บทที่ 1
บทนำ

แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน

โรคเมลิออยโดซิสเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* พบในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน (subtropical) โดยเฉพาะเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และทางเหนือของทวีปออสเตรเลีย (Dance, 2000) เคยมีรายงานการเกิดโรคในเม็กซิโก ปาปัวนิวกินี อเมริกาใต้ (Jones *et al.*, 1996) ปานามา เอกวาดอร์ ไฮติ บราซิล เปรู กายานา รัฐฮาวาย และมลรัฐจอร์เจียในประเทศสหรัฐอเมริกา (Thummakul *et al.*,1999) เชื้อนี้สามารถก่อโรคในมนุษย์และสัตว์หลายชนิดทั้งปศุสัตว์ เช่น แพะ (Chethanond, 2000) แกะ สุกร อูฐ (Short, 2002) วัว (Currie *et al.*, 2000) ม้า ฟ้อ (Li *et al.*, 1994) สัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข แมว (Choy *et al.*, 2000) สัตว์ทดลอง เช่น หนูrat หนูmice หนู hamster สัตว์ป่า เช่น ลิง กวาง (Dance, 2000) สัตว์ที่มีกระเป๋าหน้าท้อง (marsupial) ได้แก่ จิงโจ้ (Choy *et al.*, 2000) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่อยู่ในทะเล เช่น วาฬเพชรฆาต (killer whale) วาฬเพชรฆาตเทียม (false killer whale) โลมาปากขวด (bottlenose dolphin) โลมาPacific white - side สิงโตทะเลแคลิฟอร์เนีย แมวน้ำสีเทา (grey seal) (Hicks *et al.*, 2000) สัตว์เลื้อยคลาน เช่น งู จระเข้ (Choy *et al.*, 2000) สัตว์ปีก เช่น นกแก้ว นกคอกคาเทล นกกระตั้ว (Thomas,1987) ส่วนในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคเมลิออยโดซิสในสัตว์หลายชนิดในหลายภูมิภาค ได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ สุกร กวางซีก้า ลิงชิมแพนซี เป็นต้น (กรมปศุสัตว์, 2544)

อัตราการเกิดโรคเมลิออยโดซิสในประชากรไทยสูงประมาณ2000 - 3000 ราย / ปี (Leelarasamee, 2000) โดยมีอัตราการตายในกรณีเกิดโลหิตเป็นพิษเฉียบพลันสูงถึง 70 - 80 % แม้จะทำการวินิจฉัยและรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในทันทีแต่อัตราการตายยังคงสูงอยู่ วิธีวินิจฉัยมาตรฐาน (gold standard) คือการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 - 4 วัน ในการยืนยันผล ขณะที่ผู้ป่วยภาวะโลหิตเป็นพิษเฉียบพลันจะเสียชีวิตภายใน 24 - 48 ชั่วโมงภายหลังการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล (Sirisinha *et al.*, 2000) ดังนั้นการวินิจฉัยอย่างรวดเร็วและแม่นยำจึงมีความสำคัญมาก เนื่องจากโรคนี้มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง ก่อโรครุนแรง และดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น aminoglycoside, first และ second generation cephalosporin, ß - lactam, polymyxin และ macrolide ส่วนยาที่ใช้ได้ผลคือ third และ fourth generation cephalosporin ได้แก่ ceftazidime, ceftriaxone และ cefotaxime ยากลุ่ม imipenem, meropenem, piperacillin, amoxicillin - clavulonic acid, ticarcillin - clavulonic acid, tetracycline, doxycycline, azlocillin, aztreonam, sulfamethoxazole - trimethoprim โดยต้องรักษานาน 12 - 20 สัปดาห์ (Chaowagul, 2000 ; Short, 2002)

จากที่โรคเมลิออยโดซิสเป็นปัญหาสำคัญในทางสาธารณสุขของประเทศไทย จึงมีการศึกษาพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคนี้หลายวิธี เช่น วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา คือ การตรวจหา antigen ชนิดต่างๆ หรือ การตรวจหา antibody วิธีทางอณูชีวโมเลกุล คือ การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ เป็นต้น แต่ละวิธีมีข้อจำกัดแตกต่างกัน ทั้งในด้านความไวและความจำเพาะ เครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่จำเป็น ทักษะและประสบการณ์ของผู้ทำการตรวจ เป็นต้น การวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส อย่างรวดเร็วและแม่นยำมีความสำคัญมากต่อการรักษาและการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม การวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เป็นวิธีที่นิยมและมีการพัฒนาอยู่ตลอดเวลา โดยเฉพาะในทางการแพทย์ เนื่องจากวิธีเหล่านี้สามารถใช้วินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสได้อย่างรวดเร็วในเบื้องต้น ซึ่งมีทั้งวิธีตรวจหา antigen และ antibody การตรวจหา antigen มีข้อดีคือเป็นการบ่งชี้ถึงการติดเชื้อ ณ เวลานั้น แต่มีข้อด้อยคือผลการตรวจขึ้นกับช่วงเวลาที่มี antigen ในกระแสเลือดและการขับเชื้อออกมาในสิ่งคัดหลั่งต่างๆ ทำให้มีโอกาสเกิด false negative สูง ส่วนการตรวจหาระดับ antibody มีข้อดีคือ บ่งบอกถึงการสัมผัสเชื้อจริงๆในอดีต วิธีตรวจทำได้ง่าย ราคาไม่สูงนัก ไม่จำเป็นต้องใช้ทักษะหรือประสบการณ์สูงมากในการทำและการแปลผล แต่มีข้อด้อยในกรณีที่ผู้ป่วยที่เคย สัมผัสเชื้อมาก่อน (subclinical) เช่นในประชากรในถิ่นระบาดของโรค (endemic area) จะมีระดับ antibody ขึ้นสูงอยู่เป็นเวลานาน คือมีโอกาสเกิด false positive สูง นอกจากนี้จากการแยกเชื้อจากดินในประเทศไทยพบเชื้อ *Burkholderia sp.* 2 สายพันธุ์ (biotype) ซึ่งลักษณะ (morphology) และความสามารถในการเป็นแอนติเจน (antigenicity) คล้ายกัน ต่างกันเพียงความสามารถในการใช้ L - arabinose ซึ่งพบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ใช้ L - arabinose ได้ (Ara^+) ซึ่งยอมรับกันในชื่อ *B. thailandensis* (Bt) จะไม่ก่อโรค (non virulent) ส่วนเชื้อสายพันธุ์ที่ใช้ L - arabinose ไม่ได้ (Ara^-) คือ *B. pseudomallei* (Bps) จะก่อโรคเมลิออยโดซิสในคนและสัตว์ได้ (virulent) (Wuthiekanun *et al.*, 1996) ดังนั้นวิธีตรวจที่เหมาะสมควรตรวจวัดระดับ antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อโรค ซึ่งจำเป็นต้องใช้แอนติเจนที่จำเพาะจริงๆเท่านั้น

โลมาที่มีการเลี้ยงในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ โลมาปากขวด (bottlenose dolphin ; *Tursiops truncatus* ซึ่งมี 2 สายพันธุ์ย่อยคือ *T. truncatus aduncus* และ *T. truncatus gilli*) โลมาอิระวดี หรือ โลมาหัวบาตร (Irrawaddy dolphin ; *Orcaella brevirostris*) และ โลมาเผือก หรือโลมาหลังค่อม (Indo - Pacific humpback dolphin ; *Sousa chinensis*) ซึ่งสัตว์ประเภทนี้มีมูลค่าสูง และมีความสำคัญในเชิงอนุรักษ์ จากรายงานการเกิดโรคเมลิออยโดซิสในโลมา ซึ่งเป็นโลมาปากขวดชนิดเดียวกับที่มีในประเทศไทย (*Tursiops truncatus aduncus*) โดย Hicks และคณะ (2000) พบว่าโลมาเป็นสัตว์ที่ไวต่อโรคนี้มากและมีอัตราการตายสูง ส่วนมากเกิดภาวะโลหิตเป็นพิษแบบเฉียบพลัน จะแสดงอาการเบื่ออาหาร มีไข้ อ่อนแรง และตายหลังแสดงอาการประมาณ 4 วัน เมื่อผ่าซากจะพบ

รอยโรคที่อวัยวะเป้าหมาย คือ เกิดฝีที่ปอด ม้าม ตับ เป็นหลัก และพบการบวมโต (swelling) บวมน้ำ (edema) มีจุดเลือดออก (petechial and ecchymotic hemorrhage) และจุดเนื้อตาย (focal necrosis) แต่ไม่พบการเกิด granuloma แบบที่พบในโรควัณโรค (tuberculosis) บางครั้งเกิดโรคแบบเรื้อรัง โลมาที่เป็นโรคจะแสดงอาการกินอาหารลดลงเป็นเวลา 5 เดือน น้ำหนักลดลง ขยับตัวลำบาก เนื่องจากเกิดฝีและมีการลอกหลุด (erosion) ของ dorsal spinous process ที่กระดูกสันหลังส่วนอก (T_{10-11}) และเกิด osteomyelitis ที่กระดูกสันหลังส่วนสะโพก

โลมาปากขวด (*Tursiops truncatus aduncus*) เป็นสัตว์ที่มีมูลค่าสูงและมีคุณค่าในเชิงอนุรักษ์และปัจจุบันบรรจุในบัญชี CITES Appendix II (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) โลมาปากขวดเป็นสัตว์ที่มีความไวต่อการเกิดโรคเมลิออยโดซิส โดยแสดงอาการได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง จะพบโรคนี้มากในช่วงฤดูฝน และมีอัตราการตายสูงมาก การเกิดโรคเป็นปัญหาสำคัญของโลมาในที่เพาะเลี้ยงของเกาะฮ่องกงประเทศจีน (Hicks *et al.*, 2000, Kinoshita, personal communication) ส่วนในประเทศไทย ยังไม่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับโรคเมลิออยโดซิสในโลมา ขณะที่มีอุบัติการณ์การเกิดโรคนี้มีสูงในมนุษย์ การวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในโลมาใช้วิธีเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งใช้เวลานานกว่าจะทราบผล จึงอาจทำให้โลมาเสียชีวิตก่อนได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการประยุกต์ใช้วิธี indirect ELISA ซึ่งใช้ 200-kDa EPS ซึ่งเป็นแอนติเจนที่จำเพาะและพบเฉพาะในเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่ก่อโรค (Ara^-) ในการตรวจวัดระดับ antibody ที่จำเพาะ โดยศึกษาเปรียบเทียบการใช้ MAb 5F8 และ 4B11 ในการสกัด 200-kDa EPS เนื่องจาก MAb ทั้ง 2 ต่างจำเพาะต่อ 200-kDa EPS แต่ MAb 5F8 ผลิต IgM และมีการใช้ในการทำ ELISA ที่มีการพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้วินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในมนุษย์ และพบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง เพื่อการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในโลมาปากขวด ขณะที่ MAb 4B11 ซึ่งผลิต IgG_2 และยังไม่เคยใช้ในการทำ ELISA มาก่อนแต่ให้ผลจำเพาะสูงในการศึกษาด้วย Immunoblot analysis (Anuntagool and Sirisinha, 2002) จึงน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการใช้แอนติเจนที่สกัดจาก MAb ทั้ง 2 ชนิดในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในโลมาปากขวดด้วยวิธี indirect ELISA และเพื่อเป็นการศึกษาในเชิงระบาดวิทยา เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการศึกษาเกี่ยวกับโรคเมลิออยโดซิสในโลมาชนิดอื่น และสามารถพัฒนาวิธีการนี้ไปประยุกต์ ใช้กับสัตว์ชนิดอื่นต่อไปในอนาคต