การประยุกต์ใช้เทคนิค indirect ELISA ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส ในโลมาปากขวด (*Tursiops truncatus*)

นางสาว จริยา สุตานนท์ไพบูลย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา โรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN : 974 – 17 – 5375 - 6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

APPLICATION OF INDIRECT ELISA TECHNIC FOR DIAGNOSIS OF MELIOIDOSIS IN BOTTLENOSE DOLPHINS (*Tursiops truncatus*)

Miss Jariya Sutanonpaiboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Aquatic Animal Disease
Department of Veterinary Medicine
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic year 2003
ISBN : 974 – 17 – 5375 - 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประยุกต์ใช้เทคนิค indirect ELISA ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโด ซิสในโลมาปากขวด (*Tursiops truncatus*)
โดย	จริยา สุตานนท์ไพบูลย์
สาขาวิชา	โรคสัตว์น้ำ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันซื่อ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์ เกียรติคุณ ดร.สถิตย์ สิริสิงห นางนริศรา จันทราทิตย์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันซื่อ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ศาสตราจารย์ เกียรติคุณ ดร. สถิตย์ สิริสิงห)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(นริศรา จันทราทิตย์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง รัตนาภรณ์ พรหมาสา)

จริยา สุตานนท์ไพบูลย์ : การประยุกต์ใช้เทคนิค indirect ELISA ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในโลมาปากขวด (*Tursiops truncatus*). (APPLICATION OF INDIRECT ELISA TECHNIC FOR DIAGNOSIS OF MELIOIDOSIS IN BOTTLENOSE DOLPHINS (*Tursiops truncatus*).) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.สพ.ญ.ดร. นันทริกา ชันซื่อ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ศ.เกียรติคุณ ดร. สถิต สิริสิงห ; นริศรา จันทราทิตย์ ; จำนวน 62 หน้า. ISBN : 974 – 17 – 5375 - 6

การทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่แยกได้จากเลือดผู้ป่วยในประเทศไทย และเลือดโลมาปากขวดที่ป่วยในเกาะฮ่องกง เพื่อนำเทคนิค indirect ELISA ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในมนุษย์ นำมาประยุกต์ใช้ในโลมาปากขวด สิ่งที่ศึกษา ได้แก่คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อโดยใช้ API 20NE พบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและโลมามีคุณสมบัติเหมือนกัน ผลการศึกษาองค์ประกอบโปรตีนของเชื้อด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเชื้อทั้งสองมีองค์ประกอบโปรตีนเหมือนกัน ผลการศึกษาการมี 200 kDa Exopolysaccharide (EPS) ของเชื้อด้วยวิธี Western blot พบว่าเชื้อทั้งสองมี 200 kDa EPS เหมือนกัน เมื่อทำการสกัดแยก200 kDa EPS ด้วยวิธี Affinity purified chromatography โดยใช้ MAb 5F8 เปรียบเทียบกับ MAb 4B11 แล้วนำมาประยุกต์ใช้วิธี indirect ELISA เพื่อวัดระดับ IgG พบว่าการใช้แอนติเจนที่สกัดโดย MAb ทั้ง 2 ชนิดให้ผลเหมือนกันคือ มี sensitivity ที่ดีที่สุดเท่ากับ 75% ที่เวลา 1 เดือนหลังโลมาแสดงอาการป่วยในโลมากลุ่ม positive และ 75% ที่เวลา 2 สัปดาห์หลังโลมาแสดงอาการป่วยในโลมากลุ่ม suspected ส่วน specificity เท่ากับ 88.89 และ 90.74 ตามลำดับ วิธีนี้เหมาะที่จะใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสร่วมกับวิธีอื่นๆและใช้ในการเฝ้าระวังการเกิดโรคในพื้นที่ที่มีการระบาด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาอายุรศาสตร์
สาขา โรคสัตว์น้ำ
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....จริยา สุตานนท์ไพบูลย์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4475578331 : MAJOR AQUATIC ANIMAL DISEASES

KEY WORDS : MELIOIDOSIS, BOTTLENOSE DOLPHIN, INDIRECT ELISA, *Burkholderia pseudomallei, Tursiops truncatus*

JARIYA SUTANONPAIBOON : APPLICATION OF INDIRECT ELISA TECHNIC FOR DIAGNOSIS OF MELIOIDOSIS IN BOTTLENOSE DOLPHINS (*Tursiops truncatus*). THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.NANTARIKA CHANSUE, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : PROF.,STITAYA SIRISINHA, Ph.D. NARISARA CHANTRATITA. 62 pp. ISBN : 974 – 17 – 5375 - 6

This experiment was to compare the many characteristics of 2 isolates of *Burkholderia pseudomallei* from human and bottlenose dolphin. Biochemical characteristics were performed by API 20 NE showing similar results in human and dolphin. Protein characteristics were performed by SDS-PAGE which also showed similar results. 200kDa Exopolysaccharide, the specific antigen, were studied by Western blot with both isolates showing this antigen then it was purified by affinity chromatography for indirect ELISA applications. Two MAb, 5F8 and 4B11, were used to purify this antigen. The results of antibody titer (IgG) were measured. The best sensitivity of both MAb-purified antigen were 75% when detected at 1 month after becoming sick in the positive group and 2 weeks after becoming sick in the suspected group. Specificity were 88.89 and 90.74 respectively. This method combined with other methods will be appropriate as diagnostic tool of melioidosis and useful for monitoring in endemic area.

Department of Veterinary Medicine
Field of study Aquatic Animal Diseases
Academic year 2003

Student's signature.....Jariya Sutanonpaiboon
Advisor's signature.....Nantarika Chansue
Co-advisor's signature.....Narisara
Co-advisor's signature.....Stitaya Sirisinha

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รศ.สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันซื่อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร. สถิต สิริสิงห และ นางนริศรา จันทราทิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้สอนและชี้แนะแนวทางในการทำงานวิจัยชิ้นนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร.วนพร วุฒิเอกอนันต์ Dr. Reimi Kinoshita, Lawman Law, Hui Suk Wai ที่กรุณาให้ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโรคเมลิออยโดซิสในโลมาที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกง และช่วยเป็นธุระในการจัดส่งตัวอย่างสำหรับการวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ ที่อนุญาตให้ร่วมใช้ห้องปฏิบัติการและให้คำแนะนำ คุณกรแก้ว ลิ้มโพธิ์สุวรรณ ที่ช่วยดูแลตลอดระยะเวลาการทดลอง คุณวันเพ็ญ วรรณปะโพธิ์ คุณสุธีรา อาจเจริญ คุณพีรยา เอกจริยาวัฒน์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาในการทดลอง

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุกๆด้าน

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณ บิดา มารดา ผู้ซึ่งให้โอกาสในการศึกษาต่อและให้กำลังใจตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ญ
บทที่ 1 บทนำ.....1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร.....4
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการ.....12
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....21
บทที่ 5 วิจารณ์ สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....47
รายการอ้างอิง.....54
ภาคผนวก.....58
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงการจัดกลุ่มโลมาปากขวดที่ใช้ในการศึกษา 13
ตารางที่ 2 แสดงค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือดของโลมาปากขวดที่เลี้ยงในประเทศไทยตัวที่ 1 ถึง 4 21
ตารางที่ 3 แสดงค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือดของโลมาปากขวดที่เลี้ยงในประเทศไทยตัวที่ 5 ถึง 8 22
ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ Bps ที่แยกได้จากผู้ป่วยและโลมาปากขวด 24
ตารางที่ 5 แสดงระยะทางการเคลื่อนที่และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน 25
ตารางที่ 6 แสดงผลการแยกโปรตีนของ crude antigen ด้วยวิธี SDS – PAGE 25
ตารางที่ 7 แสดงผลการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต 28
ตารางที่ 8 แสดงค่า O.D. ในการศึกษา Ag ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Ag ที่สกัดโดย MAb 5F8 30
ตารางที่ 9 แสดงค่า O.D. ในการศึกษา Ag ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Ag ที่สกัดโดย MAb 4B11 31
ตารางที่ 10 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 5F8 ของโลมากลุ่มที่ 1 36
ตารางที่ 11 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 4B11 ของโลมากลุ่มที่ 1 37
ตารางที่ 12 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 5F8 ของโลมากลุ่มที่ 2 38
ตารางที่ 13 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 4B11 ของโลมากลุ่มที่ 2 39
ตารางที่ 14 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 5F8 ของโลมากลุ่มที่ 3 41
ตารางที่ 15 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่สกัดโดย MAb 4B11 ของโลมากลุ่มที่ 3 42
ตารางที่ 16 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่สกัด

โดย MAb 5F8 ของโลมากลุ่มที่ 4 43
ตารางที่ 17 ระดับแอนติบอดีต่อ 200 kDa EPS ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่สกัด
โดย MAb 4B11 ของโลมากลุ่มที่ 4 44
ตารางที่ 18 ผลการประเมินวิธี indirect ELISA โดยใช้ 200 kDa EPS ที่สกัดด้วย MAb 5F8 45
ตารางที่ 19 ผลการประเมินวิธี indirect ELISA โดยใช้ 200 kDa EPS ที่สกัดด้วย MAb 4B11 45
ตารางที่ 20 แสดงผลความไวของการทดสอบเมื่อคำนวณที่ระยะเวลาต่างๆของโลมา
กลุ่มที่ 2 และ 3 45
ตารางที่ 21 แสดงผลการประเมินวิธี indirect ELISA โดยเปรียบเทียบระหว่างการ
ใช้แอนติเจนที่สกัดโดย MAb 2 ชนิด 46

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงผลการแยกแอนติเจนของเชื้อ *B.pseudomallei* ด้วยวิธี SDS – PAGE 26
ภาพที่ 2 ผลการศึกษาการมี 200 kDa EPS ด้วยวิธี Western blot 26
ภาพที่ 3 แสดงผลการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง crude antigen กับซีรั่มโลมาปากขวด 27
ภาพที่ 4 แสดงผลการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง crude antigen กับซีรั่มโลมาปากขวด เมื่อย้อมด้วย DAB 27
ภาพที่ 5 แสดงค่า O.D. ของค่า standard glucose ซึ่งใช้ในการเปรียบเทียบหา ความเข้มข้นของ 200 kDa EPS 28
ภาพที่ 6 แสดงผลการย้อมแอนติเจนที่สกัดได้ด้วยสี Silver stain 29
ภาพที่ 7 แสดงผลการย้อมแอนติเจนที่สกัดได้ด้วยสี Comassie blue 29
ภาพที่ 8 แสดงผลในการศึกษา Ag ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Ag ที่สกัดโดย MAb 5F8 30
ภาพที่ 9 แสดงผลในการศึกษา Ag ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Ag ที่สกัดโดย MAb 4B11 31
ภาพที่ 10 สรุปขั้นตอนการทำ indirect ELISA โดยใช้แอนติเจนที่สกัดโดย MAb 5F8 33
ภาพที่ 11 สรุปขั้นตอนการทำ indirect ELISA โดยใช้แอนติเจนที่สกัดโดย MAb 4B11 34
ภาพที่ 12 จุด cut off ของวิธี indirect ELISA ซึ่งใช้ 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 5F8 35
ภาพที่ 13 จุด cut off ของวิธี indirect ELISA ซึ่งใช้ 200 kDa EPS ที่สกัดโดย MAb 4B11 35
ภาพที่ 14 แสดงระดับ IgG ต่อเชื้อ *B.pseudomallei* ของโลมากลุ่มที่ 1 โดย ใช้แอนติเจนที่สกัดโดย MAb 5F8 36
ภาพที่ 15 แสดงระดับ IgG ต่อเชื้อ *B.pseudomallei* ของโลมากลุ่มที่ 1 โดย ใช้แอนติเจนที่สกัดโดย MAb 4B11 37
ภาพที่ 16 แสดงระดับ IgG ต่อเชื้อ *B.pseudomallei* ของโลมาในกลุ่มที่ 2 โดยใช้แอนติเจน ที่สกัดโดย MAb 5F8 39
ภาพที่ 17 แสดงระดับ IgG ต่อเชื้อ *B.pseudomallei* ของโลมาในกลุ่มที่ 2 โดยใช้แอนติเจน ที่สกัดโดย MAb 4B11 40
ภาพที่ 18 แสดงระดับ IgG ต่อเชื้อ *B.pseudomallei* ของโลมาในกลุ่มที่ 3 โดยใช้แอนติเจน ที่สกัดโดย MAb 5F8 41
ภาพที่ 19 แสดงระดับ IgG ต่อเชื้อ *B.pseudomallei* ของโลมาในกลุ่มที่ 3 โดยใช้แอนติเจน ที่สกัดโดย MAb 4B11 42

ภาพที่ 20 แสดงระดับ IgG ต่อเชื้อ *B.pseudomallei* ของโลมาในกลุ่มที่ 4 โดยใช้แอนติเจนที่สกัดโดย MAb 5F8 43

ภาพที่ 21 แสดงระดับ IgG ต่อเชื้อ *B.pseudomallei* ของโลมาในกลุ่มที่ 4 โดยใช้แอนติเจนที่สกัดโดย MAb 4B11 44

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย