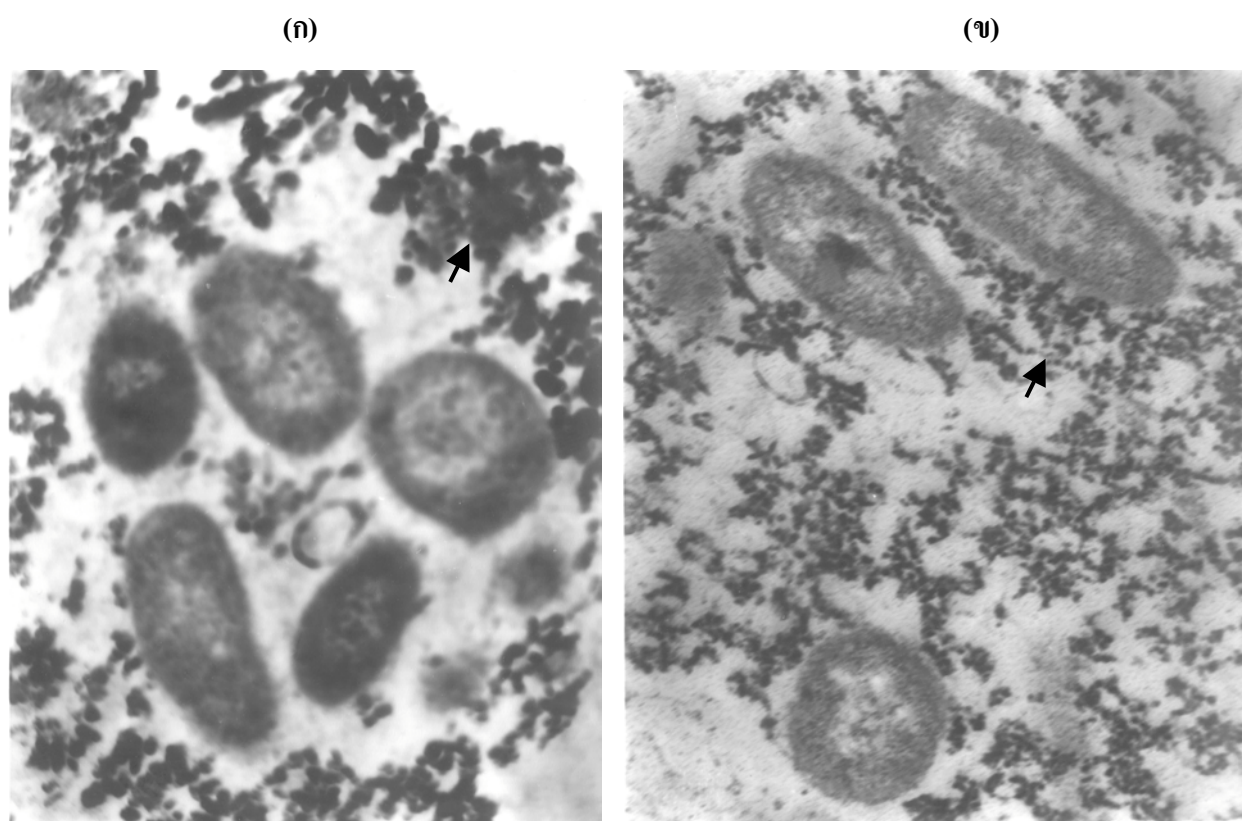
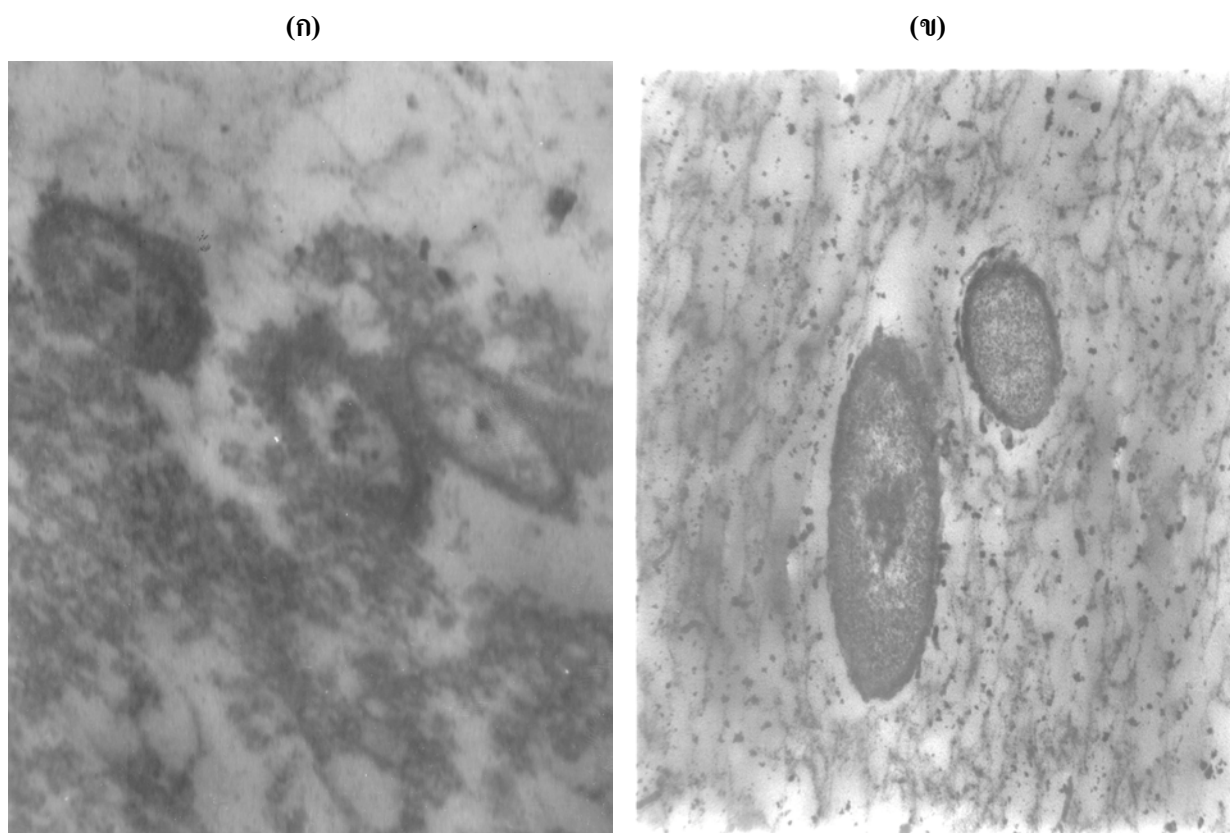


ส่วนเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara^+ strains E287 และ E261 เมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth (รูปที่ 9) พบ intercellular slime matrix บ้างแต่ไม่หนาแน่นเมื่อเปรียบเทียบกับ intercellular slime matrix ของเชื้อชนิด Ara^- strains G207 และ A2 ที่เพาะเลี้ยงใน MVBM อย่างไรก็ตามปริมาณ intercellular slime matrix ของเชื้อชนิด Ara^+ ทั้ง 2 strains (E287 และ E261) เมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth ก็ยังมีมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI broth (รูปที่ 7) ซึ่งเป็นการสนับสนุนผลการวิเคราะห์ที่วัดปริมาณไบโอฟิล์มดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 และตารางที่ 2 ที่แสดงว่าเชื้อชนิด Ara^+ ก็สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้



รูปที่ 8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara^- เมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM (ก) strain G207 (ข) strain A2 พบลักษณะการรวมกลุ่มกันเป็น microcolonies โดยมี intercellular slime matrix (ลูกศร) มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI (รูปที่ 6) นอกจากนี้ intercellular slime matrix ของเชื้อ strain G207 ยังเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนที่มีขนาดใหญ่กว่า intercellular slime matrix ของเชื้อ strain A2 (กำลังขยาย $\times 40,000$)



รูปที่ 9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara^+ เมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM (ก) strain E287 (ข) strain E261 พบ intercellular slime matrix บ้างแต่ไม่หนาแน่นเมื่อเปรียบเทียบกับ intercellular slime matrix ของเชื้อชนิด Ara^- strains G207 และ A2 ที่เพาะเลี้ยงใน MVBM (กำลังขยาย $\times 40,000$)

การเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุดและน้อยที่สุดในหนูทดลอง

ข้อมูลซึ่งแสดงจำนวนหนูที่ตายและวิธีการคำนวณค่า LD_{50} ของเชื้อ *B. pseudomallei* strains G207, A2, E287 และ E261 โดยใช้ Reed-Muench Formula แสดงในตารางที่ 3-6

ตารางที่ 3 ข้อมูลซึ่งใช้ในการคำนวณค่า LD_{50} ของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด (strain G207) โดยวิธี Reed-Muench Formula

Bacterial Dilution	Mortality Ratio	Died	Survived	Cumulated survival values			
				Died	Survived	Mortality	
						Ratio	Percent
3^5	5/5	5	0	15	0	15/15	100
3^4	5/5	5	0	10	0	10/10	100
3^3	3/5	3	2	5	2	5/7	71
3^2	2/5	2	3	2	5	2/7	28
3^1	0/5	0	5	0	10	0/10	0

การคำนวณค่า LD_{50} ของเชื้อ *B. pseudomallei* strain G207

Proportionate distance = $\frac{(\% \text{ mortality at dilution next above } 50\%) - (50\%)}{(\% \text{ mortality at dilution next above } 50\%) - (\% \text{ mortality at dilution next below})}$

$$= \frac{(71 - 50)}{(71 - 28)} = 0.49$$

Negative logarithm of LD_{50} end point titer = negative logarithm of the dilution above the 50% mortality plus the proportionate distance factor (corrected for dilution series used)

Negative logarithm of the lower dilution (next above 50% mortality) = 3.0

Proportionate distance (0.49) x dilution factor (log of 3.0) = $-(0.49 \times 0.5)$

$\log_3 LD_{50}$ titer = $3 - 0.245 = 2.755$

LD_{50} titer = $3^{2.76}$

= 20.74 CFU

ตารางที่ 4 ข้อมูลซึ่งใช้ในการคำนวณค่า LD₅₀ ของเชื้อ Ara⁻ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด (strain A2) โดยวิธี Reed-Muench Formula

Bacterial Dilution	Mortality Ratio	Died	Survived	Cumulated survival values			
				Died	Survived	Mortality	
						Ratio	Percent
3 ⁶	5/5	5	0	21	0	21/21	100
3 ⁵	5/5	5	0	16	0	16/16	100
3 ⁴	4/5	4	1	11	1	11/12	92
3 ³	5/5	5	0	7	1	7/8	88
3 ²	2/5	2	3	2	4	2/6	33

การคำนวณค่า LD₅₀ ของเชื้อ *B. pseudomallei* strain A2

$$\begin{aligned} \text{Proportionate distance} &= \frac{(\% \text{ mortality at dilution next above } 50\%) - (50\%)}{(\% \text{ mortality at dilution next above } 50\%) - (\% \text{ mortality at dilution next below})} \\ &= (88 - 50) / (88 - 33) = 0.69 \end{aligned}$$

Negative logarithm of LD₅₀ end point titer = negative logarithm of the dilution above the 50% mortality plus the proportionate distance factor (corrected for dilution series used)

Negative logarithm of the lower dilution (next above 50% mortality) = 3.0

Proportionate distance (0.69) x dilution factor (log of 3.0) = -(0.69 x 0.5)

Log₃ LD₅₀ titer = 3 - 0.345 = 2.655

LD₅₀ titer = 3^{2.66}

= 18.58 CFU

ตารางที่ 5 ข้อมูลซึ่งใช้ในการคำนวณค่า LD₅₀ ของเชื้อ Ara⁺ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด (strain E287) โดยวิธี Reed-Muench Formula

Bacterial Dilution	Mortality Ratio	Died	Survived	Cumulated survival values			
				Died	Survived	Mortality	
						Ratio	Percent
10 ⁸	4/4	4	0	11	0	11/11	100
10 ⁷	3/8	3	5	7	5	7/12	58.33
10 ⁶	4/8	4	4	4	9	4/13	30.77
10 ⁵	0/5	0	5	0	14	0/14	0
10 ⁴	0/5	0	5	0	19	0/19	0

การคำนวณค่า LD₅₀ ของเชื้อ *B. pseudomallei* strain E287

$$\begin{aligned} \text{Proportionate distance} &= \frac{(\% \text{ mortality at dilution next above } 50\%) - (50\%)}{(\% \text{ mortality at dilution next above } 50\%) - (\% \text{ mortality at dilution next below})} \\ &= (58.33 - 50) / (58.33 - 30.77) = 0.3 \end{aligned}$$

Negative logarithm of LD₅₀ end point titer = negative logarithm of the dilution above the 50% mortality plus the proportionate distance factor (corrected for dilution series used)

$$\text{Negative logarithm of the lower dilution (next above } 50\% \text{ mortality)} = 7.0$$

$$\text{Proportionate distance (0.3) x dilution factor (log of 10.0)} = -(0.3 \times 1)$$

$$\text{Log LD}_{50} \text{ titer} = 7 - 0.3 = 6.7$$

$$\text{LD}_{50} \text{ titer} = 10^{6.7}$$

$$= 0.5 \times 10^7 \text{ CFU}$$

ตารางที่ 6 ข้อมูลซึ่งใช้ในการคำนวณค่า LD₅₀ ของเชื้อ Ara⁺ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด (strain E261) โดยวิธี Reed-Muench Formula

Bacterial Dilution	Mortality Ratio	Died	Survived	Cumulated survival values			
				Died	Survived	Mortality	
						Ratio	Percent
10 ⁹	6/6	6	0	16	0	16/16	100
10 ⁸	8/8	8	0	10	0	10/10	100
10 ⁷	2/8	2	6	2	6	2/8	25
10 ⁶	0/8	0	8	0	14	0/14	0
10 ⁵	0/5	0	5	0	19	0/19	0

การคำนวณค่า LD₅₀ ของเชื้อ *B. pseudomallei* strain E261

$$\begin{aligned} \text{Proportionate distance} &= \frac{(\% \text{ mortality at dilution next above } 50\%) - (50\%)}{(\% \text{ mortality at dilution next above } 50\%) - (\% \text{ mortality at dilution next below})} \\ &= (100 - 50) / (100 - 25) = 0.67 \end{aligned}$$

Negative logarithm of LD₅₀ end point titer = negative logarithm of the dilution above the 50% mortality plus the proportionate distance factor (corrected for dilution series used)

Negative logarithm of the lower dilution (next above 50% mortality) = 8.0

Proportionate distance (0.67) x dilution factor (log of 10.0) = -(0.67 x 1)

Log LD₅₀ titer = 8 - 0.67 = 7.33

LD₅₀ titer = 10^{7.33}
= 2.14 x 10⁷ CFU

บทวิจารณ์

ในการวัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ 25 strains และ Ara⁺ 25 strains โดยใช้ modified microtiter-plate test นั้น ได้ใช้เชื้อ *B. pseudomallei* strain UE5 เป็น reference ทุกครั้งเนื่องจากเมื่อคำนวณปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแต่ละ strain เป็นอัตราส่วนต่อเชื้อ *B. pseudomallei* strain UE5 แล้ว จะสามารถเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* แต่ละ strain ได้จากค่าอัตราส่วนนั้น จากผลการศึกษาปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มโดยใช้ modified microtiter plate test พบว่า แม้ว่าเชื้อชนิด Ara⁻ ส่วนใหญ่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าเชื้อชนิด Ara⁺ แต่มีเชื้อชนิด Ara⁻ จำนวนหนึ่งที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้เท่ากับเชื้อชนิด Ara⁺ (รูปที่ 1)

เมื่อศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุดและน้อยที่สุดทั้งชนิด Ara⁻ (strains G207, A2) และ Ara⁺ (strains E287, E261) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อตัวอย่างทั้ง 4 strains ให้ผลบวก (positive) ต่อ PAS stain แสดงว่า เชื้อทั้ง 4 strains นี้มีการสร้างสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) นอกจากนี้ผลจากการศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 4 strains ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเชื้อชนิด Ara⁻ strains G207 และ A2 มีลักษณะการรวมกลุ่มกันเป็น microcolonies มากกว่าเชื้อชนิด Ara⁺ strains E287 และ E261 และยังพบ intercellular slime matrix ในกลุ่ม microcolonies ของเชื้อด้วย Intercellular slime matrix เหล่านี้น่าจะเป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต เพราะให้ผลบวกเมื่อย้อมด้วย PAS และ ruthenium red และเกี่ยวข้องกับการเกิดการรวมกลุ่มกันเป็น microcolonies ของเชื้อ

ผลการศึกษาระดับความรุนแรงในการก่อโรค (Level of virulence) ของเชื้อ *B. pseudomallei* ในหนูทดลองในการศึกษานี้พบว่า LD₅₀ ของเชื้อชนิด Ara⁻ strains G207 และ A2 มีค่าเท่ากับ 20.74 และ 18.58 CFU ตามลำดับ ส่วน LD₅₀ ของเชื้อชนิด Ara⁺ strains E287 และ E261 มีค่าเท่ากับ 0.5 x 10⁷ และ 2.14 x 10⁷ ตามลำดับ ค่า LD₅₀ ของเชื้อในการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Ulett และคณะ⁽⁴⁵⁾ ที่ได้ศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ 42 strains และชนิด Ara⁺ 2 strains ในหนูทดลอง (BALB/c) พบว่า ระดับความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ อยู่ระหว่าง < 10 CFU ถึง > 10⁷ CFU ส่วนเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ มีระดับความรุนแรงในการก่อโรคลอยู่ระหว่าง 2 x 10⁵ CFU ถึง 10⁷ CFU นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Russell and Bell⁽⁴⁶⁾ ซึ่งได้รายงานค่า minimum lethal dose ของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ ในหนูทดลอง (BALB/c) ว่ามีค่าเท่ากับ >10⁶ CFU

มีรายงานการศึกษามากมายที่บ่งชี้ว่า เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มและเจริญเติบโตอยู่ในไบโอฟิล์มมีความต้านทานต่อแอนติบอดี (antibodies) ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และ สารต้านเชื้อจุลชีพ (antibacterial agents) ต่างๆได้มากกว่าแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่แยกกันอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ (planktonic cells) นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังสามารถปกป้องเชื้อแบคทีเรียจากระบบภูมิคุ้มกันของ host ได้

เช่น ปกป้องเชื้อแบคทีเรียจาก complement activation และ phagocyte-mediated killing (27, 35-41, 47, 48) แต่ในขณะเดียวกัน ไบโอฟิล์มก็สามารถจำกัดการปล่อยสารพิษ (toxin) และ metabolites อื่นๆ ของเชื้อ รวมทั้งควบคุมการหลุดออกของ planktonic cells จึงทำให้ความสามารถของเชื้อในการก่อโรคแบบเฉียบพลัน (acute inflammatory disease) ลดลงด้วย ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตอยู่ภายในไบโอฟิล์มจึงมักเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคระยะเรื้อรัง (chronic phase), asymptomatic infection (dormant stage) และการกลับเป็นซ้ำ (relapse) ของโรค เนื่องจากบทบาทของไบโอฟิล์มในกลไกการเกิดโรคเมลิออยโดสิสยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดจนถึงขณะนี้ แต่ข้อมูลจากการศึกษานี้ พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ ที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด (strain G207) และน้อยที่สุด (strain A2) ให้ค่า LD₅₀ ใกล้เคียงกันในหนูทดลอง และในทำนองเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบ LD₅₀ ของเชื้อชนิด Ara⁺ ที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด (strain E287) และน้อยที่สุด (strain E261) ในหนูทดลองก็พบว่ามีค่า LD₅₀ ใกล้เคียงกันเช่นเดียวกับที่พบในเชื้อชนิด Ara⁻ ซึ่งดูเหมือนว่าไบโอฟิล์มอาจจะไม่มีบทบาทต่อการเกิด lethal effect อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบ LD₅₀ ของเชื้อคนละ strain อาจจะอธิบายผลการทดลองได้ยากเพราะเชื้อทั้งสองตัวอาจมีปัจจัยอื่นนอกเหนือจากไบโอฟิล์มที่แตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดลองเพิ่มเติมในการศึกษา LD₅₀ ของเชื้อ *B. pseudomallei* strain G207 ที่เพาะเลี้ยงใน BHI เปรียบเทียบกับเมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth เนื่องจากผลการศึกษาปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเชื้อมีการสร้าง intercellular slime matrix เมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI broth (รูปที่ 6 และ 8) ซึ่งแสดงว่าเชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM ผลการศึกษา LD₅₀ พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* strain G207 ที่เพาะเลี้ยงใน BHI ให้ค่า LD₅₀ ใกล้เคียงกับเมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า การสร้างไบโอฟิล์มมากหรือน้อยของเชื้ออาจไม่ทำให้โรครุนแรงมากขึ้นหรือน้อยลง เนื่องจากไม่ว่าปริมาณไบโอฟิล์มจะมากหรือน้อยก็สามารถจำกัดการปล่อยสารพิษ (toxin) ของเชื้อและควบคุมการหลุดออกของ planktonic cells ได้ดังกล่าวแล้วข้างต้น อย่างไรก็ตาม การทดลองดังกล่าวเป็นการสันนิษฐานว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ และ Ara⁻ ที่นำมาศึกษา LD₅₀ ในหนูทดลอง (in vivo) จะสร้างไบโอฟิล์มเช่นเดียวกับที่ศึกษาใน microtiter plate (in vitro) แต่อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้งชนิด Ara⁺ และ Ara⁻ มีการสร้างไบโอฟิล์มใน in vivo ต่างจาก in vitro ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

แม้ผลการศึกษาครั้งนี้ให้ข้อมูลเบื้องต้นที่ชี้ให้เห็นว่าไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* อาจจะไม่มีบทบาทต่อการเกิด lethal effect แต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าไบโอฟิล์มมีผลต่อความรุนแรงของโรคในกรณีที่เป็น chronic infections หรือไม่ เนื่องจากการสร้างไบโอฟิล์มมากหรือน้อยของเชื้อ *B. pseudomallei* อาจเกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อแอนติบอดี (antibodies) ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และสารต้านเชื้อจุลชีพ (antibacterial agents) ต่างๆ ทำให้เชื้อดื้อยาและเกิดการกลับเป็นซ้ำของโรคได้มากขึ้นซึ่งเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยเมลิออยโดสิส ซึ่งในประเด็นดังกล่าวนี้ก็ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Whitmore A, Krishnaswami CS. An account of the discovery of a hitherto undescribed infective disease occurring among the population of Rangoon. Indian Med. Gaz. 1912;47:262-267.
2. Patamasucon P, Schaad UB, Nelson JD. Melioidosis. J.Pediatr. 1982;100:175-182.
3. Howe C, Sampath A, Spotnitz M. The *Pseudomallei* group: a review. J.Infect.Dis. 1971;124:598-606.
4. Brown M, Thin RN. Melioidosis in infectious diseases and medical microbiology. Hong Kong: WB Saunders; 1986.
5. Ellison DW, Baker HJ, Mariappan M. Melioidosis in Malaysia.I. A method for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil and surface water. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1969;18:694-697.
6. Strauss JM, Jason S, Marioppen M. *Pseudomonas pseudomallei* in soil and surface water of Sabah, Malaysia. Med. J. Malaya. 1967;22:31-32.
7. Miller WR, Pannell L, Cravitz L, et al. Studies on certain biological characteristics of *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei*. I Morphology,cultivation, viability and isolation from contaminated specimens. J. Bact. 1948;55:115-126.
8. Merick GS, Zimmerman HM, Maner GD. Melioidosis on Guam. JAMA 1946;130:1063-1067.
9. Thin RN, Brown M, Stewart JB, et al. Melioidosis: a report of ten cases. Quarterly J. Med. 1970;39:115-127.
10. Atthasampunna P, Jayanetra P, Kurathong S, et al. Melioidosis : a rare disease for Thai patients? Thai Med. Council Bull. 1976;5:419-423.
11. Guard RW, Khafagi FA, Brigden MC, et al. Melioidosis in Far North Queensland. A clinical and epidemiological review of twenty cases. Am.J.Trop.Med.Hyg. 1984;33:467-473.
12. Lee MK, Chua CT. Brain abscess due to *Pseudomonas pseudomallei*. Aust.N.Z.J.Med. 1986;16:75-77.
13. Chambon L. Isolement du bacille de Whitmore a partir du milieu exterieur. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 1955;89:229-235.
14. Biegeleisen JZJ, Mosquera R, Cherry WB. A case of human melioidosis : clinical epidemiological and laboratory findings. Am. J. Trop. Med. 1964;13:89-99.
15. Pourtaghva M, Dodin A, Portovi M, et al. 1st case of human pulmonary melioidosis in Iran. (French). Bull.Soc.Pathol.Exot.Filiales. 1977;70:107-109.

16. Weber DR, Douglass LE, Brundage WG, et al. Acute varieties of melioidosis occurring in U.S. soldiers in Vietnam. *Am.J.Med.* 1969;46:234-244.
17. Spotnitz M, Rudnitzky J, Rambaud JJ. Melioidosis pneumonitis. Analysis of nine cases of a benign form of melioidosis. *JAMA.* 1967;202:950-954.
18. So SY. Melioidosis - an overlooked problem in Hong Kong. *Hong Kong Practitioner.* 1985;7:1111-1114.
19. Everett ED, Nelson RA. Pulmonary melioidosis. Observations in thirty-nine cases. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1975;112:331-340.
20. Rubin HL, Alexander AD, Yager RH. Melioidosis : a military medical problem? *Milit. Med.* 1963;128:523-542.
21. Brundage WG, Thuss CJJ, Walden DC. Four fatal cases of melioidosis in U.S.soldiers in Vietnam. Bacteriologic and pathologic characteristics. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1968;17:183-191.
22. Thurnheer U, Novak A, Michel M, et al. Septic melioidosis following a visit to India. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1988;118:558-564.
23. Chan CK, Hyland RH, Leers WD, et al. Pleuropulmonary melioidosis in a Cambodian refugee. *Can.Med.Assoc.J.* 1984;131:1365-1367.
24. Leelarasamee A. Epidemiology of melioidosis. In: *Proc. Natl. Workshop on Melioidosis*, Jan. 14-15; 1988; Khon Kaen, Thailand; p. 22-47.
25. Nigg C. Serologic studies on subclinical melioidosis. *J.Immunol.* 1973;91:18-28.
26. Ashdown LR, Guard RW. The prevalence of human melioidosis in Northern Queensland. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1984;33:474-478.
27. Leelarasamee A, Bovornkitti S. Melioidosis: review and update. *Rev.Infect.Dis.* 1989;11:413-425.
28. Punyakupta S. In: *Proc. Natl. Workshop on Melioidosis*, Jan. 14-15, 1988; Khon Kaen, Thailand; p. 12-21.
29. Piggott JA, Hochholzer L. Human melioidosis. A histopathologic study of acute and chronic melioidosis. *Arch. Pathol.* 1970;90:101-111.
30. Chaowagul W, Suputtamongkol Y, Dance DAB, et al. Relapse in melioidosis: incidence and risk factors. *J. Infect. Dis.* 1993;168:1181-1185.
31. Desmarchelier PM, Dance DA, Chaowagul W, et al. Relationships among *Pseudomonas pseudomallei* isolates from patients with recurrent melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31:1592-1596.

32. Vorachit M, Lam K, Jayanetra P, et al. Electron microscopy study of the mode of growth of *Pseudomonas pseudomallei* in vitro and in vivo. J.Trop.Med.Hyg. 1995;98:379-391.
33. Kapliev VI, Denisov II, Kurilov VI. The morphological characteristics of mucoid variants of *Pseudomonas pseudomallei*. Zh.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol. 1990;10:41-45.
34. Vorachit M, Lam K, Jayanetra P, et al. Resistance of *Pseudomonas pseudomallei* growing as a biofilm on silastic discs to ceftazidime and co-trimoxazole. Antimicrob.Agents Chemother. 1993;37:2000-2002.
35. Ketyi I. Bacterial biofilms and medical practice. Orv. Hetil. 1989;130:2455-2457.
36. Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. Prog. Drug Res. 1991;37:91-105.
37. Hoiby N, Espersen F, Fomsgaard A, et al. Biofilm, foreign bodies and chronic infections. Ugeskr. Laeger. 1994;156:5998-6005.
38. Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. Biofilm resistance to antimicrobial agents. Microbiol. 2000;146:547-549.
39. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999;284:1318-1322.
40. Joiner KA. Complement evasion by bacteria and parasites. Annu. Rev. Microbiol. 1988;42:201-230.
41. Pruksachartvuthi S, Aswapokee N, Thankerngpol K. Survival of *Pseudomonas pseudomallei* in human phagocytes. J.Med.Microbiol. 1990;31:109-114.
42. Smith MD, Angus BJ, Wuthiekanun V, et al. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. Infect. Immun. 1997;65:4319-4321.
43. Steinmetz I, Rohde M, Brenneke B. Purification and characterization of an exopolysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*. Infect. Immun. 1995;63:3959-3965.
44. Steinmetz I, Reganzerowski A, Brenneke B, et al. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* by latex agglutination based on an exopolysaccharide-specific monoclonal antibody. J. Clin. Microbiol. 1999;37:225-228.
45. Ulett GC, Currie BJ, Clair TW, et al. *Burkholderia pseudomallei* virulence: definition, stability and association with clonality. Microbes. Infect. 2001;3:621-631.
46. Russell P, Bell DL. Murine models of melioidosis : effects of strain variation of *Burkholderia pseudomallei* and murine strain. Abstract D-111. In: American Society for Microbiology 100th General meeting; 2000; Los Angeles California; p. 251.

47. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358:135-138.
48. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends. Microbiol*. 2001;9:34-39.
49. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 2000;40:175-179.
50. Lam J, Chan R, Lam K, et al. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun*. 1980;28:546-556.
51. McManus JFA. *Stain Techn. (AFIP modification)*: Williams & Wilkins Co.; 1948.
52. Reed LJ, Muench H. A simple method for estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg*. 1938;27:493-497.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Vogel and Bonner's medium (MVBM) เพื่อกระตุ้นการสร้างไบโอฟิล์ม
วิธีเตรียม

- | | | |
|----|-------------------------------------|--------|
| 1. | MgSO ₄ 7H ₂ O | 0.2 g |
| | Citric acid (anhydrous) | 2.0 g |
| | NaNH ₄ HPO ₄ | 3.5 g |
| | K ₂ HPO ₄ | 10.0 g |

Dissolved in order listed in glass-distilled water to a final volume of 919 ml with a final pH of 7.2

2. After autoclaving, 1 ml of CaCl₂ 2H₂O from a stock of 36 g/100 ml and 80 ml of a 25% solution of D-gluconate were added; both of these were filter sterilized.

ภาคผนวก ข

ผลงานที่นำเสนอในงานประชุม

6th FIMSA Advanced Course and Conference, October 20-25, 2002

Ayutthaya, Thailand

รายนามและสถานที่ทำงานของผู้วิจัยและนักวิจัยที่ปรึกษา

1. รศ. ดร. ทพญ. สุวิมล ทวีชัยสุภพงษ์
ภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002
โทรศัพท์ 043-202405 โทรสาร 043-244475
2. ศ. ดร. ทพ. สถิตย์ สิริสิงห
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระราม 6 พญาไท จังหวัดกรุงเทพ 10400