 %	45 – 78
- Band neutrophil	0 %	1 %	0 %	0 %	0
- Eosinophil	11 %	12 %	8 %	13 %	4 - 24
- Basophil	0 %	0 %	0 %	0 %	0
- Lymphocyte	34 %	23 %	41 %	38 %	11 - 45
- Monocyte	3 %	9 %	5 %	7 %	3 - 5
Blood chemistry					
Creatinine	1.01 mg. / dl	0.848mg./ dl	1.09 mg. / dl	1.26 mg./ dl	1 – 2
Blood Urea Nitrogen	104 mg. / dl	86 mg. / dl	96.8 mg. / dl	103 mg. / dl	70 - 110
ALT	52 U / l	104 U / l	38 U / l	44.5 U / l	28 – 60
GGT	25 U / l	30.7 U / l	27.2 U / l	24 U / l	30 – 50
Glucose	72.4 mg. / dl	59.7 mg. / dl	77.9 mg. / dl	75.5 mg. / dl	90 – 170
ESR	42 mm / hr	9 mm / hr	29 mm / hr	38 mm / hr	4 – 45

ส่วนผลการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากช่องหายใจบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA พบเชื้อ *Streptococcus sp., Staphylococcus sp.*และ *Pseudomonas sp.* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและจากระบบทางเดินหายใจส่วนต้น (Kinoshita, personal communication) และไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด ASH ผลการเพาะเชื้อจากเลือด ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ซึ่งอาจบ่งชี้ว่าไม่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด

โลมาปากขวดที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนมีอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป โดยเป็นโลมาที่เกิดในสถานที่เพาะเลี้ยงในเกาะฮ่องกง 3 ตัว และได้จากการจับจากธรรมชาติในน่านน้ำแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 11 ตัวและแบ่งโลมาเป็น 4 กลุ่ม ตามตารางที่ 1

โดยโลมากลุ่มที่ 2 แสดงอาการผิดปกติคือกินอาหารลดลง มีอุณหภูมิของร่างกายสูงขึ้น (rectal temperature) คือ สูงกว่า 37.5 องศาเซลเซียส ปกติอุณหภูมิร่างกายโลมาจะอยู่ที่ 36 – 37 องศาเซลเซียส ซึมลง พฤติกรรมผิดปกติไป ก่อนที่เสียชีวิตโลมามักแสดงอาการหายใจลำบาก ผลการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากช่องหายใจและเลือด พบเชื้อ *B. pseudomallei* ค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือดผิดปกติ คือ มีจำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มสูงขึ้น (leukocytosis) จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด

neutrophil เพิ่มสูงขึ้น (neutrophilia) อัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น (Erythrocyte Sedimentation Rate; ESR) ปริมาณธาตุเหล็กและไฟบริโนเจนในซีรั่มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อทำการผ่าชันสูตรซากจากโลมาที่ตายพบลักษณะการติดเชื้อแบบทั่วร่างกาย (septicemia) เกิดการอักเสบแบบมีหนองที่ปอด ตับ และม้าม เป็นหลัก เมื่อทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียพบว่าเป็นเชื้อ *B. pseudomallei*

โลมาในกลุ่มที่ 3 แสดงอาการผิดปกติเล็กน้อย เช่น ซึม กินอาหารลดลง และมีการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดี ไตเตอร์ต่อ crude antigen ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งเป็นวิธีที่ทางโรงพยาบาลสัตว์ของ Ocean Park ได้จัดทำขึ้นมา ค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือดผิดปกติคล้ายกับโลมาในกลุ่ม 1 แต่เมื่อทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากเลือดเป็นลบและจากช่องหายใจไม่พบว่ามีเชื้อก่อโรค (pathogen)

โลมาในกลุ่มที่ 4 โลมาที่มีสุขภาพปกติ มีอาการและพฤติกรรมปกติ ค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือดอยู่ในช่วงปกติ ผลการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากเลือดเป็นลบ และจากช่องหายใจไม่มีความผิดปกติ คือไม่พบเชื้อก่อโรค (pathogen) ส่วนโลมาที่ป่วยด้วยโรคอื่น ได้แก่ โรคติดเชื้อ Staphylococcus 1 ตัว แสดงอาการผิดปกติ คือ ซึม กินอาหารลดลง มีไข้ต่ำ ค่าโลหิตวิทยาผิดปกติ ผลการเพาะเชื้อพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* โลมาอีก 2 ตัวป่วยด้วยโรคตับอักเสบ โดยมีอาการผิดปกติและมีค่าชีวเคมีของเลือดผิดปกติไป คือค่าเอนไซม์ที่บ่งบอกภาวะถูกทำลายของเซลล์ตับเพิ่มสูงขึ้น ผลการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากเลือดและช่องหายใจเป็นลบ

2. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *B. pseudomallei*

2.1 การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่ได้จากคนและโลมาปากขวด

เมื่อนำตัวอย่างเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสในประเทศไทย (Bp 844) 1 ตัวอย่าง เชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากโลมาปากขวดที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสในเกาะฮ่องกง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน 1 ตัวอย่าง นำมาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป API 20 NE พบว่าเชื้อตัวอย่างทั้ง 2 มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนกันดังนี้ คือ NO_3 (+), Tryptophane (-), Glucose (-), L – Arabinose (-), Arginine Dihydrolase (+), Urease(-), Esculin (-), Gelatin (+), PNPG (Para – NitroPhenyl – ßD – Galactopyranosidase) (-), D – glucose (+), Mannose (+), Mannitol (+), N – Acetyl – Glucosamine (+), Maltose (-), Potassium Gluconate (+), Capric acid (+), Adipic acid (+), Malic acid (+), Trisodium citrate (+), Phenylacetic acid (+), Oxidase (+)

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและโลมาปากขวด

Biochemical property	Bps from human	Bps from dolphin
NO_3	+	+
Tryptophane	-	-
Glucose	-	-
L-Arabinose	-	-
Arginine Dihydrolase	+	+
Urease	-	-
Esculin	-	-
Gelatin	+	+
PNPG(Para-NitroPhenyl-ß D-	-	-
Galactopyranosidase	-	-
D-glucose	+	+
Mannitol	+	+
N-Acetyl-Glucosamine	+	+
Maltose	-	-
Potassium Gluconate	+	+
Capric acid	+	+
Adipic acid	+	+
Malic acid	+	+
Trisodium citrate	+	+
Phenylacetic acid	+	+
Oxidase	+	+

2.2 การแยกโปรตีนแอนติเจนด้วยวิธี SDS – PAGE

เมื่อนำตัวอย่างเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสในประเทศไทย (Bp 844) 1 ตัวอย่าง เชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากโลมาปากขวดที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสในเกาะฮ่องกง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน 1 ตัวอย่าง มาศึกษาด้วยวิธี SDS – PAGE แล้วทำการย้อมสี Comassie blue เพื่อดูองค์ประกอบโปรตีนของเชื้อเมื่อ นำมาศึกษาเปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่กับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าเชื้อทั้ง 4 มีแถบโปรตีนในรูปแบบเดียวกัน โดยมี 9 แถบหลักที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน มีน้ำหนักโมเลกุล 140, 64, 49, 39.5, 35.2, 31.9, 30.5, 28.9 และ 27.5 kDa ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 – 6 และภาพที่ 1

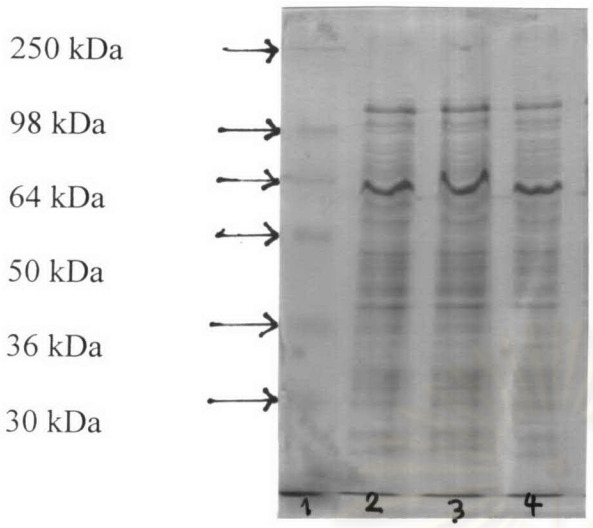
ตารางที่ 5 แสดงระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

Protein marker	Relative mobility (Rf)	Distance (c.m.)	Molecular weight (kDa)
1. Myosin	0.090	0.4	250
2. BSA	0.266	1.2	98
3. GDH	0.376	1.7	64
4. ADH	0.487	2.2	50
5. CA	0.686	3.1	36
6. Myoglobin	0.860	3.9	30

ตารางที่ 6 แสดงผลการแยกโปรตีนของ crude antigen ด้วยวิธี SDS – PAGE

Band	Rf	Distance (c.m.)	Molecular weight (kDa)
1	0.1992	0.90	140.0
2	0.3760	1.70	64.0
3	0.5090	2.30	49.0
4	0.6300	2.85	39.5
5	0.7080	3.20	35.2
6	0.8080	3.65	31.9
7	0.8400	3.80	30.5
8	0.9080	4.10	28.9
9	0.9400	4.25	27.5

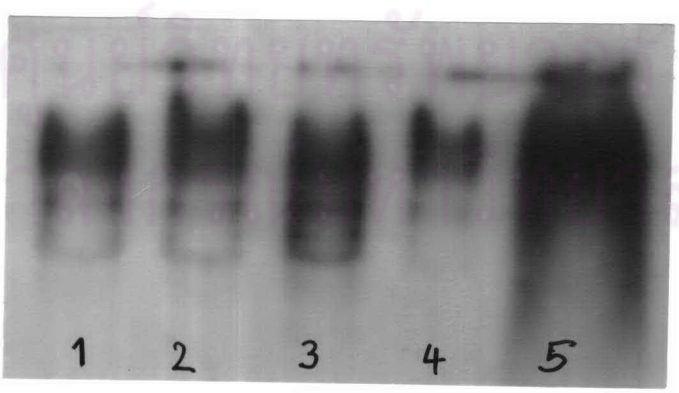
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1 แสดงผลการแยกแอนติเจนของเชื้อ B. pseudomallei ด้วยวิธี SDS – PAGE และย้อมด้วยสี Comassie blue เพื่อดูองค์ประกอบโปรตีนของเชื้อ เลนที่ 1 protein marker เลนที่ 2 เชื้อ Bp 844 เลนที่ 3 และ 4 เชื้อ B. pseudomallei จากโลมาชื่อ Wiki ที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสที่เกาะฮ่องกง

2.3 การทดสอบการมี 200 kDa EPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี Western blot

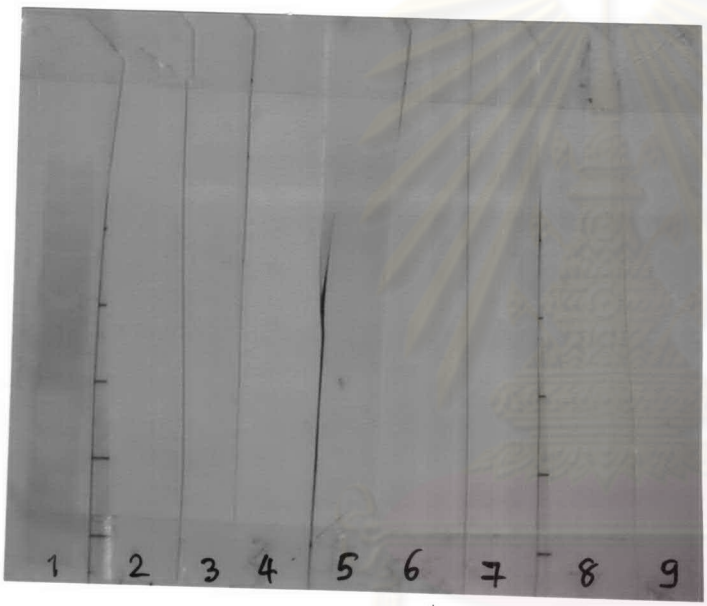
การทดสอบแถบแอนติเจนของ crude antigen ในแผ่นเจลที่แยกได้โดยวิธี SDS – PAGE แล้วนำมา blot ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยวิธี Western blot และทดสอบกับ MAb 5F8 เพื่อดูการมี 200 kDa EPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาอย่างมาก (strong reaction) ที่ตำแหน่ง 200 kDa ใน crude antigen ของเชื้อที่แยกได้จากทั้งคนและโลมา ซึ่งแสดงว่าเชื้อจากทั้งคนและโลมามี 200 kDa EPS เหมือนกัน ผลแสดงในภาพที่ 2



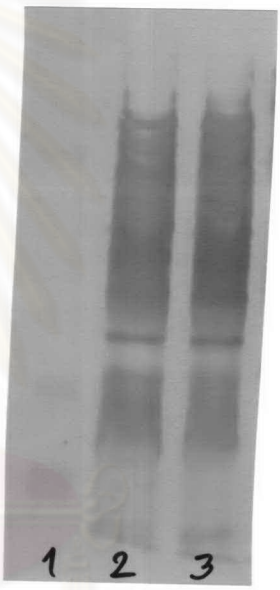
ภาพที่ 2 ผลการศึกษาการมี 200 kDa EPS ด้วยวิธี Western blot เลนที่ 1 คือเชื้อ Bp 844 เลนที่ 2 ถึง 4 คือเชื้อที่แยกได้จากโลมา เลนที่ 5 คือ supernatant จากเชื้อที่แยกได้จากโลมาที่จะใช้ในการสกัดแยก 200 kDa EPS ด้วยวิธี Affinity purified chromatography ต่อไป

2.4 **การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง** crude antigen **กับซีรั่มโลมาปากขวดที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส และโลมาปากขวดสุขภาพปกติด้วยวิธี** Western blot

การทดสอบแถบแอนติเจนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเพื่อดูการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีในซีรั่มโลมาที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส (positive control) กับแอนติเจนต่างๆของเชื้อ โดยวิธี Western blot และทำการย้อมด้วยสี DAB ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์ Horseraddish Peroxidase ซึ่ง conjugate อยู่กับ secondary antibody พบว่าเกิดปฏิกิริยาอย่างมากกับทุกๆแถบแอนติเจนของเชื้อ *B. pseudomallei* ส่วนโลมาปกติที่เลี้ยงในประเทศไทยจำนวน 8 ตัว ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาที่แถบแอนติเจนใดๆของเชื้อ ผลแสดงในภาพที่ 3 - 4



ภาพที่ 3



ภาพที่ 4

ภาพที่ 3 แสดงผลการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง crude antigen กับซีรั่มโลมาปากขวดที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส (เลน 1) และโลมาปากขวดสุขภาพปกติที่เลี้ยงในประเทศไทย 8 ตัว (เลน 2 ถึง 9) ด้วยวิธี Western blot และย้อมสี DAB ซึ่งพบการเกิดปฏิกิริยาเฉพาะซีรั่มโลมาป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ส่วนซีรั่มโลมาสุขภาพปกติที่เลี้ยงในประเทศไทยไม่พบการเกิดปฏิกิริยา

ภาพที่ 4 แสดงผลการศึกษาด้วยวิธี Western blot และย้อมสี DAB เพื่อดูการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง crude antigen เลน 1 คือ protein marker เลน 2 คือ Bp 844 เลน 3 คือเชื้อ B.pseudomallei ที่แยกได้จากโลมา พบว่าซีรั่มโลมาปากขวดที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสมีการเกิดปฏิกิริยากับทุกๆองค์ประกอบของเชื้อ

3. การสกัด 200 kDa EPS และการศึกษาลักษณะของแอนติเจนที่สกัดได้

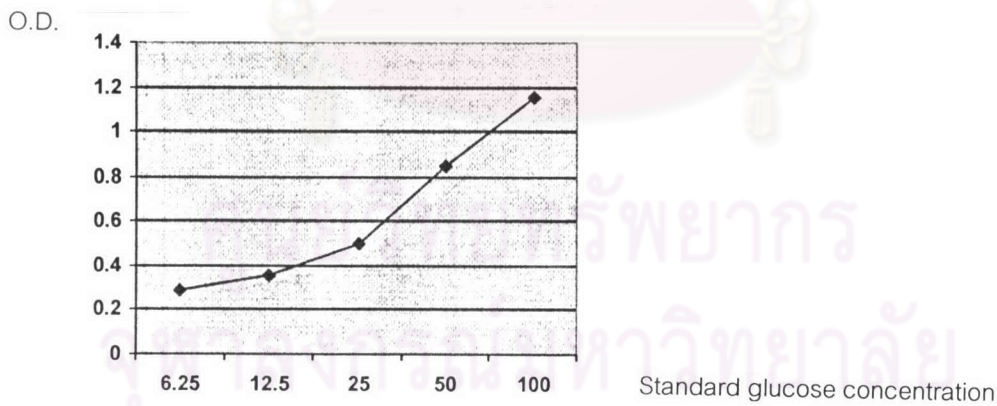
เมื่อนำเชื้อ*B. pseudomallei* ที่ทำการเพิ่มจำนวน จากนั้นนำมาสกัดแยก 200 kDa EPS ด้วยวิธี Affinity purified chromatography แล้วนำแอนติเจนที่ได้มาวัดความเข้มข้นของแอนติเจนโดย

วัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Orcinol – sulphuric acid assay ซึ่งเมื่อทำการเทียบกับ standard glucose แล้วพบว่าแอนติเจนที่สกัดได้โดยใช้ MAb 5F8 มีความเข้มข้น 120 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ขณะที่แอนติเจนที่สกัดได้โดยใช้ MAb 4B11 มีความเข้มข้น 155 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ผลดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 5

ตารางที่ 7 แสดงผลการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต

ความเข้มข้นของ glucose standard (µg / ml)	O.D.
6.25	0.2847
12.50	0.3585
25.00	0.4997
50.00	0.8493
100.00	1.1577
Ag 5F8 1 : 10	0.3416
Ag 4B11 1 : 10	0.3861

ใช้ Ag เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 9

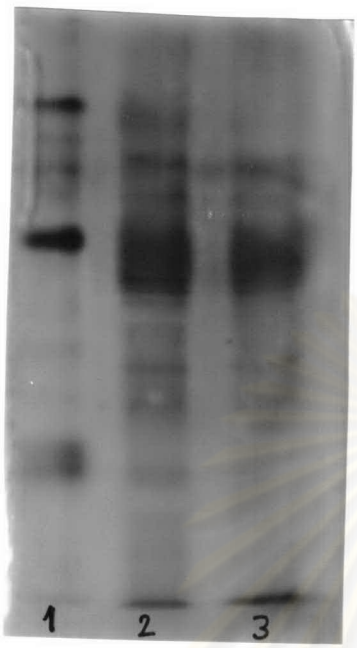


ภาพที่ 5 แสดงค่า O.D. ของค่า standard glucose ซึ่งใช้ในการเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของ200 kDa EPS

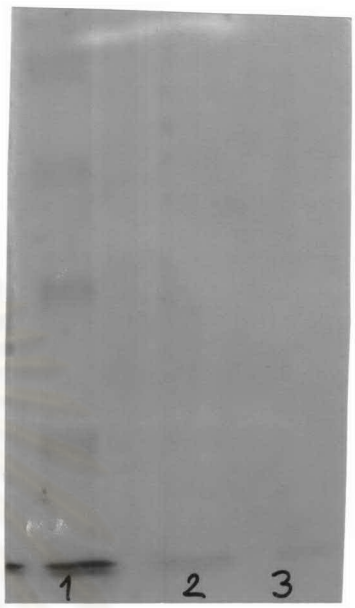
ส่วนผลการตรวจดูความบริสุทธิ์ของแอนติเจนที่สกัดได้โดยวิธี SDS – PAGE และย้อมสี Silver stain (ดังแสดงในภาพที่ 6) ซึ่งจะย้อมติดส่วนของคาร์โบไฮเดรต พบว่ามีการติดสีที่ตำแหน่ง 200 kDa

และพบลักษณะ ladder ของ LPS ซึ่งปนมาด้วย ส่วนผลการย้อมสี Comassie blue ซึ่งจะย้อมติดส่วนของโปรตีน ไม่พบการติดสีที่แถบใดๆบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (ดังแสดงในภาพที่ 7)

ภาพที่ 6



ภาพที่ 7



ภาพที่ 6 แสดงผลการย้อมแอนติเจนที่สกัดได้ด้วยสีSilver stain พบแถบของ 200kDa EPS และladder ของ LPS
ภาพที่ 7 แสดงผลการย้อมแอนติเจนที่สกัดได้ด้วยสีComassie blue ไม่พบโปรตีนใดๆปนมาด้วย เลนที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน เลนที่ 2 และ 3 คือแอนติเจนจากโลมา

4. การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี indirect ELISA

4.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 200 kDa EPS

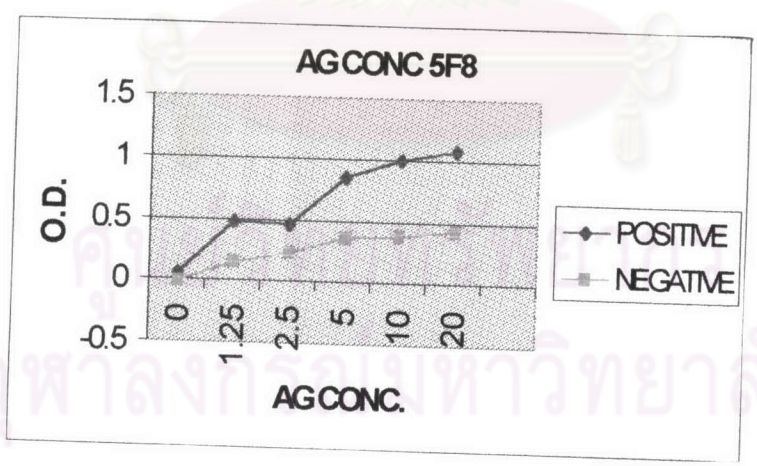
จากการทดลองใช้แอนติเจนที่สกัดด้วย MAb 5F8 ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยใช้ตัวอย่างซีรั่มโลมาที่ให้ผลบวกและลบ (positive and negative control) ที่ความเข้มข้น 1 : 1000 และ 2^{o} Ab ที่ความเข้มข้น 1 : 10,000 ในทั้ง 2 การทดลอง พบว่าแอนติเจนที่สกัดด้วย MAb 5F8 มีค่า O.D. ของตัวอย่างที่เป็นบวกและลบห่างกันมากที่สุดคือเมื่อใช้แอนติเจนที่ความเข้มข้น 2.4 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร คือ 0.658 แต่ค่า O.D.ของตัวอย่างที่เป็นลบมีค่าค่อนข้างสูง คือ 0.4235 ดังนั้นความเข้มข้นที่ 1.2 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างของตัวอย่างที่บวกและลบสูงเป็นอันดับถัดมา คือ 0.621 ขณะที่ค่า O.D.ของตัวอย่างที่เป็นลบ เท่ากับ 0.3730 ซึ่งต่ำกว่าและเพื่อเป็นการประหยัดแอนติเจน ดังนั้นที่ความเข้มข้นที่ 1.2 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่เลือกใช้ในการทดลองตลอดการศึกษาในครั้งนี้

ส่วนแอนติเจนที่สกัดด้วย MAb 4B11 มีค่าO.D.ของตัวอย่างที่เป็นบวกและลบห่างกันมากที่สุดคือที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร คือ 0.6325 แต่ค่า O.D.ของตัวอย่างที่เป็นลบมีค่า

ค่อนข้างสูง คือ 0.4325 ดังนั้นความเข้มข้นที่ 1.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างของตัวอย่างที่บวกและลบสูงเป็นอันดับถัดมา คือ 0.6095 ขณะที่ค่า O.D.ของตัวอย่างที่เป็นลบ เท่ากับ 0.3835 ซึ่งต่ำกว่าและเพื่อเป็นการประหยัดแอนติเจน ดังนั้นที่ความเข้มข้นที่1.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่เลือกใช้ในการทดลองตลอดการศึกษาในครั้งนี้ ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 8 - 9

ตารางที่ 8 แสดงค่า O.D.ในการศึกษา Ag ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Ag ที่สกัดโดย MAb 5F8

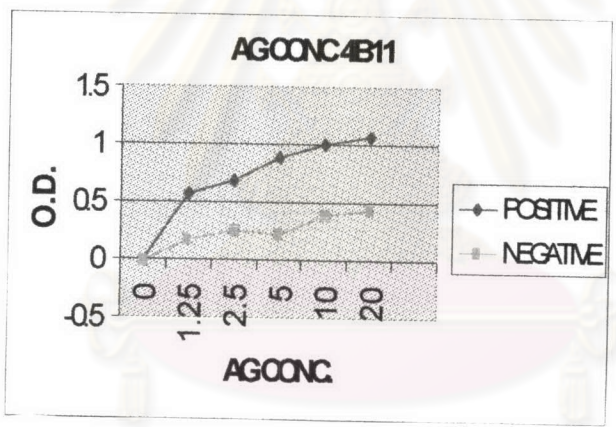
Ag concentration (µg / ml)	Positive	Negative	Positive – Negative differentiation
2.4000	1.0815	0.4235	0.6580
1.2000	0.9940	0.3730	0.6210
0.6000	0.8480	0.3610	0.4870
0.3000	0.5670	0.2315	0.3355
0.1500	0.4710	0.1545	0.3165
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000



ภาพที่ 8 แสดงผลในการศึกษา Ag ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Ag ที่สกัดโดย MAb 5F8

ตารางที่ 9 แสดงค่า O.D.ในการศึกษา Ag ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Ag ที่สกัดโดย MAb 4B11

Ag concentration (µg / ml)	Positive	Negative	Positive – Negative differentiation
3.0000	1.0650	0.4325	0.6325
1.5000	0.9930	0.3835	0.6095
0.7500	0.8855	0.3250	0.5605
0.3750	0.6880	0.2455	0.4425
0.1875	0.5625	0.1620	0.4005
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000



ภาพที่ 9 แสดงค่า O.D.ในการศึกษา Ag ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Ag ที่สกัดโดย MAb 4B11

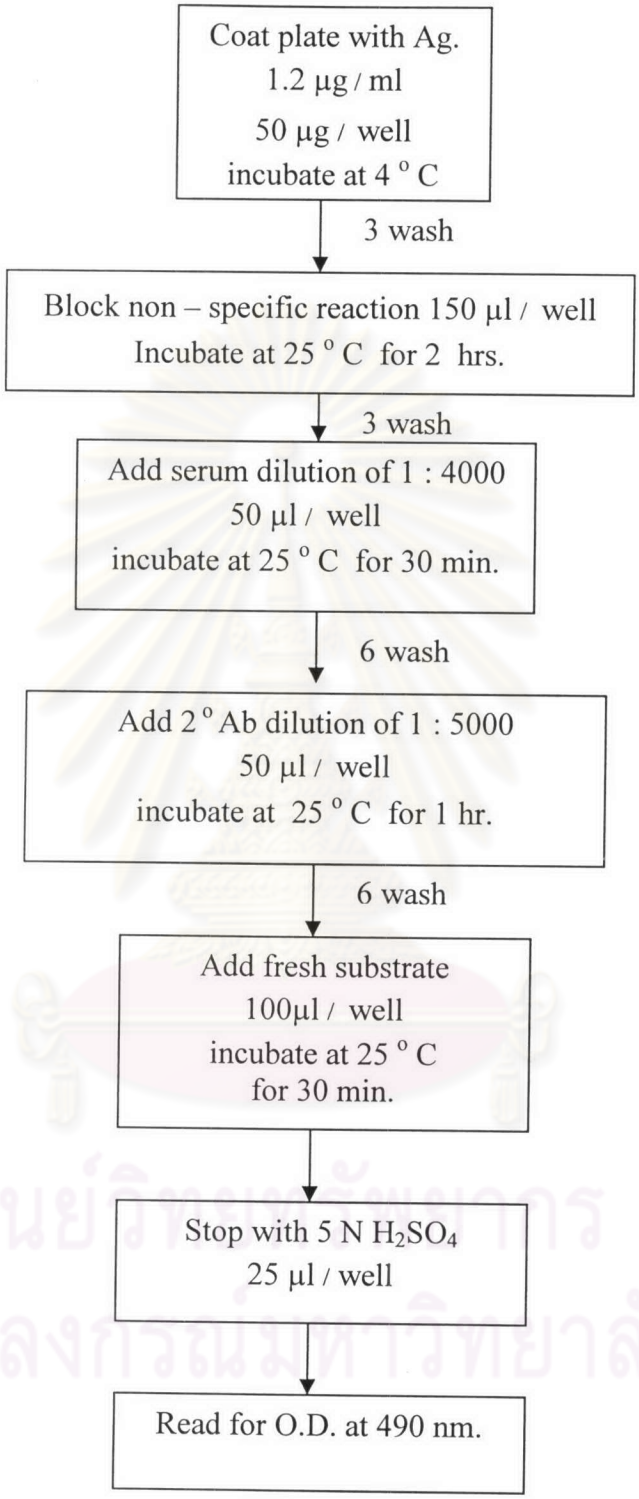
4.2 **สรุปวิธีการทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีรั่มตัวอย่าง** (primary antibody) **และ** secondary antibody

จากผลการทดลองเมื่อได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน (200 kDa EPS) ทั้งที่สกัดโดย MAb 5F8 และ MAb 4B11 แล้วจึงทำการศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีรั่มตัวอย่างและsecondary antibody (HRP - conjugated rabbit anti – bottlenose dolphin IgG) รวมถึงระยะเวลาการบ่มที่ให้ผลดีที่สุด ซึ่งสามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทำ indirect ELISA เพื่อวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในโลมาปากขวดได้ดังนี้ (ภาพที่ 10 – 11)

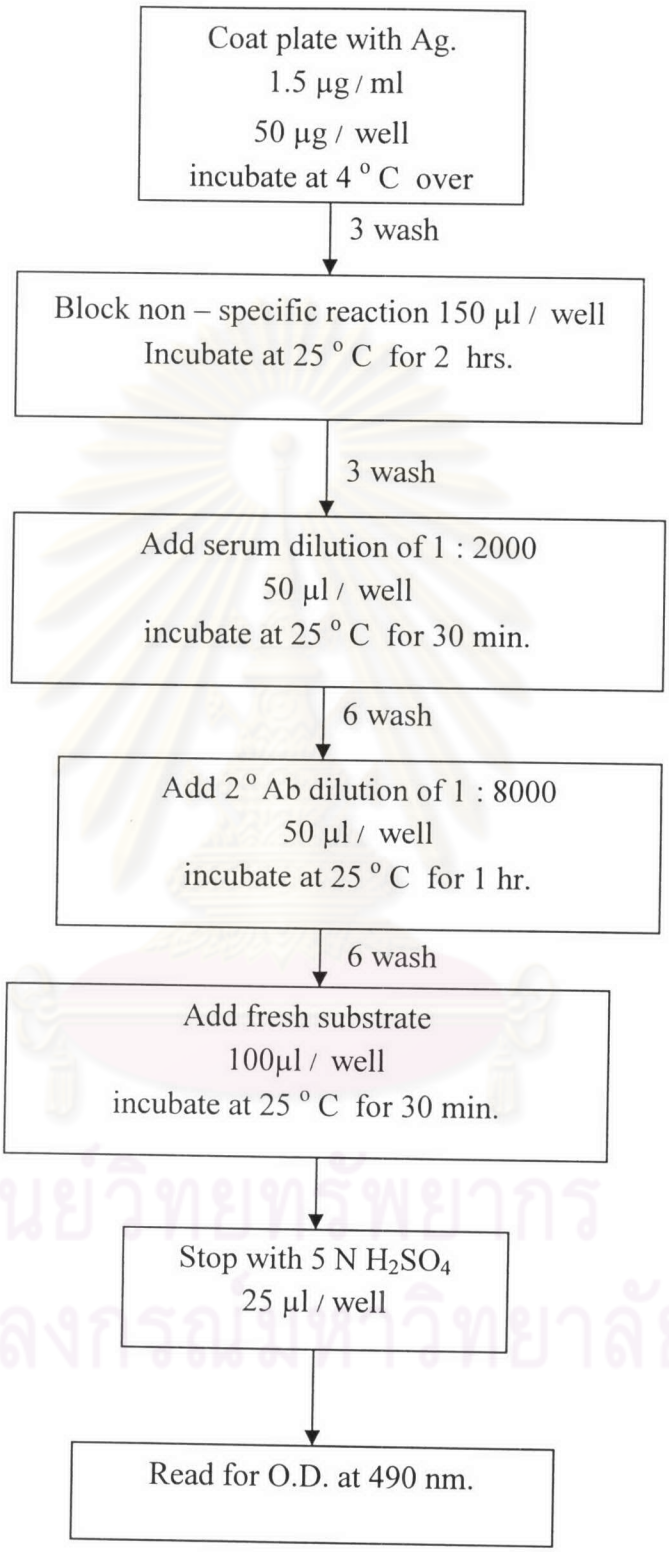
ดูด 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 5F8 ใช้ความเข้มข้น 1.2 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เป็นจำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุม ทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้าง 3 ครั้ง จากนั้นทำการ block non – specific reaction ด้วย 5 % skim milk ใน PBS 150 ไมโครลิตร / หลุม เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย washing buffer 3 ครั้งแล้วจึงใช้ซีรั่มตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1 : 4000 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร / หลุม บ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่ 25 องศาเซลเซียส ล้าง 6 ครั้ง ใช้ secondary antibody ที่ความเข้มข้น 1 : 5000 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร / หลุม บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 25 องศาเซลเซียส ล้าง 6 ครั้ง ใส่ substrate (OPD) 100 ไมโครลิตร / หลุม ทำปฏิกิริยาในที่มืดที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 5 N H_2SO_4 25 ไมโครลิตร / หลุม ทำการอ่านค่า O.D. ด้วยเครื่อง Microreader ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร แล้วบันทึกเป็นระดับแอนติบอดีของแต่ละตัวอย่างต่อไป

ดูด 200 kDa ที่สกัดโดย MAb 4B11 ใช้ความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เป็นจำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุม ทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้าง 3 ครั้ง จากนั้นทำการ block non – specific reaction ด้วย 5% skim milk ใน PBS 150 ไมโครลิตร / หลุม เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง ใช้ซีรั่มตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1 : 2000 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร / หลุม บ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่ 25 องศาเซลเซียส ล้าง 6 ครั้ง ใช้ secondary antibody ที่ความเข้มข้น 1 : 8000 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร / หลุม บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 25 องศาเซลเซียส ล้าง 6 ครั้ง ใส่ substrate 100 ไมโครลิตร / หลุม ทำปฏิกิริยาในที่มืดที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 5 N H_2SO_4 25 ไมโครลิตร / หลุม ทำการอ่านค่า O.D. ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร แล้วบันทึกเป็นระดับแอนติบอดีของแต่ละตัวอย่างต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 10 แผนผังสรุปขั้นตอนการทำ indirect ELISA โดยใช้แอนติเจนที่สกัดโดย MAb 5F8

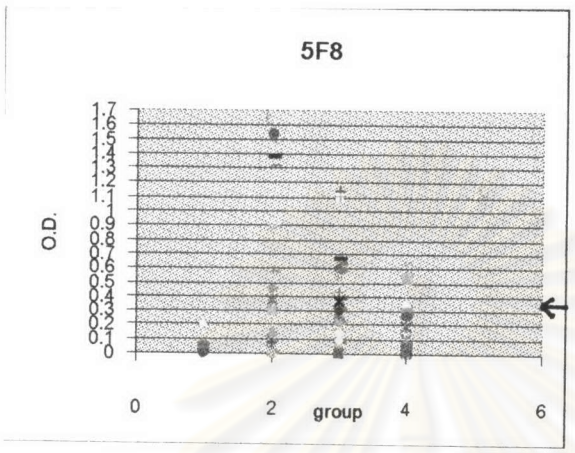


ภาพที่ 11 แผนผังสรุปขั้นตอนการทำ indirect ELISA โดยใช้แอนติเจนที่สกัดโดย MAb 4B11

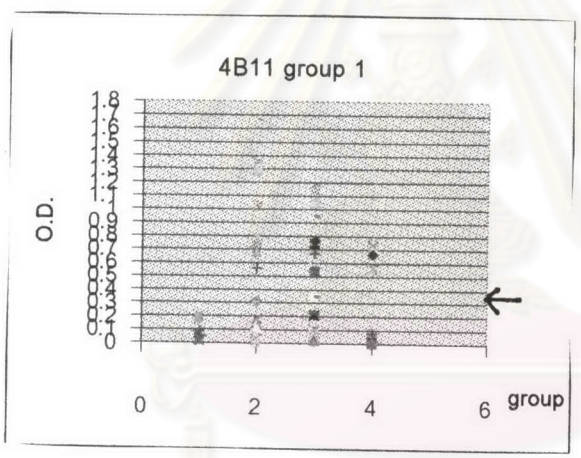
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 **การหาค่า cut off ของการทดสอบด้วยวิธี** indirect ELISA

การกำหนดค่า cut off ของการทดสอบคำนวณโดยวิธี T – test ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ผลปรากฏว่าได้ค่า cut off เท่ากับ 0.34 สำหรับ 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 5F8 และ 0.35 สำหรับ 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 4B11 (ภาพที่ 12 - 13)



Cut off ของ 5F8 - purified Ag.
ที่ O.D. 0.34



Cut off ของ 4B11 - purified Ag.
ที่ O.D. 0.35

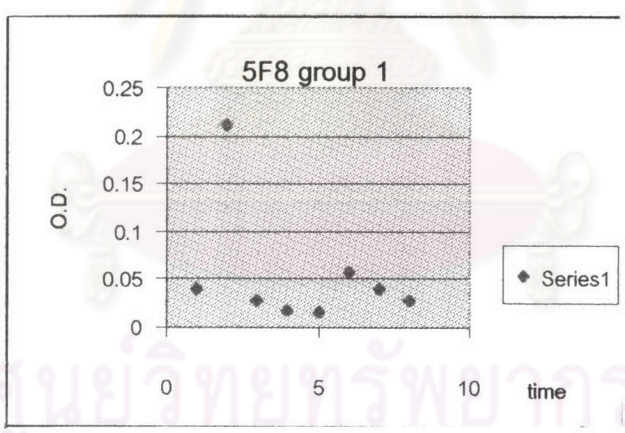
ภาพที่ 12 จุด cut off ของการวิธี indirect ELISA ซึ่งใช้ 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 5F8
ภาพที่ 13 จุด cut off ของการวิธี indirect ELISA ซึ่งใช้ 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 4B11

4.4 **การทดสอบระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในซีรั่มโลมาปากขวด**

ผลการทดสอบระดับแอนติบอดี (IgG) ต่อการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในซีรั่มโลมาปากขวดในที่เพาะเลี้ยงพบว่าโลมาปากขวดที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยทุกตัวมีระดับ IgG ต่อเชื้อ Bps ต่ำ มีเพียงโลมาตัวที่ 2 ที่มีระดับ IgG ต่อเชื้อ Bps สูงกว่าโลมาอีก 7 ตัวเล็กน้อย ทั้งจากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ที่ใช้ 200 kDa EPS ที่สกัด โดย MAb 5F8 และ 4B11 ผลดังแสดงในตารางที่ 10 และ 11 ภาพที่ 14 และ 15

ตารางที่ 10 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 5F8 ของโลมากลุ่มที่ 1 ที่เลี้ยงในประเทศไทย

โลมาตัวที่	ระดับแอนติบอดี (O.D.)
1	0.0409
2	0.2120
3	0.0285
4	0.0170
5	0.0162
6	0.0573
7	0.0400
8	0.0284

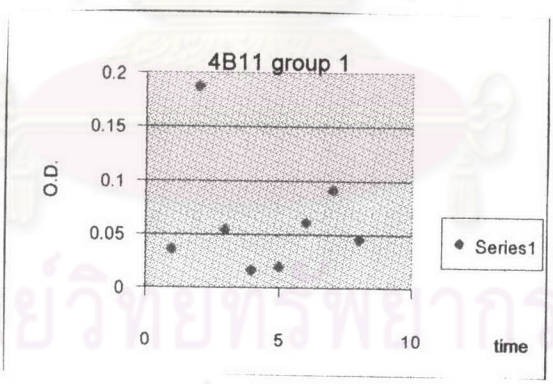


ภาพที่ 14 แสดงระดับ IgG ต่อเชื้อ B. pseudomallei ของโลมากลุ่ม 1 ที่เลี้ยงในประเทศไทยจำนวน 8 ตัว โดยใช้การทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ที่ใช้ 200 kDa EPS ที่สกัด โดย MAb 5F8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 4B11 ของโลมากลุ่มที่ 1 ที่เลี้ยงในประเทศไทย

โลมาตัวที่	ระดับแอนติบอดี (O.D.)
1	0.0359
2	0.1871
3	0.0542
4	0.0160
5	0.0192
6	0.0608
7	0.0910
8	0.0455



ภาพที่ 15 แสดงระดับ IgG ต่อเชื้อ B. pseudomallei ของโลมากลุ่ม 1 ที่เลี้ยงในประเทศไทยจำนวน 8 ตัว โดยใช้การทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ที่ใช้ 200 kDa EPS ที่สกัด โดย MAb 4B11

ส่วนโลมากลุ่มที่ 2 – 4 ที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกง เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ที่ใช้ 200 kDa EPS ที่สกัด โดย MAb 5F8 พบว่าระดับ IgG ของโลมาแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ที่ใช้ 200 kDa EPS ที่สกัด โดย

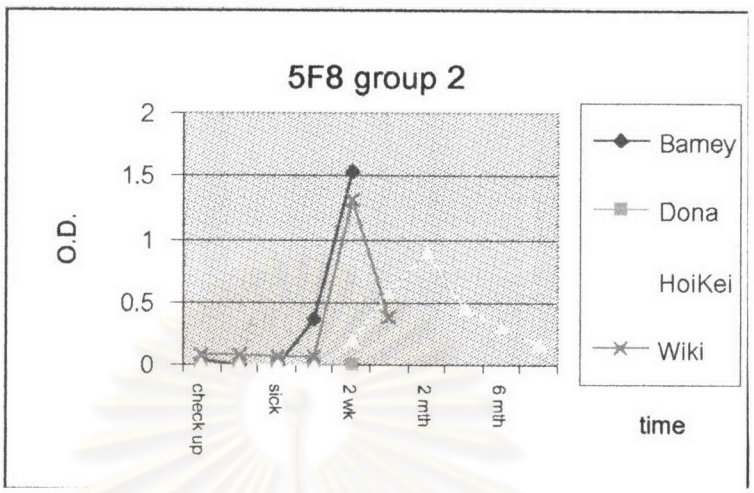
MAb 4B11 พบว่าระดับ IgG ของโลมาแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่ม 2 แตกต่างกับกลุ่ม 4 (negative healthy) และกลุ่ม 3 แตกต่างจากกลุ่ม 4 อย่างมีนัยสำคัญ

กลุ่มที่ 2 ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส มีระดับ IgG สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หลังจากแสดงอาการได้ 1 สัปดาห์ และเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ยกเว้นโลมาตัวหนึ่งที่ไม่มีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเลยตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา โลมาตัวหนึ่งที่ป่วยและรอดชีวิต มีการเพิ่มสูงขึ้นของระดับ IgG เรื่อยๆจนสูงสุดในเดือนที่ 2 หลังแสดงอาการป่วย แล้วเริ่มลดลงในเดือนที่ 3 จนต่ำลงในเดือนที่ 12 หลังแสดงอาการป่วย ผลแสดงในตารางที่ 12 และภาพที่ 15

ตารางที่ 12 แสดงระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 5F8 ของโลมากลุ่มที่ 2

ชื่อโลมา / ช่วงเวลา	Barney (adult) False Killer Whale	Dona (adult)	Hoi Kei (1 year old)	Wiki (adult)
ตรวจสุขภาพ	0.0362	0	0	0.0788
ตรวจสุขภาพ	0.0065	0	0.002	0.076
แสดงอาการป่วย	0.0038	0	0	0.0578
1สัปดาห์หลังป่วย	0.3735	0	0	0.072
2สัปดาห์หลังป่วย	1.5347	0	0.1928	1.3125
1 เดือนหลังป่วย			0.5717	1.3785
2 เดือนหลังป่วย			0.8978	
3 เดือนหลังป่วย			0.4517	
6 เดือนหลังป่วย			0.3057	
12 เดือนหลังป่วย			0.1525	

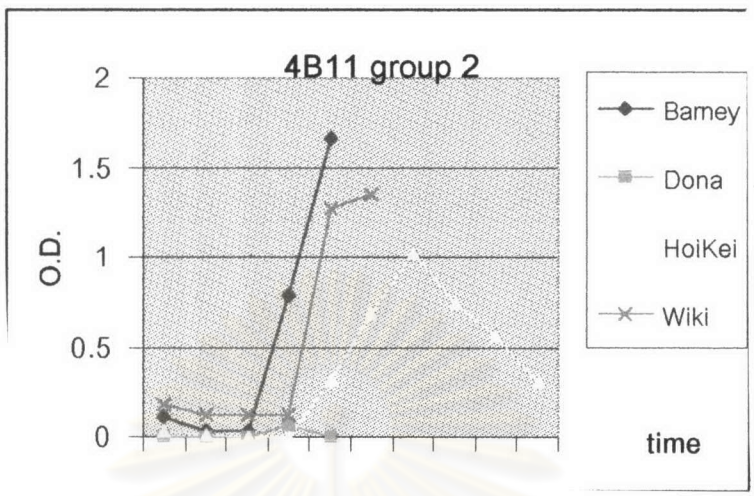
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 16 ระดับ Ab (IgG) ต่อเชื้อ Bps ของโลมาในกลุ่ม 2 ที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ทดสอบโดย 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 5F8

ตารางที่ 13 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 4B11 ของโลมากลุ่มที่ 2

ชื่อโลมา / ช่วงเวลา	Barney (adult) False killer whale	Dona (adult)	Hoi Kei (1 year old)	Wiki (adult)
ตรวจสุขภาพ	0.1074	0	0.031	0.1755
ตรวจสุขภาพ	0.0341	0	0.0123	0.1287
แสดงอาการป่วย	0.0296	0.00375	0.0047	0.1218
1สัปดาห์หลังป่วย	0.7861	0.06475 (1 วัน)	0.0017	0.1288
2สัปดาห์หลังป่วย	1.6609	0 (1 วัน)	0.3125	1.2725
1 เดือนหลังป่วย			0.6803	1.352
2 เดือนหลังป่วย			1.022	
3 เดือนหลังป่วย			0.7356	
6 เดือนหลังป่วย			0.5598	
12 เดือนหลังป่วย			0.3066	



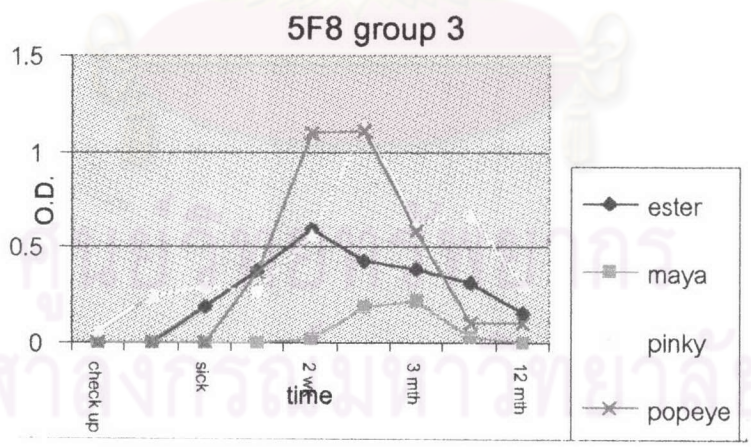
ภาพที่ 17 ระดับ Ab (IgG) ต่อเชื้อ Bps ของโลมาในกลุ่ม 2 ที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ทดสอบโดย 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 4B11

ส่วนโลมากลุ่มที่ 3 ที่สงสัยว่าป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส พบว่าระดับแอนติบอดีสูงขึ้นอย่างช้าๆและสูงขึ้นไม่มากนักซึ่งตรวจวัดด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งใช้ heat – killed bacteria เป็นวิธีที่พัฒนาโดย Ocean Park ของฮ่องกง แต่ผลการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากเลือด ช่องหายใจ และตัวอย่างชนิดอื่น ไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* การเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีของโลมาในกลุ่มนี้เป็นไปในแนวทางเดียวกัน คือ ระดับ IgG ต่อเชื้อ Bps จะเพิ่มสูงหลังแสดงอาการป่วย 1 สัปดาห์และเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วง 2 สัปดาห์ถึง 3 เดือน จากนั้นจะค่อยๆลดลงจนต่ำในเดือนที่ 12 หลังแสดงอาการป่วย ผลแสดงในตารางที่ 14 และภาพที่ 17

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 5F8 ของโลมากลุ่มที่ 3

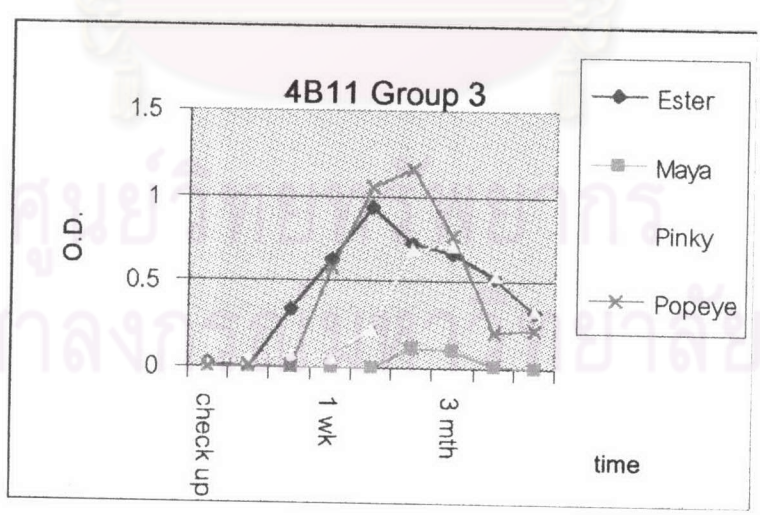
ชื่อโลมา / ระดับแอนติบอดี	Ester (adult)	Popeye (adult)	Pinky (adult)	Maya (1 year old)
ตรวจสุขภาพ	0	0	0.0625	0
ตรวจสุขภาพ	0.0003	0	0.24025	0
แสดงอาการป่วย	0.1892	0	0.29425	0
1สัปดาห์หลังป่วย	0.381	0.3658	0.27325	0
2สัปดาห์หลังป่วย	0.5945	1.1002	0.5625	0.02425
1 เดือนหลังป่วย	0.4298	1.1127	1.142	0.18525
2 เดือนหลังป่วย	0.3858	0.5882	0.6332	0.218
3 เดือนหลังป่วย	0.3155	0.1007	0.6662	0.02975
6 เดือนหลังป่วย	0.1522	0.1022	0.2997	0



ภาพที่ 18 ระดับ Ab (IgG) ต่อเชื้อ Bps ของโลมาในกลุ่ม 3 ที่สงสัยว่าป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ทดสอบโดย 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 5F8

ตารางที่ 15 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 4B11 ของโลมากลุ่มที่ 3

ชื่อโลมา / ระดับแอนติบอดี	Ester (adult)	Popeye (adult)	Pinky (adult)	Maya (1 year old)
ตรวจสุขภาพ	0.0265	0	0.007	0
ตรวจสุขภาพ	0.0018	0.0137	0.052	0
แสดงอาการป่วย	0.3342	0.002	0.0648	0
1สัปดาห์หลังป่วย	0.6382	0.585	0.058	0
2สัปดาห์หลังป่วย	0.941	1.0552	0.2198	0.0032
1 เดือนหลังป่วย	0.731	1.1568	0.6958	0.115
2 เดือนหลังป่วย	0.6688	0.7712	0.7115	0.1062
3 เดือนหลังป่วย	0.528	0.2082	0.5377	0.017
6 เดือนหลังป่วย	0.3287	0.2187	0.342	0.0007

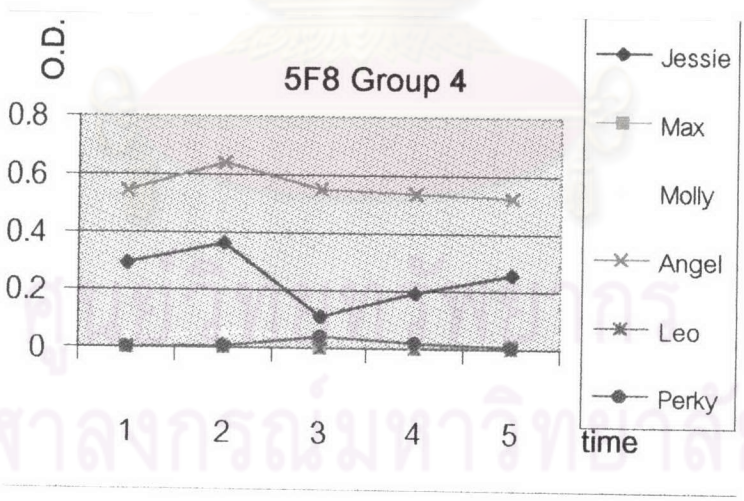


ภาพที่ 19 ระดับ Ab (IgG) ต่อเชื้อ Bps ของโลมาในกลุ่ม 3 ที่สงสัยว่าป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ทดสอบโดย 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 4B11

โลมากลุ่ม 4 ซึ่งมีสุขภาพปกติ ไม่พบการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนโลมาที่ป่วยด้วยโรคอื่น ได้แก่ โรคติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* มีระดับ IgG ต่อเชื้อ Bps ค่อนข้างสูง ขณะที่โลมาที่ป่วยด้วยโรคตับอักเสบมีระดับ IgG ต่อเชื้อ Bps ค่อนข้างต่ำ

ตารางที่ 16 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 5F8 ของโลมากลุ่มที่ 4

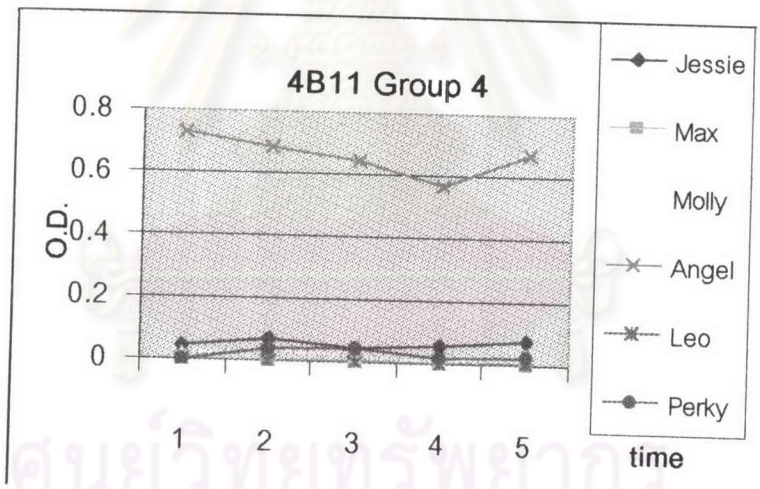
ชื่อโลมา / ระดับแอนติบอดี	Jessie (adult)	Perky (adult)	Max (1 year old)	Angel (adult)	Molly (adult)	Leo (adult)
ตรวจสุขภาพ	0.295	0	0	0.544	0.0288	0
ตรวจสุขภาพ	0.364	0.009	0	0.63775	0.0565	0
ตรวจสุขภาพ	0.111	0.0445	0.0025	0.55025	0.0347	0
ตรวจสุขภาพ	0.19225	0.01825	0	0.53875	0.0145	0.00225
ตรวจสุขภาพ	0.2605	0.00925	0.01075	0.52475	0.023	0



ภาพที่ 20 ระดับ IgG ของโลมาในกลุ่ม 4 ที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ทดสอบโดย 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 5F8

ตารางที่ 17 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 4B11 ของโลมากลุ่มที่ 4

ชื่อโลมา / ระดับแอนติบอดี	Jessie (adult)	Perky (adult)	Max (1 year old)	Angel (adult)	Molly (adult)	Leo (adult)
ตรวจสุขภาพ	0.048	0.0022	0	0.7293	0.0202	0
ตรวจสุขภาพ	0.06925	0.037	0	0.6838	0.0313	0.001
ตรวจสุขภาพ	0.0455	0.0483	0.0033	0.6443	0.022	0
ตรวจสุขภาพ	0.05625	0.0225	0.0018	0.5662	0.0087	0
ตรวจสุขภาพ	0.0775	0.0227	0.0007	0.6712	0.031	0.0035



ภาพที่ 21 ระดับ IgG ของโลมาในกลุ่ม 4 ที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ทดสอบโดย 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 4B11

เมื่อทำการคำนวณความไวของการทดสอบ (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) ค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) ผลบวกเทียม (false positive) ผลลบเทียม (false negative) ความแม่นยำ (accuracy) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 18 – 19

ตารางที่ 18 ผลการประเมินวิธี indirect ELISA โดยใช้ 200 kDa EPS ที่สกัดด้วย MAb 5F8

Culture / ELISA	positive	negative	total
Positive	19	6	25
Negative	27	48	75
Total	46	54	100

ตารางที่ 19 ผลการประเมินวิธี indirect ELISA โดยใช้ 200 kDa EPS ที่สกัดด้วย MAb 4B11

Culture / ELISA	positive	negative	total
Positive	20	5	25
Negative	26	49	75
Total	46	54	100

ตารางที่ 20 แสดงผลความไวของการทดสอบเมื่อคำนวณที่ระยะเวลาต่างๆของโลมากลุ่มที่ 2 และ 3

	5F8		4B11	
Time	Group 2 positive	Group 3 suspect	Group 2 positive	Group 3 suspect
Sick	0 / 4 (0 %)	0 / 4 (0 %)	0 / 4	0 / 4
1 wk. later	1 / 4 (25 %)	2 / 4 (50 %)	1 / 4	2 / 4
2 wk. later	2 / 4 (50 %)	3 / 4 (75%)	2 / 4	3 / 4
1 mth. Later	3 / 4 (75 %)	3 / 4 (75%)	3 / 4	3 / 4

ตาราง 21 แสดงผลการประเมินวิธี indirect ELISA โดยเปรียบเทียบระหว่าง MAb 2 ชนิด

Assessment	5F8	4B11
Cut – off value	0.34	0.35
Sensitivity	41.30	43.48
Specificity	88.89	90.74
Positive predictive value	76.00	80.00
Negative predictive value	64.00	65.33
False positive	11.11	9.26
False negative	58.69	56.52
Accuracy	67.00	69.00

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย