

รายงานโครงการวิจัย

MELIOIDOSIS: A NATIONAL PROBLEM

โดย

ร. ดร. สถิตย์ สิริสิงห

พญ. ชารินทร์ ชารากุล

พญ. วิภาดา เขาวกุล

ผศ. ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน

MELIOIDOSIS: A NATIONAL PROBLEM

โดย

ศ. ดร. สถิตย์ สิริสิงห

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

ผศ. พญ. ธารารัตน์ ธารากุล

ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราช
พยาบาล ม. มหิดล

พญ. วิภาดา เขาวกุล

กลุ่มงานอายุรกรรม ร.พ. สรรพสิทธิประสงค์
จ. อุบลราชธานี

ผศ. ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม.ขอนแก่น

ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนพัฒนาโครงการวิจัย (PDG 3-02/2538)

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

คำนำ

รายงานการวิจัยฉบับนี้ เป็นผลงานที่ได้รับการสนับสนุนในด้านงบประมาณจากทุนพัฒนาโครงการวิจัยฝ่ายวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม และสวัสดิการสาธารณะของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ซึ่งทาง สกว. ได้ขอให้ผมทำรายงานเรื่องนี้ โดยเริ่มต้นโครงการตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน พ.ศ. 2538 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2538 ในจำนวนเงินทุน 100,000.- บาท (หนึ่งแสนบาทถ้วน) ในการทำรายงานนี้มีผู้ร่วมงานอีก 3 ท่าน คือ ผศ.พญ. ชารินทร์ ชารากุล, พญ.วิภาดา เขาวกุล และ ผศ.ดร. สุศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ซึ่งตลอดเวลา 6 เดือน ทุกท่านได้ใช้ความพยายามอย่างมาก และให้ความร่วมมืออย่างดีที่สุด ได้มีการพบปะปรึกษากันหลายครั้งกว่างานจะสำเร็จออกมาเป็นรูปเล่มที่เห็นนี้ โดยเฉพาะผู้ร่วมงานท่านหนึ่งที่ต้องเดินทางไปกลับระหว่างอุบลราชธานี และ กรุงเทพมหานคร และอีกท่านหนึ่งระหว่างขอนแก่น และกรุงเทพมหานครเป็นประจำหลายครั้ง นอกจากนี้ ยังได้รับความร่วมมือในการให้ข้อมูลและค้นข้อมูลจากหลายท่าน โดยเฉพาะจาก ดร. สุวรรณ ตระกูลสมบุรณ์ (ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล) รศ. ดร. มัลลย์ วรจิตร (ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี) และ บรรณารักษ์ โดยเฉพาะจากคุณรุจเรขา อัคริษฐ์ ของห้องสมุดสตางค์มงคลสุข คณะวิทยาศาสตร์ สำนักหอสมุด ที่ช่วยในเรื่องข้อมูล โดยเฉพาะจากสิ่งตีพิมพ์ในประเทศที่ค้นหาจากฐานข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบัน ท้ายสุดการจัดทำให้ออกมาเป็นรูปเล่มคงเป็นไปได้ยาก หากไม่ได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีจากคุณประไพพร ไพรศุภา ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สถิตย์ สิริสิงห

31 ตุลาคม 2538

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1: Introductory Remarks	1
บทที่ 2: Ecology and Epidemiology	4
บทที่ 3: <i>Burkholderia pseudomallei</i>	13
บทที่ 4: Pathogenesis and Immunity	32
บทที่ 5: Laboratory Diagnosis	43
บทที่ 6: Clinical Features of Melioidosis	55
บทที่ 7: Treatment in Melioidosis	66

บทที่ 1

INTRODUCTORY REMARKS

เมลิออยโดสิส (Meliodosis) เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิด Gram negative bacilli ที่เพิ่งจะได้รับการจัดกลุ่มให้ใหม่ในปี ค.ศ. 1992 ด้วยการใช่วิธีการทางชีวเคมีร่วมกับอนุชีววิทยา (Molecular biology) โดย Genus ใหม่ที่ตั้งขึ้นมาคือ Genus *Burkholderia*¹ ดังนั้น ในปัจจุบันเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคในขณะนี้จึงมีชื่อเป็นทางการว่า *Burkholderia pseudomallei* แทน *Pseudomonas pseudomallei* ซึ่งใช้เรียกกันมาหลายปี (ความจริงเชื่อนี้ในอดีตมีชื่อหลายชื่อ เป็นต้นว่า *Malleomyces pseudomallei*, *Actinobacillus pseudomallei*, *Pfeifferella pseudomallei*, *Bacillus whitmori*, *Pfeifferella whitmori*, *Lofferella whitmori*) เชื้อแบคทีเรียนี้เป็น free-living saprophyte ซึ่งพบอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมในถิ่นระบาดของโรค ซึ่งเกือบทั้งหมดอยู่ระหว่างเส้นรุ้งขนาน 20 องศาเหนือและใต้ของเส้นศูนย์สูตร และจากการศึกษาเกี่ยวกับการกระจายของเชื้อในถิ่นระบาด พบว่าส่วนมากพบได้ในดินและน้ำนิ่งในแหล่งน้ำทั่วไป

โรคนี้มีผู้รายงานเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1912 โดย Whitmore และ Krishnaswami ในประเทศพม่า หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1947 จึงมีรายงานเพิ่มขึ้นอีก 2 ราย ซึ่งทั้งสองคนเป็นเชลยศึกชาวต่างประเทศ และในปี ค.ศ. 1955 จึงมีรายงานผู้ป่วยซึ่งเป็นคนไทยเป็นครั้งแรก และหลังจากนั้นไม่ค่อยได้มีผู้สนใจโรคนี้มากเท่าที่ควร^{2,3} จนกระทั่งในช่วงของสงครามเวียดนาม จึงกลับเริ่มมาให้ความสนใจเพิ่มขึ้น เมื่อทหารอเมริกันที่เข้ามาประจำการในเวียดนามจำนวนมากป่วยและล้มตายด้วยโรคนี้ และเป็นที่น่าสังเกตว่าผู้ป่วยเกือบ 30% เป็นนักบินขับเครื่องบินเฮลิคอปเตอร์ และมีอาการทางปอด จึงได้สันนิษฐานว่าเป็นเพราะหายใจเอาฝุ่นที่ฟุ้งกระจายในสนามรบ ดังนั้น จึงมีการขนานนามโรคนี้ว่า *Vietnam tuberculosis* นอกจากพบการเกิดโรคในขณะปฏิบัติงานในถิ่นระบาดแล้ว ยังพบว่ามีทหารผ่านศึกบางรายยังล้มป่วยลงด้วยโรคนี้ หลังจากกลับไปอเมริกาแล้วหลาย ๆ ปี ซึ่งแสดงว่าน่าจะมีเชื้อที่ยัง infectious หลงเหลืออยู่ในร่างกายได้เป็นเวลานาน และเมื่อเวลาที่ร่างกายอ่อนแอลง จะทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตและออกฤทธิ์ได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการขนานนามโรคนี้ว่า *Time-bomb disease*² อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบัน เรามีรายงานผู้ป่วยด้วยโรคนี้ในประเทศไทยเป็นจำนวนมาก และคาดว่าในแต่ละปียังมีผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงและอาจถึงแก่ชีวิตด้วยอาการของโลหิตเป็นพิษปีละอย่างน้อย ๆ 2000 ราย ซึ่งเมื่อรวม ๆ กับจำนวนผู้ป่วยที่เกิดจากเชื่อนี้แต่มีอาการแสดงออกในลักษณะอื่น ๆ (ซึ่งน่าจะมีจำนวนมากกว่าอาการของโลหิตเป็นพิษ) จึงทำให้คาดกันว่าในแต่ละปีคงมีผู้ที่ได้รับเชื่อนี้ ทั้งที่มีอาการและไม่มีอาการมากกว่าที่รายงานกันไว้ ในปัจจุบันการวินิจฉัยโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อยังเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือและแม่นยำที่สุด และเป็นวิธีที่ทำได้ไม่ยากนักหากมีประสบการณ์มาบ้าง ส่วน

อาการแสดงออกของผู้ได้รับเชื่อนั้น อาจไม่มีอาการทางคลินิกที่เด่นชัดโดยเฉพาะ และในบางคน อาจมีอาการคล้ายกับโรคติดเชื้ออื่น ๆ ได้อีกหลายโรค ขึ้นอยู่กับว่าอวัยวะส่วนใดถูก effect มากที่สุด ดังนั้น จึงมีคนเรียกโรคนี้ว่า The Great Imitator

แม้ว่าโรคmelioidosisจะไม่ได้เป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาสำคัญระดับโลกอย่างโรคเอดส์ หรือโรคมาเลเรียก็ตาม แต่ก็ยังเป็นโรคระดับท้องถิ่นที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีการระบาดของโรคมากที่สุด เจ้าหน้าที่ทุกฝ่ายยอมรับว่าโรคนี้เป็นปัญหาใหญ่ และจำเป็นที่จะต้องหาความรู้และมีการวิจัยเพิ่มเติม เพื่อที่จะได้ให้เราเข้าใจแง่มุมต่าง ๆ ของโรคนี้ ได้ดีขึ้น ไม่ว่าจะเป็นระดับวิทยา กลไกของการเกิดโรค การวินิจฉัยและการดูแลรักษาผู้ป่วย ดังนั้น สมาคมโรคติดเชื้อของประเทศไทย จึงจัดการประชุมระดับชาติเป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1986² เพื่อทบทวนความรู้ที่มีในขณะนั้นทั้งหมดและรวบรวมสิ่งที่ไม่รู้และยังต้องการการวิจัยเพิ่มเติม และหลังจากนั้น 5 ปี ได้มีการจัดการประชุมขึ้นอีกครั้งเพื่อติดตามความก้าวหน้า⁴ จากการประชุมทั้ง 2 ครั้ง พบว่าความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวกับโรคนี้ก้าวหน้าไปได้ค่อนข้างช้า เพราะ นักวิจัยหรือแพทย์ที่สนใจในโรคนี้ยังไม่มีโอกาสรวมกลุ่มวางแผนและทำงานวิจัยร่วมกันอย่างจริงจัง ช่วยเหลือซึ่งกันและกันอย่างใกล้ชิด และมีประสิทธิภาพพอที่จะให้ได้ผลซึ่งจะนำไปประยุกต์ใช้ได้เร็วขึ้น คณะกรรมการสภานิติบัญญัติแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ตระหนักถึงปัญหานี้ จึงได้จัดให้มีการประชุมของผู้ที่สนใจโรคmelioidosisขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1991 และได้สรุปผลการ สัมมนาไว้ในรายงานการสัมมนา “อีสานการแพทย์” ซึ่งได้เสนอแนวทางและหัวข้อการวิจัยที่สำคัญ ๆ เอาไว้อย่างละเอียด⁵ นอกจากการประชุมในระดับประเทศในลักษณะต่าง ๆ ที่ได้จัดขึ้นใน ประเทศไทยแล้ว ในปี ค.ศ. 1994 ยังได้มีการประชุมระดับนานาชาติที่จัดขึ้นเกี่ยวกับโรคนี้โดยเฉพาะ ณ เมืองกัวลาลัมเปอร์ ประเทศมาเลเซีย โดยในการประชุมครั้งนั้น (International Symposium on Melioidosis: Prevailing Problems and Future Directions 1994) ผู้จัดการประชุมพยายามเน้นเฉพาะความก้าวหน้าของงานวิจัยพื้นฐาน ระบาดวิทยา ตัวเชื้อ การวินิจฉัย และการดูแลรักษาผู้ป่วย⁶

ในปัจจุบัน มีแพทย์และนักวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยที่ทำการวิจัยอย่างจริงจังเกี่ยวกับ โรคmelioidosisอยู่ในจำนวนที่ค่อนข้างจำกัด โดยที่มีกลุ่มใหญ่ ๆ เพียงไม่กี่แห่ง งานวิจัย ส่วนใหญ่ในขณะนี้มาจากกลุ่มนักวิจัยชาวอังกฤษจาก Wellcome Foundation ที่มาประจำอยู่ที่ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน และมีฐานปฏิบัติการและทำงานร่วมกับนักวิชาการของโรงพยาบาล สรรพสิทธิ์ประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี นอกจากนี้ก็มีกลุ่มวิจัยที่กรมวิทยาศาสตร์การ แพทย์ของกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งร่วมงานกับนักวิจัยชาวญี่ปุ่นที่มาประจำอยู่ระยะสั้น ๆ และ กลุ่มอาจารย์ข้าราชการในมหาวิทยาลัยต่าง ๆ โดยเฉพาะมหาวิทยาลัยขอนแก่น มหาวิทยาลัย มหิดล และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ยังมีนักวิจัยที่กระจายอยู่ในสถาบันวิจัยทางการแพทย์บางแห่ง เช่น สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และ AFRIMS เป็นต้น

ในการเตรียมรายงานฉบับนี้ ผู้รับผิดชอบได้ตกลงกันว่าจะเน้นสรุปเฉพาะข้อมูลที่ยัง เป็นปัญหาโดยเฉพาะในประเทศไทย และยังต้องการการวิจัยเพิ่มเติม และส่วนมากเป็นข้อมูล

ใหม่ที่ยังไม่เคยมีการนำมาสรุปเอาไว้แล้วเท่านั้น ส่วนข้อมูลที่เป็นที่รับรู้กันแล้วทั่วไป เราจะไม่นำเอามาสรุปซ้ำอีก นอกจากส่วนที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับจริง ๆ ผู้สนใจอาจจะหาอ่านได้จากที่มีการสรุปไว้แล้ว เช่น จากบทความที่เขียนเอาไว้โดยนายแพทย์สมพนธ์ ปุณยะคุปต์² และนายแพทย์อมร ลีลารัตน์³ หรือจากกลุ่มของ Dr. K. Kanai^{7,8} ที่ได้รวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับโรคที่เกิดในประเทศไทยไว้โดยเฉพาะ และจากกลุ่มของ Wellcome Foundation⁹

เอกสารอ้างอิง

1. Yabuuchi E, Arakawa M. *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: be aware in temperate area. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 823-836.
2. Punyagupta S, Sirisanthana T, Stapatayavong B. *Melioidosis*. Bangkok Medical Publisher, Bangkok, Thailand. 1989, 264 p.
3. Leelarasamee A, Bovornkitti, S. *Melioidosis: review and update*. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 413-425.
4. Santapitak P. *Proceedings of National Workshop on Melioidosis*, Khon Kaen, Thailand, 1988.
5. คณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ รายงานการสัมมนา "อีสานการแพทย์" สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม 2534; หน้า 86-106.
6. Programme & Abstracts. *International Symposium on Melioidosis: Prevailing Problems and Future Directions*. Kuala Lumpur, Malaysia, 7-8 April 1994.
7. Kanai K, Dejsirilert S. *Pseudomonas pseudomallei* and melioidosis with special reference to the status in Thailand. *Jpn J Med Sci Biol* 1988; 41: 123-157.
8. Kanai K, Kondo E. Recent advances in medical sciences of *Burkholderia pseudomallei* (Basonym: *Pseudomonas pseudomallei*). *Jpn J Med Sci Biol* 1994; 47: 1-45.
9. Dance DA. *Melioidosis: the tip of the iceberg?* *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 52-60.

บทที่ 2

ECOLOGY AND EPIDEMIOLOGY

1. GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF *B. PSEUDOMALLEI*

เป็นที่รู้กันทั่วไปแล้วว่า *B. pseudomallei* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็น free-living organisms ที่พบได้ในสภาวะแวดล้อมทั่วทุกภาคของประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ในแถบเอเชียอาคเนย์ ที่ตั้งอยู่ระหว่างเส้นรุ้งขนาน 20 องศาเหนือและใต้เส้นศูนย์สูตร (Tropical & subtropical zones) และแหล่งธรรมชาติที่พบมากที่สุดคือในดินและน้ำนิ่ง (เช่น ในนาข้าว) สำหรับในประเทศไทยนั้น ได้มีการสำรวจการกระจายของเชื้อในสิ่งแวดล้อมกันอย่างจริงจังเป็นครั้งแรกในช่วงปี ค.ศ. 1965 โดยกลุ่มนักวิจัยของสนธิสัญญาป้องกันเอเชียอาคเนย์ (สปอ. หรือ SEATO Lab ในสมัยนั้น)¹ โดยในครั้งนั้นได้เก็บตัวอย่างดิน 22 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำอีกจาก 99 ตัวอย่าง จากภาคต่าง ๆ ของประเทศ และได้ทำการแยกเชื้อโดยนำน้ำละลายของตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำที่เก็บมาฉีดเข้าช่องท้องหนูแฮมสเตอร์ ซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่ sensitive ต่อเชื้อมาก แล้วจึงนำเชื้อที่แยกจากหนูที่ตายมาพิสูจน์เชื้อ การศึกษาครั้งนั้นสามารถพบและแยกเชื้อได้จากตัวอย่างดินแค่เพียงแห่งเดียว คือดินที่เก็บจากพื้นที่ในบริเวณใกล้แม่น้ำมูล จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นข้อมูลที่ไม่ตรงกับที่ได้คาดกันเอาไว้ เพราะก่อนหน้านี้เพียง 2 ปี Nigg ได้รายงานไว้ว่า ประชากรไทยที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดีนั้นเป็นผู้ที่มี antibody ถึง 20-30% ซึ่งเป็นการแสดงว่าการติดเชื้อนี้จะเกิดขึ้นได้บ่อยมาก² และตัวเลขของการกระจายของเชื้อในแหล่งธรรมชาติที่รายงานก็ต่ำกว่าที่พบในประเทศไทยใกล้เคียง เช่น มาเลเซีย³ และเวียดนาม ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาการกระจายของเชื้อขึ้นใหม่⁴ โดยสุ่มตัวอย่างจำนวนมากขึ้น และอาจเป็นได้ว่านักวิจัยเหล่านี้มีความชำนาญมากขึ้นจึงได้ผลที่ดีขึ้น โดยพบว่าเชื้อนี้มีการกระจายอย่างแพร่หลายทั่วประเทศ จากยะลาและสงขลาในภาคใต้ไปจนถึงแม่ฮ่องสอนในภาคเหนือ และหลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1985⁵ ได้มีการศึกษาการกระจายของเชื้ออย่างละเอียดยิ่งขึ้นในจังหวัดสงขลา โดยในครั้งนั้นได้มีการนำเอา selective medium มาใช้ จึงช่วยให้สามารถพบและแยกเชื้อได้มากขึ้นจากตัวอย่างที่มีเชื้ออื่น ๆ ปนอยู่มาก นักวิจัยกลุ่มนี้พบว่าเชื้อนี้กระจายอยู่ทั่วไปทั้งจังหวัด โดยเฉพาะพบว่าจากตัวอย่างของผิวดินในสวนยางพบเชื้อได้ถึง 60% และในดินทุ่งนามีกว่า 78% อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลล่าสุดได้มีการสำรวจเชื้อในดินตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยเฉพาะ ตรวจพบเชื้อได้ถึง 68% ของดินตัวอย่างที่เก็บจาก 167 แห่ง^{5a} นอกจากนี้ ยังได้รายงานเพิ่มเติมว่า isolation rate ของการพบเชื้อในผิวดินนาข้าวอยู่ในระดับต่ำ แต่จะสูงขึ้นในดินที่อยู่ลึกลงไป และพบต่อว่าโอกาสตรวจพบเชื้อได้ในหน้าแล้งมีสูงกว่าในหน้าฝน

มีข้อมูลจากการศึกษาโดยกลุ่มของนักวิจัยชาวออสเตรเลีย⁶ ว่าพบเชื้ออยู่ในชั้นใต้ดินได้ลึกถึงกว่า 45 ซม. ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อสามารถมีชีวิตรอดหลบซ่อนอยู่ใต้ดินได้ตลอดทั้งปี

และในช่วงที่มีฝนตกชุก ระดับน้ำใต้ดินซึ่ง มีระดับสูงขึ้นจะนำเอาเชื้อขึ้นมาอยู่ที่ผิวดิน เช่น ผิวดิน ในสวนยาง หรือดินในนาข้าว และเมื่อชาวนาชาวสวนเริ่มทำนาทำสวนในฤดูฝน จึงมีโอกาสรับ เชื้อมากขึ้นและทำให้มีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อสูงในฤดูฝน อย่างไรก็ตาม การคืบคลานที่มีเชื้อปน อยู่อาจไม่ใช่วิธีการที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคได้ ดังจะเห็นได้ว่ากลุ่มนักวิจัยของ สปอ.⁴ ได้พบเชื้อ ในบ่อน้ำบาดาลแห่งหนึ่งในจังหวัดปราจีนบุรี แต่จำนวนของคนและสัตว์เลี้ยงที่ใช้น้ำและอาจได้ รับเชื้อ (โดยตรงระดับของ antibody) มีไม่มากนัก และยังได้ทดลองต่อโดยใช้ชะนิกินน้ำจากบ่อน้ำ บาดาลนั้น แต่ก็ไม่พบว่ามี การติดเชื้อเกิดขึ้นในสัตว์ทดลองเลย นอกจากในดินและในน้ำแล้ว ยังไม่ปรากฏว่ามีผู้ใดสามารถแยกเชื้อได้จากสัตว์เลี้ยงหรือสัตว์ป่าในประเทศไทยเลย แม้ว่าสัตว์ บางตัวจะมี antibody ขึ้นในระดับต่ำ ๆ ก็ตาม จะเห็นได้ว่าการวิจัยในเรื่อง ดังกล่าวยังมีค่อนข้างน้อยมากในประเทศไทย อาจเป็นได้ว่าผู้ที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะนักสัตวแพทย์ให้ความสนใจ ในเรื่องดังกล่าวค่อนข้างจะน้อย ซึ่งต่างจากในประเทศมาเลเซียซึ่งมีการศึกษากันมาก และพบ การระบาดของเชื้อในสัตว์หลายชนิด และในดินบริเวณที่เลี้ยงสัตว์เหล่านี้

ข้อมูลจากการศึกษาในหลายสถาบันทั้งในและนอกประเทศ ทำให้เราพอจะสรุปได้ว่า เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อที่มีความคงทนต่อสภาวะแวดล้อมที่โดยปกติจะไม่เอื้ออำนวยให้ เชื้อแบคทีเรียที่ไม่สร้าง spore อื่นๆ มีชีวิตอยู่ได้ เป็นต้นว่า เชื้อ *B. pseudomallei* นี้สามารถทน อุณหภูมิต่ำในตู้เย็น (คือ 5°C) ได้เป็นเวลานานหลายเดือน⁷ แม้กระทั่งทิ้งให้อยู่ในน้ำกลั่นนาน ๆ เชื้อก็ยังไม่ตาย เราอาจนำดินที่มีเชื้อนี้มาตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลานานหลายเดือนก็ยัง สามารถแยกเชื้อออกมาได้

คุณสมบัติที่น่าสนใจอีกข้อหนึ่ง คือความสามารถที่เชื้อนี้จะปรับตัวเองให้เข้ากับสภาวะ แวดล้อมที่ต่าง ๆ กันได้เป็นอย่างดี (versatility และ adaptability) ดังจะเห็นได้ว่าเชื้อสามารถ เจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีระดับออกซิเจนต่าง ๆ กัน สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำเลี้ยง เชื้อที่มีความเป็นกรดได้ถึง pH 4.5⁸ และที่อุณหภูมิระหว่าง 15-42°C ดังนั้น มีความเป็นไปได้สูงที่จะพบเชื้อ *B. pseudomallei* มีชีวิตอยู่ได้ในน้ำและดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีทั้ง ความเป็นกรด และความเข้มข้นของเกลือสูง เป็นที่ ๆ มีความชื้นต่ำและมีอุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อเชื้อนี้สามารถปรับตัวเองให้มีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน ได้ดี และมีความคงทนต่ออุณหภูมิต่ำ ๆ ทำไมจึงไม่ค่อยปรากฏว่ามีผู้ใดรายงานการแพร่กระจาย ของเชื้อในบริเวณที่อยู่นอกเหนือ 20° เหนือและใต้ของเส้นศูนย์สูตร และจากรายงานผู้ป่วยที่พบ ในพื้นที่บริเวณดังกล่าว เมื่อได้สอบประวัติจะพบว่าเป็นผู้ที่เคยเข้ามาในบริเวณที่เป็นแหล่งระบาดของ โรคแล้วทั้งนั้น อย่างไรก็ตาม ในปี 1994 ได้มีการนำ ribotyping มาประยุกต์ใช้ และได้พบว่า เชื้อนี้สามารถอยู่ได้ในแถบ temperate zone ได้เป็นเวลาหลายปี

ได้ทราบมาว่ากลุ่มนักวิจัยของ Wellcome ได้พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วย เป็นพวก Arabinose negative แต่เชื้อที่พบในสิ่งแวดล้อม (เช่น ในดิน) มีทั้งพวกที่เป็น ทั้ง Arabinose positive และ Arabinose negative และทราบต่อมาด้วยว่าพวกที่เป็น Arabinose negative นั้น เมื่อฉีดเข้าไปในหนู ๆ จะตาย และตายก่อนที่จะ form abscess ซึ่ง

บ่งชี้ว่าการตายน่าจะมาจากสารพิษ แต่หากทำการฉีดหนูด้วยเชื้อที่เป็น Arabinose positive หนูจะไม่ตาย

Research questions

1. เนื่องจากการสำรวจการกระจายของเชื้อ นักวิทยาศาสตร์จะใช้วิธีการทางแบคทีเรียที่เคยทำกันอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป ตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน และไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างที่อาจจะมึระหว่างเชื้อที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ แต่ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำเอาวิธีการทาง molecular biology ที่เรียกว่า ribotyping ซึ่งเป็นวิธีที่มีศักยภาพในการใช้ศึกษา genotype ต่าง ๆ ของเชื้ออื่น และในปัจจุบันได้มีการเอามาใช้กับ *B. pseudomallei* แล้ว การนำวิธีการดังกล่าวมาใช้คงจะช่วยให้เราตอบคำถามหลายข้อได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เป็นต้นว่า

- เชื้อที่กระจายอยู่ในภาคต่าง ๆ ของประเทศเหมือนกันหรือต่างกัน
- เชื้อที่พบในฤดูฝน ต่างไปจากที่พบในฤดูอื่นหรือไม่
- เชื้อที่พบในประเทศไทยมี predominant type ที่เหมือนหรือแตกต่างไปจากเชื้อที่พบในประเทศเอเชียอาคเนย์อื่น ๆ
- เชื้อที่พบในผู้ป่วยเป็นชนิดใดและต่างจากเชื้อที่พบในสิ่งแวดล้อมของผู้ป่วยหรือไม่
- ความรุนแรงของเชื้อในสิ่งแวดล้อม (หากมีจริง) ขึ้นอยู่กับปัจจัยอะไรบ้าง
- หากแยกเชื้อได้จากสัตว์ จะเป็นเชื้อที่มี ribotype ประเภทใด และอาจจะช่วยบอกได้ว่า มีสัตว์เป็น reservoir ได้หรือไม่

2. หากมีการนำเชื้อที่มี ribotype อื่นเข้ามาในสภาวะแวดล้อมใหม่ ๆ เชื้อดังกล่าวจะมีชีวิตได้หรือไม่ อยู่ได้นานเท่าใด และความรู้เหล่านี้อาจเป็นประโยชน์ในการศึกษาระบาดวิทยาของโรค ดังจะเห็นได้ว่าในปัจจุบันจะมีการเดินทางไปมาระหว่างผู้คนที่ยู่ในถิ่นระบาดของโรคไปยังนอกถิ่นระบาดของโรคอยู่เสมอ

3. น่าจะมีการศึกษาเพื่อให้ทราบว่าทำไมเชื้อ *B. pseudomallei* คงทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่ค่อยจะเอื้ออำนวยให้เชื้ออื่นๆ เจริญเติบโตได้ และมีองค์ประกอบอะไรที่ทำให้เชื้อ *B. pseudomallei* นี้ สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาได้เป็นอย่างดี และทำไมจึงไม่ค่อยมีรายงานว่าพบเชื้อในบริเวณที่อยู่นอกถิ่นระบาดของโรค

4. หากนำเชื้อนี้ไป contaminate ดินหรือสิ่งแวดล้อมที่อยู่นอก endemic area เชื้อจะสามารถคงทนและมีชีวิตอยู่ได้หรือไม่ และนานมากน้อยเท่าใด

5. หากผลของ Arabinose เป็นที่ยอมรับกันได้ น่าจะ

- สำรวจเชื้อใน environment ทางภาคใต้และภาคอีสาน ซึ่งอาจได้คำตอบว่าทำไมจึงดูเหมือนกับว่าจะมีผู้ป่วยด้วยโรคนี้นมากในอีสาน ทั้ง ๆ ที่พบเชื้อใน environment ได้เหมือน ๆ กันทั้งสองภาคของประเทศ
- เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง arabinose typing กับ ribotyping

-เมื่อนำเอาเชื้อที่ไม่ทำให้หนูตาย (Arabinose positive) ฉีดเข้าไปในช่องท้องหนู และ
ทำเป็น serial passage ต่อไป เพื่อดูว่าจะทำให้เชื้อกลายเป็น Arabinose
negative ได้หรือไม่ (การทำแบบนี้จะทำให้เชื้อซึ่งมีความรุนแรงน้อยเปลี่ยนไป
เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงสูงได้)

2. PREVALENCE AND DISTRIBUTION OF MELIOIDOSIS

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าโรคเมลิอยโดสิส เป็นโรคที่พบได้ในคนทุกเพศทุกวัยตั้งแต่แรก
เกิดจนถึงวัยชรา แต่จะพบในชายมากกว่าหญิง และส่วนมากพบในช่วงอายุ 40-50 ปี⁹⁻¹⁵
ผู้ที่เป็โรคส่วนมากจะเป็นชาวสวนชาวนาที่ต้องคลุกคลีอยู่กับน้ำและดินท้องนาเป็นประจำ
สำหรับในประเทศไทย เมลิอยโดสิสเป็นโรคที่พบในประชากรทั่วทุกภาคของประเทศ แต่มี
รายงานมากที่สุดจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ¹⁶⁻¹⁹ โดยเฉพาะในจังหวัดขอนแก่นและอุบล
ราชธานี (อาจเป็นไปได้ว่าในจังหวัดทั้งสองนี้ เจ้าหน้าที่และห้องปฏิบัติการคุ้นกับโรคนี้และเชื
นี้ดีกว่าจังหวัดอื่นก็ได้) มีปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญหลายอย่าง เช่น เบาหวาน เป็นต้น ในปี ค.ศ.1991
ยังเคยมีรายงานด้วยว่าเชืนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคโหลตายในคนไทยที่ไปทำงานที่ประเทศ
สิงคโปร์²⁰ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้นั้นยังมีข้อสงสัยอีกหลายจุด แต่ก็น่าจะมีการศึกษาเพื่อ
ให้เรื่องนี้มีความกระจ่างชัดขึ้น

ตามที่ได้เกริ่นไว้ในตอนแรกแล้วว่า subclinical infection นั้น มีค่อนข้างจะมาก^{2, 9, 10}
และ relapse ของโรคนั้นเกิดขึ้นได้บ่อยพอสมควร^{21, 22} มีรายงานการเป็นโรคในผู้ป่วยซึ่งเคย
ออกไปจากถิ่นระบาดแล้วกว่า 20 ปี²³ การเกิด relapse จาก subclinical infection นั้น พบได้
บ่อยมากทั้งในคนและสัตว์²⁴⁻²⁶ ข้อมูลที่ได้จากกลุ่มนักวิจัยของออสเตรเลียร่วมกับกลุ่มของ
Wellcome แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่กลับมาเป็นโรคอีกครั้งนั้น ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อที่หลบซ่อน
อยู่ภายในตัวของผู้ป่วยเอง และมีส่วนน้อยมากที่เป็นเพราะได้รับเชื้อเข้ามาใหม่²⁷ การที่ได้
ข้อมูลนี้มา เป็นผลสืบเนื่องมาจากการที่เราเอา ribotyping ของเชื้อมาใช้ในการศึกษารั้งนี้
ข้อมูลใหม่ ๆ ที่น่าสนใจที่เกี่ยวกับการระบาดวิทยา คือ

- จำนวนของผู้ที่มี antibody จะค่อย ๆ สูงขึ้นตามอายุ และระดับของ antibody ใน
ประชากรจะมีระดับสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่อายุ 6 เดือน เป็นต้นไป¹⁰
- ไม่สามารถตรวจหรือแยกเชื้อได้จากคนหรือสัตว์ปกติในถิ่นระบาด เช่น จาก throat
และ rectal swabs
- คนที่เข้ามาอยู่ในถิ่นระบาดเป็นเวลานาน เช่น 6 เดือน-1 ปี มีโอกาสได้รับเชื้อ
เข้าไปในร่างกาย แต่ไม่มีอาการใดแสดงออกมา นอกจากผลบวกจากการทดสอบ
antibody ต่อเชื้อ

Research questions

1. ทำไมโอกาสที่ประชากรในถิ่นระบาดของโรคที่ได้สัมผัสกับเชื้อแม้จะมีมาก แต่ผู้ได้รับเชื้อส่วนใหญ่จะเป็นพวก subclinical และไม่มีอาการแสดงออกของโรคเลย (ตรวจพบโดยดูจากระดับของ antibody เท่านั้น)
 - Ribotype ของเชื้อมีความสำคัญมากน้อยเท่าใดกับการเกิดโรค
 - ผู้ป่วยตามภาคต่าง ๆ ได้รับเชื้อที่มี ribotype เหมือนกันหรือต่างกัน
 - Predominant ribotype ที่แยกได้จากสภาวะแวดล้อมของผู้ป่วย เป็นประเภทเดียวกับที่แยกได้จากผู้ป่วยหรือไม่
2. การติดเชื้อมากกว่า 1 ribotype ในเวลาใดเวลาหนึ่งมีบ่อยมากน้อยเท่าใด และเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโรคทางคลินิกอย่างไรบ้าง ribotype ชนิดใดที่สามารถแยกได้บ่อย ๆ ในอวัยวะอะไรของผู้ป่วย
3. ปัจจัยร่วมอื่น ๆ โดยเฉพาะในการเกิดโรคร่วมกับผู้ป่วยโรคเอดส์ ซึ่งภูมิคุ้มกันเสียไปนั้น จะทำให้มีอุบัติการณ์และความรุนแรงของโรคเมลิออยโดสิสในอนาคดเปลี่ยนไปมากน้อยเท่าใด
4. มีปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ อะไรอีกบ้าง เช่น อุบัติการณ์และความรุนแรงของโรคในผู้ที่เป็นชาลัสซีเมีย เป็นต้น
5. การระบาดในสัตว์มีมากน้อยเท่าใด ในสัตว์ประเภทใด และติดต่อกันได้อย่างไร
6. Healthy carrier มีในคนและสัตว์ใดหรือไม่ และหากมี เป็น ribotype อะไร และมีความสัมพันธ์กับโอกาสที่จะเกิดเมลิออยโดสิสหรือไม่
7. ในขณะที่โรคสงบ เชื้อหลบซ่อนอยู่ในบริเวณใด ในเซลล์อะไร หรือใน compartment ใดของเซลล์

3. TRANSMISSION

ข้อมูลจากทางด้านระบาดวิทยาและจากคลินิก ชี้ให้เห็นแน่ชัดว่า กลไกของการติดเชื้อที่สำคัญที่สุดคือทางผิวหนัง เช่น จากบาดแผล นอกจากนี้ จากการที่พบโรคนี้มากในนักบินและเจ้าหน้าที่ทำงานเกี่ยวกับเครื่องบินเฮลิคอปเตอร์ ที่ต้องหายใจเอาฝุ่นที่ปลิวอยู่ในถิ่นระบาดของเชื้อจากการเกิด aerosol ที่เกิดจากอุบัติเหตุในห้องทดลอง²⁸ และการดูแลผู้ป่วยอย่างใกล้ชิด^{29, 30} เป็นการสนับสนุนว่าการติดต่อโดยการหายใจเป็นสิ่งที่น่าจะเป็นไปได้สูง นอกจากนี้จากรายงานเกี่ยวกับการติดเชื้อในสามีและภรรยา บ่งชี้ว่าโรคอาจติดต่อกันได้ทางเพศสัมพันธ์อีกด้วย³¹ นอกจากวิธีการที่กล่าวมาแล้ว ข้อมูลที่พบว่ามี การติดเชื้อในเด็กแรกเกิดในโรงพยาบาลหรือในสถานพยาบาลอื่น ๆ เป็นการชี้ให้เห็นว่าโรคนี้จัดอยู่ในกลุ่ม nosocomial และ iatrogenic infection ได้เหมือนกัน

การติดเชื้อโดยทางระบบทางเดินอาหาร ไม่ว่าจะกินอาหารหรือดื่มน้ำที่มีเชื้อปะปนอยู่ ยังเป็นสิ่งที่ถกเถียงกันอยู่โดยเฉพาะในคน แต่ข้อมูลที่ได้จากการระบาดของโรคในสัตว์เลี้ยงใน

ต่างประเทศ เช่น แคนาดา ออสเตรเลีย บ่งชี้ว่าการติดเชื้อโดยการกินน้ำที่มีเชื้อปะปนอยู่นั้นอาจเกิดขึ้นได้เหมือนกัน อย่างไรก็ตาม ในกรณีหลังนี้อาจมีผู้ต้านได้เหมือนกันว่าการติดเชื้อของสัตว์ดังกล่าวน่าจะผ่านทาง aerosol มากกว่า (ที่เกิดจากการฉีดน้ำ)

Research questions

1. เป็นไปได้หรือไม่ที่คนจะได้รับเชื้อทาง GI tract
2. เป็นไปได้หรือไม่ที่จะมีการติดเชื้อระหว่างคนและสัตว์
3. Carrier state มีหรือไม่ทั้งในคนและสัตว์ปกติ
4. ศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการติดเชื้อโดย route ต่าง ๆ กัน ซึ่งอาจจะต้องใช้วิธีการทดลองในสัตว์ทดลองก่อน

เอกสารอ้างอิง

1. Finkelstein RA, Chulasamaya M, Atthasampunna P, et al. SEATO Med Res Lab Ann Prg Rep 1965; D57-D62.
2. Nigg C. Serologic studies on subclinical melioidosis. J Immunol 1963; 91: 18-28.
3. Strauss JM, Groves MG, Mariappan M, Ellison DW. Melioidosis in Malaysia. II. Distribution of *Pseudomonas pseudomallei* in soil and surface water. Am J Trop Med Hyg 1969; 18: 698-702.
4. Atthasampunna P, Grossman RA, Noyes HE. SEATO Med Res Lab Ann Prog Rep 1970; 83-86.
5. Nachiangmai N, Patamasucon P, Tipayamonthein B, et al. *Pseudomonas pseudomallei* in southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1985; 16: 83-87.
- 5a. Wuthiekanun V, Smith MD, Dance DAB, White NJ. Isolation of *Pseudomonas pseudomonas pseudomallei* from soil in north-eastern Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89: 41-43.
6. Thomas AD, Forbes-Faulkner J, Parker M. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clay layers in defined depths. Am J Epidemiol 1979; 110: 515-521.
7. Yabuuchi E, Wang L, Arakawa M, Yano I. Survival of *Pseudomonas pseudomallei* strains at 5 degrees C. Kansenshogaku Zasshi. J Jpn Assoc Inf Dis 1993; 67: 331-335.

- 78X Dejsirilert S, Kondo E, Chiewsilp D, Kanai K. Growth and survival of *Pseudomonas pseudomallei* in acidic environments. Jpn J Med Sci Biol 1991; 44: 63-74.
- 78aX Currie B, Smithvaughan H, Golledge C, Buller N, Sriprakash KS, Kemp DJ. *Pseudomonas pseudomallei* isolates collected over 25 years from a non-tropical endemic focus show clonality on the basis of ribotyping. Epidemiol Infect 1994; 113: 307-312.
- 79X Naigowit P, Maneeboonyoung W, Wongroonsub P, et al. Serosurveillance for *Pseudomonas pseudomallei* infection in Thailand. Jpn J Med Sci Biol 1992; 45: 215-230.
- 710X Kunaphun P, Thirawattanasuk N, Supattamongkol Y, et al. Serology and carriage of *Pseudomonas pseudomallei*: a prospective study in 1000 hospitalized children in northeast Thailand. J Inf Dis 1993; 167: 230-233.
- 711X Puthcheary SD, Parasakthi N, Lee MK. Septicaemia melioidosis: a review of 50 cases from Malaysia. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86: 683-685.
- 712X Van Phung L, Quynh HT, Yabuuchi E, Dance DA. Pilot study of exposure to *Pseudomonas pseudomallei* in northern Vietnam. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993; 87: 416.
- 713X Merianos A, Patel M, Lane JM et al. The 1990-1991 outbreak of melioidosis in the Northern Territory of Australia: epidemiology and environmental studies. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1993; 24: 425-435.
- 714X Ashdown LR, Guard RW. The prevalence of human melioidosis in Northern Queensland. Am J Trop Med Hyg 1984; 33: 474-478.
- 715X Batchelor BI, Paul J, Trakulsomboon S, et al. Melioidosis survey in Kenya. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 88: 181.
- 716X Chaowagul W, White NJ, Dance DA et al. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northern Thailand. J Infect Dis 1989; 159: 890-899.

17. Charoenwong P, Lumbiganon P, Puapermpoonsiri S. The prevalence of the indirect hemagglutination test for melioidosis in children in an endemic area. *Southeast Asia J Trop Med Pub Hlth* 1992; 23: 687-701.
18. Kanai K, Kurata T, Akksilp S et al. A preliminary survey for human immunodeficiency virus (HIV) infection in tuberculosis and melioidosis patients in Ubon Ratchathani, Thailand. *Jpn J Med Sci Biol* 1992; 45: 247-253.
19. Boonsawat W, Boonma P, Tangdajahiran T, et al. Community-acquired pneumonia in adults at Srinagarind Hospital. *J Med Assoc Thailand* 1990; 73: 345-352.
20. Yap EH, Chan YC, Goh KT et al. Sudden unexplained death syndrome ... a new manifestation in melioidosis ? *Epidemiol Infect* 1991; 107: 577-584.
21. Chaowagul W, Suputtamongkol Y, Dance DA et al. Relapse in melioidosis: incidence and risk factors. *J Infect Dis* 1993; 168: 1181-1185.
22. Johnson AB, Ali N. Reactivation of latent melioidosis. *Postgrad Med J* 1990; 66: 732-733.
23. Mays EE, Ricketts EA. Melioidosis: recrudescence associated with bronchogenic carcinoma twenty-six years following initial geographic exposure. *Chest* 1975; 68: 261-263.
24. Wilks D, Jacobson SK, Lever AM, Farrington M. Fatal melioidosis in a tourist returning from Thailand. *J Infect* 1994; 29: 87-90.
25. Dance DA, King C, Aucken H et al. An outbreak of melioidosis in imported primates in Britian. *Vet Rec* 1992; 130: 525-529.
26. Trakulsomboon S, Pitt TL, Dance DA. Molecular typing of *Pseudomonas pseudomallei* from imported primates in Britian. *Vet Rec* 1994; 135: 65-66.
27. 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.
28. Green RN, Tuffnell PG. Laboratory-acquired melioidosis. *Am J Med* 1968; 44: 599-605.

29. Ashdown LR. Nosocomial infection due to *Pseudomonas pseudomallei* : two cases and an epidemiologic study. Rev Infect Dis 1979; 1: 891-894.
30. Kunakorn M, Jayanetra P, Tanphaichitra D. Man-to-man transmission of melioidosis. Lancet 1991; 337: 1290-1291.
31. McCormick JB, Sexton DJ, McMurray JG et al. Human to human transmission of *Pseudomonas pseudomallei*. Ann Intern Med 1975; 183: 512-513.

บทที่ 3

BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI

1. ISOLATION AND IDENTIFICATION

ปัญหาที่มีในปัจจุบันโดยเฉพาะที่เกี่ยวกับการวินิจฉัยโรคโดยวิธีการเพาะเลี้ยงและพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* นั้น คือความล่าช้า เช่น ในการทำ hemoculture ในบางรายอาจต้องใช้ เวลา 3-5 วันกว่าเชื้อจะขึ้น หลังจากนั้นก็ต้องนำมาเพาะเลี้ยงต่อเพื่อพิสูจน์เชื้อทางแบคทีเรีย วิทยาและทางชีวเคมี ซึ่งเมื่อรวม ๆ แล้วต้องใช้เวลายาวนานถึง 4-5 วัน ซึ่งอาจจะเป็นการ สลายเกินไป โดยเฉพาะในกรณีของการติดเชื้อชนิดโลหิตเป็นพิษ ซึ่งผู้ป่วยอาจจะถึงแก่ชีวิตได้ ภายใน 24-48 ชั่วโมง หลังจากเข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาล นอกจากนี้ปัญหาหลักอีกอัน คือการแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อที่อาจมีอยู่น้อยจากสิ่งส่งตรวจที่ heavily contaminated ด้วยเชื้ออื่นที่ อาจมีปริมาณมากกว่าหลายเท่า เช่น ใน feces, rectal swab, จากดิน ฯลฯ ซึ่งเป็นปัญหาที่ ประสพกันในอดีตก่อนที่จะมีการพัฒนา selective & differential media สำหรับใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเฉพาะ ในสมัยก่อนนักวิจัยจะต้องนำสิ่งส่งตรวจมาเพาะเลี้ยงและพิสูจน์โดย การฉีดเข้าไปในช่องท้องของหนูแฮมสเตอร์ หรือ guinea pig ซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่ไวต่อเชื้อนี้มาก (เช่น สำหรับหนูแฮมสเตอร์จะตายภายใน 2-3 วัน โดยใช้เชื่อน้อยกว่า 10 ตัว เป็นต้น) ก่อน แล้วจึงจะพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* หลังจากนั้นคือในช่วงต้น ๆ ของทศวรรษ 1970 ได้มีกลุ่มนักวิจัยชาวออสเตรเลียได้พัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการแยกเชื้อนี้โดยเฉพาะคือ Ashdown selective and differential medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารฆ่าเชื้ออื่น ๆ ที่ ปะปนอยู่แต่ไม่ฆ่าเชื้อ *B. pseudomallei* และการเพาะเลี้ยงจะได้ผลดีขึ้นหากจะใช้ร่วมกับ Pre-enrichment broth¹ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าวิธีการนี้ช่วยให้การพิสูจน์เชื้อง่ายขึ้น แต่ก็ยังต้องใช้ เวลามากอยู่ดี ในช่วงปี ค.ศ. 1989 ก็ได้มีการพัฒนา commercial kit (API 20NE) สำหรับ พิสูจน์เชื้อนี้ได้โดยตรง² ซึ่งเป็นวิธีการที่สะดวกทำได้ง่าย มีโอกาสผิดพลาดน้อยมาก เหมาะ สำหรับบุคลากรและห้องปฏิบัติการที่ยังไม่คุ้นกับเชื้อนี้ เช่น ห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้อยู่ในถิ่นระบาด ของเชื้อ แม้ว่า commercial kit ดังกล่าวจะช่วยได้มาก แต่มีราคาที่ค่อนข้างจะสูง (ได้ทราบมาว่า ในอังกฤษ การทดสอบแต่ละครั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายประมาณ 2 ปอนด์) นอกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เหล่านี้ ในปัจจุบันยังมี media อื่น ๆ ที่ช่วยให้การแยกเชื้อสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพมาก ขึ้นอีก เป็นต้นว่า

- CVCB medium สำหรับใช้แยกเชื้อจากดินโดยเฉพาะ (ประกอบด้วย trypticase soy broth ที่ใส่ 0.5 mg crystal violet และ 2 mg colistin/ลิตร) ก่อนที่จะนำไปทำ subculture ลงใน Ashdown medium ต่ออีก 48 ชม.³

- TBSS medium ซึ่งประกอบด้วย basal salt solution ที่มี L-threonine ด้วยจะให้ผลดีกว่า CVCB medium ในการแยกเชื้อจากดิน^{3a} โดยเฉพาะหากใส่ colistin ลงไปด้วย เพื่อลดไม่ให้เชื้ออื่นในดินเจริญเติบโต นอกจากนั้นนักวิจัยกลุ่มนี้ยังใช้อุณหภูมิ 42°C ในการเพาะแยกเชื้อ โดยให้เหตุผลว่าการใช้อุณหภูมิสูงขึ้นก็เป็น selective condition อีกอย่างหนึ่งเหมือนกัน
- ปัญหาที่สองคือการที่เชื้อ *B. pseudomallei* ออกจากเชื้อ *B. cepacia* หรือ *B. mallei* ซึ่งมีคุณสมบัติหลาย ๆ อย่างที่คล้ายกันมาก แม้ว่าตามทฤษฎีอาจจะไม่ยากเท่าใด เช่น หากใช้ motility test เราก็ควรที่จะคัด *B. mallei* ออกไปได้แล้ว แต่ปัญหาหลักคือการแยก *B. cepacia* ซึ่งมีคุณสมบัติอื่น ๆ หลายอย่าง เช่น cellular fatty acid profile และ pH of acid activity pattern phosphatase ที่เหมือน ๆ กัน ดังนั้น ในการพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* เราจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการทดสอบหลาย ๆ วิธีร่วมกัน จึงจะสามารถพิสูจน์และแยกออกจากกันได้ และเมื่อปี ค.ศ. 1992⁴ ก็ได้มีการพัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของ commercial kit ที่เรียกว่า Minitek disc ที่ใช้สำหรับแยกเชื้อ *B. cepacia* จากเชื้อ *B. pseudomallei* ได้เป็นอย่างดี ซึ่งประกอบด้วย paper disc ที่มีสารที่เป็น substrate ของ enzyme หลาย ๆ ชนิดสำหรับทดสอบ enzymes หลายตัว ซึ่งสร้างด้วยเชื้อใดเชื้อหนึ่งเท่านั้น และทำให้ได้ผลรวมออกมาเป็น enzyme pattern ซึ่งใช้ในการ differentiate เชื้อทั้งสองนี้ได้โดยรวม ๆ แล้วกว่าจะ identify ได้ จึงไม่ใช่เรื่องง่าย และในปัจจุบันเรายังไม่มี typing sera สำหรับการนี้โดยตรง อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันกลุ่มนักวิจัยที่คณะวิทยาศาสตร์ และที่คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ได้พัฒนา monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะสำหรับใช้ในการ identify เชื้อนี้แล้ว นอกจากนี้เมื่อเร็ว ๆ นี้ก็ได้มีนักวิจัยชาวรัสเซียได้รายงานถึงการใช้ bacteriophage ในการพิสูจน์เชื้อ *Pseudomonas* species ต่าง ๆ อีกด้วย^{4a}

Research questions

1. พัฒนา Specific reagents สำหรับใช้ในการตรวจสอบเชื้อให้ได้ง่าย ๆ และรวดเร็ว เช่น
 - Monoclonal antibodies
 - DNA probes (ดูบทที่ 5 Laboratory Diagnosis)
 - Bacteriophages
2. วิธีการใหม่ ๆ สำหรับในการจัดกลุ่มเชื้อ เช่น Ribotyping (ดูส่วนที่ 5 ของบทนี้) และ Arabinose typing

2. ADAPTABILITY & PHENOTYPIC VARIATION

แม้ว่าการเพาะเลี้ยงและพิสูจน์แยกเชื้อ *B. pseudomallei* จะไม่ใช่ของยากสำหรับนักวิทยาศาสตร์ที่ทำงานเกี่ยวกับเรื่องนี้ หรือสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์และงบประมาณที่ไม่จำกัด แต่ก็ยังเป็นการยากสำหรับผู้ที่ไม่คุ้นเคยกับเชื้อนี้ โดยเฉพาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่ไม่อยู่ในถิ่นระบาดของโรคนี้ ทั้ง ๆ ที่เชื่อนี้เป็นเชื้อที่เลี้ยงขึ้นได้ค่อนข้างจะง่าย ปัญหาที่พบอยู่บ่อยครั้ง คือการที่เชื่อนี้มี phenotypic variation ค่อนข้างจะสูง เป็นต้นว่า ลักษณะของ colonies ก็ไม่แน่นอน เชื้อชนิดเดียวกัน strain เดียวกัน บางครั้งก็ให้ลักษณะ colonies ที่ดูแตกต่างกัน เช่น อาจมีลักษณะที่เป็นได้ทั้ง mucoid, smooth หรือ rough appearance หรือเชื้อที่ได้มาจาก colony เดียวกัน อาจมี electron microscopic appearance ต่างกัน เช่น เชื้อบางตัวดูเหมือนคล้าย ๆ กับว่ามี macrocapsule อยู่รอบ ๆ แต่บางตัวอาจมีคล้าย ๆ กับ microcapsule และมี density ที่แตกต่างกันไป หรือเชื้อบางตัวก็ดูเหมือนกับว่าไม่มี capsule เลย การศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้มีการทำกันค่อนข้างมากโดยเฉพาะในนักวิจัยชาวรัสเซียและยุโรปตะวันออก แต่ไม่สามารถติดตามรายละเอียดต่าง ๆ ได้ เนื่องจากตีพิมพ์ในวารสารรัสเซียเกือบทั้งนั้น นอกจากนี้เชื้อที่ดูเหมือนมีลักษณะทางชีวเคมีเหมือนกันทุกอย่าง แต่มีความรุนแรงออกฤทธิ์ (virulence) ที่แตกต่างกัน เป็นต้นว่า เชื้อที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลองนาน ๆ เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงต่ำ (laboratory strain) แต่ก็ยังสามารถทำให้เกิดโรคได้ (โดยดูจากการที่เคยมีนักวิทยาศาสตร์ติดโรคนี้ได้เมื่อเกิดอุบัติเหตุทำหลอดเลี้ยงเชื้อชนิด laboratory strain แตกในขณะปั่นเชื้อ) เมื่อนำ laboratory strain ไปใช้เพื่อให้สัตว์ทดลองเกิดโรค ก็พบว่าต้องใช้เชื้อในปริมาณที่สูงมาก แต่หากทำ serial passages ในสัตว์ทดลองหลาย ๆ ครั้ง ก็พบว่าเชื่อนี้มีความรุนแรงสูงขึ้นและเปลี่ยนจาก less virulent lab strain เป็น more virulent strain ได้ แต่เชื่อนี้ก็ยังมี phenotypic properties อื่น ๆ เหมือนเดิม และ differentiate ออกจากกันไม่ได้

อาจจะเป็นเพราะเชื่อนี้มี phenotypic variation ค่อนข้างสูง จึงทำให้มันสามารถที่จะปรับตัวของมันเองให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ต่าง ๆ กัน และอาจจะไม่ค่อยเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่น ๆ เป็นต้นว่า ในสภาวะหนึ่งเชื้อจะเจริญเติบโตได้ดีและมีความรุนแรงมาก แต่ในอีกสภาวะหนึ่งเชื้อเดียวกันนี้ (เช่น เมื่อต้องใช้ metabolic pathway ที่แตกต่างกันไป) อาจกลายเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงน้อยก็ได้ หรือในอีกสภาวะหนึ่ง เช่น เมื่อมีอาหารที่ไม่เหมาะสม เชื้อก็จะปรับตัวให้สามารถใช้พลังงานน้อยกว่าที่เคย และทำให้มันสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะนี้เป็นเวลานาน ตัวอย่างของ adaptability ในลักษณะอื่น ๆ ของเชื้อ *B. pseudomallei* ยังมีมาก เช่น

- สามารถเปลี่ยนจาก aerobic ไปเป็น anaerobic metabolism ได้ เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณที่มี low oxygen tension จึงเป็นไปได้ว่าทำไมมันจึงมีชีวิตอยู่ได้ในดินลึก ๆ หรือในบาดแผลได้เป็นเวลานาน
- เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรด และอุณหภูมิสูง (เช่น ในดินแถบอีสาน) และอาจเป็นไปได้หรือไม่ว่าในสภาวะนี้เชื้อจะมีความรุนแรงสูง และเป็นสาเหตุหนึ่งที่

ทำให้พบโรคเมลิออยโดสิสในคนอีสานสูงกว่าคนทางภาคใต้ ซึ่งมีสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน

- สามารถที่จะปรับตัวเองให้ใช้พลังงานแต่เพียงน้อย ๆ และทำให้มันมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานาน (unfavorable dormant state เช่น ในเซลล์ของเม็ดเลือดขาว)
- ในบางสภาวะเชื้ออาจสามารถสร้าง glycocalyx ซึ่งทำหน้าที่เป็น biofilm และช่วยให้เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (เช่น ในตัว host ที่มีภูมิคุ้มกันในระดับสูง)
- ในสภาพแวดล้อมบางอย่าง เชื้ออาจจะสามารถ regulate expression ของ virulence gene(s) ได้ และทำให้มีความรุนแรงต่าง ๆ กันออกไป
- เป็นไปได้หรือไม่ว่าบนผิวนอกของเชื้อจะมีองค์ประกอบที่ทำหน้าที่คล้าย ๆ กับเป็น "Sensor system" ที่ทำให้มันสามารถปรับตัวเข้ากับ environment ต่าง ๆ ได้ เช่น
 - Receptor สำหรับ insulin ซึ่งทำหน้าที่คล้าย ๆ กับ ligand ที่ไปกระตุ้นให้เชื้อสร้าง growth inhibitory factor และใช้อธิบายได้ว่าทำไมเชื้อจึงเจริญได้ดีใน serum ที่มีระดับ insulin ต่ำ แต่เจริญได้ช้าใน serum ที่มีระดับ insulin สูง⁵ ซึ่งตรงกับข้อเท็จจริงที่พบโรคนี้บ่อยในผู้ที่ เป็นโรคเบาหวาน
 - การสร้าง acid phosphatase ได้หลาย ๆ ชนิดที่มี optimal enzyme activity ที่ต่างกันและปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจขึ้นอยู่กับ degree of glycosylation (e.g., highly glycosylated acid phosphatase บน cell surface มี pH optimal สูง และทนต่อความร้อนได้ดีกว่า acid phosphatase ที่มี glycosylation ต่ำและพบมากภายในเซลล์ของตัวเชื้อ)

Research questions

Correlation of different colonial morphology with

- virulence
- antigenicity
- antibiotic susceptibility
- stability of infectivity
- growth rate
- etc.

3. ANTIGENS

การศึกษาเกี่ยวกับแอนติเจนของเชื้อ *B. pseudomallei* ยังมีน้อยและไม่ลึกซึ้ง เหมือนกับที่มีการศึกษากันในเชื้อ Gram-negative bacilli อื่น ๆ เช่น *Salmonella* หรือ *Escherichia*^{6, 7} เนื่องจากเป็นเชื้อซึ่งไม่ค่อยเป็นที่น่าสนใจสำหรับนักวิทยาศาสตร์ในประเทศ ตะวันตกส่วนมาก

เพื่อให้สะดวกในการวิเคราะห์ เราจะจัดกลุ่มของแอนติเจนของ *B. pseudomallei* ออกได้เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ 4 กลุ่ม คือ secreted (metabolic) antigen หรือ exoantigen, envelope หรือ K antigen, somatic antigen และ flagella antigens ซึ่งพอจะสรุปอย่างคร่าว ๆ ได้ดังนี้คือ

3.1 Secreted antigen เป็นแอนติเจนที่พบได้ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเกิดจากการที่เชื้อ สร้างแล้ว secrete ออกมาเป็น exoantigen จริง ๆ หรือเกิดจากการที่เชื้อตายแล้วและมีการ lysis เกิดขึ้น (เป็นส่วนที่อยู่ภายในเซลล์และไม่ได้ secrete ออกมาจริง ๆ) หากต้องการที่จะ differentiate จริง ๆ ว่าเป็นลักษณะใด คงจะต้องนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงไว้ในระยะสั้น ๆ และเก็บ มาศึกษาก่อนที่เชื้อจะเริ่มตาย แต่เป็นวิธีการนี้ไม่ค่อยสะดวก ในส่วนของ exoantigen ที่เป็น excreted product จริง ๆ ที่มีการศึกษากันมากคือพวก exotoxins และ enzymes ซึ่งสำหรับเชื้อ นี้จะมีมากมายหลายชนิด และมีความเป็นไปได้สูงที่บางชนิดจะมีความสัมพันธ์กับความรุนแรง ของเชื้อ (จะสรุปและวิจารณ์อยู่ในส่วนถัดไป) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลใหม่ ๆ ชี้แนะว่า ในน้ำ เลี้ยงเชื้อของ *B. pseudomallei* ก็มีองค์ประกอบที่เป็นส่วนของตัวเชื้อปนรวมอยู่ด้วย เช่น lipopolysaccharide (LPS)

นอกจาก LPS แล้ว ยังมีพวก polysaccharide อื่น ๆ ปะปนอยู่ด้วยเหมือนกัน ซึ่งคาดว่า คงจะเป็นส่วนของ soluble product ที่หลุดละลายออกมาจากส่วนที่เป็น slime layer

3.2 Envelope antigen ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผนังรอบนอกของเชื้อ ซึ่งมีความสลับซับซ้อนมากเหมือนกับที่พบใน Gram-negative bacteria อื่น ๆ คือมีตั้งแต่ cytoplasmic หรือ plasma membrane และ peptidoglycan ไปจนถึง LPS ซึ่งเป็นส่วนของ "Outer membrane" ของเชื้อ Gram negative ทั่ว ๆ ไป และองค์ประกอบส่วนนอกออกไปอีกคือ capsule และ slime layer ดังที่ได้กล่าวแล้ว เชื้อ *B. pseudomallei* มีคุณสมบัติบางอย่างที่ทำให้ศึกษาได้ยาก คือในด้าน ของรูปร่างลักษณะของ colony ซึ่งแตกต่างกันตั้งแต่ mucoid ไปถึง smooth และ rough โดย ปรกติลักษณะทั่ว ๆ ไปของ colony จะขึ้นอยู่กับ การสร้าง capsule หรือ slime layer และสำหรับ เชื้อนี้มีผู้รายงานว่าบางครั้งก็พบว่ามี capsule แต่บางครั้งก็ไม่มี แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นปริมาณของทั้ง capsule และ slime layer ที่สร้างคงจะขึ้นกับชนิดและปริมาณของสารอาหาร รวมถึงสภาวะของ การเพาะเลี้ยงมากกว่าอย่างอื่น กลุ่มนักวิจัยที่ ร.พ. ราชวิถี ร่วมกับนักวิจัยที่ประเทศแคนาดา ได้รายงานไว้ว่าเชื้อนี้สร้างพวก slime layer และ extracellular polysaccharide (ซึ่งมีองค์ ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล mannose) ได้ในปริมาณมากเรียกว่า glycocalyx ซึ่งทำหน้าที่เป็น biofilm คล้าย ๆ กับเป็นเกราะป้องกันตัวมันเอง^{8, 9} การที่เชื้อรวมกันอยู่ได้เป็นกลุ่ม ๆ โดยมี

glycocalyx เป็นตัวยึด ทำให้เชื้อสามารถคงทนอยู่ได้ภายในเซลล์ของ host หรือนอกเซลล์โดยไม่ถูกทำลาย และในทางตรงกันข้าม การที่มี glycocalyx ทำให้การผ่านเข้าออกของสารอาหารหรือสารพิษเป็นไปได้อย่างลำบาก แต่มันก็ยังสามารถคงทนและมีชีวิตอยู่ได้ และวันดีคืนดีเมื่อมีความเปลี่ยนแปลงบางอย่างในตัวของ host เชื้อก็อาจสามารถ ออกมาจาก dormant state และเริ่มเจริญเติบโต และทำให้อาการของโรคกลับมาอีก (relapse) นอกจากนี้โครงสร้างดังกล่าวอาจมีส่วนร่วมในการที่ทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถเข้าไปถึงตัวเชื้อได้⁷ และมีความเป็นไปได้ว่าทำไมเมื่อเราเปรียบเทียบ antibiotic susceptibility testing ในห้องทดลองและที่ใช้จริงในผู้ป่วย จึงให้ผลที่ไม่ตรงกันเสมอไป เมื่อเดือนตุลาคม ค.ศ. 1995 นี้เอง กลุ่มนักวิจัยจากประเทศเยอรมัน^{7a} ได้รายงานการใช้ monoclonal antibody ในการศึกษาคุณสมบัติของ exopolysaccharide ของเชื้อ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 150 kDa และเป็นองค์ประกอบที่จำเพาะสำหรับเชื้อนี้เท่านั้น

นอกจาก extracellular หรือ surface polysaccharide เหล่านี้แล้ว เรายังพบว่า outer surface ของ cell wall ยังมีพวกสารประเภท glycoprotein อีกด้วย ซึ่งบางตัวมีคุณสมบัติเป็น enzyme เช่น acid phosphatase และจากที่ได้กล่าวมาแล้วอาจทำหน้าที่คล้าย ๆ กันเป็น sensor system ให้เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะต่าง ๆ กันได้

นอกจากองค์ประกอบเหล่านี้แล้ว ยังมี LPS และ peptidoglycan-associated peptides ที่เป็นองค์ประกอบของ outer membrane (ซึ่งถึงแม้ว่าจะเป็นส่วนหนึ่งของ cell envelop ก็ตาม เพื่อความต่อเนื่องจะนำไว้กล่าวรวมไว้ในส่วนของ somatic antigens)

3.3 Flagellin antigen flagella ของเชื้อ *B. pseudomallei* เป็น polar flagella คือพบได้ตรงปลายใดปลายหนึ่ง และอาจจะมีจำนวนมากกว่า 1 เส้นก็ได้ ซึ่งต่างไปจากเชื้อ *B. mallei* ที่ไม่มีเลย อย่างไรก็ตาม *Burkholderia* และ *Pseudomonas* species อื่น ๆ ก็มี flagella ได้เหมือนกัน แต่ monomeric flagellin protein ของเชื้อ *Burkholderia* และ *Pseudomonas* แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติทางเคมีต่างกัน¹⁰ เป็นต้นว่า ของ *P. stutzeri* และ *P. aeruginosa* มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 45,000-55,000 คาลตัน และของ *B. cepacia* และ *X. maltophilia* มีขนาด 31,000-45,000 คาลตัน นักวิทยาศาสตร์ชาวแคนาดาได้รายงานไว้เมื่อเร็วๆ นี้ ว่า *B. pseudomallei* flagellin ซึ่งเป็น nonsheathed flagella นั้นมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 43,400 ซึ่งอยู่ในขนาดใกล้เคียงกับ flagellin ของ *B. cepacia* แต่เมื่อทำ amino acid analysis พบว่าไม่ต่างไปจาก flagellin ของเชื้ออื่น ๆ ในกลุ่มนี้มากนัก โดยเฉพาะการเรียงตัวของกรดอะมิโนในทาง N-terminal sequence นั้น คล้ายกันมาก และน่าจะเป็นส่วนที่เชื้อ conserved ไว้ ในปัจจุบันมีความพยายามที่จะ clone gene ของเชื้อนี้ และนำไปเปรียบเทียบกับของเชื้อใกล้เคียงกันที่อยู่ในกลุ่มอื่น ๆ ซึ่งก็พบว่า มี gene sequence บางส่วนที่จำเพาะสำหรับเชื้อ *B. pseudomallei* อย่างเดียว และจากการทำ immunoblotting analysis ก็พบว่า flagellin ของเชื้อแต่ละ strain (65 strains) นั้นเหมือนกันมาก โดยพบว่า 64 จาก 65 เชื้อตัวอย่างสามารถทำปฏิกิริยากับ polyclonal rabbit antiserum ที่เตรียมได้จากการฉีดกระตุ้นด้วย purified flagellin และนักวิจัยกลุ่มนี้ยังได้แสดงต่อไปอีกว่า antiserum ดังกล่าวสามารถป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ทดลองได้อีก

ด้วย (โดยทดลองในหนู Rat ที่ทำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด Streptozotocin¹⁰) แม้ว่ากลไกในการป้องกันการเกิดโรคโดยแอนติบอดีจะยังไม่เป็นที่ทราบกัน แต่คาดว่ากลไกหนึ่งน่าจะมาจากการที่แอนติบอดีไปขัดขวางการเคลื่อนไหวและทำให้ตัวเชื้อแพร่กระจายได้ไม่ดี

3.4 Somatic antigen แอนติเจนในกลุ่มนี้ รวมถึงที่พบใน cytoplasm และที่เป็น membrane-associated (เช่น LPS และ peptidoglycan-associated peptides) อย่างไรก็ตาม เมื่อพูดถึง somatic antigen ส่วนมากเราจะนึกถึง envelope component เท่านั้น โดยเฉพาะ LPS ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามพวก (Cross reaction) กับเชื้อในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน สำหรับองค์ประกอบทางเคมีและความสำคัญของ peptidoglycan-associated peptides นั้น ยังมีการศึกษากันค่อนข้างน้อย แต่ในปีที่ผ่านมา มีนักวิจัยในกลุ่มของ Wellcome ร่วมกับกลุ่มทางประเทศแคนาดา¹¹ ได้รายงานว่าสามารถเตรียม outer membrane ได้ค่อนข้างจะบริสุทธิ์ และแยกออกได้เป็น 2 ส่วน คือ OM-1 และ OM-2 ซึ่งมีคุณสมบัติคล้าย ๆ กัน เมื่อนำเอา OM-1 มาศึกษาอย่างละเอียด พบว่าประกอบด้วย polypeptides หลายชนิด แต่มีอยู่ 5 ชนิดที่มีขนาดโมเลกุล 70,000, 38,000, 31,000, 24,000 และ 17,000 ดาลตัน ซึ่งพบได้ในทุก strain ของ *B. pseudomallei* และสำหรับโมเลกุลขนาด 38,000 ดาลตันนั้น ในตัวเชื้อจะอยู่เป็น oligomer ที่มีขนาด 110,000 (แต่จะแตกตัวเป็น monomer โดยความร้อนที่ 95°C) จากการศึกษาเพิ่มเติมก็พบว่าโปรตีนนี้ทำหน้าที่คล้ายกับ Porin ที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารอาหารโมเลกุลเล็ก ๆ

ส่วน lipopolysaccharide (LPS) หรือที่รู้จักกันว่า endotoxin เป็น macromolecule ซึ่งประกอบด้วยสารเคมี 3 ส่วน คือส่วนในสุดที่เรียกว่า Lipid A ซึ่งเป็นส่วนที่ incorporate อยู่กับ lipid bilayer และเป็นส่วนที่มี biological activity และพิษมากที่สุด ส่วนนี้มี covalent bonding กับ polysaccharide ซึ่งประกอบขึ้นด้วย polysaccharide core (เชื่อมกับ Lipid A ด้วย KDO) และ repeated polysaccharide side chains ซึ่งเป็นส่วนที่ให้ความจำเพาะสำหรับเชื้อแต่ละชนิด LPS ที่มีองค์ประกอบครบทั้ง 3 ส่วนนี้ เรียกว่า smooth type LPS พวกที่ไม่มี repeated side chain คือมีแต่ core polysaccharide กับ Lipid A เป็น rough LPS โดยปกติ LPS จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28,000-30,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับขนาดของ repeated subunit และจำนวนของ subunit เราสามารถที่จะ extract LPS ออกจากเซลล์โดยใช้ phenol และเมื่อวิเคราะห์โดย SDS-PAGE และย้อมด้วย silver stain จะเห็นเป็น ladder appearance ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ smooth LPS ทั่ว ๆ ไป และเมื่อทำ immunoblotting โดย probe ด้วย Anti-LPS จะเห็น ladder pattern คล้าย ๆ กัน แต่ไม่ค่อยชัดเหมือนย้อมด้วย silver เท่านั้น

LPS ของ *B. pseudomallei* นั้นค่อนข้างจะ homogeneous และมีคุณสมบัติทางเคมีและภูมิคุ้มกันวิทยาเหมือนกันทุก strain¹² อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าส่วนที่เป็น fatty acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ Lipid A นั้น ต่างไปจาก LPS ซึ่งเตรียมจากเชื้ออื่น ๆ^{13, 14} คือองค์ประกอบส่วนนี้ของ *B. pseudomallei* LPS เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของเชื้อ ดังจะเห็นได้ว่า เท่าที่มีการสำรวจกันไว้ antiserum ต่อ LPS ที่เตรียมจากเชื้อนี้ ไม่มี cross reaction กับเชื้ออื่น¹⁵ นอกจาก

นี้ยังมีรายงานอีกว่าเมื่อฉีด LPS เข้าไปในสัตว์ทดลอง จะทำให้สัตว์นี้มีความต้านทานต่อการติดเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ฉีด¹⁰ ซึ่งแสดงให้เห็นว่านอกจากมีฤทธิ์เป็น endotoxin แล้ว ตัวมันเองยังทำหน้าที่เป็น protective antigen ได้ด้วยเหมือนกัน

Research questions

1. เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่ง่ายและสะดวกสำหรับแยก antigen component เหล่านี้ให้บริสุทธิ์ในปริมาณที่จะนำมาศึกษาอย่างละเอียดต่อไป ดังนั้น น่าจะนำเทคโนโลยีและเครื่องมือแยกสารสมัยใหม่สำหรับเตรียมให้ได้องค์ประกอบที่บริสุทธิ์ พร้อมทั้งหาชนิดและ cultural condition ที่เหมาะสมเพื่อ enrich องค์ประกอบที่ต้องการเตรียมด้วย

2. ดังที่ได้กล่าวไว้ในตอนแรกแล้วว่า เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อที่มี phenotypic variation สูง จึงน่าจะศึกษาต่อว่า คุณสมบัติข้อนี้รวมไปถึง antigenic variation ด้วยหรือไม่ เพื่อจะได้ใช้เป็นแนวทางว่าจะใช้ serotyping ในการจำแนกเชื้อได้หรือไม่ หรือเพื่อใช้เป็น marker สำหรับใช้แยกว่าเชื้อประเภทใดทำให้เกิด clinical หรือ subclinical และเชื้อประเภทใดที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด relapse หรือดูว่าชนิดใดสัมพันธ์กับการเป็น Arabinose positive และ Arabinose negative เป็นต้น

3. การศึกษา immune response ในผู้ป่วย เพื่อดูว่าองค์ประกอบใดกระตุ้น humoral และองค์ประกอบใดกระตุ้น cellular response ซึ่งจะได้นำข้อมูลไปวิเคราะห์เพื่อหาผลในทางประยุกต์ต่อไป เช่น ในการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรค หรือหาทางป้องกันโรค

4. ควรที่จะเตรียม reagents สำหรับใช้ในการศึกษาแง่มุมต่าง ๆ ของเชื้อนี้ต่อไป เช่น monoclonal antibodies, DNA probes, หรือแม้กระทั่ง polyclonal antibodies ที่มีความจำเพาะต่อองค์ประกอบหรือ epitopes ต่าง ๆ

5. Characterize antigen ต่าง ๆ ของเชื้อให้ละเอียดขึ้น เพื่อความก้าวหน้าในด้านพัฒนาความรู้พื้นฐานทางวิชาการ และอาจนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ต่อไป

6. หา experimental animal model อื่น ที่เหมาะสมเพิ่มขึ้นอีกนอกเหนือจากหนูแฮมสเตอร์ และ guinea pig เพื่อใช้ศึกษา host-parasite relationship ได้สะดวก หรือแม้กระทั่งหา cell line ที่เหมาะสมจะใช้เป็น in vitro study ในบางแง่มุม เช่น เกี่ยวกับ toxin ของเชื้อ

4. VIRULENCE

เป็นที่ยอมรับกันว่า เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงมาก ทำให้เสียชีวิตได้ในการเกิดของ acute septicemic form (แม้จะได้รับการวินิจฉัยและดูแลรักษาอย่างถูกต้องแล้วก็ตาม) ไปจนกระทั่งทำให้เกิดแต่เพียง subclinical infection ซึ่งตรวจพบโดยการตรวจพบ antibody ต่อเชื้อนี้เท่านั้น แต่ทำไมเชื้อถึงสามารถหลบอยู่เฉย ๆ ในร่างกายได้เป็นเวลานานนับสิบปี และจะแสดงออกเป็นครั้งคราวเท่านั้น ข้อสงสัยเหล่านี้ยังไม่มีคำตอบเพราะเรายังไม่

ทราบเกี่ยวกับ virulence factor และ mechanism of pathogenicity และความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อและผู้ป่วย ดีพอ ดังนั้น หากมีการพัฒนาความรู้ในด้านนี้ได้มากเท่าใด เร็วเท่าใด ก็จะทำให้เราสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อดูแลผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นได้เท่านั้น

ผลจากการศึกษาในผู้ป่วยและในสัตว์ทดลอง แสดงให้เห็นว่า virulence factors ที่สำคัญ ๆ คือ exotoxin(s) และ LPS สำหรับ LPS นั้นยังไม่มีข้อมูลที่เด่นชัดที่จะสรุปว่ามีกี่ชนิดและแต่ละชนิดอาจมี biological activity แตกต่างกันหรือไม่¹⁶⁻¹⁸ แต่เมื่อเร็ว ๆ นี้มีรายงานว่า LPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ทุก strains มีคุณสมบัติเหมือนกัน¹² และน่าจะมียูเพียเพียงชนิดเดียว ส่วน exotoxins นั้นมีแน่ ๆ แต่จะเป็น critical factor ในการทำให้เกิดโรคหรือไม่ และความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับสารพิษเหล่านี้หรือไม่ นอกจากองค์ประกอบสำคัญ 2 ชนิดที่กล่าวมาแล้วนี้ ยังมีองค์ประกอบอื่นที่มึนนักวิทยาศาสตร์พูดถึง เช่น acid phosphatase, insulin receptor, iron-binding siderophore (Malleobactin), flagella และ mortality enhancing peptide เป็นต้น ข้อมูลสำคัญ ๆ ที่พอจะสรุปได้มีดังนี้คือ

4.1 Lipopolysaccharide (LPS: endotoxin) ปัญหาหลักของ *B. pseudomallei*

LPS คือการเตรียมเพื่อให้ได้ LPS ที่บริสุทธิ์ในปริมาณมากพอที่จะนำมาศึกษาให้ละเอียดลึกซึ้งขึ้น จากความรู้ทางเคมีที่เกี่ยวกับโครงสร้างของ LPS นั้น ได้พบข้อแตกต่างที่สำคัญคือไม่สามารถตรวจพบ KDO ใน LPS ของเชื้อนี้^{13, 14} และ binding ระหว่าง inner polysaccharide core และ Lipid A นั้น ทนต่อ acid hydrolysis¹⁴ มากกว่าที่พบได้ใน LPS ของเชื้ออื่น ๆ อย่างไรก็ตาม biological activities ของ LPS ของเชื้อนี้ ไม่ค่อยจะแตกต่างไปจาก LPS ของเชื้ออื่น ๆ อย่างเด่นชัด เป็นต้นว่า LPS ของ *B. pseudomallei* มี mitogenic activity, TNF inductivity, body weight decreasing และ lethality คล้าย ๆ กันกับที่เคยมีการศึกษาไว้ในเชื้ออื่น ๆ¹⁸ อย่างไรก็ตาม มีข้อมูลที่น่าสนใจคือสามารถตรวจพบ LPS ได้ในน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง (secreted LPS) ซึ่งต่างไปจากในกรณีของ *B. cepacia* และของเชื้ออื่นที่มีเฉพาะ cell-bound LPS เท่านั้น และแทบไม่พบในน้ำเลี้ยงเชื้อเลย ดังนั้น จะเห็นได้ว่า สำหรับเชื้อนี้ LPS อาจทำหน้าที่คล้าย ๆ กับ exotoxin ได้อีกด้วย และอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ Septicemia ที่เกิดจากเชื้อนี้มีความรุนแรงมาก

เชื่อว่า LPS เป็น predominant antigen ที่ใช้ในการทำ indirect hemagglutination เนื่องจากการเตรียมแอนติเจนสำหรับใช้ทดสอบด้วยวิธีนี้ ส่วนใหญ่ใช้ความร้อนในระดับที่ protein antigen จะถูกทำลายหรือมีโครงสร้างเปลี่ยนไปหมดแล้ว นอกจากนี้เมื่อเร็ว ๆ นี้ มีการเตรียม LPS โดยใช้วิธี phenol extraction เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีโดยกลุ่มนักวิจัยไทยและญี่ปุ่นที่ NIH¹⁵ และกลุ่มของนักวิจัยที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ใช้ monoclonal antibody (ซึ่งคาดว่ามีความจำเพาะต่อ LPS) ในการเตรียม affinity purified antigen สำหรับใช้ตรวจหาระดับของ antibody ในผู้ป่วยโดยวิธี indirect ELISA ซึ่งปรากฏว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจมากในระดับหนึ่ง¹⁹

4.2 Exotoxin(s) การศึกษาในเรื่องนี้ยังไม่ลึกซึ้งและก้าวหน้าไปช้ามาก อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษากันมากอยู่พักหนึ่งคือ ในระหว่างปี ค.ศ. 1959-1965²⁰⁻²² โดยนักวิจัยในสหรัฐอเมริกา ซึ่งให้ข้อมูลที่มีคุณค่ามาก และน่าที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติม ในปัจจุบันมีนักวิจัยอีกกลุ่มหนึ่งที่กำลังการศึกษาละเอียดขึ้น คือกลุ่มนักวิจัยชาวมาเลเซีย โดยศึกษาในช่วงตั้งแต่ประมาณปี ค.ศ. 1982 เป็นต้นมา²³⁻²⁹

สำหรับกลุ่มของ Heckly และ Nigg²⁰⁻²² ในสหรัฐอเมริกานั้น ได้พยายามที่จะนำเอาน้ำเลี้ยงเชื้อมาแยกเพื่อให้ได้องค์ประกอบที่บริสุทธิ์จาก crude culture fluid ด้วยวิธีที่มีใช้กันอยู่ในขณะนั้น เพื่อใช้สำหรับศึกษา biological activity หลาย ๆ อย่าง เป็นต้นว่า lethality, dermonecrosis, proteolysis, hemolysis และ cytotoxicity แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร แต่อย่างน้อยที่สุด สามารถที่จะใช้วิธี differential denaturation หลาย ๆ วิธี (เช่น การใช้กรดและด่างอ่อน ๆ ความร้อน หรือ urea) พบว่า activity แต่ละอย่างขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่ต่างกัน ซึ่งผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้สูงที่จะเตรียมองค์ประกอบเหล่านี้ให้บริสุทธิ์ได้หากมีการนำวิธีการและเครื่องมือสมัยใหม่มาใช้

สำหรับกลุ่มวิจัยของ Ismail จากประเทศมาเลเซียนั้น เขาได้พยายามศึกษาค้นคว้ามากและลึกซึ้ง ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์มาก หากจะมีผู้อื่นสามารถทำตามได้ นักวิจัยกลุ่มนี้สนใจ lethal toxin โดยได้พยายาม partially purified toxic material จากน้ำเลี้ยงเชื้อ^{24, 25} และพบว่า lethal toxin เป็นคนละส่วนกับที่เป็น dermonecrotic toxin และ hemolysin lethal toxin นี้เป็น heat labile component ซึ่งไม่ทนต่อการย่อยด้วย trypsin toxin นี้ นอกจากจะสามารถฆ่าหนูแล้ว ยังมี cytotoxic activity ต่อ mammalian cell line หลายชนิด²⁵ และในปี ค.ศ. 1987 ก็สามารถเตรียม toxin นี้ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ gel filtration และพบว่ามีขนาดโมเลกุลประมาณ 31,000 ดาลตัน²⁶ toxin ดังกล่าวสามารถหยุดยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและ DNA ได้เมื่อทดสอบกับ cultured macrophages มีรายงานเพิ่มเติมว่าการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนนั้นเกิดขึ้นทันทีหลังจากใส่ toxin เพียง 0.06-2.0 µg/ml²⁸ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อมูลว่ากลไกดังกล่าว พบในสัตว์ทดลองหรือไม่ การเกิดโรคตามธรรมชาติในแกะ ทำให้มันสร้าง antitoxin ต่อ toxin ได้²⁷ นอกจากนี้มีการทดลองเพิ่มเติมต่อมาว่าหนูที่ได้รับการฉีด toxin สามารถสร้างความต้านทานการติดเชื้อได้เป็นอย่างดี นักวิจัยกลุ่มนี้ยังได้เตรียม monoclonal antibody ต่อ exotoxin นี้ และได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณของสารพิษโดยวิธีการ MAb-based competitive ELISA²⁶ เพื่อประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้วัดสารพิษในผู้ป่วย ซึ่งน่าจะมีประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยาของโรคอีกด้วย²⁹

4.3 Hemolysins มีข้อมูลบางอย่างที่ชี้แนะว่า toxin ชนิดนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดโรค เช่น จากกลุ่มของ Ashdown ที่ประเทศออสเตรเลีย³⁰ และกลุ่มของนักวิจัยไทยที่คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ แม้ว่าในปัจจุบันนี้เราจะยังไม่สามารถสรุปชัดในเรื่องที่เกี่ยวกับกลไกของ hemolysis แต่มีข้อมูลที่พอจะสรุปได้ว่า hemolysin ที่สร้างโดยเชื้อ *B. pseudomallei* นั้น อาจมีมากกว่า 1 ชนิด ชนิดที่พบใน strain เกือบทุก strain นั้น เป็นโมเลกุลที่มี activity ไม่ค่อยสูง และ

ทนต่อความร้อนได้ดี ส่วน hemolysin อีกชนิดหนึ่งนั้นพบได้น้อยในตัวอย่าง แต่เป็นชนิดที่ไม่ทนต่อความร้อนและมี activity สูง สารพิษในกลุ่มหลังนี้มีคุณสมบัติคล้าย ๆ กับ hemolysin ที่สร้างโดยเชื้อ *B. cepacia*

4.4 Mortality enhancing polypeptide (MEP) นักวิจัยจากสหรัฐอเมริกาได้พบในปี ค.ศ. 1955 ว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สร้างโมเลกุลที่มีขนาดค่อนข้างจะเล็ก คือมีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยประมาณ 12,000 ดาลตัน และมีความคงทนต่อความร้อน^{31, 32} นักวิจัยเหล่านี้พบว่าสารดังกล่าวไม่สามารถฆ่าหนู mice ได้ แต่ถ้าฉีดเข้าไปในหนูที่กำลังได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* อยู่ จะทำให้หนูมีอัตราการตายสูงขึ้นมาก อย่างไรก็ตาม หลังจากรายงานดังกล่าวนี้ ก็ไม่ปรากฏว่ามีนักวิจัยกลุ่มใดสนใจศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเรื่องนี้อีกเลย

4.5 Extracellular enzymes เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อที่สามารถสร้าง enzymes ได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น lecithinase, lipase หรือ protease ก็ตาม (ยังตรวจไม่พบ elastase) แต่ในปัจจุบันยังไม่ทราบว่า enzyme เหล่านี้เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคหรือไม่ แต่หากจะพิจารณาจากเอนไซม์ของมันแล้ว ก็คาดว่าองค์ประกอบเหล่านี้น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค เป็นต้นว่า อาจเกี่ยวข้องกับการพวก cytotoxic activity ต่อ mammalian cells บางชนิด ในปี 1994 นี้เอง มีรายงานการค้นพบ *B. pseudomallei* ที่ไม่สร้าง extracellular protease มีความรุนแรงในการทำให้เกิดพยาธิสภาพในสัตว์ทดลองต่ำกว่าเชื้อ parental wild type strain^{32a}

4.6 Malleobactin เป็น low molecular weight, high affinity iron chelator ซึ่งสร้างโดย *B. pseudomallei* เพื่อใช้แย่งธาตุเหล็กจาก transferrin และ lactoferrin ที่มีอยู่ในน้ำเหลืองและน้ำคั่งหลัง^{33, 34} โดยปรกติเชื้อแบคทีเรียต้องการใช้ธาตุเหล็กในการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษ แต่ในร่างกายของเรามี iron chelators ในปริมาณที่สูง จึงทำให้ไม่มี free iron เหลือสำหรับที่เชื้อจะใช้ได้ ดังนั้น เชื้อส่วนใหญ่จึงต้องสร้าง chelator ขึ้นมา สำหรับแย่งจับธาตุเหล็ก (จาก host chelator) และ malleobactin เป็น iron-chelator ที่สร้างโดย *B. pseudomallei* แต่มีคุณสมบัติต่างจากที่สร้างโดยเชื้ออื่น รวมทั้ง *B. cepacia* ด้วย คือชนิดที่สร้างโดย *B. pseudomallei* แย่งจับธาตุเหล็กจาก transferrin ได้ดี แต่ไม่ค่อยมีประสิทธิภาพในการแย่งเหล็กในขณะที่เชื้อถูกกินเข้าไปอยู่ในเซลล์ของ host แล้ว

4.7 Miscellaneous นอกจากองค์ประกอบกลุ่มใหญ่ ๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ อีกหลายชนิดที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดโรคได้ด้วยเหมือนกัน และอาจจะทำงานเดี่ยว ๆ หรือร่วมกับองค์ประกอบอื่น ๆ ก็ได้ ตัวอย่างที่จะกล่าวถึงบ้างคือ flagella ของเชื่อนี้ แม้ว่าไม่มีข้อมูลโดยตรง แต่ข้อมูลที่พอจะมีแสดงว่า antiserum ต่อ flagella สามารถขัดขวางการเคลื่อนไหวของเชื้อ (motility inhibition) ในหลอดทดลอง และยังทำให้หนูมีความต้านทานต่อการติดเชื้อเพิ่มขึ้น¹⁰ เป็นการแสดงให้เห็นว่า flagella น่าจะเป็น virulence factor อันหนึ่งของเชื่อนี้เหมือนกัน

Acid phosphatase ก็เป็นอีก factor หนึ่งที่มีการศึกษาทางด้านพื้นฐานค่อนข้างมาก โดยเฉพาะในกลุ่มของนักวิจัยชาวญี่ปุ่นที่ร่วมกับกลุ่มที่สถาบันวิทยาศาสตร์การแพทย์ของ

ไทย³⁵⁻³⁷ เชื่อนี้สร้าง enzyme ดังกล่าวได้มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมี activity ที่ต่างกัน จึงอาจเป็นตัวช่วยให้เชื้อสามารถปรับตัวเองให้มีชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และเชื้อที่เจริญเติบโตในสภาวะหนึ่งอาจมีความรุนแรงและสามารถทำให้เกิดโรคได้ดี แต่ในอีกสภาวะหนึ่งความรุนแรงจะลดน้อยลงก็ได้ และอาจจะใช้เพื่ออธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงของอุบัติการณ์ของการเป็นโรคนี้ในช่วงฤดูต่าง ๆ ของปีก็ได้

Research questions

จะเห็นได้ว่าในปัจจุบัน ความรู้เกี่ยวกับเรื่องนี้ยังมีค่อนข้างจะจำกัด และยังไม่มีข้อสรุปเกี่ยวกับกลไกของการเกิดโรคได้ ปัญหาที่มีส่วนที่ทำให้ความก้าวหน้าทางด้านนี้ก้าวหน้าไปช้ากว่าที่ควร คือการที่เราไม่มี experimental animal model ที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษาเรื่องนี้ นอกจาก guinea pig³⁸ และการที่เราไม่รู้เกี่ยวกับ genetics ของเชื้อค่อนข้างน้อย ทำให้เราไม่สามารถที่จะ manipulate เชื้อหรือ clone gene เพื่อให้ได้คุณสมบัติตามที่เรต้องการ อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่น่าสนใจมีมากมาย ดังตัวอย่างต่อไปนี้

1. เชื้อที่ทำให้เกิดโรคชนิด subclinical กับ clinical infection เป็นเชื้อชนิดเดียวกันหรือต่างกัน มีความรุนแรงมากน้อยต่างกันหรือไม่ หรือขึ้นอยู่กับสภาวะของ host ในขณะที่ได้รับเชื้อ
2. เชื้อที่ทำให้โรคมีย clinical spectrum ที่แตกต่างกันมาก ๆ มีความรุนแรง หรือองค์ประกอบอะไรที่เหมือนกัน หรือไม่เหมือนกัน
3. ทำไมเชื้อถึงสามารถหลบความต้านทานอยู่ในร่างกายได้นาน ๆ (long latency period) มีกลไกอะไรที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติข้อนี้
4. มี factor อะไรที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิด reactivation และทำให้เกิดเกิด relapse ขึ้นมา เช่น ความเครียด การใช้ยาเพื่อกดภูมิคุ้มกัน
5. เชื้อที่สามารถทำให้เกิด relapse นั้นต่างไปจากที่ไม่ทำให้เกิด relapse หรือไม่ จะมีอะไรที่จะใช้ในการ predict ว่าโอกาสจะเกิด relapse ในผู้ป่วยแต่ละรายมีมากน้อยต่างกันอย่างไร
6. Cofactors หรือ predisposing factors ที่เกี่ยวข้องกับกาเกิดโรคเมลิออยโดสิส มีอะไรอีกบ้างนอกเหนือจากที่มีข้อมูลอยู่บ้าง เช่น เบาหวาน โรคไต มะเร็ง และความเครียด ในอนาคตมีโอกาสที่จะพบมากขึ้นในผู้ป่วยโรคเอดส์ได้หรือไม่
7. พัฒนาวิธีการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สามารถเตรียมองค์ประกอบที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรคได้สะดวกขึ้น
8. ศึกษาแง่มุมต่าง ๆ ของ Arabinose positive และ Arabinose negative *B.pseudomallei* เช่น มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงและชนิดของโรคหรือไม่
9. ทำ gene cloning และ gene library ของเชื้อเพื่อตรวจและง่ายในการศึกษาต่อไป
10. โครงสร้างทางเคมีของ membrane (cell)-associated LPS และ secreted LPS ต่างกันหรือเหมือนกัน และสัมพันธ์กับ biological activity หรือไม่

11. ความรุนแรงของเชื้อขึ้นอยู่กับความสามารถที่เชื้อสามารถสร้าง secreted LPS หรือไม่

12. เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของ Lipid A ของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่างไปจากของเชื้อแกรมลบอื่น ๆ อยู่บ้าง LPS ของเชื้อนี้ใช้ lipopolysaccharide binding protein (LBP) ชนิดเดียวกันกับของเชื้อแกรมลบอื่น ๆ หรือไม่ และหากใช้ LBP คนละตัว จะใช้อธิบายว่า LPS ของ *B. pseudomallei* มี biological activity ที่ดูเหมือนต่างไปจาก LPS ของเชื้อแกรมลบอื่น ๆ ได้หรือไม่

13. เราจะใช้ระดับของ LPS เป็น marker เพื่อทำนายความรุนแรงและ outcome ของการเกิดโรคแบบใดติดเป็นพิษได้หรือไม่ ถ้าได้ จะใช้วิธีใดถึงจะนำมาประยุกต์ใช้ได้ง่าย ๆ

14. จะใช้อะไรเป็น criteria เพื่อช่วยชี้แนะว่าจะเลือก exotoxin ตัวใดมาใช้ในการศึกษา โดยละเอียด โดยเฉพาะในเรื่องกลไกของการเกิดโรค¹⁵ มี exotoxin ตัวใด หรือไม่ที่อาจช่วยเสริมให้ผลของ LPS รุนแรงมากขึ้น และอาจทำหน้าที่เป็น mortality enhancing factor ที่มีนักวิจัยสหรัฐเคยรายงานไว้หลายปีมาแล้วก็ได้

5. RIBOTYPING

ในปัจจุบันยังไม่มีวิธี typing วิธีใดซึ่งจะสามารถนำมาใช้ในการแยก strain ของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ ในอดีตมีการพยายามใช้ serotype เช่น ในปี 1956 Chambon และ Fournier ใช้ heat-stable O antigen และสามารถแยกเชื้อนี้ออกเป็น 2 serotypes คือ I และ II โดยเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม Serotype I พบระบาดใน Southeast Asia และ Australia ส่วน Serotype II พบเฉพาะใน Australia เท่านั้น³⁹ ในปี 1991 Lertmongkolchai และคณะ⁴⁰ ได้ใช้วิธี SDS-PAGE และ Western blot ของแอนติเจนที่เตรียมจาก veronal extract เพื่อศึกษา typing ของ bacteria ตัวนี้ พบว่าไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างได้ เนื่องจากเชื้อนี้ทำให้เกิดโรคที่มีอาการแสดงออกแตกต่างกันหลายแบบ ดังนั้น จึงได้มีคณะผู้วิจัยพยายามที่จะพัฒนาวิธีที่จะใช้ในการแยก strain ของเชื้อเพื่ออาจนำมาอธิบายถึงการเกิด pathogenesis ที่ต่างกัน หรือการกลับเป็นซ้ำของโรค ตลอดจนเพื่อให้ทราบถึงระบาดวิทยาของโรคชัดเจนขึ้น ดังนั้น ในปี 1993 Sexton และคณะ⁴¹ ได้พัฒนาวิธี ribotyping โดยใช้ rRNA ของ *E. coli* เป็น probe มา type genomic DNA ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ถูกตัดด้วย restriction enzymes ชนิดต่าง ๆ คือ Eco RI, Hind III, Sal I และ Pst I จากการใช้ EcoRI enzyme สามารถทำให้แยกเชื้อออกได้เป็น 6 types คือ A-F แต่ละ types มีขนาด DNA ประมาณ 5.5-10 kb. Type A เป็น predominate type ที่พบได้ใน environment ถึง 50% (5 ใน 10 ตัวอย่าง) ส่วน Type E และ F ไม่พบว่าทำให้เกิดโรคในคน จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าสามารถใช้ typing system อันนี้ไปศึกษาการเกิด relapse ของโรคได้ในปีเดียวกัน Low & Desmarchelier⁴² พัฒนา molecular typing โดยใช้ 16S และ 23S ribosomal RNA ของ *E. coli* เป็น probes มา type DNA ของ *B. pseudomallei* ที่ตัดด้วย Bam HI ด้วยวิธี

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) พบว่าสามารถแยก *B. pseudomallei* ออกได้เป็น 22 types คือ 1 ถึง 22 จากการศึกษาคั้งนี้ไม่พบว่ามี type ที่เป็น host specific และต่อมา Desmarcheller และคณะ⁴³ ได้นำ technique นี้ไปศึกษาการเกิด relapse ในผู้ป่วยmelioidosis โดสิธจำนวน 25 ราย พบว่ามีผู้ป่วยถึง 23 รายที่เกิด relapse และมีเพียง 2 ราย ที่เกิดจาก reinfection เนื่องจาก strain ของเชื้อที่ตรวจพบหลังจากการติดเชื้อครั้งแรกเป็นคนละ strain กับการติดเชื้อครั้งแรก อย่างไรก็ตาม ก็ไม่แน่ว่าใน 23 รายจะเป็น relapse ทั้งหมด เพราะเชื้อจากผู้ป่วยส่วนมากเป็นพวกที่ค่อนข้างจะ common นอกจากที่กล่าวมาแล้ว ในต้นปี 1995 กลุ่มนักวิจัยชาวออสเตรเลียอีกเหมือนกัน ได้นำเอา ribotyping มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา⁴⁴

เมื่อเร็ว ๆ นี้อาจารย์สุวรรณา ตระกูลสมบุรณ์ ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับ ribotype ของเชื้อนี้อย่างละเอียดที่ประเทศอังกฤษ โดยได้ใช้เชื้อตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ ที่ได้มาจากหลายประเทศ รวมถึง 350 ตัวอย่าง โดยใช้ข้อมูลจาก rRNA variation และพบว่าสามารถแยกเชื้อออกได้ถึง 44 ribotypes ผลของการศึกษาก็ยังพบว่ามีเชื้อบาง ribotype ที่พบได้บ่อยในแถวทวีปเอเชีย และเชื้อบางชนิดอาจมีความสัมพันธ์กับอาการแสดงออกของโรคอีกด้วย นอกจากนี้ยังได้ศึกษาต่อไปว่าใน ribotypeใด ribotypeหนึ่ง ยังพบความ heterogeneity ของ DNA โดยใช้วิธีการของ pulse field gel electrophoresis อีกด้วย (personal communication)

ในปี 1994 Semsaman และคณะ⁴⁵ ได้สร้าง DNA probe ที่จำเพาะสำหรับเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีชื่อเรียกว่า pKKU-S23L โดยนำเอา probe นี้ไปใช้ในการ typing genomic DNA ของเชื้อด้วยวิธี RFLP พบว่าสามารถแยกได้เป็น 8 types คือ A-H Type B เป็น predominant type (21 จาก 60 ตัวอย่าง) Type H เป็น type ที่ทำให้เกิด septicemia มากที่สุด ในขณะที่ Type B, D และ H เป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคในซอนแก่นมากถึง 80% ของทั้งหมด (48 จาก 60 ตัวอย่าง)

Research questions

1. ยังไม่มี standard typing ที่แน่นอน ไม่มีการเปรียบเทียบระหว่าง type ที่พัฒนาโดยกลุ่มคณะวิจัยที่ต่างกัน
2. เชื้อนี้ประกอบขึ้นด้วย limitless number of strains หรือเปล่า
3. พัฒนาริธี typing ที่มี discriminatory power ที่มากกว่านี้ (เช่น pulse field gel electrophoresis และ PCR) เพื่อช่วยบอก relapse และ reinfection ที่แท้จริง
4. ยังไม่มีการเปรียบเทียบ type ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคต่างกัน ซึ่งอาจจะบอก pathogenesis หรือหา virulent strain ได้
5. Environmental strains จากภาคต่าง ๆ ตรวจว่าเป็น Typical/Atypical ribotypes มากน้อยต่างกันหรือไม่

เอกสารอ้างอิง

- ๑ 1. ~~X~~ Wuthiekanun V, Dance DAB, Wattanagoon Y et al. The use of selective media for the isolation of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice. J Med Microbiol 1990; 33: 121-126.
- ๑ 2. ~~X~~ Dance DAB, Wuthiekanun V, Naigowit P, White NJ. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and PI 20NE. J Clin Pathol 1989; 42: 645-648.
- ๑ 3. ~~X~~ Ashdown LR, Clarke SG. Evaluation of culture techniques for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil. Appl Environ Microbiol 1992; 58: 4011-4015.
- ๑ 3a. ~~X~~ Wuthiekanun V, Smith MD, Dance DAB, White NJ. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil in north-eastern Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89: 41-43.
- ๑ 4. ~~X~~ Ashdown LR. Rapid differentiation of *Pseudomonas pseudomallei* from *Pseudomonas cepacia*. Lett Appl Microbiol 1992; 14: 203-205.
- ๑ 4a. ~~X~~ Manzenyuk OY, Volozhantsev NV, Svetoch EA. Identification of *Pseudomonas mallei* bacteria with the help of *Pseudomonas pseudomallei* bacteriophages. Microbiology 1994; 63: 303-307.
- ๑ 5. ~~X~~ Woods DE, Jones AL, Hill PJ. Interaction of insulin with *Pseudomonas pseudomallei*. Infect Immun 1993; 61: 4045-4050.
- ๑ 6. ~~X~~ Wongratanacheewin S, Tattawasert U, Lulitanond V. et al. Characterization of *Pseudomonas pseudomallei* antigens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1993; 24: 107-113.
- ๑ 7. ~~X~~ Anuntagool N, Rugdech P, Sirisinha S. Identification of specific antigens *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 1232-1236.
- ๑ 7a. ~~X~~ Steinmetz I, Rohde M, Breneke B. Purification and characterization of an exopolysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*. Infect Immunity 1995; 63: 3959-3965.
- ๑ 8. ~~X~~ Vorachit M, Lam K, Jayanetra P, Costerton JW. Resistance of *Pseudomonas pseudomallei* growing as a biofilm on silastic discs to ceftacidime and co-trimoxazole. Antimicrob Agents Chemotherapy 1993; 37: 2000-2002.

- 9/ Vorachit M, Lam K, Jayanetra P, Costerton JW. Electron microscopy study of the mode of growth of *Pseudomonas pseudomallei* in vitro and in vivo. *J Trop Med Hyg* 1995; 98 (in press).
- 10/ Brett PJ, Mah DCW, Woods DE. Isolation and characterization of *Pseudomonas pseudomallei* flagellin proteins. *Infect Immun* 1994; 62: 1914-1919.
- 11/ Gotoh N, White NJ, Chaowagul W, Woods DE. Isolation and characterization of the outer-membrane proteins of *Buhtkolderia* (*Pseudomonas*) *pseudomallei*. *Microbiology* 1994; 140: 797-805.
- 12/ Pitt TL, Aucken H, Dance DA. Homogeneity of lipopolysaccharide antigens in *Pseudomonas pseudomallei*. *J infect* 1992; 25: 139-146.
- 13/ Knirel YA, Paramonov NA, Shashkov AS, et al. Structure of the polysaccharide chains of *Pseudomonas pseudomallei*. *Carbohydrate Res* 1992; 233: 185-193.
- 14/ Kawahara K, Dejsiralert S, Danbara H, Ezaki T. Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Pseudomonas pseudomallei*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 75: 129-133.
- 15/ Petkanjanapong V, Naigowit P, Kondo E, Kanai K. Use of endotoxin antigens in enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *P. pseudomallei* infections (Meliodosis). *Asian Pacific J Allergy Immunol* 1992; 10: 145-150.
- 16/ Bryan LE, Wong S, Woods DE, Dance DAB, Chaowagul W. Antisera recognizing a common antigen of *P. pseudomallei* lipopolysaccharide which is protective in an animal model of infection. *Can J Inf Dis* (in press).
- 17/ Rapaport FT, Millar JW, Ruch J. Endotoxic properties of *Pseudomonas pseudomallei*. *Archv Pathol* 1961; 71: 429-436.
- 18/ Iwasa S, Petkanchanapong W, Naigowit P, Kondo E, Kanai K. Endotoxin of *Pseudomonas pseudomallei* detected by the body weight-decreasing reaction in mice and comparison of it with those of *P. cepacia* and *P. aeruginosa*. *Jpn J Med Sci Biol* 1992; 45: 35-47.
- 19/ Rugdech P, Anuntagool N, Sirisinha S. Monoclonal antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* and their potential for diagnosis of melioidosis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 231-235.

- 320/ Colling M, Nigg C, Heckly RJ. Toxins of *Pseudomonas pseudomallei* . I. Production *in vitro*. J Bact 1958; 76: 422-426.
- 321/ Heckly RJ, Nigg C. Toxins of *Pseudomonas pseudomallei*. II. Characterization. J Bact 1958; 76: 427-436.
- 322/ Heckly RJ. Differentiation of exotoxin and other biologically active substances in *Pseudomonas pseudomallei* filtrates. J Bact 1964; 88: 1730-1736.
- 323/ Razak N, Ismail G. Interaction of human polymorphonuclear leukocytes with *Pseudomonas pseudomallei*. J Gen Appl Microbiol 1982; 28: 509-518.
- 324/ Razak CN, Ismail G, Embi N, Omar O. Protection studies using whole cells and partially purified toxic material (PPTM) of *Pseudomonas pseudomallei*. Malays Appl Biol 1986; 15: 105-111.
- 325/ Ismail G, Noor Embi M, Omar O, Razak N. Toxigenic properties of *Pseudomonas pseudomallei* extracellular products. Trop Biomed 1987; 4: 101-110.
- 326/ Ismail G, Noor Embi M, Omar O, Allen JC, Smith CJ. A competitive immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin. J Med Microbiol 1987; 23: 353-357.
- 327/ Ismail G, Mohamed R, Rohana S, Sharifah HS, Embi N. Antibody to *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin in sheep exposed to natural infection. Vet Microbiol 1991; 27: 277-282.
- 328/ Mohamed R, Nathan S, Embi N, Ismail G. Inhibition of macromolecular synthesis in cultured macrophages by *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin. Microbiol Immunol 1989; 33: 811-820.
- 329/ Embi N, Suhaimi A, Mohamed R, Ismail G. Prevalence of antibodies of *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin and whole cell antigens in military personnel in Sabah and Sarawak, Malaysia. Microbiol Immunol 1992; 36: 899-904.
- 330/ Ashdown LR, Koehler JM. Production of hemolysin and other extracellular enzymes by clinical isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. J Clin Microbiol 1990; 28: 2331-2334.
- 331/ Nigg C, Ruch J, Scott E, Noble K. Enhancement of virulence of *Malleomyces pseudomallei*. J Bact 1955; 71: 530-541.

32. Levine HB, Lien OG, Maurer RL. Mortality enhancing polypeptide constituents from *Pseudomonas pseudomallei*. J Immunol 1955; 83: 468-477.
- 32a. Sexton MM, Jones AL, Chaowakul W, Woods DE. Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas pseudomallei*. Can J Microbiol 1994; 40: 903-910.
33. Yang HM, Chaowagul W, Sokol PA. Siderophore production by *Pseudomonas pseudomallei*. Infect Immun 1991; 59: 776-780.
34. Yang H, Kooi CD, Sokol PA. Ability of *Pseudomonas pseudomallei* malleobactin to acquire transferrin-bound, lactoferrin-bound, and cell-derived iron. Infect Immun 1993; 61: 656-662.
35. Kondo E, Dejsirilert S, Wijprasit N, Chiewsilp D, Kanai K. Heat-stable and heat-labile components of nonspecific acid phosphatase detected in *Pseudomonas pseudomallei*. Jpn J Med Sci Biol 1991; 44: 51-62.
36. Kondo E, Naigowit P, Phanichruttiwong P et al. Fatty acid profile and acid phosphatase activity of fresh isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. Jpn J Med Sci Biol 1991; 44: 195-211.
37. Kanai K, Kondo E. Substrate response in acid phosphatase activity of *Pseudomonas pseudomallei* and *Pseudomonas cepacia*, with special reference to tyrosine phosphatase. Jpn J Med Sci Biol 1991; 44: 225-237.
38. Vorachit M, Lam K, Jayanetra P, Costerton JW. Study of the pathogenicity of *Pseudomonas pseudomallei* - a guinea pig model (Manuscript in preparation).
39. Fournier J. Melioidosis and the Whitmore bacillus, Epidemiological and taxonomic controversies.(French). Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de Ses Filiales 1965; 58: 753-765.
40. Lertmemongkolchai K, Manmontri W, Leelayuwat C, Romphruk A, Waropastrakul S. Immunoblot analysis to demonstrate antigenic variability of clinical isolated *Pseudomonas pseudomallei*. Asian Pacific J Allergy Immunol 1991; 9: 5-8.
41. Sexton MM, Goebel LA, Godfrey AJ, Choawagul W, White NJ, Woods DE. Ribotype analysis of *Pseudomallei pseudomallei* isolates. J Clin Microbiol 1993; 31: 238-243.

- 342~~X~~ Lew AE, Desmarchelier PM. Molecular typing of *Pseudomonas pseudomallei*: Restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes. J Clin Microbiol 1993; 31:533-539.
- 343~~X~~ Desmarchelier PM, Dance DAB, Chaowagul W, Suputtamongkol Y, White NJ, Pitt TL. Relationships among *Pseudomonas pseudomallei* isolates from patients with recurrent melioidosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 1592-1596.
- 344~~X~~ Haase A, Smithvangan H, Melder A, Wood Y, Janmaat A, Gilfedder J, Kemp D, Currie B. Subdivision of *Burkholderia pseudomallei* ribotypes into multiple types by random amplified polymorphic DNA analysis provides new insights into epidemiology. J Clin Microbiol 1995; 1687-1690.
- 345~~X~~ Sermswan RW, Wongratanacheewin S, Tattawasart U, Wongwajana S. Construction of a specific DNA probe for diagnosis of melioidosis and use as an epidemiological marker of *Pseudomonas pseudomallei*. Mol Cell Probes 1994; 8: 1-9.

บทที่ 4

PATHOGENESIS AND IMMUNITY

กลไกการเกิดโรค

โรคเมลิออยโดสิสเป็นโรคที่ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่ได้รับเชื้อโดยทางบาดแผลที่ผิวหนังหรือทางการหายใจ และส่วนน้อยอาจได้รับเชื้อทางการกิน (ดูรายละเอียดในบทลักษณะทางคลินิก) คาดว่าการติดเชื้อส่วนใหญ่เป็นชนิดไม่มีอาการ เนื่องจากสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อในผู้ที่อยู่ใน endemic area จำนวนมาก ในปัจจุบันเชื่อว่า โรคเมลิออยโดสิสมีกลไกการเกิดโรค 2 วิธีหลัก คือ

1. การเกิดโรคเมลิออยโดสิส เป็นผลจากการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่แอบแฝงอยู่ในร่างกาย ภายหลังการติดเชื้อครั้งแรก ๆ คล้ายกับกรณีของวัณโรค โดยเชื่อว่าการติดเชื้อส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อชนิดไม่มีอาการและผู้ที่อยู่ใน endemic area ส่วนใหญ่เคยได้รับเชื้อแล้ว (เนื่องจากสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อได้โดยวิธี indirect hemagglutination) หลังจากนั้นเชื้อสามารถซ่อนตัวอยู่ในร่างกายได้เป็นเวลานาน เมื่อเกิดความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันหรือมีสาเหตุอื่นอีกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด จะทำให้เชื้อที่หลบซ่อนตัวอยู่นั้น สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นได้จนทำให้เกิดโรค โดยมีข้อมูลสนับสนุนที่สำคัญ คือ

- พบว่าเชื้อซ่อนตัวอยู่นี้สามารถซ่อนตัวอยู่ได้เป็นเวลาหลายสิบปี โดยไม่ก่อให้เกิดโรค เช่น ในกรณีของทหารอเมริกันที่รบในสงครามเวียดนามอาจเกิดโรคเมลิออยโดสิสได้ ภายหลังกลับไปสหรัฐอเมริกาแล้วเป็นเวลานาน
- พบว่ามากกว่าครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสจะมีโรคอื่นร่วมด้วย โดยเฉพาะโรคที่คาดว่ามีความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคเบาหวาน โรคไตวายเรื้อรัง โรคมะเร็งของระบบโลหิต เป็นต้น
- พบผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสที่กลับเป็นซ้ำได้เป็นจำนวนมาก ภายหลังจากการรักษาหายแล้วในครั้งแรก และเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มนี้มักเป็นเชื้อที่มี ribotype เดียวกับเชื้อที่ติดครั้งแรก ซึ่งแสดงว่าเชื้อสามารถซ่อนตัวอยู่ในร่างกายได้
- การศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายในเซลล์ของร่างกายบางชนิด โดยไม่ถูกทำลาย

2. การเกิดโรคเมลิออยโดสิส เป็นผลจากการติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อมอย่างเฉียบพลัน เหมือนการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมนลบอื่น ๆ โดยมีข้อมูลสนับสนุนที่สำคัญ คือ

- ผู้ป่วยจำนวนหนึ่งเกิดโรคเมลิออยโดสิส ภายหลังการสัมผัสเชื้อโดยตรง เช่น มีบาดแผลจากอุบัติเหตุ, จมน้ำ เป็นต้น

- มักพบโรคเมลิออยโดสิสมากในฤดูฝน เนื่องจากเป็นช่วงที่ทำนา และชาวนาต้องสัมผัสเชื้อที่อยู่ในดินบริเวณนา รวมทั้งเกิดบาดแผลได้บ่อยระหว่างการทำนา

เชื้อกลุ่ม virulent strain และ avirulent strain

ในปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าเชื้อ *B. pseudomallei* มีสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงแตกต่างกันหรือไม่ โดยมีข้อมูลสนับสนุนทั้งสองกลุ่ม

การศึกษาของ Dannenberg และคณะที่ University of California, Berkeley ในช่วงปี 1958-1960 โดยเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ *B. pseudomallei* สองกลุ่มในหนูทดลอง (mice และ hamsters) คือ ระหว่าง virulent strain (ลักษณะเป็น smooth colony ในจานเพาะเชื้อ) กับ avirulent strain (ลักษณะเป็น rough colony) พบว่า lethal dose ของเชื้อสองกลุ่มนี้ในหนูทดลองแตกต่างกันมาก¹ และพบว่าเชื้อกลุ่ม avirulent strain เมื่อเข้าไปอยู่ในหนูแล้วจะกระจายไปตามอวัยวะต่างภายใน 2-3 วันแรก แต่ไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพขนาดใหญ่ (gross pathological change) โดยอาจพบเพียง microabscess ซึ่งจะหายไปในเวลาไม่นาน นอกจากนี้ยังพบว่าความแตกต่างในความรุนแรงของเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้เกิดจากความแตกต่างในการเพิ่มจำนวนเชื้อภายในเนื้อเยื่อต่าง ๆ

ความรุนแรงของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ยังขึ้นกับชนิดของสัตว์ที่ติดเชื้อด้วย การศึกษาในประเทศมัลกาเรีย พบว่าเชื้อกลุ่ม smooth และ rough form มีความรุนแรงเท่ากันในหนู (mice) และใน golden hamster, ชนิด rough form มีความรุนแรงมากกว่าใน guinea pig, แต่ smooth form มีความรุนแรงกว่าใน ground squirrel² ดังนั้น การศึกษาความรุนแรงของเชื้อในแต่ละกลุ่มจำเป็นต้องคำนึงถึงสัตว์ทดลองที่ใช้ด้วย

การศึกษาของกลุ่มในประเทศอังกฤษและประเทศแคนาดา พบว่าสามารถจำแนกเชื้อ *B. pseudomallei* ออกได้เป็นหลายกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรม เช่น ใช้วิธี ribotyping หรือ RFLP³ โดยเชื้อบางกลุ่มแยกได้จากเฉพาะจากดินและน้ำเท่านั้น โดยที่ไม่พบในผู้ป่วยเลย ข้อมูลดังกล่าว บ่งชี้ว่าเชื้อที่พบในสิ่งแวดล้อมนั้นอาจมีทั้งพวกที่เป็น virulent strain และ avirulent strain โดยเชื้อกลุ่ม virulent strain เท่านั้นที่ก่อให้เกิดโรคได้ ผู้ที่อยู่ใน endemic area อาจได้รับเชื้อทั้งสองกลุ่ม สมมติฐานดังกล่าวยังไม่ได้รับการพิสูจน์ ถ้าสมมติฐานดังกล่าวเป็นความจริง อาจจะสามารถอธิบายการที่พบอัตราการเกิดโรคต่ำในบริเวณที่มีเชื้อมากในดินและน้ำ โดยที่เชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้อาจเป็นชนิด avirulent strain ก็ได้

พยาธิสภาพ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากภาวะ acute septicemic melioidosis โดย Piggott และคณะ⁴ พบลักษณะที่สำคัญคือจะพบรอยโรคกระจาย

ในหลาย ๆ อวัยวะทั่วร่างกาย โดยพบบ่อยที่สุดใน ปอด, ตับ, ม้ามและต่อมน้ำเหลือง พบเชื้อ *B. pseudomallei* ได้จำนวนมากภายในรอยโรค ซึ่งมีลักษณะเป็น multiple microabscess มี focal necrosis ล้อมรอบด้วย neutrophils และ histiocytes จะพบ focal necrosis ได้แม้ในรอยโรคที่ใหม่มาก ๆ ซึ่งแตกต่างชัดเจนจากลักษณะทางพยาธิวิทยาในผู้ป่วยที่เป็น chronic melioidosis ซึ่งจะพบรอยโรคอยู่เฉพาะที่ และจะพบเชื้ออยู่น้อยมาก รอยโรคจะมีลักษณะเป็น granuloma มี central necrosis ล้อมรอบด้วย exudate และมี epithelioid cells คล้ายกับในรอยโรคของวัณโรค

ลักษณะดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่าพยาธิสภาพที่เกิดในระยะ acute septicemic melioidosis นั้น มีการทำลายเนื้อเยื่อไม่มากพอที่จะเป็นสาเหตุการตายได้ แต่น่าจะเกิดจาก toxin ที่ตัวเชื้อสร้างขึ้น และปล่อยออกมาในระยะเวลาดังนั้น ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว ซึ่งสมมติฐานดังกล่าวได้รับการยืนยันจากการศึกษาพยาธิสภาพในสัตว์ทดลอง โดยพบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อจะเสียชีวิตอย่างรวดเร็วภายใน 1-2 วัน โดยที่แทบจะตรวจไม่พบ gross pathological change เลย⁵

พยาธิสภาพที่พบใน chronic melioidosis บ่งชี้ว่าเชื้อได้ถูกจำกัดให้อยู่ภายในรอยโรค โดยเชื้อส่วนใหญ่ได้ถูกทำลายไปแล้ว ส่วนเชื้อที่หลงเหลืออยู่ก็อยู่ในสภาพที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนน้อยมาก การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญในการทำลายเชื้อส่วนใหญ่ ส่วนภูมิคุ้มกันด้านเซลล์น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมปริมาณเชื้อจำนวนน้อยที่เหลืออยู่ไม่ให้เพิ่มมากขึ้น

แม้ยังไม่ได้มีการศึกษาพยาธิสภาพในผู้ป่วยที่เป็น asymptomatic melioidosis แต่ก็เชื่อว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถซ่อนตัวอยู่ในร่างกายได้เป็นเวลานาน โดยอาจอยู่ในสภาพ microabscess หรือ granuloma นอกจากนี้ จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงได้พบว่าเชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายในเซลล์กลุ่มฟาโกไซท์โดยที่ไม่ถูกทำลายภายในเซลล์⁶ และยังสามารถซ่อนตัวในเซลล์กลุ่มอื่นได้อีก เช่น เซลล์ fibroblast (Dharakul, unpublished data) พฤติกรรมดังกล่าวเป็นลักษณะของเชื้อในกลุ่ม intracellular bacteria

ประเด็นสำคัญที่ควรให้ความสนใจเป็นพิเศษที่เกี่ยวข้องกับด้านกลไกการเกิดโรคและภูมิคุ้มกัน

1. ความรุนแรงของโรคเมลิออยโดสิส โดยเฉพาะปัจจัยที่ทำให้ภาวะ septicemic melioidosis มีความรุนแรงสูงมาก
2. ความสัมพันธ์ระหว่างโรคเมลิออยโดสิสกับโรคเบาหวาน
3. การเกิด relapse/reactivation/reinfection

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการติดเชื้อ *B. pseudomallei*

การศึกษาของ พญ. วิชาดา เขาวกุล และคณะ⁷ พบว่า septicemic melioidosis มีอัตราตายสูงกว่าภาวะ sepsis จากเชื้ออื่น ๆ และผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็ว ลักษณะเช่นนี้อาจจะเกิดเนื่องจากสาเหตุสำคัญคือ

1. วินิจฉัยได้ช้า ไม่ทันท่วงที
2. ให้การรักษาช้า และการรักษาไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ เช่น ให้ยาปฏิชีวนะที่เชื่อด้อย
3. ปัจจัยจากตัวเชื้อเอง ที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงมากกว่าเชื้ออื่น ๆ
4. ปัจจัยพื้นฐานเรื่องสภาพของผู้ป่วย

ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาเพื่อปรับปรุงการดูแลผู้ป่วยโดยเฉพาะในแง่การวินิจฉัยและการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อุบลราชธานี ซึ่งอาจถือได้ว่ามีมาตรฐานสูงมากที่สุดแห่งหนึ่ง ปรากฏว่าสามารถลดอัตราการตายของผู้ป่วยจากประมาณ 80% เหลือ 40%⁸ จึงเห็นได้ว่าปัจจัย 2 ข้อข้างต้น คือ การวินิจฉัยและการรักษาที่ถูกต้องเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรค อย่างไรก็ตาม ปัจจัยที่เหลืออีก 2 ปัจจัยคือ ปัจจัยจากตัวเชื้อเอง และปัจจัยพื้นฐานเรื่องสภาพของผู้ป่วย ก็มีผลต่ออัตราการตายที่สูงมากเช่นเดียวกัน

ในแง่ปัจจัยพื้นฐานเรื่องสภาพของผู้ป่วยนั้น จะกล่าวในรายละเอียดในเรื่องความสัมพันธ์กับโรคเบาหวานและภาวะบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน ในส่วนปัจจัยจากตัวเชื้อเอง ได้มีผู้ศึกษาปัจจัยที่อาจมีผลต่อความรุนแรงของเชื้อ (potential virulence factor) ในภาวะ sepsis ของตัวเชื้อที่สำคัญคือ lipopolysaccharide (LPS) และ exotoxins

การศึกษาโครงสร้างของ LPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่ามีลักษณะโครงสร้างจำเพาะที่แตกต่างจากเชื้อแบคทีเรีย genus อื่นอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม เมื่อ Iwasa และคณะได้ศึกษา toxicity ของ lipopolysaccharide ของ *B. pseudomallei* เปรียบเทียบกับของเชื้อ *P. aeruginosa* และ *B. cepacia* พบว่า *B. pseudomallei* LPS มี toxicity เพียงประมาณ 1/15 ของ *P. aeruginosa* แสดงว่า LPS ของเชื่อนี้ไม่น่าจะมี toxicity มากกว่า LPS ของแบคทีเรียอื่น ๆ ทั่วไปแต่อย่างใด⁹

ในแง่ของ exotoxins ของเชื่อนี้ ได้มีผู้ศึกษาอยู่หลายกลุ่มและสามารถแยกได้ exotoxin หลายชนิด แต่ยังไม่สามารถสรุปลักษณะของ exotoxin นี้อย่างชัดเจน

การศึกษาโดย Heckly และคณะที่ University of California, Berkeley ในช่วงปี 1958-60 พบว่าเชื่อนี้มี extracellular products ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ ซึ่งสามารถมี toxicity ได้ใน 2 รูปแบบคือ lethal effect และ necrotoxicity แต่ไม่สามารถที่จะแยกสกัด toxin นี้ให้บริสุทธิ์ เพื่อพิสูจน์ลักษณะทางเคมีได้ exotoxin ทั้งสองรูปแบบนี้ไม่ทนต่อความร้อน (thermolabile)^{5, 10-11}

การศึกษาของ Ismail และคณะ ที่ประเทศมาเลเซียระหว่างปี 1987-1989¹²⁻¹³ พบว่า exotoxin สามารถยับยั้งทั้งขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ และการสร้างโปรตีน (inhibit DNA synthesis และ protein synthesis) ประกอบด้วย lethal toxin และ necrotising toxin และราย

งานว่า lethal toxin ของเชื้อเป็นสารกลุ่มโปรตีน ขนาดประมาณ 31 kDa มี LD₅₀ ในหนู ประมาณ 20-30 microgram

โดยสรุปเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถสร้าง lethal exotoxin ได้ และ toxin นี้ น่าจะมีความสำคัญในการทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว และอาจมีประโยชน์ในการดูแลรักษาผู้ป่วย เนื่องจากอาจสามารถหาวิธียับยั้งฤทธิ์ของ toxin อย่างจำเพาะ แต่ในปัจจุบันยังมีข้อมูลรายละเอียดของ toxin นี้น้อยมาก จึงควรได้รับการศึกษาต่อไป

นอกจากนี้ยังมีผู้พยายามศึกษา virulent factor อื่น ๆ ของตัวเชื้ออีกมาก แต่ยังไม่ได้ข้อสรุปที่สำคัญ ตัวอย่างเช่น siderophore หรือ malleobactin¹⁴⁻¹⁵ ซึ่งทำให้เชื้อสามารถแย่งเหล็กจาก transferrin, hemolysis,¹⁶ protein tyrosine phosphatase¹⁷ และ extracellular enzymes อื่น ๆ (ดูรายละเอียดในบท *Burkholderia pseudomallei*) ซึ่งอาจมีบทบาทในการทำลายเนื้อเยื่อ (necrotoxicity) ที่กล่าวข้างต้น

ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดโคธิสกับภาวะเบาหวาน

ข้อมูลทางคลินิกบ่งชี้ชัดเจนว่าการเกิดเม็ดเลือดโคธิสมีความสัมพันธ์เป็นพิเศษกับภาวะเบาหวาน แต่ยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน โดยหลักการแล้วอาจเกิดได้จากความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุทั้งจากในส่วนของ serum factor และในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น phagocytes โดยมีผู้ศึกษาพบว่าประมาณ 25% ของผู้ป่วยเบาหวานชนิดต้องใช้อินซูลิน (IDDM) มีระดับคอมพลีเมนต์ C4 ต่ำกว่าปกติ¹⁸ รวมทั้งผู้ป่วยโรคเบาหวานอาจมีความบกพร่องในการทำงานของเซลล์กลุ่ม polymorphonuclear phagocyte ในขั้นตอน chemotaxis¹⁹ และผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ควบคุมไม่ได้ในภาวะ diabetic ketoacidosis จะมีความบกพร่องของการจับกินเชื้อแบคทีเรียในขั้นตอน ingestion และ bactericidal²⁰

จากการศึกษาความสามารถของเซลล์กลุ่ม polymorphonuclear phagocyte ในการจับกินเชื้อ *B. pseudomallei* ในผู้ที่เคยเป็นเม็ดเลือดโคธิส พบว่ามีความบกพร่องระดับปานกลาง เฉพาะในขั้นตอน bactericidal ในผู้ป่วยที่มีโรคเบาหวานร่วมด้วย ทั้งกลุ่มที่ควบคุมภาวะเบาหวานได้ดีและที่ควบคุมได้ไม่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับในคนปกติซึ่งสามารถฆ่าเชื้อนี้ได้ (Dharakul, unpublished data)

อย่างไรก็ตาม ภาวะความบกพร่องของกระบวนการ phagocytosis ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน อาจจะไม่ใช่อุปสรรคเดียวที่ทำให้ผู้ป่วยกลุ่มนี้ติดเชื้อ *B. pseudomallei* มากกว่าปกติ และอาจมีสาเหตุอื่นอีกที่ทำให้พบความสัมพันธ์ระหว่างโรคเม็ดเลือดโคธิสกับโรคเบาหวาน

การศึกษาของ Woods และคณะ²¹ ที่ University of Calgary พบว่า เชื้อ *B. pseudomallei* มี receptor สำหรับอินซูลิน ทำให้อินซูลินสามารถควบคุมอัตราการเติบโตของตัวเชื้อ โดยพบว่าเชื้อจะเติบโตได้ดีในภาวะที่ไม่มีอินซูลิน และการเติมอินซูลินลงไปจะยับยั้งการเติบโตของเชื้อ นอกจากนี้

นี้ยังพบว่าในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาเพื่อทำลาย beta cells ของตับอ่อน ทำให้เกิดภาวะเบาหวานชนิดขาดอินซูลิน เมื่อเปรียบเทียบการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในสัตว์ที่ขาดอินซูลินกับในสัตว์ปกติ พบว่าปริมาณเชื้อที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าหนูได้ 50% (LD₅₀) ในสัตว์ที่เป็นเบาหวานจะน้อยกว่าในหนูปกติถึงกว่า 10,000 เท่า และปริมาณเชื้อในปอดในสัตว์ที่เป็นเบาหวานเพิ่มขึ้นมากกว่าในหนูปกติประมาณ 100 เท่า อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ได้อ้างว่ามีข้อมูลทางคลินิกชัดเจนจากการศึกษาในประเทศไทยว่าภาวะเบาหวานชนิดขาดอินซูลิน (IDDM) เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคเมลิออยโดสิส แต่เท่าที่ทราบยังไม่มีการศึกษาในเรื่องนี้ และผู้ป่วยโรคเบาหวานในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนใหญ่ได้รับการรักษาเบาหวานแบบ non-insulin dependent (NIDDM) และส่วนน้อยเท่านั้นที่ได้รับการรักษาด้วยอินซูลิน

ในขณะนี้ยังไม่ทราบว่า ความสำคัญทางคลินิกของความสัมพันธ์ระหว่างอินซูลินกับโรคเมลิออยโดสิส เช่น ผู้ป่วยเมลิออยโดสิสที่เป็นเบาหวานมีภาวะอินซูลินต่ำหรือไม่ และความสำคัญแค่ไหน หรือหากแก้ไขภาวะอินซูลินต่ำจะมีผลต่อการดำเนินโรคเมลิออยโดสิสหรือไม่ รวมทั้งมีปัจจัยด้านอื่นหรือไม่ในผู้ป่วยเบาหวานที่ทำให้เป็นเมลิออยโดสิสอย่างรุนแรง

Relapse/reactivation/reinfection

ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยเมลิออยโดสิสคือการกลับเป็นซ้ำ (relapse) พบว่าประมาณ 23% ของผู้ที่เคยเป็นเมลิออยโดสิสจะกลับเป็นซ้ำอีก ข้อมูลจากการศึกษาของ พญ. วิชาดา เขาวงศ์และคณะ²² พบว่ามีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 2 ส่วนคือ ความรุนแรงของการติดเชื้อครั้งแรกและวิธีการและชนิดของยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษา โดยพบว่าหากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อครั้งแรกเป็น septicemic melioidosis หรือ multifocal localized melioidosis จะมีโอกาสเป็นเมลิออยโดสิสซ้ำได้มากกว่าในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อครั้งแรกเป็น localized melioidosis ประมาณ 5 เท่า และพบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย co-amoxiclav หรือ conventional antibiotics (chloramphenicol/doxycycline/trimethoprim/sulfamethoxazole) จะมีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูงกว่าการใช้ ceftriaxime ประมาณ 2 เท่า ซึ่งบ่งชี้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ bactericidal ที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียภายในเซลล์ได้ จะสามารถลดอัตราการกลับเป็นซ้ำได้ ข้อมูลนี้ประกอบกับข้อมูลจากการศึกษาของ Desmarchelier และคณะจากประเทศอังกฤษ³ ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อมากกว่าหนึ่งครั้ง โดยวิธี ribotyping พบว่าในผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากการติดเชื้อครั้งแรก มักเป็นเชื้อที่มี ribotype เดียวกันกับเชื้อที่แยกได้ในผู้ป่วยรายเดียวกันเมื่อเป็นเมลิออยโดสิสครั้งที่สอง จากข้อมูลข้างต้นนี้พอสรุปได้ว่าการเกิด relapse ในโรคเมลิออยโดสิสส่วนใหญ่เกิดจากการที่เชื้อถูกทำลายไม่หมด โดยเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถซ่อนตัวอยู่ภายในเซลล์มาโครฟาจและอาจมีอยู่ภายในเซลล์ชนิดอื่น ๆ โดยอาจบ่งชี้ว่าการติดเชื้อครั้งแรกด้วยเชื้อที่มีความรุนแรงสูง อาจทำให้เชื้อแพร่กระจายไปได้มากกว่าภายในร่างกาย หลังจากการได้รับยาปฏิชีวนะแล้ว ในบางตำแหน่งที่ยาปฏิชีวนะไม่สามารถเข้าถึงตัวเชื้อ จึงสามารถซ่อนตัวได้

เป็นเวลานาน อย่างไรก็ตาม การเกิดจากติดเชื้ออีกครั้งจากภายนอกก็ยังมีโอกาสเกิดขึ้นได้เหมือนกัน

มีรายงานว่าสามารถพบ asymptomatic infection ได้ในสัตว์ โดยพบรอยโรคได้ในต่อมน้ำเหลืองและม้าม²³ แต่ยังไม่ทราบว่าในมนุษย์จะมี asymptomatic infection (latency หรือ dormant stage) จริงหรือไม่ และหากมีเชื้อซ่อนตัวอยู่ที่ใด

ในปัจจุบัน ยังไม่ทราบกลไกที่แน่นอนในการซ่อนตัวของเชื้อ เราทราบเพียงว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถสร้าง biofilm ทั้งในจานเพาะเชื้อและในร่างกายของสัตว์ทดลองและของผู้ติดเชื้อได้ biofilm หรือ glycocalyx ที่สร้างขึ้นประกอบด้วย exopolysaccharide ที่สามารถหุ้มตัวเชื้อ ทำให้ป้องกันตัวเองจากยาปฏิชีวนะและกลไกของร่างกายที่จะมาทำลายเชื้อ²⁴ แต่ยังไม่ทราบว่ายังมีปัจจัยอื่นเกี่ยวข้องด้วยหรือไม่ ในการซ่อนตัวของเชื้อใน dormant form virulence factor อื่น ๆ เช่น extracellular enzymes อาจจะมีบทบาทในเรื่องนี้

ในปัจจุบันมีคำถามที่สำคัญหลายคำถาม เช่น เชื้อซ่อนตัวอยู่ที่ใด, โดยอาศัยกลไกอย่างไร และมีวิธีใดที่จะตรวจพบและกำจัดตัวเชื้อจากที่ซ่อนเหล่านี้, ร่างกายผู้ติดเชื้อใช้กลไกอย่างไรในการควบคุมให้เชื้อหลบซ่อนอยู่โดยไม่เกิดโรคขึ้น และจะมีแนวทางอย่างไรในการป้องกันไม่ให้เชื้อที่ซ่อนอยู่ เพิ่มจำนวนและก่อให้เกิดโรคอีก รวมทั้งการเกิด relapse/reactivation อาศัยกลไกใดและมีปัจจัยใดเกี่ยวข้องด้วย

ภูมิคุ้มกันโรค

ร่างกายตอบสนองต่อการติดเชื้อเมลิออยโดสิสโดยการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังจากการติดเชื้อครั้งแรกหนึ่งจะไม่สามารถป้องกันไม่ให้ติดเชื้ออีกได้ (ไม่ใช่ protective immunity) เนื่องจากผู้ป่วยที่เคยเป็นเมลิออยโดสิสมาแล้วอาจเกิดเป็นโรคซ้ำได้อีก นอกจากนี้ ความรุนแรงของโรคและอัตราการตายของผู้ป่วยที่มี relapse ก็ไม่แตกต่างจากในการติดเชื้อครั้งแรก

มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่เคยมี relapse มีการทำงานของเซลล์ฟาโกไซต์ที่ผิดปกติ โดยพบว่า bactericidal activity ของเซลล์ลดลง แม้ว่าผู้ป่วยจะได้รับการรักษาจนไม่มีอาการของโรคแล้วก็ตาม ความบกพร่องนี้พบมากที่สุดที่สุดในผู้ที่ไม่มีเบาหวานร่วมด้วย (Dharakul, unpublished data)

การที่พบว่าพยาธิสภาพของ chronic melioidosis มีลักษณะเป็น granuloma บ่งชี้ว่ามีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ ซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการยับยั้งให้ตัวเชื้อถูกจำกัดอยู่ภายในรอยโรค ไม่แพร่กระจายออกไป

ความที่มีสมมติฐานว่า เชื้อที่ซ่อนตัวอยู่ในร่างกายจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น เมื่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันลดลงนั้น ยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างจริงจัง คาดว่าอาจจะพบผู้ป่วยโรคเมลิออย

โตขึ้นมากในผู้ที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเอดส์ แต่จนถึงปัจจุบัน ยังไม่พบว่าอัตราการเป็นโรคเมลิออยโดสิสเพิ่มขึ้นสูงกว่าปกติในผู้ป่วยเหล่านี้

การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า การสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองโดยใช้ killed bacteria ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ แต่การใช้วัคซีนเชื้อตัวเป็นที่ย่อยมาจาก avirulent strain สามารถลดความรุนแรงของการติดเชื้อสายพันธุ์ virulent strain ได้²⁵ มีการทดลองให้แอนติบอดีจำเพาะต่อ flagellin ของเชื้อพร้อมกับตัวเชื้อเป็น พบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อในสัตว์ทดลองได้²⁶

ภูมิคุ้มกันต่อโรคชนิดที่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ (protective immunity) น่าจะมีทั้งภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ เนื่องจากเชื้อเป็นชนิด intracellular bacteria ดังได้กล่าวมาแล้ว และภูมิคุ้มกันชนิดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ virulence factor บางชนิด เช่น แอนติบอดีต่อ exotoxin และ lipopolysaccharide ซึ่งอาจลดความรุนแรงของ acute septicemic melioidosis ได้ หรือแอนติบอดีต่อ flagellin หรืออื่น ๆ ที่สามารถลดการแพร่กระจายของเชื้อ เป็นต้น ปัจจุบันยังมีการศึกษาเรื่องการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในโรคเมลิออยโดสิสน้อยมาก

Research questions

1. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคเมลิออยโดสิส โดยเฉพาะปัจจัยที่ทำให้ภาวะ septicemic melioidosis มีความรุนแรงสูงมาก ซึ่งประกอบด้วยปัจจัยของตัวเชื้อเองที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค ได้แก่ virulent/avirulent strains, virulence factors และกลไกการเกิดความรุนแรง และปัจจัยพื้นฐานเรื่องสภาพของผู้ป่วยที่ทำให้มีอัตราตายสูง อันได้แก่ภาวะบกพร่องด้านภูมิคุ้มกันหรืออื่น ๆ ที่ยังไม่ทราบในปัจจุบัน

2. ความสัมพันธ์ระหว่างโรคเมลิออยโดสิสกับโรคเบาหวาน โดยเฉพาะความรู้ความเข้าใจในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล ความสำคัญทางคลินิกของอินซูลินในโรคเมลิออยโดสิส เช่นผู้ป่วยเมลิออยโดสิสที่เป็นเบาหวานมีภาวะอินซูลินต่ำหรือไม่ และความสำคัญแคโทน หรือหากแคโทนภาวะอินซูลินต่ำจะมีผลต่อการดำเนินโรคเมลิออยโดสิสหรือไม่อย่างไร

3. กลไกและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิด relapse/reactivation/reinfection ได้แก่ มี asymptomatic infection (latency หรือ dormant stage) จริงหรือไม่ และเชื้อซ่อนตัวอยู่ที่ใด กลไกและปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการซ่อนตัวของเชื้อใน dormant form และมีวิธีใดที่จะตรวจพบและกำจัดตัวเชื้อจากที่ซ่อนเหล่านี้ ร่างกายผู้ติดเชื้อใช้กลไกอย่างไรในการควบคุมให้เชื้อหลบซ่อนอยู่โดยไม่เกิดโรคขึ้น และจะมีแนวทางอย่างไรในการป้องกันไม่ให้เชื้อที่ซ่อนอยู่ เพิ่มจำนวนและก่อให้เกิดโรคอีก รวมทั้งการเกิด relapse/reactivation อาศัยกลไกใดและมีปัจจัยใดเกี่ยวข้องด้วย

4. Protective immunity ในโรคเมลิออยโดสิส ทั้งภูมิคุ้มกันด้านเซลล์และภูมิคุ้มกันชนิดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ virulence factor บางชนิด ซึ่งอาจลดความรุนแรงของ acute septicemic melioidosis ได้ การศึกษาลักษณะนี้อาจอาศัยการใช้เชื้อชนิดที่เป็น virulent/avirulent

strains โดยใช้ animal model การศึกษากลไกของระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนาวัคซีน

เอกสารอ้างอิง

- ๓ 1. Dannenberg AM, Scott EM. Melioidosis: Pathogenesis and immunity in mice and hamsters. II. Studies with avirulent strains of *Malleomyces pseudomallei*. Amer J Path 1958; 34: 1099-1121.
- ๓ 2. Veljanov D, Najdenski H. Virulence and susceptibility to phagocytosis of *Pseudomonas pseudomallei* R- and S-forms for ground squirrels (*Citellus citellus* L.). Acta Microbiol Bulgarica 1993; 26: 11-16.
- ๓ 3. Desmarchelier PM, Dance DAB, Chaowagul W, Suputtamongkol Y, White NJ, White TL. Relationships among *Pseudomonas pseudomallei* isolates from patients with recurrent melioidosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 1592-1596.
- ๓ 4. Figgott JA, Hochholzer L. Human melioidosis: A histopathologic study of acute and chronic melioidosis. Arch Path 1970; 90: 101-111.
- ๓ 5. Colling M, Nigg C, Heckly RJ. Toxins of *Pseudomonas pseudomallei*. I. Production in vitro. J Bacteriol 1958; 76: 122-126.
- ๓ 6. Pruksachartvuthi S, Aswapokee N, Thankerngpol K. Survival of *Pseudomonas pseudomallei* in human phagocytes. J Med Microbiol 1990; 31: 109-114.
- ๓ 7. Chaowagul W, White NJ, Dance DAB, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TME, Looareesuwan S, Pitakwatchara N. Melioidosis: A major cause of community-acquired septicemia in Northeastern Thailand. J Infect Dis 1989; 159: 890-899.
- ๓ 8. White NJ, Dance DAB, Chaowagul W, Wattanagoon, Wuthiekanun V, Pitakwatchara N. Halving of mortality of severe melioidosis by Ceftazidime. Lancet 1989, ii, 697-700.
- ๓ 9. Iwasa S, Petkanchanopong W, Naigowit P, Kondo E, Kanai K. Endotoxin of *Pseudomonas pseudomallei* detected by the body weight-decreasing reaction in mice and comparison of it with those of *P. cepacia* and *P. aeruginosa*. Jpn J Med Sci Biol 1992; 45: 35-47.

10. Heckly RJ. Differentiation of exotoxin and other biologically active substances in *Pseudomonas pseudomallei* filtrates. J Bacteriol 1964; 88: 1730-1736.
11. Heckly RJ, Nigg C. Toxins of *Pseudomonas pseudomallei*. II. Characterization. J Bacteriol 1958; 76: 427-436.
12. Ismail G, Embi MN, Omar O, Razak N. Toxigenic properties of *Pseudomonas pseudomallei* extracellular products. Tropical Biomed 1987; 4: 101-111.
13. Mohamed R, Nathan S, Embi N, Razak N, Ismail G. Inhibition of macromolecular synthesis in cultured macrophages by *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin. Microbiol Immunol 1989; 33: 811-820.
14. Yang H, Chaowagul W, Sokol PA. Siderophore production by *Pseudomonas pseudomallei*. Infect Immunol 1991; 59: 776-780.
15. Yang H, Kooi CD, Sokol PA. Ability of *Pseudomonas pseudomallei* malleobactin to acquire transferrin-bound, lactoferrin-bound, and cell-derived iron. Infect Immunol 1993; 61: 656-662.
16. Ashdown LR, Koehler JM. Production of hemolysin and other extracellular enzymes by clinical isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. J Clin Microbiol 1990; 28: 2331-2334.
17. Kanai K, Kondo E. Recent advances in biomedical sciences of *Burkholderia pseudomallei* (Basionym: *Pseudomonas pseudomallei*). Jpn J Med Sci Biol 1994; 47: 1-45.
18. Pickup JC, Williams G. Textbook of diabetes. Boston : Blackwell Scientific Publications. 1991; 2: 813-831.
19. Molenaar DM, Palumbo PJ, Wilson WR, Rims RE. Leucocyte chemotaxis diabetic patients and their nondiabetic first degree relatives. Diabetes 1976; 25 (Suppl 2); 880-883.
20. Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ. Impaired leukocyte function inpatients with poorly controlled diabetes. Diabetes 1974; 23: 9-15.
21. Woods DE, Jones AL, Hill PJ. Intereaction of insulin with *Pseudomonas pseudomallei*. Infect Immunol 1993; 61: 4045-4050.
22. Chaowagul W, Suputtamongkol Y, Dance DAB, Rajachanuvong A, Pattararechachai J, White NJ. Relapse in melioidosis: Incidence and risk factors. J Infect Dis 1993; 168: 1181-1185.

- ~~23~~ Laws L, Hall WTK. Melioidosis in animal in North Queensland. I. Incidence and pathology, with special reference to central nervous system lesions. *Queensland J Agric Sci* 1963; 20: 499-513.
- ~~24~~ Vorachit M. Role of glycocalyx in melioidosis. Annual meeting of the Infectious Disease Association of Thailand. 1993; 52-54.
- ~~25~~ Dannenberg AM, Scott EM. Melioidosis: Pathogenesis and immunity in mice and hamsters. III. Effect of vaccination with avirulent strains of *Pseudomonas pseudomallei* on the resistance to the establishment and the resistance to the progress of respiratory melioidosis caused by virulent strains; all-or-none aspects of the disease. *J Immunol* 1960; 84: 233-246.
- ~~26~~ Brett PJ, Mah DCW, Woods DE. Isolation and characterisation of *Pseudomonas pseudomallei* flagellin proteins. *Infect Immunol* 1994; 62: 1914-1919.

บทที่ 5

LABORATORY DIAGNOSIS

แม้ว่าโรคเมลิออยโดสิสมีอาการแสดงออกทางคลินิกได้หลายรูปแบบ แต่จากสถิติซึ่งมีการบันทึกเอาไว้ พบว่าเป็นอาการของโลหิตเป็นพิษอย่างรุนแรง (septicemia) มากที่สุดคือประมาณ 60% และมีอัตราการการตายสูงมาก และส่วนใหญ่จะตายภายใน 2-3 วัน หากไม่ได้รับการวินิจฉัยโรคและรักษาอย่างทันที เนื่องจากอาการทางคลินิกของโรคเมลิออยโดสิสนั้น อาจเหมือน ๆ กับโรคอื่น ๆ ดังนั้น การวินิจฉัยโรคทางคลินิกนั้นเป็นไปด้วยความยากลำบาก และต้องอาศัยแพทย์ผู้มีประสบการณ์สูง ดังนั้น การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญมาก การที่จะวินิจฉัยโรคนี้ออกจากโรคติดเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ โดยทั่ว ๆ ไปแล้วทำได้ 3 แบบ คือ

1. การวินิจฉัยโดยอาศัยแบคทีเรียวิทยา
2. การวินิจฉัยโดยอาศัยภูมิคุ้มกันวิทยา
3. การวินิจฉัยโดยอาศัยอนุชีววิทยา

การวินิจฉัยโรคโดยอาศัยแบคทีเรียวิทยา

การวินิจฉัยแบบนี้มักจะทำโดยเริ่มจากการย้อมสีแกรมจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ซึ่งได้แก่เลือด เสมหะ หนองจากฝีที่ได้จากอวัยวะต่าง ๆ ลักษณะการติดสีของเชื้อนี้จะติดสีแกรมลบรูปแท่ง โดยจะติดสีเข้มที่ปลายทั้งสองข้าง (bipolar staining) แต่ลักษณะการติดสีดังกล่าวไม่จำเพาะต่อเชื้อนี้ เพราะอาจพบได้ในพวก *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* และ *Pasteurella pestis* ดังนั้น จึงเป็นความจำเป็นที่จะต้องเพาะเชื้อเพื่อให้แน่ใจว่าเป็นเชื้อนี้ การเพาะเชื้อมักทำโดยการนำสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยมาเพาะเชื้อบน blood agar และ MacConkey agar หรือ EMB agar ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อขึ้นให้สังเกตลักษณะโคโลนีที่เหี่ยวบน (ถ้ามีอายุมากขึ้น) และมีกลิ่นของไอระเหยของดินหลังฝนตก เมื่อย้อมสีแกรมจะพบว่าติดสีแกรมลบเป็น bipolar stain เพื่อให้ได้การวินิจฉัยที่ถูกต้องแม่นยำว่าเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* จริง จะต้องทดลองปฏิกิริยาทางชีวเคมีเช่นเดียวกับการ identify เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น การทดสอบที่ใช้มี oxides test, motility, nitrate reduction, การเกิดกรดใน OF glucose, OF maltose และ OF lactose (10%) โดยที่เชื้อ *B. pseudomallei* จะให้ผลบวกกับ test ที่กล่าวมาทุก test ยกเว้น nitrate reduction ซึ่งอาจให้ผลลบก็ได้ นอกจากนี้แล้วยังมีนักวิทยาศาสตร์บางท่านได้พยายามที่จะพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective media) สำหรับแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ โดยการเติมสารเคมีหรือยาต้านจุลชีพบางอย่างลงไป เช่น Farkas-Himsley¹ ได้เติม collistin หรือ penicillin G ลงใน MacConkey agar, Ashdown และ

คณะ² ได้เติม crystal violet, glycerol, neutral red และ gentamicin ลงใน TSA (Trypticase soy agar) (Ashdown's selective medium); Ashdown's selective medium ใช้ได้ดีในการแยกเชื้อ *B. pseudomallei* จากสิ่งส่งตรวจที่ได้จากผู้ป่วยและจาก environment. Wuthiekanun และคณะ³ ได้ประเมินประสิทธิภาพของ Ashdown's selective medium โดยได้นำไปใช้ในห้องปฏิบัติการกับสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยจำนวน 1,970 ตัวอย่าง พบว่าเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ สามารถทำให้ตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* จากสิ่งส่งตรวจที่มีการปนเปื้อนของ normal flora เช่น จาก throat, rectum, wounds และ sputum เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการใช้เลี้ยงโดย blood agar และ MacConkey agar นอกจากการพัฒนา selective media ต่าง ๆ แล้ว ในปี 1989 ยังได้มีการนำเอา API 20 NE kit มาใช้เป็น biochemical tests สำหรับการ identify เชื้อ *B. pseudomallei* โดย Dance และคณะ⁴ API 20 NE kit นี้ได้ถูกนำมาเป็น screening test โดยให้ผลถูกต้องถึง 97.5% จากเชื้อทั้งหมด 390 strains โดยเชื้อที่วิเคราะห์ผิดมีเพียง 1 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์เป็น *B. cepacia* นอกจาก Dance และคณะ⁴ แล้วในปี 1993 Mik⁵ ได้นำ kit นี้ไปใช้ได้ผลเป็นที่น่าพอใจในการ identify เชื้อ *B. pseudomallei* ในประเทศญี่ปุ่น ต่อมาในปี 1992 Ashdown⁶ ได้นำเอา Minitek disc system มาใช้แยกเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. cepacia* ได้ผลเป็นที่น่าพอใจโดยการแยกเชื้อทั้งสองออกจากกัน อาศัยเอ็นไซม์ arginine dehydrolase, lysine decarboxylase, ornithin decarboxylase, beta-galactopyranosidase และ nitrate reductase อย่างไรก็ตาม การวินิจฉัยโรคโดยวิธีการเพาะเชื้อต้องกินเวลาอย่างน้อย 2-3 วัน จึงจะได้ผลการตรวจ ซึ่งบางครั้งอาจไม่ทันการ โดยเฉพาะในกรณีที่มีการติดเชื้อในเลือด

นอกจากวิธีการชีวเคมีที่ใช้โดยการ identify เชื้อแล้ว ยังมีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มได้พัฒนาวิธีการตรวจทาง serology สำหรับการ identify เชื้อโดยใช้ Latex agglutination, Direct และ Indirect Immunofluorescent โดย Latex agglutination⁷ จะใช้ polyclonal antibody ต่อ boiled whole cells แล้วนำมาเคลือบกับ latex เพื่อทำ agglutination กับ bacteria ที่สงสัย จากวิธีนี้พบว่าให้ sensitivity 100% และ specificity 100% เช่นกัน ส่วนวิธี Immunofluorescent⁸ นั้น ได้มีการใช้ polyclonal antibody ซึ่งผลิตจาก guinea pig และ rabbit โดยใช้ antibody ที่จำเพาะต่อ lipopolysaccharide (LPS) และ partially purified culture filtrate (ซึ่งเป็น proteins) พบว่าถ้าใช้ antibody จาก rabbit ผลการทดสอบไม่ต่างกันระหว่าง LPS กับ protein antigen คือได้ผลบวก 178 จาก 187 และ 177 จาก 187 ตามลำดับ เมื่อนำเอา antibody ดังกล่าวไปทดสอบกับเชื้อชนิดอื่น พบว่า guinea pig anti-protein antibody จะไม่มี cross-reaction กับ *B. cepacia* ขณะที่ antibody ชนิดอื่นมี แต่อย่างไรก็ตาม antibody ดังกล่าวก็ยังเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *Pseudomonas* spp. (1/24) และ *Staphylococci* (3/3)

ในปี 1994 Walsh และคณะ⁹ ได้พัฒนาวิธี Direct Immunofluorescent (DIF) antibodies เพื่อใช้ identify เชื้อใน clinical specimens ชนิดต่าง ๆ เช่น sputum, wound swabs, pus, body fluids และ urine โดยเตรียม antibody จากกระต่ายที่ฉีดด้วย heat killed suspension ของเชื้อ *B. pseudomallei* จากการศึกษาพบว่าวิธี DIF ให้ผลบวกกับเชื้อ *B. pseudomallei* ทุกตัว (51

จาก 51 strains) และไม่มี cross reaction กับ *Pseudomonas* species อื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *B. cepacia* และเชื้อจากกลุ่ม Enterobacteriaceae สรุปแล้วพบว่ามี sensitivity 73% และจะต้องมีเชื้อในสิ่งส่งตรวจอย่างน้อย 10^4 – 10^5 ตัว/ml จึงจะตรวจพบได้

การวินิจฉัยโรคทางภูมิคุ้มกันวิทยาหรือน้ำเหลืองวิทยา (Serology)

เพื่อให้การวินิจฉัยโรคนี้เป็นไปด้วยความรวดเร็วยิ่ง ๆ ขึ้น จึงได้มีคณะผู้วิจัยกลุ่มต่าง ๆ พยายามพัฒนาวิธีการตรวจหา antibody หรือ antigen ที่จำเพาะต่อเชื้อในสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเมลิออยโดสิส

-การตรวจหา specific antibodies

การพัฒนาการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิสทางน้ำเหลืองวิทยา มักจะอาศัยการตรวจหา antibody ในซีรัมผู้ป่วยที่สงสัย วิธีที่เคยใช้ตรวจกันมามีหลายวิธีคือ

1. Agglutination เป็นวิธีแรก ๆ (ปี 1963)¹⁰ ของการทำการตรวจหา antibody โดยการตรวจหา antibody ที่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เตรียมเป็น cell suspension เกิดการเกาะกลุ่มตกตะกอนลงมาให้เห็น วิธีนี้เป็นวิธีง่าย ๆ แต่ให้ sensitivity ค่อนข้างต่ำ โดยในครั้งนั้นได้นำเอาวิธีนี้ไป survey inapparent infections ในคนไทยปกติ เทียบกับคนอเมริกัน และต่อมาได้มีนักวิทยาศาสตร์กลุ่มอื่นนำวิธีดังกล่าวไปใช้เช่นกัน

2. Complement fixation test (CF) เป็นวิธีที่คิดค้นขึ้น โดย Nigg และ Johnston เมื่อปี ค.ศ. 1961¹¹ และต่อมาได้มีผู้นำมาใช้เปรียบเทียบกับวิธีอื่น ๆ อีกหลายครั้ง โดยแอนติเจนที่เตรียมเพื่อใช้ในวิธีนี้มีหลายแบบ ตั้งแต่แบบที่เป็น trichloroacetic acid extract, aqueous extracts (ทำให้เซลล์แตกโดยใช้เสียง), somatic antigen ที่เตรียมจาก saline extraction จากการศึกษาพบว่า CF (ที่ทำโดยใช้ sonicated and disrupted cells) นั้น จะให้ความไว (sensitivity) ในการตรวจสูงถึงร้อยละ 80–100 จากการศึกษาของ Alexander และคณะ¹² พบว่า CF สามารถตรวจหา antibody ได้หลังจากผู้ป่วยมีอาการของโรคเพียง 1 สัปดาห์ และจะพบ antibody สูงสุดในสัปดาห์ที่ 3–4–5 แต่อย่างไรก็ตาม CF นี้อาจให้ผลลบ (19%) ในที่คนไข้ยังมีอาการอยู่ และอาจให้ผลบวกปลอม (false positive) กับซีรัมของผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่น ๆ เช่น Tuberculosis, *Pseudomonas aeruginosa* infections, *P. stutzeri*, leptospirosis, brucellosis, typhoid และ influenza จากการศึกษาของ Ashdown¹³ ในปี 1981 โดยใช้วิธี CF พบว่า CF ให้ผลการตรวจหา antibody ได้ sensitivity สูงกว่า IHA แต่ antibody ที่ตรวจพบไม่สามารถบอกว่าเป็น subclinical infection ได้ ต่อมาในปี 1988 Thomas และคณะ¹⁴ ได้นำเอาวิธี CF ของ Alexander และคณะ มาทดลองใช้ในการวินิจฉัยโรคในสัตว์ประเภท caprine และพบว่าสามารถตรวจพบ antibody ในแพะภายใน 7 วันหลังจากที่ได้รับเชื้อและให้ผล sensitivity = 82.4% specificity = 100% อย่างไรก็ตาม พบว่าวิธี IHA จะให้ sensitivity ต่ำกว่า CF

3. Indirect hemagglutination test (IHA) (วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน) เป็นวิธีที่พัฒนาโดย Ileri ในปี 1965¹⁵ และได้มีผู้คิดค้นดัดแปลงต่อ ๆ มาโดยเปลี่ยนอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงเชื้อและชนิดของ antigen ที่ใช้ เช่น Alexander และคณะ,¹² Ashdown และคณะ,¹³ Khupulsup และ Petchclai,¹⁶ Appassakij และคณะ,¹⁷ แอนติเจนที่เตรียมสำหรับวิธี IHA นี้มีอยู่ 2 ชนิด คือ antigen ที่เตรียมจากการเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* ในอาหารสังเคราะห์ (ซึ่งมีการใช้อาหารสังเคราะห์ 2 ชนิดด้วยกัน ชนิดแรกที่ใช้คืออาหารสังเคราะห์ที่เตรียมด้วยวิธีของ Rice และคณะ¹⁸ ส่วนชนิดที่สองเป็น glycine broths เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยวิธี autoclave หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเอา supernatant ออกมาแล้ว เติม phenol ให้เป็น 0.5% แล้วจึงนำแอนติเจนนี้มาเคลือบบนเม็ดเลือดแดงของแกะโดยใช้ 2.5% glutaraldehyde จากการทำ IHA ของกลุ่ม Alexander และคณะ¹² พบว่ามีความไวสูงถึงร้อยละ 80-100 และมีความจำเพาะสูงกว่าวิธี CF ที่กล่าวมา แต่ก็ยังอาจมี cross-reaction กับซีรัมผู้ป่วยบางรายในโรค tuberculosis, leptospirosis, influenza, typhus และโรคติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri* โดย IHA ที่ทำการศึกษาสามารถตรวจหา antibody ได้ 1 สัปดาห์ หลังจากมีอาการของโรคเมื่อใช้ cut off titer 1:40 แต่ให้ผลลบในผู้ป่วยถึง 19% นอกจากนั้นยังพบว่ายังสามารถตรวจพบ IHA antibody ได้หลังมีอาการเกิดขึ้นได้นานถึง 2 ปี คล้าย ๆ กับผลของ Ashdown¹³ ซึ่งได้ทดลองใช้ IHA กับผู้ป่วย 23 ราย และพบว่าสามารถตรวจพบ antibody ได้ตั้งแต่ 6 เดือนแรกจนถึง 2 ปีของการติดเชื้อ

ต่อมาในปี 1988 Thomas และคณะ¹⁴ ได้เปรียบเทียบวิธี IHA ที่ใช้ antigen ต่างกัน ทำโดยให้ชื่อเรียกว่า IHA-A (ตามวิธีของ Alexander และคณะ,¹² และ Ashdown¹³ ที่กล่าวมา ซึ่งใช้ antigen ที่เตรียมจาก synthetic medium ตามวิธีของ Rice และคณะ¹⁸) กับวิธี IHA-L (ซึ่งใช้ antigen ที่เตรียมจาก nutrient agar) เมื่อใช้ serum จากแพะที่ได้รับเชื้อจำนวน 118 ราย ในการทดสอบพบว่า IHA-A และ IHA-L สามารถใช้ตรวจหา antibody ได้ตั้งแต่ 7 วันนับจากวันที่ได้รับเชื้อ โดย IHA-A ให้ sensitivity ดีกว่า IHA-L ส่วน specificity นั้น ทั้ง IHA-A และ IHA-L ให้ผลเท่ากันแต่วิธี CF ไม่ได้

ในปี 1986 Khupulsup และ Petchclai¹⁶ ได้นำเอา IHA วิธีของ Alexander มาใช้ในการตรวจกับ blood donor sera และ serum ผู้ป่วยเม็ดเลือดขาวโตสิสและผู้ป่วยโรคอื่น ๆ พบว่า ใน blood donor ให้ผลบวกถึง 47.1% (cut off $\geq 1:40$) sera โรคอื่นให้ผลบวก 29.5% และ serum ผู้ป่วยเม็ดเลือดขาวโตสิสให้ผลบวก 7 จาก 9 คน ในปี 1990 Appassakij และคณะ¹⁷ ได้ใช้ IHA ที่เตรียม antigen จาก glycine broth มาทดสอบกับ serum ชนิดต่าง ๆ พบว่าถ้าใช้ cut off $\geq 1:40$ จะให้ผลบวกใน blood donor ของประชากรในภาคใต้ของประเทศไทยถึง 21% และเมื่อใช้ cut off $\geq 1:160$ จะให้ sensitivity 92%

ข้อเสียของวิธี serology ที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด คือไม่สามารถใช้แยกแยะระหว่างการติดเชื้อปัจจุบัน (current infection) ออกจากการติดเชื้อในอดีตแต่ได้หายแล้ว (previous infection) และ cut-off titer ที่ใช้ในการแยกผู้ป่วยออกจากคนปกตินั้นจะแตกต่างกันออกไปในแต่ละแห่ง

เนื่องจากว่าคนปกติจากที่ต่าง ๆ กันอาจมี titer สูงต่ำไม่เท่ากัน จึงทำให้การใช้ titer เหล่านี้ในการวินิจฉัยโรคเป็นไปด้วยความยากลำบากโดยต้องศึกษาระดับ antibody ในคนปกติก่อน นอกจากนี้ IHA ยังให้ false positive ในคนปกติ และ false negative ในผู้ป่วยได้อีกด้วย

4. Indirect fluorescent antibody staining (IFA) เป็นวิธีที่เริ่มใช้โดย Ashdown¹³ โดยการประยุกต์เอาวิธี immunofluorescent มาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี แอนติเจนที่ใช้สำหรับการตรวจเตรียมจากการเพาะเลี้ยงเชื้อบน TSA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ของเชื้อที่ได้มาปั่นล้างใน phosphate buffered saline, pH 7.4 เพื่อนำมาทำเป็น cell suspension หลังจากนั้นจึงนำแอนติเจนที่ได้มาหยดบน slide เพื่อนำมาทำปฏิกิริยากับ serum ที่ได้จากผู้ป่วย แล้วจึงใส่ conjugated secondary antibody ที่มีความจำเพาะกับ IgM หรือ IgG ของคนลงไป โดยวิธีนี้ทำให้สามารถตรวจหา IgM antibody ได้โดยการดูจากการเรืองแสงของเชื้อ โดยใช้กล้อง fluorescence วิธีนี้จะช่วยในการแยกวินิจฉัยได้ว่าผู้ป่วยกำลังเป็นโรคอยู่ (current infection) คือมี specific IgM antibody หรือว่าเคยป่วยด้วยโรคนี้มาก่อนแล้วหาย (previous infection) หรือมี antibody อยู่ แต่ตรวจไม่พบเชื้อ (subclinical infections) วิธีนี้มีความไวสูงกว่าวิธี IHA และยังมี specificity สูงอีกด้วย เนื่องจากไม่พบ false positive ในซีรัมคนปกติ ตลอดจนผลที่ได้ยังมีความสัมพันธ์กับอาการของโรคด้วย IFA IgM นี้ จะให้ผลลบใน 3-6 เดือน หลังจากผู้ป่วยดังกล่าวได้รับการรักษาแล้ว อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ก็ยังมีความข้อเสียที่ว่าเพราะว่ามีรายงานว่าตรวจ IgM antibody พบในคนปกติในที่แตกต่างกันมีระดับไม่เท่ากัน จึงจำเป็นจะต้องมี cut-off titer ของแต่ละแห่งอีกด้วย และยังต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง และผู้อ่านผลจะต้องมีประสบการณ์มากพอสมควร

5. Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นโดยนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มที่ใช้ในการตรวจหา antibody ชนิด IgG หรือ IgM ต่อ crude antigen, endotoxin และ exotoxin ตลอดจนศึกษาโดยใช้ specific antigen เริ่มแรก โดยทำการตรวจหา ELISA IgG, IgM ที่จำเพาะต่อ crude extract โดย Ashdown⁹ ในปี 1989 (antigen ชนิดเดียวกับที่ใช้ใน CF test ของ Alexander และคณะ¹²) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับวิธี IFA IgG, IFA IgM และ IHA พบว่า ELISA IgG ให้ sensitivity = 90% และ specificity = 99% (เมื่อเทียบกับ IFA IgG) โดยมีความไวกว่า IHA ซึ่งให้ sensitivity เพียง 74% นอกจากนั้น ยังพบว่า ELISA IgM จะให้ผลบวกโดยมี titer $\geq 1:5,120$ ในผู้ป่วยที่มี active diseases ถึง 92% และ titer $\leq 1:1,280$ ในผู้ป่วยที่มี subclinical infection ถึง 93% ดังนั้น ผลดังกล่าวจึงสามารถใช้แยก active กับ subclinical infections ออกจากกันได้โดยอาศัย cut off titer 1:2,560 แต่อย่างไรก็ตาม ELISA IgM ดังกล่าวยังให้ผลบวกกับ serum คนปกติ (1/200), Infectious mononucleosis (1/30), *P. aeruginosa* (2/11) *B. cepacia* (1/3) และ *Legionella* (1/5)

ในปี 1990 Kunakorn และคณะ²⁰ ได้ทดสอบ ELISA IgM และ IgM capture ในผู้ป่วยเมลิออยโดสิสคนไทยและคนปกติ เมื่อเทียบกับ IHA พบว่า ELISA IgM ให้ผลดีที่สุดคือ sensitivity 88% และ specificity 92.2% ปี 1992 Petkanjanapong และคณะ²¹ ได้พัฒนา ELISA เพื่อตรวจหา IgG antibody ที่จำเพาะต่อ endotoxin antigen (LPS) เมื่อเทียบกับ IHA พบ

ว่าให้ sensitivity = 95.7% และ specificity 94.2% ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มของ Embi และคณะ²² ใน 1992 ซึ่งใช้ ELISA ต่อ exotoxin และ whole cell มาศึกษา prevalence ของ antibodies ในทหารชาวมาเลเซีย และพบว่าให้ผลบวกต่อ exotoxin ถึง 54.4% และต่อ whole cell ถึง 65.7%

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าวิธี ELISA ที่ใช้ยังให้ผลบวกปลอมได้ในผู้ป่วยโรคต่าง ๆ เนื่องจาก antigen ที่ใช้ยังเป็น crude antigen อยู่ ดังนั้น ในปี 1993 Anuntagool และคณะ²³ จึงได้ศึกษาหา antigen ที่จำเพาะของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยวิธี SDS-PAGE และ Western blot พบว่า antigen ที่จำเพาะสามารถเตรียมได้จาก crude cell extract ซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 19.5 kDa และเตรียมได้จาก veronal extract ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 39.0 kDa งานดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับงานของ Wongratanacheewin และคณะ²⁴ ปี 1993 ที่พบว่า antigen ที่จำเพาะของเชื้อตัวนี้คือ 19.5 kDa, 19.0, 20.5 kDa และ 40 kDa Anuntagool และคณะ²³ จึงได้ purified 19.5 kDa fraction โดยวิธี elution จาก SDS-PAGE มาพัฒนาวิธี ELISA เพื่อตรวจจาก IgG antibody พบว่าให้ sensitivity 92% specificity 91% แต่ ELISA IgG ดังกล่าวยังเกิด cross reaction กับ *B. cepacia* แต่เมื่อนำ antigen ขนาด 39 kDa มาพัฒนา ELISA เพื่อตรวจหา IgM antibody พบว่าให้ sensitivity เพียง 38% ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มของ Ashdown¹⁹ และ Kunakorn²⁰ ซึ่งให้ sensitivity สูงกว่านี้มาก ผลอันนี้อาจเนื่องมาจาก สิ่งส่งตรวจที่เก็บมาจากที่ต่าง ๆ กัน อีกทั้งผู้ป่วยที่อยู่ใน endemic area อาจมีการติดเชื้อซ้ำ ๆ หรือโรคในปัจจุบันเป็น relapse ซึ่งทำให้ตรวจไม่พบ IgM ก็เป็นได้ เช่นเดียวกับกลุ่มของ Wongratanacheewin และคณะ²⁵ ได้พัฒนาวิธี ELISA และ dot immunoassay เพื่อตรวจหา antibody ต่อ culture filtrate (CF) antigen ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนใหญ่มีขนาดโมเลกุลเป็น 40 kDa ที่เป็น specific antigen โดยเปรียบเทียบกับวิธี IHA พบว่า dot immunoassay ให้ sensitivity = 94.1% specificity = 99.2% ในขณะที่ IHA ให้ผล sensitivity 64.7% specificity 93.6% (ที่ cut off titer ≥ 1.80)

เมื่อต้นปี 1995 Rugdech และคณะ²⁶ ได้รายงานการผลิต Monoclonal antibody จากหนู BALB/c และได้ MAb ที่คาดว่าจะมีความจำเพาะต่อ LPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* และเป็น MAb ที่มี isotype เป็น IgM MAb สามารถใช้ identify เชื้อจาก Primary culture โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามพวกกับเชื้ออื่น ๆ เลย รวมทั้ง *B. cepacia* นักวิจัยกลุ่มนี้ได้เตรียม Affinity-purified antigen และนำมาทดสอบในการหา IgG antibody ในผู้ป่วยด้วย Acute septicemia โดยให้ผล sensitivity 93% และ specificity 97%

6. Gold blot เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Kunakorn และคณะ²⁷ ในปี 1991 โดยใช้ crude antigen ของ *B. pseudomallei* วิธีนี้ใช้สำหรับตรวจหา IgM และ IgG antibodies โดย IgM ให้ sensitivity = 87.5% specificity = 88% ในขณะที่ IgG เป็น 100% และ 91% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ราคาตรวจค่อนข้างแพงและไม่ได้ศึกษากับ serum ของผู้ป่วยโรคติดเชื้อชนิดอื่น

-การตรวจหา specific antigen

วิธีที่ดีที่สุดที่จะบอกว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อหรือไม่ และแยกผู้ป่วยที่เคยได้รับเชื้อมาก่อนแล้วหาย กับผู้ป่วยที่กำลังเป็นโรคนั้น คือการตรวจดูว่ามีแอนติเจนของเชื้อชนิดนี้อยู่ในสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากผู้ป่วย และยังสามารถที่จะใช้เป็นตัว monitor ถึงระดับความรุนแรงของโรค, ติดตามการรักษาโรค ตลอดจนสามารถใช้ตรวจหาการเป็นซ้ำของโรค (relapse) ในปัจจุบันยังได้มีผู้พยายามพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ โดยวิธี ELISA หลายกลุ่มเป็นต้นว่า Ismail และคณะ²⁸ ได้พัฒนา Competitive ELISA สำหรับตรวจหา exotoxin antigen โดยใช้ monoclonal antibodies โดยทำการตรวจหา antigen ในสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อ (experimental animals) ยังไม่ได้นำมาใช้ในผู้ป่วยจริงเช่นเดียวกันกับ Wongratanacheewin และคณะ²⁹ ที่พัฒนาวิธี avidin-biotin ELISA โดยใช้ rabbit anti-partially purified antigens (PCE) มี sensitivity สูงถึง 3.9 ng/ml แต่ยังไม่ได้นำไปใช้จริงเช่นกัน และล่าสุดโดย Desakorn และคณะ³⁰ ในปี 1994 พัฒนาริธี ELISA เพื่อตรวจหา antigen ใน urine ผู้ป่วยโดยใช้ polyclonal anti-heat killed whole cell คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในผู้ป่วย acute melioidosis 135 ราย ผู้ป่วยโรคอื่น ๆ 194 ราย และคนปกติ 40 ราย พบว่าให้ sensitivity 91% specificity = 92% วิธีดังกล่าวสามารถใช้ตรวจหา antigen ใน urine ผู้ป่วยที่เป็น septicemic melioidosis ได้ถึง 96% (85/89), ผู้ป่วย urinary tract infection ที่เกิดจาก *B. pseudomallei* 100% (6 จาก 6) และ 80% (32 จาก 40) ในผู้ป่วย localized infection นอกจากนั้น การตรวจหา antigen นี้สามารถให้ผล sensitivity ได้ถึง 90% ใน urine ที่เก็บวันแรกของการ admission และ 92% ในวันที่ 1-3 ของการ admission จะเห็นได้ว่าวิธีการนี้ไวกว่าวิธีการที่นักวิจัยกลุ่มที่ได้รายงานไว้ภายหลังโดยใช้วิธี latex agglutination ซึ่งมีความไวเพียง 18%³¹

จากผลงานที่ผ่านมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่าในปัจจุบันมีวิธีที่จะสามารถนำมาใช้ในการตรวจหา antigen ใน urine ที่ให้ผลค่อนข้างดี แต่ยังมีผลบวกปลอมอยู่ โดยเฉพาะ urine ที่มี bacteria count $\geq 10^4$ colony/ml การใช้ specific MAb อาจจะช่วยให้ผลบวกปลอมมีค่าลดลงไปอีก และในปัจจุบันก็กำลังมีการพัฒนาวิธีการดังกล่าวอยู่

การวินิจฉัยโรคโดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

ในปัจจุบันมีการนำความรู้ทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มาประยุกต์ใช้กับการวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อต่าง ๆ โดยอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า nucleic acid hybridization ในการพัฒนาการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิสโดยอาศัย DNA hybridization และ DNA probe Sermawan และคณะ³² ในปี 1994 ได้สร้าง DNA probe ที่จำเพาะสำหรับเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีชื่อเรียกว่า pKKU-S23L โดย DNA probe นี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจหา DNA ของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ โดยมี sensitivity = 1.5 ng หรือ 40,000 cell DNA probe นี้ ไม่เกิด cross-hybridization กับ DNA ของเชื้อ bacteria อื่นที่ทำให้เกิด septicemia โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

B. cepacia ต่อมา Low และ Desmarchelier³³ ได้พัฒนาวิธี PCR เพื่อตรวจหา DNA ของเชื้อโดย design primer (18 bp) จาก 23S ribosomal DNA (23S rDNA) เมื่อนำ PCR นี้ไปใช้โดยนำไปตรวจหา ribosomal DNA ของเชื้อใน artificial inoculated blood พบว่าให้ sensitivity = 10^4 cells/ml. แต่ถ้านำเลือดตั้งกล่าวไป culture 24 h ก่อนมาทำ PCR หรือ concentrate จากเลือด 0.5 ml จะให้ sensitivity = 10^2 cells/ml ในกรณีที่ specimens เป็น sputum จะให้ sensitivity = 10^3 cells/ml เมื่อเร็ว ๆ นี้ Kunakorn และ Markham³⁴ ได้พยายามที่จะนำวิธีการของอนุชีววิทยา มาพัฒนาต่อเพื่อให้สามารถนำมาใช้ได้สะดวกขึ้น โดยใช้วิธีการ Seminested PCR โดยใช้ primer จาก DNA sequence ระหว่าง 16S และ 23S rRNA genes และมีความไวในการตรวจพบเชื้อที่มีเพียง 75-300 ตัวต่อ ml Dharakul และคณะสามารถพัฒนาวิธี PCR โดยใช้ primer จาก 16S rRNA gene ที่มีความไวสูงมาก โดยสามารถตรวจพบเชื้อเพียง 2 ตัวใน PCR reaction และสามารถตรวจให้ผลบวกกับ buffy coat ที่ได้จากผู้ป่วย septicemia ได้ผลใกล้เคียงกับการ culture จากเลือด

ปัญหาของการนำเทคโนโลยีทางนี้มาใช้ยังคงเป็น sensitivity ของการทดสอบและระยะเวลาในการทดสอบ ซึ่งต้องมีการปรับปรุงให้ดียิ่งขึ้น

Research questions

1. Serological tests ที่ผ่านมามีมากมาย แต่ไม่มีการ standardize หรือเปรียบเทียบกันไม่ทราบว่าจะเมื่อใช้ samples ชุดเดียวกันจะให้ผลต่างกันอย่างไร
2. ส่วนมากยังใช้ crude antigens อยู่ควรมีการ purified และศึกษารายละเอียดของ antigens ให้มากกว่านี้
3. ยังไม่มีการศึกษา kinetic ของ immune responses ในผู้ป่วย ไม่มีข้อมูลที่จะบอกว่าเมื่อมีการติดเชื้อ antigen อยู่ในร่างกาย (เลือด) นานเท่าใด antibody ขึ้นเวลาไหน อยู่ยาวนานเท่าใด ส่วนใหญ่เป็น IgG ใช่หรือไม่ ทำให้การนำ test ไปใช้ evaluate ได้ยาก
4. ควรจะมีการพัฒนา tests ในแง่ของการนำไปใช้ใน experimental models ก่อน จะได้ทราบถึง kinetic immune responses ก่อนนำมาใช้จริงในผู้ป่วย
5. ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าควรใช้ antigen ที่เป็น LPS หรือ protein ดีในการพัฒนา test มีงานเปรียบเทียบน้อยมาก
6. ข้อมูลในแง่การกลับเป็นซ้ำของโรคและ pathogenesis ของโรคยังไม่แน่ชัด มีผลทำให้การตรวจหา IgM antibody ในแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน ควรมีการนำ samples ในกลุ่มที่ตรวจได้มาทดสอบกับอีกกลุ่มอื่นเพื่อเปรียบเทียบ
7. ยังต้องอาศัยการพัฒนา test อีกในแง่ของความเร็วของการทำ ซึ่งจะแก้ปัญหาของโรคนี้โดยตรง เนื่องจากงานที่ผ่านมามีความก้าวหน้าในแง่ของการพัฒนาความเร็วของ test น้อยมาก

8. Antigen ที่ release ออกมาใน fluids ต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น blood, urine หรือ CSF เป็น antigen ส่วนไหนของเชื้ออยู่ภายใน มี kinetic ของการ release อย่างไร จะเป็นตัวช่วยในการพัฒนาวิธีการ detection ได้

เอกสารอ้างอิง

- 31/ Farkas-Himsley H. . selection and rapid identification of *Pseudomonas pseudomallei* from other gram-negative bacteria. Am J Clin Pathol 1968; 49: 850-856.
- 32/ Ashdown LR. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in the clinical laboratory. J Clin Pathol 1979; 32: 500-504.
- 33/ Wuthiekanun V, Dance DAB, Wattanagoon Y, Suputtamongkol Y, Chaowagul V, White NJ. The use of selective media for the isolation of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice. J Med Microbiol 1990; 33: 121-126.
- 34/ Dance DA, Wuthiekanun V, Naigowit P, White NJ. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and API 20NE. J Clin Pathol 1989; 42: 645-648.
- 35/ Miki R. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical specimens: the first experience in Japan. Mediacircle 1993; 38: 157-160.
- 36/ Ashdown LR. Rapid identification of *Pseudomonas pseudomallei* and *Pseudomonas cepacia*. Lett Appl Microbiol 1992; 14: 203-205.
- 37/ Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh AL, Pitt TL. Latex agglutination test for identification of *Pseudomonas pseudomallei*. J Clin Pathol 1993; 46: 374-375.
- 38/ Naigowit P, Kurata T, Wongroongsub P, Petkanjanapong V, Kondo E, Kanai K. Application of indirect immunofluorescence microscopy to colony identification of *Pseudomonas pseudomallei*. Asian Pacific J Allergy Immunol 1993; 11: 149-154.
39. Walsh AL, Smith MD, Wuthiekanun V, Suputtamongkol Y, Desakorn V, Chaowagul W, White NJ. Immunofluorescence microscopy for the rapid diagnosis of melioidosis. J Clin Pathol 1994; 47: 377-379.
310. Nigg C. Serologic studies on subclinical melioidosis. J Immunol 1963; 91: 18-28.

11. Nigg C, Johnston MM. Complement fixation test in experimental clinical and subclinical melioidosis. *J Immunol* 1961; 82: 159-168
12. Alexander AD, Huxsoll DL, Warner ARJ, Shepler V, Dorsey A. Serological diagnosis of melioidosis with indirect hemagglutination and complement fixation test. *Appl Microbiol* 1970; 20: 825-833.
13. Ashdown LR. Relationship and significance of specific immunoglobulin M antibody response in clinical and subclinical melioidosis. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 361-364.
14. Thomas AD, Spinks GA, D'Arcy TL, Norton JH, Trueman KF. Evaluation of four serological tests for the diagnosis of caprine melioidosis. *Aust Vet J* 1988; 65: 261-264.
15. Ileri SZ. the indirect hemagglutination test in the diagnosis of melioidosis in goats. *Brit Vet J* 1965; 121:164-170.
16. Khupulsup K, Petchclai B. Application of indirect hemagglutination test and indirect fluorescent antibody test for IgM antibody for diagnosis of melioidosis in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 366-369.
17. Appassakij H, Silpapojakul KR, Wansit R, Pornpatkul M. Diagnostic value of the indirect hemagglutination test for melioidosis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 248-253.
18. Rice CE, Kohst H, Duthie RC. Studies by complement fixation methods of malleins produced in broth and synthetic media I. Relative immunizing activities in horses and rabbits. *Cand J Compara Med* 1951; 15:284-291.
19. Ashdown LR, Johnson RW, Koehler JM, Cooney CA. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of clinical and subclinical melioidosis. *J Infect Dis* 1989; 160: 253-260.
20. Kunakorn M, Boonma P, Khupulsup K, Petchclai B. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1249-1253.
21. Petkanjanapong V, Naigowit P, Kondo E, Kanai K. Use of Endotoxin antigens in Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *P. pseudomallei* infection (melioidosis). *Asian Pacific J Allergy Immunol* 1992; 10:145-150.

22. Embi N, Suhaimi A, Mohamed R, Ismail G. Prevalence of antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin and whole cell antigens in military personnel in Sabah and Sarawak, Malaysia. *Microbiol Immunol* 1992; 36: 899-904.
23. Anuntagool N, Rugdech P, Sirisinha S. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1232-1236.
24. Sermswan RW, Sookpranee M, Nuntirooj K. Characterization of *Pseudomonas pseudomallei* antigens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and western blot. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1993; 24: 107-113.
25. Wongratanacheewin S, Amornpant S, Sermswan RW, Tattawasart U, Wongwajana S, Nuntirooj K. Use of culture-filtrated antigens in an ELISA and a Dot immunoassay for the diagnosis of melioidosis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1995 (in Press).
26. Rugdech P, Anuntagool N, Sirisinha S. Monoclonal antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* and their potential for diagnosis of melioidosis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 231-235.
27. Kunakorn M, Petchelai B, Khupulsup K, Naigowit P. Gold blot for detection of immunoglobulin M (IgM)- and IgG-specific antibodies for rapid serodiagnosis of melioidosis. *J Clin Microbiol* 1991;29: 2065-2067.
28. Ismail G, Noor Embi M, Omar O, Allen JC, Smith CJ. A competitive immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin. *J Med Microbiol* 1987; 23: 353-357.
29. Wongratanacheewin S, Tattawasart U, Lulitanond V. An avidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Pseudomonas pseudomallei* antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 429-430.
30. Desakorn V, Smith MD, Wuthiekanun V, Dance DAB, Aucken H, Suntharasamai P, Rajchanuwong A, White NJ. Detection of *Pseudomonas pseudomallei* antigen in urine for the diagnosis of melioidosis. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 627-633.

31. Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh AL, Teerawattanasook N, Desakorn V, Suputtamongkul Y, Pitt TL, White NJ. Latex agglutination for rapid detection of *Pseudomonas pseudomallei* antigen in urine of patients with melioidosis. *J Clin Pathol* 1995; 48: 174-176.
32. Sermswan RW, Wongratanacheewin S, Tattawasart U, Wongwajana S. Construction of a specific DNA probe for diagnosis of melioidosis and use as an epidemiological marker of *Pseudomonas pseudomallei*. *Mol Cell Probes* 1994; 8: 1-9.
33. Lew AE, Desmarchelier PM. Detection of *Pseudomonas pseudomallei* by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1326-1332.
34. Kunakorn M, Markham RB. Clinically practical seminested PCR for *Burkholderia pseudomallei* quantitated by enzyme immunoassay with and without solution hybridization. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2131-2135.

บทที่ 6

CLINICAL FEATURES OF MELIOIDOSIS

ลักษณะทางคลินิกของโรคmelioidosis

Melioidosis เป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญที่สุดโรคหนึ่งที่พบในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และบริเวณใกล้เคียง ในประเทศไทยมีรายงานผู้ป่วยโรคนี้จากทุกภาคของประเทศ ภาคอีสานพบได้มากกว่าภาคอื่น ๆ โดยเฉพาะจังหวัดอุบลราชธานีและขอนแก่นพบผู้ป่วยปีละ 100-150 คน รองลงมาคือ ภาคใต้¹ ผู้ทำงานกับดินและน้ำโดยเฉพาะชาวนา ชาวไร่ ชาวสวนมีโอกาสเป็นโรคนี้ได้บ่อย การติดเชื้อเกิดตั้งแต่วัยเด็กและเกิดโรคได้ทุกอายุตั้งแต่ทารกแรกเกิดถึงอายุมากกว่า 80 ปี อายุเฉลี่ย 42.7 ปี ช่วงอายุ 40-59 ปี พบได้มากที่สุดถึงร้อยละ 42 สำหรับผู้ป่วยเด็กพบเพียงร้อยละ 18 ช่วงอายุที่พบบ่อยคือ 5-9 ปี พบได้ทั้งสองเพศโดยมีอัตราส่วนชายต่อหญิง 1.4:1 โรคนี้พบมากในฤดูฝนซึ่งไม่มีทางเลี้ยงต่อการติดเชื้อ จังหวัดอุบลราชธานีพบผู้ป่วยส่วนใหญ่ร้อยละ 75 ต่อปีในฤดูฝนตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึงเดือนพฤศจิกายน จำนวนผู้ป่วยจะสัมพันธ์กับปริมาณน้ำฝนในปีนั้นๆ²

โรคนี้พบได้บ่อยทั้งผู้มีสุขภาพแข็งแรงและมีโรคเดิมอยู่ ร้อยละ 53 เป็นผู้ที่มิโรคเดิมหรือมีภาวะเอื้ออำนวยต่อการติดเชื้อ เบาหวานเป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดถึงร้อยละ 19 ของผู้ป่วยทั้งหมด และเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญสำหรับโรคmelioidosis ในชายหญิงทุกวัยเว้นหญิงช่วงอายุ 50-59 ปี (R.R 7.5, 95% CI 0.9-14.3)² นอกนั้นยังพบภาวะ stress hyperglycemia หรือ impaired glucose tolerance (ที่ตรวจพบระดับ plasma fructosamine สูงมาก) พบได้ร้อยละ 19.6 โรคอื่น ๆ ที่พบรองลงมาคือโรคไตพบร้อยละ 16 (เช่น โรคไตในไต และไตวายเรื้อรัง) นอกนั้นมีโรคเลือด (เช่น ธาลัสซีเมีย, aplastic anemia, มะเร็งเม็ดเลือดขาว) SLE, วัณโรค, ตับแข็ง, มะเร็งปอด, การใช้ยาสเตียรอยด์, การได้สารเคมีบำบัด, ภาวะพิษสุราเรื้อรัง, การสูบบุหรี่³ การจมน้ำจืด หรืออุบัติเหตุบาดแผลตามร่างกายก็เป็นปัจจัยชักนำให้เกิดการติดเชื้อได้ ในผู้ป่วยบางรายพบมีโรคเดิมมากกว่าหนึ่งโรค มีรายงานว่าผู้ป่วยบางรายมีโรคและปัจจัยเสี่ยงถึง 4 ชนิด³ นอกนั้นยังมีรายงานพบผู้ป่วยโรคนี้พร้อมกับโรคเอดส์ตั้งแต่ 10 ปีที่แล้ว⁵ ขณะนี้พบร่วมกันมากขึ้น ในอนาคตโรคนี้อาจเป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection) ชนิดหนึ่งในผู้ป่วยโรคเอดส์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือก็ได้

Clinical classification

Melioidosis เป็นโรคติดเชื้อที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในกระแสเลือดและโรคปอดบวม แต่เชื้อสามารถก่อโรคให้แก่ทุกอวัยวะ มีทั้งลักษณะเฉียบพลันรุนแรงหรือเรื้อรัง

ก่อโรคในลักษณะ acute suppurative หรือ chronic granulomatous หรืออาจพบทั้ง 2 ระยะในคน ๆ เดียวกัน โรคmelioidosisเป็นโรคที่มีความหลากหลายทางคลินิกมาก ตั้งแต่การติดเชื้อโดยไม่มีอาการ หรือติดเชื้อเฉพาะที่ในอวัยวะหนึ่งทีอาจเป็นเรื้อรังไปจนถึงรุนแรง มีการติดเชื้อเฉียบพลันในกระแสเลือดและเสียชีวิตในเวลาเพียง 1-3 วัน ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าโรคนี้เป็นสาเหตุการตายที่สำคัญที่สุดของการติดเชื้อในกระแสเลือด⁶

ลักษณะทางคลินิก อาจแบ่งโดยดูจากอาการแสดงเป็นระยะ ๆ หรือแบ่งตาม clinical manifestation ก็ได้ สำหรับการแบ่งโดยใช้ระยะเวลาของการเป็นโรคนั้นแบ่งเป็น 3 ระยะคือ

1. Acute melioidosis มีการติดเชื้อบริเวณที่สัมผัสเป็นเฉียบพลัน เช่น ปอดบวม หรือมีการติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรงจนเสียชีวิต มักมีภาวะแทรกซ้อนหรือตรวจพบว่ามีหนองฝีในอวัยวะอื่นๆ

2. Subacute melioidosis มีการติดเชื้อในร่างกายมานาน และมีภาวะที่กระตุ้นให้เกิดโรค ขึ้นโดยเฉพาะในปอดเหมือนวัณโรค

3. Chronic melioidosis มีการติดเชื้อนานเกิดเป็นฝีเรื้อรังในอวัยวะต่างๆ อาการไม่รุนแรง มีรายงานการติดเชื้อที่ทำให้มีอาการอยู่จนถึง 14 ปี เช่นฝีในม้าม⁷

สำหรับการแบ่งโดยใช้ clinical manifestation นั้น มีการแบ่งหลายวิธี เช่น ในประเทศไทยอาจแบ่งออกเป็น 4 และ 5 กลุ่ม สำหรับในประเทศออสเตรเลียแบ่งเป็น 3 และ 5 กลุ่ม ดังนี้

Clinical classification ในประเทศไทย

สมาคมโรคติดเชื้อ¹

1. Disseminated septicemic melioidosis (DSM)
2. Non disseminated septicemic melioidosis (NSM)
3. Transient bacteremic melioidosis (TM)
4. Localised melioidosis (LM)
5. Subclinical

อุบลราชธานี⁸

1. Disseminated septicemic melioidosis (DSM)
2. Non disseminated septicemic melioidosis (NSM)
3. Multifocal localised melioidosis
4. Localised melioidosis

Clinical classification ในประเทศออสเตรเลีย (Northern Territory)

Currie et al³

Asche et al⁹

- | | |
|---|---|
| 1. Subclinical | 1. Pneumonia (Acute and chronic with or without hemoculture positive) |
| 2. Local cutaneous and soft tissue | 2. Non pulmonary group include septicemia with no known focus |
| 3. Septicemia without or with abscess | 3. Neurological melioidosis |
| 4. Residual active foci without life threatening systemic illness | |
| 5. Recrudescence (from latent residual foci) | |

ลักษณะทางคลินิกและอาการแสดงของโรคmelioidosis

อาการและอาการแสดงของโรคมีทุกแบบ^{10, 11} ขึ้นกับอวัยวะที่ติดเชื้อ ส่วนใหญ่ร้อยละ 88 มีอาการไข้ซึ่งพบร่วมกับอาการอื่นถึงร้อยละ 35.3 นอกนั้นมีอาการไอซึ่งเกือบครึ่งจะมีเสมหะร่วมด้วย อาการเบื่ออาหาร ปวดท้อง ปวดตามตัว มีก้อน คลื่นไส้ ไม่ค่อยรู้สึกตัว ท้องเสีย เป็นต้น และเป็นได้กับทุกอวัยวะของร่างกาย โดยมีรูปแบบของการติดเชื้อดังนี้

1. **การติดเชื้อในกระแสเลือด** พบได้ร้อยละ 65 ของผู้ป่วยทั้งหมด และอาจพบร่วมกับการติดเชื้อของอวัยวะอื่น ในกรณีของ disseminated septicemia พบการติดเชื้อร่วมมากกว่า 1 แห่ง ร้อยละ 46 สำหรับ non-disseminated septicemia พบการติดเชื้อรวม 1 แห่ง ร้อยละ 10 และอีกร้อยละ 9 ไม่พบแหล่งติดเชื้อจากอวัยวะอื่น ผู้ป่วยอาจมีอาการช็อคร่วมด้วย พบอาการทางปอดร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือดมากที่สุดถึงร้อยละ 50 รองลงมาคือการติดเชื้อในตับและม้ามพบร้อยละ 12 การติดเชื้อของกล้ามเนื้อ กระดูก และข้อพบได้ร้อยละ 12 การติดเชื้อในกระแสเลือดจากเชื้อนี้เป็น community acquired septicemia ที่สำคัญทางภาคอีสานของประเทศไทย อัตราตายจากภาวะนี้สูงถึงร้อยละ 60-80 และสูงกว่าการติดเชื้อในกระแสเลือดจากเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญ^{6, 12}

ระดับ TNF ใน septicemic melioidosis ที่สูงตั้งแต่แรกเริ่มของผู้ป่วยจะสัมพันธ์กับภาวะช็อค, ความดันโลหิตต่ำ และบ่งบอกถึงความรุนแรงของโรค ระดับของ TNF ในโรคนี้นสูงกว่า septicemia ที่เกิดจากเชื้ออื่น¹³ มีรายงานว่าระดับ TNF ที่สูงขึ้นไม่สัมพันธ์กับ outcome ของผู้ป่วย เพราะร้อยละ 75 ของผู้ป่วยที่ตาย ไม่ได้รับการตรวจระดับ plasma TNF เลย ตรงกัน

ข้ามพบวาระดับของ Interleukin-6 (IL-6) ที่สูงกว่า 1000 pg/ml จะมีอัตราตายมากกว่าร้อยละ 75 ดังนั้น IL-6 จึงน่าจะเป็น predictor ที่สำคัญกว่า TNF ในการพยากรณ์โรค¹⁴

2. ปอด เป็นอวัยวะที่พบการติดเชื้อบ่อยที่สุดถึงร้อยละ 50 ของผู้ป่วยทั้งหมด อาจเป็น primary focus หรือเป็นอวัยวะที่เชื้อมักกระจายจากกระแสเลือดเข้าไปก็ได้¹⁵ ร้อยละ 70 ของอาการทางปอดมักจะพบร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อ¹⁶ ว่าเป็น community acquired pneumonia ที่พบบ่อยที่สุดในผู้ใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ¹⁶

ลักษณะทางคลินิกอาจเป็นกับปอดข้างเดียวหรือสองข้างก็ได้ ถ้าเป็นข้างเดียวมักเป็นปอดขวามากกว่าซ้าย จะเป็นทีกลีบบนน้อยกว่ากลีบล่าง ภาพรังสีของปอดที่ผิดปกติไม่สามารถแยกได้ชัดเจนจากวัณโรคเพียงแต่เมลิออยโตสิสมักไม่เป็นที่ apical segment อาจพบลักษณะ lobar pneumonia, pulmonary infiltration, lung abscess, bronchiectasis ถ้าเป็นปอดสองข้าง ร้อยละ 29 จะมีลักษณะภาพรังสีเป็น blood borne pneumonia, diffuse interstitial infiltration, bilateral patchy shadow เหมือน bronchopneumonia¹⁷⁻²⁰

ผู้มีประวัติจมน้ำจืดและติดเชื้อนี้มักมีอาการของปอดอักเสบสองข้างร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือด^{4 21 22} บางรายมีต่อมน้ำเหลืองที่ซั้วปอดโตขึ้น²³ บางรายเป็นปอดบวมอยู่หลายปี²⁴ ร้อยละ 10 พบ pleural effusion หรือ hydropneumothorax น้ำที่เจาะชุดออกมามีสีเหลืองขุ่น, น้ำปนเลือด หรือหนอง

ลักษณะของโพรงหนองในปอดมักเป็น thin walled cavity พบอันเดียวหรือหลายอัน และรอบๆ cavity มีการอักเสบร่วมด้วย

3. ตับ พบหนองฝีซึ่งอาจเป็นเฉพาะที่ หรือร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือดถึงร้อยละ 68 (หนองฝีในตับจากแบคทีเรียอื่นจะพบร่วมกับ septicemia ร้อยละ 50)²⁵ ภาพรังสีอัลตราซาวด์มีลักษณะจำเพาะ คือ multiple hypoechoic area แบบ multiloculated microabscess บางรายมีลักษณะ bull's eye²⁶ พบฝีที่ตับกลีบขวา และสัมพันธ์กับฝีที่ม้ามร้อยละ 74 และ 56 ตามลำดับ การเจาะชุดหนองจากตับช่วยวินิจฉัยโรคได้ดีที่สุด อาจชุดได้หนอง, เลือด หรือเศษเนื้อที่ตายแล้ว หนองมักข้นไม่เหลว ชุดได้จำนวนน้อย อาจพบลักษณะฝีเล็ก ๆ หลายตัวรวมเป็นฝีใหญ่ ฝีอาจอยู่นานเป็นปีและเมื่อหายแล้วบางรายมี calcification ที่มองเห็นได้จากภาพรังสี

4. ม้าม พบหนองฝีเช่นเดียวกับตับ²⁷ อาจพบเฉพาะที่หรือร่วมกับฝีในตับ และหรือร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือด ลักษณะภาพรังสีอัลตราซาวด์เหมือนฝีในตับ CT scan มีลักษณะ multiple low attenuation abnormalities บางรายมี calcification²⁸ อาจพบฝีหลาย ๆ อันในม้ามที่โตมาก และฝีอาจแตกเกิดเป็นหนองได้เยื่อหุ้มม้าม หรือแตกเข้าไปในช่องท้องเป็นหนองได้กะบังลมซ้าย หรือเกิดอักเสบในช่องท้องมีผังผืดติดกับกะเพาะ หรือแตกเป็นรูติดต่อกับหน้าท้องด้านบนซ้าย (Kistula)

ในท้องที่ที่มีการระบาศ เชื้อนี้เป็นสาเหตุสำคัญของฝีในม้าม จากการเจาะชุดหนองจากม้าม 18 ราย พบหนองหรือเลือด 10 ราย เพาะเชื้อได้ 7 ราย เป็นเชื้อ *S. pseudomallei*

4 ราย *E. coli* 1 ราย *Streptococcus milleri* 1 ราย *Penicillium marneffei* 1 ราย มีรายงานการติดเชื้อที่ม้ามอันเป็นสาเหตุให้มีไข้และปวดท้องเป็น ๆ หาย ๆ ถึง 14 ปี⁷

5. ระบบทางเดินปัสสาวะและสืบพันธุ์ พบได้ร้อยละ 10 อาจพบเชื้อจากปัสสาวะหรือระบบอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น เป็น prostatitis²⁹ prostatic abscess³⁰ epididymo-orchitis³¹ orchitis with abscess บางรายมาด้วยอาการปัสสาวะไม่ออก³² อาจพบร่วมกับนิ่วในไตหรือไม่ก็ได้ บางรายพบร่วมกับภาวะไตวายเรื้อรัง³³ การติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะอาจเป็นลักษณะของ primary หรือเป็นผลจากการกระจายของการติดเชื้อในกระแสเลือด มีรายงานการเกิดเป็นซ้ำในคนเป็นนิ่วห่างจากครั้งแรก 5 ปีครั้ง นอกนั้นอาจพบฝีในไตด้วย

6. ผิวหนังและเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง พบได้ร้อยละ 14 ลักษณะของการติดเชื้อเป็นฝีเล็ก ๆ หรือ superficial skin abscess คล้าย ๆ pustule จากเชื้อ *Staphylococcus* ส่วนใหญ่ไม่มี clinical diagnosis ฝีใต้ผิวหนังอาจลึกถึงกล้ามเนื้อ เป็นแบบ tropical pyomyositis (ที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus*) ที่นอง, ขา, หลัง บางรายมีลักษณะของลมพิษร่วมกับการติดเชื้อในปอด³⁴ อาการแสดงทางผิวหนังนี้ อาจเป็นแหล่งติดเชื้อโดยตรงหรือกระจายมาจากอวัยวะอื่นหรือเลือด พบร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือดร้อยละ 42 บางรายพบเป็นฝีที่ใบหน้า³⁵ หน้าอก หรือ เต้านม บางรายมีอาการของกล้ามเนื้ออักเสบร่วมด้วย

7. กระดูกและข้อ พบได้ร้อยละ 5.1 พบร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือดร้อยละ 78 การติดเชื้อของกระดูกจะเป็น osteomyelitis³⁶ ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง เป็นได้กับกระดูกทุกแห่ง เช่น tibia, calcaneum, femur, spine, pelvis มี sacrocoxitis coccydynia⁷ สำหรับข้อจะเป็น septic arthritis³⁷ พบบ่อยที่ข้อเข่า, ข้อสะโพก, ข้อมือ, หัวไหล่ sternoclavicular joint ซึ่งไม่พบจากการติดเชื้อชนิดอื่น ลักษณะทางคลินิกของข้ออักเสบมักจะเหมือนการติดเชื้อ *Staphylococcus* หรือวัณโรค³⁸ บางรายพบ psoas abscess ร่วมกับรอยโรคที่กระดูกสันหลัง

8. ระบบประสาท พบได้ร้อยละ 0.9 พบร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือดร้อยละ 77 ลักษณะทางคลินิกของระบบนี้ มักพบเป็นเยื่อหุ้มสมองอักเสบ³⁹ encephalitis⁴⁰ meningoencephalitis, epidural abscess, ฝีในสมอง ซึ่งอาจมีฝีอันเดียวหรือหลายอันก็ได้^{41,42} การอักเสบเริ่มจากการอักเสบของหนังศีรษะหรือบริเวณ mastoid⁴³ เกิดเป็นเยื่อหุ้มสมองอักเสบและฝีในสมอง หรืออาจเกิดจากเชื้อผ่านเข้า venous channels หรือจากภาวะ transient bacteremia⁴⁴ บางรายมาด้วยอาการประสาทสมองคู่ที่ 3 อักเสบทั้งสองข้าง⁴⁵ หรือมีอาการคล้ายอัมพาต⁴⁶

นอกนั้นยังมีการแสดงทางระบบประสาทเรียกว่า neurological melliodosis⁴⁷ โดยมีอาการของ peripheral motor weakness (คล้าย Guillain Barre' syndrome), brain stem encephalitis, aseptic meningitis และ respiratory failure ภาวะนี้จะไม่พบร่วมกับการติดเชื้อในระบบประสาท แต่สันนิษฐานว่าเกิดจาก exotoxin ทำให้เกิดอาการของระบบประสาท ในออสเตรเลียมีรายงาน 7 ราย และขณะนี้เริ่มพบใน จังหวัดอุบลราชธานี แล้ว 3 ราย

9. ระบบหัวใจและหลอดเลือด พบร้อยละ 0.8 ส่วนใหญ่มาด้วยอาการของ pericardial effusion⁴⁸ อาจพบร่วมกับเมดิออยโดสิสของปอด⁴⁹ น้ำที่เจาะได้ อาจเป็นสีเหลือง หรือน้ำเลือด แต่ไม่ค่อยพบลักษณะของหนอง บางรายมีอาการคล้ายกล้ามเนื้อหัวใจตาย⁵⁰ บางรายมีอาการของ mycotic aneurysm ของ abdominal aorta⁵¹ และ aortic arch

10. ระบบ หู คอ จมูก พบอาการของ parapharyngeal abscess⁵² เชื่อว่าสำคัญไม่เป็นแหล่งเพาะของเชื้อ ในเด็กซึ่งเพาะเชื้อ *B. pseudomallei* ได้จากสำคอต ถือว่าเป็นโรคเมดิออยโดสิส⁵³ แต่ในผู้ใหญ่ซึ่งเพาะเชื้อจากสำคอตมักพบร่วมกับการเพาะเชื้อจากอวัยวะอื่น เช่น จากปอดหรือเลือดถือเป็น colonization

ต่อมน้ำลาย parotid มักอักเสบจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* พบได้ร้อยละ 7 ซึ่งเกือบทั้งหมดจะพบในเด็ก และเป็นลักษณะจำเพาะช่วยในการวินิจฉัยโรคเมดิออยโดสิสในเด็ก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ parotid abscess มักเป็นข้างเดียว มีอาการกัมบวม เจ็บ มีไข้ บางรายมีอาการปากเบี้ยวอาจเกิดอย่างถาวรหรือชั่วคราวก็ได้ อาการบวมของฝีอาจแตกเข้าไปใน auditory canal ไม่ค่อยพบร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือด

11. ตา มีรายงานพบ corneal ulcer ตามหลัง corneal trauma ทำให้เกิดเป็น ulcer, subconjunctival abscess และ hypopyon⁵⁴ นอกนั้นอาจพบการติดเชื้อใน orbit ซึ่งเกิดตามหลัง trauma และ enucleation⁵⁵ หรือมีลักษณะ orbital cellulitis⁵⁶ หรือ dacryocystitis⁵⁷

นอกจากการติดเชื้อที่กล่าวมาแล้ว ยังเคยมีรายงานการเกิด nosocomial infection⁵⁸ ในโรงพยาบาลที่อยู่ในท้องถิ่นที่มีแหล่งระบาด โดยพบการติดเชื้อจากการใส่เครื่องมือเข้าไปในร่างกาย เช่น urethral catheter หรือใส่ endotracheal tube หรือทำ cut down เป็นต้น

12. Relapse⁹

ผู้ป่วยโรคเมดิออยโดสิสเมื่อได้รับการรักษาจนอาการดีขึ้น และติดตามไปอีกระยะหนึ่ง อาจมีการกลับเป็นซ้ำของโรคได้ถึงร้อยละ 23 บางรายมีการกลับเป็นซ้ำหลายครั้ง มากที่สุดพบได้ถึง 6 ครั้ง อัตราการกลับเป็นซ้ำเท่ากับร้อยละ 15 ต่อปี ระยะเวลาเฉลี่ยที่เกิดการกลับเป็นซ้ำคือ 21 อาทิตย์ ระยะเวลาสั้นที่สุดคือ 5.5 ปี ผู้ป่วยที่มีอาการของการติดเชื้อจากอวัยวะหลาย ๆ แห่ง หรือมีการติดเชื้อในกระแสเลือด มีโอกาสเป็นซ้ำสูงกว่าพวกติดเชื้อเฉพาะที่ถึง 4.7 เท่า ผู้ป่วยเมดิออยโดสิสที่มีโรคเดิมอยู่ไม่ว่าจะเป็นเนื้องอกหรือภาวะอื่นไม่เป็นปัจจัยเสี่ยงของการกลับเป็นซ้ำ ถ้าผู้ป่วยได้รับยาสม่ำเสมอและนานพอ จะลดอัตราเสี่ยงของการกลับเป็นซ้ำได้ 1.6 เท่า อัตราตายในผู้ป่วยกลุ่มนี้ค่อนข้างสูง ไม่ต่างจากพวกติดเชื้อในระยะเฉียบพลัน การที่จะทราบว่ามีการกลับเป็นซ้ำของโรคเกิดจากเชื้อตัวเดิมหรือไม่ จำเป็นต้องทำ ribotyping เพื่อพิสูจน์ว่าเป็น relapse หรือ reinfection

Research questions

1. ปัจจัยเสี่ยงของการเกิด relapse นอกเหนือจากที่ระบุไว้ในข้อ 12
2. Immune response ในผู้ป่วยที่มี relapse แตกต่างจากผู้ที่ไม่มีอาการ relapse หรือไม่

3. มีวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ อะไรที่จะช่วยให้ทราบว่าเป็น relapse เช่น antibody titer, bacterial antigens, acute phase protein, ribotyping เป็นต้น
4. ยาอะไร และระยะเวลาทานเท่าใดจึงจะมีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ป้องกันการกลับเป็นซ้ำ
5. การติดเชื้อ HIV จะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคmelioidosisหรือไม่
6. ความสัมพันธ์ของคนที่เป็นเบาหวานกับโรคmelioidosisในแง่ภูมิคุ้มกัน รวมทั้งระดับของอินซูลิน ทำให้เกิด septicemia ได้มากกว่า localised form หรือไม่

เอกสารอ้างอิง

1. Leclarasamee A. Epidemiology of Melioidosis. J Infect Dis Antimicrob Agents 1986; 3: 584-593.
2. Suputtamongkol Y, Hall AJ, Dance DA et al. The epidemiology of melioidosis in Ubon Ratchatani, northeast Thailand. Intern J Epidemiol 1994; 23: 1082-1090.
3. Currie B, Howard D, Vinh N et al. The 1990-1991 outbreak of melioidosis in the northern territory of Australia: clinical aspect. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1993; 24: 436-443.
4. Pruekprasert P, Jitsurong S. Case report: septicemic melioidosis following near drowning. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1991; 22: 276-278.
5. Tanphichitra D, Sahaphong S, Srimuang S et al. A case comparison of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in homosexual males with spindle-endothelial cell abnormalities and with recrudescence melioidosis. Asian Pacific J Allergy Immunol 1985; 3: 200-204.
6. Chaowagul W, White NJ, Dance DA et al. Melioidosis: a major cause of community acquired septicaemia in northeastern Thailand. J Inf Dis 1989; 159: 890-899.
7. Anonymous. Case records of the Massachusetts general Hospital. Weekly clinicopathological exercise. Case 40-1992. A 43-year-old Cambodian man with several years of recurrent bouts of fever and abdominal pain. N Eng J Med 1992; 327: 1081-1087.
8. Chaowagul W, Suputtamongkol Y, Dance DA et al. Relapse in melioidosis: incidence and risk factors. J Inf Dis 1993; 168: 1181-1185.
9. Asche V. Melioidosis - a disease for all organs. Today's Life Science 1991; 6: 34-40.

10. Yee KC, Lee MK, Chua CT et al. Melioidosis. The great mimicker: a report of 10 cases from Malaysia. *J Trop Med Hyg* 1988; 91: 249-254.
11. Poe RH, Vassalo CL, Domm BM. Melioidosis: The remarkable imitator. *Am Rev Resp Dis* 1971; 104: 427-431.
12. Puthucheary SD, Parasakthi N, Lee MK. Septicaemic melioidosis: a review of 50 cases from Malaysia. *Trans. R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 683-685.
13. Suputtamongkol Y, Kwiatkowski D, Dance DA et al. Tumor necrosis factor in septicaemic melioidosis. *J Inf Dis* 1992; 165: 561-564.
14. Friedland JS, Suputtamongkol Y, Remick DG et al. Prolonged elevation of interleukin-8 and interleukin-6 concentrations in plasma and of leukocyte interleukin-8 mRNA levels during septicemic and localized *Pseudomonas pseudomallei* infection. *Infect Immun* 1992; 60: 2402-2408.
15. Everett ED, Nelson RA. Pulmonary melioidosis. Observations in thirty-nine cases. *Am Rev Resp Dis* 1975; 112: 331-340.
16. Boonsawat W, Boonma P, Tangdajahiran T et al. Community acquired pneumonia in adults at Srinagarind Hospital. *J Med Assoc Thailand* 1990; 73: 345-342.
17. วิวัฒน์วรพันธ์ ธ., ดีลารักมี อ., วรณแสง ส. และคณะ. ความชุกของเมลิออยโดสิสในผู้ป่วยที่มีภาพรังสีปอดผิดปกติ. *วารสารโรคติดเชื้อและเขาด้านจุลชีพ* 2531; 5: 1-5.
18. สิงห์เจริญ ธ. Chest radiographic findings in melioidosis. *รังสีวิทยาการ* 2526; 20: 1-8.
19. เหล่าไพบุณย์ จ., ไชยคำ จ., งามดล น. และคณะ. ภาพรังสีปอดของผู้ป่วย melioidosis 83 ราย ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์. *ศรีนครินทร์เวชสาร* 2529 ; 1: 269-275.
20. Dhiensiri T, Puapairoj S, Susaengrat W. Pulmonary melioidosis: Clinical-radiologic correlation in 183 cases in northeastern Thailand. *Radiology* 1988; 166: 711-715.
21. Lee N, Wu JL, Lee CH et al. *Pseudomonas pseudomallei* infection from drowning: the first reported case in Taiwan. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 352-354.
22. Achana V, Silpapojakul K, Thininta W et al. Acute *Pseudomonas pseudomallei* pneumonia and septicemia following aspiration of contaminated water: a case report. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1985; 15: 500-504.

23. Tanphaichitra D. Acute septicaemic melioidosis with pulmonary hilar prominence: a case report with a unique chest radiographic pattern. *Thorax* 1979; 34: 565-566.
24. Sheppard MJ, Marriott RM, Brown TJ. Long latency pneumonia: a case of melioidosis. *J Infect* 1990; 20: 83-84.
25. Vatcharapreechasakul T, Supputtamongkol Y, Dance DA et al. *Pseudomonas pseudomallei* liver abscess: a clinical, laboratory and ultrasonographic study. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 412-417.
26. Singcharoen T. CT findings in melioidosis. *Aust Radiol* 1989; 33: 376-378.
27. Levine S, Whelan TJ Jr. Melioidosis of the spleen. *Am J Surg* 1968; 115: 849-853.
28. Morrison RE, Young EJ, Harper WK et al. Chronic prostatic melioidosis treated with trimethoprim sulfamethoxazole. *JAMA* 1979; 241: 500-501.
29. Woo ML, Chan PS, French GL. A case of melioidosis presenting with prostatic abscess in Hong Kong. *J Urol* 1987; 137: 120-121.
30. Jayanetra P, Vorachit M, Indraprasit S. Epididymo-orchitis due to *Pseudomonas pseudomallei*. *J Urol* 1983; 130: 576.
31. Que TL, Chan YF, Lam Sy. Acute disseminated melioidosis presenting as acute retention of urine. *Brit J Urol* 1991; 67: 556-557.
32. Sussaengrat W, Dhiensiri T, Sinavatana P et al. Renal failure in melioidosis. *Nephron* 1987; 46: 167-169.
33. Steck WD, Byrd RB. Urticaria secondary to pulmonary melioidosis. Report of a case. *Arch Derm* 1969; 99: 80-81.
34. Zallen RD. Melioidosis as a facial abscess: report of case. *J Oral Surg* 1971; 29: 144-145.
35. Borchardt KA, Stansifer P, Albano PM. Osteomyelitis due to *Pseudomonas pseudomallei*. *JAMA* 1966; 196: 660-662.
36. Boonma P, Puapairoj A, Nanagara R et al. The pelvic bone infection of melioidosis: a report on four cases. *Intern Med* 1988; 4: 112-115.
37. Diamond HS, Pastore R. Septic arthritis due to *Pseudomonas pseudomallei*. *Arthritis Rheumatol* 1967; 10: 459-466.
38. Kosuwon W, Saengnipanthkul S, Mahaisavariya B et al. Musculoskeletal melioidosis. *J Bone Joint Surg* 1993; 75: 1811-1815.

39. Christenson-Bravo B, Rodriguez JE, Vazquez G et al. *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis): acute septicaemia and meningitis in patient with systemic lupus erythematosus. *Boletin-Assoc Med Puerto Rico* 1986; 78: 347-349.
40. Poe PH, Vassallo CL, Domm BM. Melioidosis: the remarkable imitator. *Am Rev Resp Dis* 1971; 104: 427-431.
41. Lee MK, Chua CT. Brain abscess due to *Pseudomonas pseudomallei*. *Aust & New Zeal J Med* 1986; 16: 75-77.
42. Plekanos JT, Appleton DB. Melioidosis with multiple cerebral abscesses. *Ped Neurol* 1989; 5: 48-52.
43. Pit S, Chea FK, Jamal F. Melioidosis with brain abscess. *Postgrad Med J* 1988; 64: 140-142.
44. Visudhipan P, Chiemchanya S, Dheandhanoo D. Central nervous system melioidosis in children. *Ped Inf Dis J* 1990; 9: 658-661.
45. Beck RW, Janssen RS, Smiley ML et al. Melioidosis and bilateral third-nerve palsies. *Neurology* 1984; 34: 105-107.
46. Kong HL, Ong BK, Lee TK et al. Melioidosis of the brain presenting with a stroke syndrome. *Aust New Zeal J Med* 1993; 23: 413-414.
47. Woods ML 2d, Currie BJ, Howard DM et al. Neurological melioidosis: seven cases from the Northern Territory of Australia. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 163-169.
48. Majid AA. Successful surgical management of a case of pulmonary and pericardial melioidosis. *Aust New Zeal J Med* 1990; 60: 139-141.
49. Ruft MJ, Lamkin NJr, Braun J et al. Melioidosis complicated by pericarditis. *Chest* 1976; 69: 227-229.
50. Baumann BB, Morita ET. Systemic melioidosis presenting as myocardial infarct. *Ann Int Med* 1967; 67: 836-842.
51. Pitaksinachanekij S, Susaengrat W, Tangkulboriboon S et al. Mycotic aneurysm of the abdominal aorta : two cases report with successful operations. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 1991; 8: 115-117.
52. Elango S, Sivakumaran S. Parapharyngeal space melioidosis in a diabetic. *J Laryng Otol* 1991; 105: 582-583.

53. Kanaphun P, Thirawattanasuk N, Suputtamongkol Y et al. Serology and carriage of *Pseudomonas pseudomallei*: a prospective study in 1000 hospitalized children in northeast Thailand. J Inf Dis 1993; 167: 230-233.
54. Siripanthong S, Turapantuwat S, Prugsanusak W et al. Corneal ulcer caused by *Pseudomonas pseudomallei*: report of three cases. Rev Inf Dis 1991; 13: 335-337.
55. Nussbaum JJ, Hull DS, Carter MJ. *Pseudomonas pseudomallei* in an anophthalmic orbit. Arch Ophthalmol 1980; 98: 1224-1225.
56. Yospaiboon Y, Saengveejit J. Orbital cellulitis due to *Pseudomonas pseudomallei*. Thai J Ophthalmol 1987; 1: 51-54.
57. Suwanwatana C. Acute dacryocystitis due to *Pseudomonas pseudomallei*. Srinakarin Hosp Med J 1990; 5: 56-58.
58. Ashdown LR. Nosocomial infection due to *Pseudomonas pseudomallei*: two cases and an epidemiologic study. Rev Inf Dis 1979; 1: 891-894.
59. Dance DA. Melioidosis. Rev Med Microbiol 1990; 1: 143-150.

บทที่ 7

TREATMENT IN MELIOIDOSIS

เชื้อ *B. pseudomallei* มีความไวต่อยาต้านจุลชีพไม่เหมือนกับเชื้อในกลุ่ม pseudomonads โดยทั่ว ๆ ไป จะคือต่อยาบางตัว ไวต่อยาบางกลุ่ม และแม้จะใช้ผลความไวของยาต่อเชื้อเป็นหลักในการรักษา ก็ยังพบว่าได้ผลไม่เหมือนในหลอดทดลอง นอกจากนี้ ยานางตัวได้ผลไม่ดีในหลอดทดลองแต่ได้ผลทางคลินิก ยานางชนิดสามารถฆ่าเชื้อได้ บางชนิดได้แต่เพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่านั้น การดื้อยาเกิดบ่อยทั้งก่อน ระหว่าง และหลังการรักษา เกิดขึ้นกับยาต้านจุลชีพหลายชนิด ทำให้ต้องเปลี่ยนยาใหม่ การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพต้องให้ขนาดสูง เพื่อให้ระดับยาในกระแสเลือดสูงพอ และได้ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ โดยทั่วไปการใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกัน ก็เพื่อลดการดื้อยา ลดพิษของยาแต่ละตัว ลดขนาดของยา เพื่อเสริมฤทธิ์กัน หรือรักษาโรคติดเชื้อหลายชนิด¹ แต่การรักษาโรคmelioidosis นั้น การใช้ยาร่วมกันหลายขนานมิได้ใช้เพื่อเหตุผลข้างต้นทั้งหมด เป็นผลจากอัตราตายในโรคสูง ตายเร็ว และพบว่าถ้าใช้ยาร่วมกันจะได้ผลดีขึ้นจากฤทธิ์ที่อาจจะเสริมกัน² แต่ในทางคลินิกพบว่ายาที่ใช้ร่วมกัน มีทั้งต้านฤทธิ์, เสริมฤทธิ์ หรือไม่เสริมฤทธิ์กัน และมีผลข้างเคียงพอสมควร การให้ยาขนาดสูงและต้องให้นานพอกก็เพื่อป้องกันการกลับเป็นซ้ำ

ความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* มีความไวต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดได้แก่ chloramphenicol, tetracycline, co-trimoxazole, kanamycin ซึ่งเป็นยาเดิม ต่อมาเมื่อมีการพบยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ๆ พบว่าเชื้อไวต่อยาในกลุ่ม third generation cephalosporin โดยเฉพาะ cefotaxime, ceftizoxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefixime, cefetamet, azlocillin, piperacillin, imipenem, meropenem และยังไวต่อยาในกลุ่ม quinolone (เช่น ciprofloxacin, ofloxacin)³ และกลุ่ม amoxycillin-clavulanic acid, ticarcillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam⁴ ในทางตรงกันข้าม เราพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* จะดื้อยาในกลุ่ม aminoglycoside เช่น gentamicin, netilmicin, tobramycin, amikacin แต่ kanamycin มีระดับ MIC ต่ำที่สุดของกลุ่ม⁴ นอกจากยาเหล่านี้แล้ว เชื้อยังดื้อต่อ penicillin, ampicillin, และ cephalosporin รุ่นที่ 1 และ 2 อีกด้วย รายละเอียดเกี่ยวกับความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่มต่างๆ พอลสรุปได้ดังนี้ คือ

1. กลุ่มยาเดิม (conventional group)

ยาในกลุ่มนี้คือ chloramphenicol, tetracycline, kanamycin และ co-trimoxazole มีรายงาน MIC₉₀ ของยาทั้ง 4 ตัวนี้แม้จะอยู่ในระดับที่ใช้รักษาได้ แต่ก็มีฤทธิ์เป็นเพียง

bacteriostatic เท่านั้น⁵ สำหรับ co-trimoxazole นั้น แม้ end point ใน disc susceptibility และ MIC ใน microbroth dilution จะใช้ตัดสินความไวของเชื้อได้ค่อนข้างลำบาก แต่เมื่อใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพตัวอื่นจะต้านฤทธิ์กัน เช่น co-trimoxazole ต้านฤทธิ์ bacteriostatic ของยา chloramphenicol หรือ doxycycline⁶ นอกจากนั้น Eickhoff และคณะยังพบการต้านฤทธิ์ระหว่าง tetracycline หรือ chloramphenicol กับ kanamycin และ sulphadiazine กับ chloramphenicol ในหลอดทดลอง⁷ ส่วนยา novobiocin กับ tetracycline จะเสริมฤทธิ์กัน⁸ และพบว่ายาเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพต่อยาลดหรือมีระดับของ MIC ของยาสูงขึ้นเมื่อจำนวนของเชื้อเพิ่มมากขึ้น (inoculum effect)

มีรายงานว่ายาในกลุ่มนี้ใช้รักษาโรคได้ เช่น การติดเชื้อในปอดในเด็ก และในการติดเชื้อของต่อมลูกหมากอีกเสบ เป็นต้น^{9, 10-13}

การที่เชื้อคือยา chloramphenicol อาจเกิดตั้งแต่แรกเริ่มหรือเกิดระหว่างการรักษา (พบได้ร้อยละ 7) สำหรับสายพันธุ์ที่คือยา chloramphenicol (เชื้อคือยาดังแต่ต้น) มาก ๆ (เช่น มีระดับ MIC > 256 mg/l) ก็จะต้องต่อยา tetracycline, sulphamethoxazole trimethoprim และ ciprofloxacin ด้วย แต่กลับมีความไวต่อยา betalactam และ aminoglycoside เพิ่มขึ้น กลไกการคือยาอาจเกิดจาก mutation ที่ทำให้ cell wall permeability ลดลง มากกว่าจะเป็นผลของ plasmid coded multiple resistance⁴

มีรายงานว่าการสร้าง biofilm โดยเชื้อ *B. pseudomallei* อาจมีส่วนช่วยให้เชื้อคือต่อยา co-trimoxazole และ ceftazidime¹⁴

2. กลุ่มยา cephalosporin รุ่นที่ 3

จากการตรวจด้วย disc susceptibility พบว่าเชื้อไวต่อยาหลายตัว¹⁵ แต่เมื่อใช้วิธี MIC/MBC ความไวของยาแต่ละตัวจะแตกต่างกัน และมี inoculum effect ด้วย

สำหรับ ceftazidime นั้น เชื้อส่วนใหญ่มี MIC₉₀ และ MBC₉₀ < 2 mg/l และเชื้อจะไวต่อยานี้มากกว่า ceftiraxone และ cefotaxime So และคณะเป็นกลุ่มแรกที่รายงานการใช้ยานี้รักษาโรคเมลิออยโดสิสที่เกิดจากเชื้อที่เป็น multiresistant strain¹⁶ ยานี้เป็น bactericidal เมื่อตรวจด้วยวิธี microdilution MBC technique แต่เมื่อใช้วิธี time-kill studies แล้ว พบว่ายานี้ไม่มีฤทธิ์เป็น bactericidal สำหรับทุกสายพันธุ์ โดยเฉพาะเชื้อบางสายพันธุ์มี regrowth หลังจากได้รับยาแล้ว 24 ชั่วโมง^{17, 18} ในการรักษาโรคที่เกิดจาก ceftazidime resistance strain ที่เกิดขึ้นระหว่างการรักษา เราสามารถแก้ไขได้ด้วยการเติม clavulanic acid^{4, 19} มีรายงานการต้านฤทธิ์ bactericidal ของยานี้เมื่อใช้ร่วมกับยาที่ออกฤทธิ์ bacteriostatic ตัวอื่น²⁰ มีรายงานการต้านฤทธิ์ของ ceftazidime กับ chloramphenicol ทั้งในหลอดทดลองและทางคลินิก¹² ในทางตรงกันข้ามมีการทดสอบผลการใช้ ceftazidime ร่วมกับยาอื่นโดยวิธี time-kill studies เพื่อดูว่ายานี้จะเสริมฤทธิ์กันหรือไม่ ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ ceftazidime ร่วมกับ kanamycin หรือ ciprofloxacin จะเสริมฤทธิ์กันเป็น bactericidal แต่ co-trimoxazole ไม่มีผลต่อฤทธิ์ของ ceftazidime¹⁷

อย่างไรก็ตาม ก็ยังมีรายงานเกี่ยวกับการกลับเป็นซ้ำในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย ceftazidime เนื่องจากยานี้ไม่สามารถเข้าไปในเซลล์ จึงไม่สามารถทำลายเชื้อที่อยู่ในรูปของ non-multiplying bacteria ได้ นอกจากนี้เชื้อ *B. pseudomallei* ยังเป็นเชื้อที่สามารถสร้าง microcolony ได้เมื่อเข้าไปอยู่ในร่างกาย และเชื้อที่อยู่ในลักษณะดังกล่าวจะดื้อต่อสารต้านจุลชีพ ไม่ว่าจะเป็น ceftazidime หรือ cotrimoxazole ก็ตาม

3. กลุ่มยา Amoxicillin-clavulanic acid และ piperacillin

3.1 Amoxicillin-clavulanic acid ยานี้มี MIC₉₀ และ MBC₉₀ ที่ 2 mg/l ในขณะที่ amoxicillin มี MIC₉₀ ที่ 128 mg/l ทั้งนี้เพราะเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถสร้าง beta lactamase ได้ในปริมาณที่มาก (ทั้งจาก plasmid และ chromosome) Livermore และคณะได้รายงานว่า ampicillin resistance ซึ่งเกิดจาก Richmond & Syker Class I betalactamase จะถูกยับยั้งด้วย clavulanic acid²² ได้มีการนำยา amoxicillin-clavulanic acid มาใช้รักษาโรคเม็ดเลือดแดงและได้ผลเป็นที่น่าพอใจ^{23,24} มีการนำเอายานี้มาศึกษาด้วยวิธี time-kill studies พบว่าไม่เป็น complete bactericidal และไม่เสริมฤทธิ์กับ kanamycin บางครั้งเชื้อที่ดื้อยา ceftazidime และ piperacillin ก็ดื้อต่อยา amoxicillin-clavulanic acid ด้วย¹⁷

3.2 Piperacillin ยานี้มี MIC₉₀ และ MBC₉₀ ที่ 1 mg/l แต่ยามี inoculum effect สูงมาก เนื่องจากเป็นยาที่ไม่ทนต่อ beta lactamase ยานี้ผ่านเข้า outer cell wall ของเชื้อและรวมกับ penicillin binding protein ได้ดีกว่า ceftazidime จากการใช้ time-kill studies พบว่า piperacillin มีฤทธิ์เป็น bactericidal ที่ดีและสามารถฆ่าเชื้อได้ภายในเวลา 6 ชั่วโมง เชื้อบางสายพันธุ์จะดื้อต่อยานี้ (4 mg/l) แต่เมื่อเติม tazobactam ลงไป จะพบว่ามีฤทธิ์เสริมฤทธิ์กันและให้ผล bactericidal ดีขึ้น เราสามารถใช้ยานี้กับสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ amoxicillin-clavulanic acid และความเข้มข้นของ piperacillin ที่ใช้มีขนาดเพียงครึ่งของ MIC เดิม¹⁷ ผลที่ได้นี้ไม่เหมือนกับของ Sookpranee และคณะที่รายงานว่า piperacillin 64 mg/l ไม่มี bactericidal activity¹⁸

4. กลุ่มยา Carbapenem

ปัจจุบันยาในกลุ่มนี้เป็น betalactam ที่ให้ผลดีที่สุด และยังมีฤทธิ์เป็น bactericidal อีกด้วย การที่ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์ในหลอดทดลองดีกว่ายา ceftazidime อาจเนื่องจากยากลุ่มนี้สามารถผ่านเข้าไปใน cell wall และรวมกับ penicillin-binding protein ได้หลายตำแหน่ง^{24,25}

4.1 Imipenem ยานี้มี MIC₉₀ และ MBC₉₀ ที่ 1 mg/l⁴ และไม่มี inoculum effect พบว่ามีฤทธิ์เป็น bactericidal ในเวลา 4 ชั่วโมง (time-kill studies)¹⁷ แต่ Sookpranee และคณะ พบว่า imipenem 4 mg/l ไม่มี bactericidal activity¹⁸ มีรายงานการใช้ยานี้ในการรักษาโรคเม็ดเลือดแดงในเด็ก²⁶ และเพิ่งเริ่มมีการศึกษาการใช้ยานี้เป็น controlled clinical trials กับยา ceftazidime (unpublished data)

4.2 Meropenem ยานี้มี MIC₉₀ ที่ 2 mg/l และมี bactericidal effect ภายใน 6 ชั่วโมง¹⁷ แต่ยังไม่มียารายงานการใช้รักษาในผู้ป่วยเลย การดื้อยาในกลุ่ม beta lactam เกิดโดยมีกลไกดังนี้²⁷

- ลด chromosomal beta lactamase ทำให้เชื้อต้องใช้ยา beta lactam ขนาดสูงขึ้น
- enzyme beta lactamase ไม่ไวต่อ clavulanic acid ทำให้เกิดการดื้อยาเฉพาะ amoxicillin-clavulanic acid
- การเปลี่ยนแปลงใน beta lactamase enzyme ทำให้มี hydrolysis ของ ceftazidime แต่ไม่มีผลต่อ beta lactam ตัวอื่นๆ

beta lactamase ที่สร้างขึ้นจากเชื่อนั้นอาจมาจาก plasmid หรือ chromosome ก็ได้ และจะมีผลชัดเจนโดยเฉพาะในกรณีของ cephalosporinase activity (isoelectric point ที่ 7.4-7.7 และ MW 29,500) พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่เอามาทดสอบกับ cephalosporin สามารถสร้าง beta lactamase ได้ไม่มากนักน้อย ซึ่งส่วนใหญ่จะพบอยู่ภายใน cell ดังนั้น การเติม clavulanic acid หรือ sulbactam ต่อ amoxicillin และ ticarcillin จะช่วยลด MIC ได้^{2,17}

5. กลุ่มยา Quinolone compounds

การทดสอบโดย disc susceptibility พบว่าเชื่อนี้ไวต่อยาพวก fluoroquinolone (เช่น ofloxacin และ ciprofloxacin) แต่ให้ผล MIC₉₀ ที่ 4 mg/l และ MBC₉₀ ที่ 8 mg/l^{3,28,29} จึงทำให้คิดว่าไม่น่าจะนำไปใช้รักษาภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดได้²⁸ ยากลุ่มนี้จะผ่านเข้า cell ได้ดี และให้ความเข้มข้นใน phagocytic cell สูง¹⁹ จึงน่าจะใช้เป็นยาที่ใช้รักษาโรคในภาวะเรื้อรังได้ และพบว่าเมื่อใช้ร่วมกับ ceftazidime ในหลอดทดลองก็เสริมฤทธิ์กัน¹⁷

Carumonam และ aztreonam ก็มี MIC₉₀ ที่ระดับ 2 และ 16 mg/l³⁰ แต่ยังไม่มีการนำมาใช้ทางคลินิก

สรุป

วิธีเดิมที่ใช้ในการทดสอบความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อยาต้านจุลชีพคือวิธี disc susceptibility และเมื่อใช้วิธี MIC MBC ด้วย microbroth dilution method พบว่า imipenem เป็นยาที่ดีที่สุด ตามด้วย piperacillin, doxycycline, amoxicillin-clavulanic acid และ ceftazidime โดยยาส่วนใหญ่จะมี MIC < 2 mg/l^{4,18} ต่อมาเมื่อมีการใช้ time-kill studies ก็ยังพบว่า imipenem ดีกว่า ceftazidime อีกด้วย การใช้ tazobactam ร่วมกับ piperacillin ก็ให้ผลดีมาก และการใช้ ceftazidime ร่วมกับ kanamycin หรือ ciprofloxacin ก็เสริมฤทธิ์กัน¹⁷

การพิจารณาเลือกใช้ยาต้านจุลชีพ

การรักษาผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสนั้น ความสำคัญอยู่ที่การวินิจฉัยโรคให้ได้ถูกต้องรวดเร็วที่สุด และตัดสินใจว่าผู้ป่วยอยู่ในระยะใด ถ้ามีการติดเชื้อซึ่งลุกลามเร็วโดยมิได้เกิดจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล หรือการพบรอยโรคมากกว่าหนึ่งแห่งซึ่งอาจมีรอยโรคเดิมแล้วแพร่กระจายไปอวัยวะอื่น ให้สงสัยว่าจะเป็นโรคเมลิออยโดสิสเป็นอันดับแรก ต้องให้การรักษาแบบ septicemic melioidosis ไปเต็มที่ก่อนจนกว่าจะพิสูจน์ได้ว่าไม่เป็นเมลิออยโดสิสจึงค่อยเปลี่ยนยา แต่ถ้าเป็นการติดเชื้อเฉพาะที่ เช่น ที่ผิวหนัง กล้ามเนื้อ ปอดหรือตับที่อาการไม่รุนแรง อาจจะรอจนกว่าจะได้ผลเพาะเชื้อจึงเริ่มให้การรักษา การใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมเท่านั้นที่จะทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสหายจากโรคได้บ้าง โดยเฉพาะแบบ septicemia นั้นก็ยังมีอัตราการตายสูงแม้ว่าจะได้รับยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าเชื้อก็ตาม ส่วนโรคแบบเฉพาะที่จะมีอัตราการตายต่ำ รายที่ได้รับการรักษาไม่เหมาะสม หรือไม่ได้รับการรักษา ไม่มีรายใดรอดชีวิตเลย³¹

การใช้ยาต้านจุลชีพชนิดเดี่ยวหรือร่วมกันนั้นค่อนข้างจะแตกต่างกันในแต่ละแห่ง และมีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมมาก ในระยะ 10 ปีนี้ มีการศึกษาที่เป็น randomized controlled trial ในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพอยู่หลายอัน การที่จะบอกว่า regimen ใดดีที่สุด คงจะลำบาก แต่จะบอกได้เพียงข้อได้เปรียบเสียเปรียบของแต่ละวิธีเท่านั้น

1. การรักษา septicemic melioidosis

เนื่องจากผู้ป่วยที่อยู่ในระยะนี้มีอัตราการตายสูง เสียชีวิตอย่างรวดเร็ว การใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมจะช่วยผู้ป่วยได้ ขนาดของยาที่ใช้ค่อนข้างสูง ส่วนใหญ่จะใช้ยาร่วมกันหลายขนาน regimen ต่างๆที่มีการใช้เท่าที่รวบรวมได้มีดังนี้

1.1 Acute phase มักให้ยาชนิดฉีดเข้าเส้นประกอบด้วย

1.1.1 Conventional regimen คือ การใช้ยาร่วมกัน 3 ชนิด: chloramphenicol (100 มก/กก/วัน) + doxycycline (4 มก/กก/วัน) + co-trimoxazole (8 มก/กก/วัน ของ trimethoprim หรือ 40 มก/กก/วัน ของ sulphamethoxazole) แต่ผลของการรักษาไม่ดี คือมีอัตราการตายสูงมากถึงประมาณร้อยละ 74-80³²⁻³⁴ ปัจจุบันจึงไม่แนะนำให้ใช้ regimen นี้ในการรักษา severe melioidosis และยาในกลุ่มนี้เป็น bacteriostatic ทั้งนั้น

1.1.2 Ceftazidime (monotherapy)³²

มีการศึกษาแบบ randomized controlled trial ที่จังหวัดอุบลราชธานี โดยใช้ ceftazidime ขนาด 120 มก/กก/วัน เปรียบเทียบกับการใช้แบบ conventional regimen และพบว่าสามารถลดอัตราการตายในกลุ่ม severe melioidosis จากร้อยละ 74 เหลือร้อยละ 37 ระยะเวลาที่ใช้น้ำหนักเฉลี่ย 14 วัน ขณะนี้ยา ceftazidime ถือเป็น drug of choice สำหรับเมลิออยโดสิสที่มีอาการรุนแรง และมักใช้ยานี้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลการรักษากับยาด้านจุลชีพตัวอื่น ๆ นอกจากนั้นมีรายงานการใช้ยานี้ขนานเดียวรักษาผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสของปอดในนักท่องเที่ยวชาวต่างประเทศและมีอาการหลังเดินทางกลับจากประเทศไทย³⁵

เป็นที่น่าสังเกตว่ายานี้จะไม่ลดอัตราการตายใน 48 ชั่วโมงแรก แสดงว่าการที่ผู้ป่วยถึงแก่กรรมอย่างรวดเร็ว อาจสะท้อนถึงพยาธิสภาพที่ irreversible ประมาณครึ่งหนึ่งของผู้ป่วย septicemia จะตายภายใน 48 ชม.^{34, 36}

1.1.3 Ceftazidime combination (multi-drug therapy)

1.1.3.1 Ceftazidime - cotrimoxazole (ceftazidime 100 มก/กก/วัน ร่วมกับ co-trimoxazole 8 มก/กก/วัน) มีการศึกษาการรักษาแบบ multicenter randomized controlled trial³³ ที่จังหวัดขอนแก่น เปรียบเทียบกับ conventional regimen พบว่าการใช้ regimen นี้ สามารถลดอัตราการตายของ septicemic melioidosis ได้ถึง 56.6% นอกจากนี้ก็มีการสรุปว่าการใช้ regimen นี้ดีกว่า regimen 1.1.2 คือ³⁷

- พบว่ามี bacterial eradication rate เร็วกว่า (100% eradication เปรียบเทียบกับ 80% ภายใน 48 ชั่วโมง)
- มี relapse rate ต่ำกว่า และไม่พบว่ามีอาการดื้อต่อกันเมื่อใช้ ceftazidime ร่วมกับ co-trimoxazole³⁸ อย่างไรก็ตาม Dance และคณะ Indifferent effect ระหว่างยา 2 ชนิดนี้ในการทดสอบในหลอดทดลอง²⁰ และจากการใช้ time-kill studies ก็พบว่า co-trimoxazole ไม่มีผลในการเสริมฤทธิ์ของ ceftazidime¹⁷ และนอกจากนี้ยังพบ acquired ceftazidime resistant *B. pseudomallei* ด้วย⁴

นอกจากนั้นก็มีผู้สนับสนุนการใช้ยาสองขนานนี้ร่วมกันโดยให้เหตุผลว่ายาทั้งสองชนิดมีกลไกออกฤทธิ์คนละแห่งกัน³⁹

1.1.3.2 Ceftazidime-rolitetracycline⁴⁰ มีรายงานการใช้ยาคู่นี้ในประเทศออสเตรเลีย แต่ไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบผลการรักษา

1.1.3.3 ceftazidime-ciprofloxacin มีการใช้รักษาในบางราย

1.1.3.4 ceftazidime-doxycycline

ผู้ป่วยจะตอบสนองต่อยา ceftazidime ช้ามาก บางรายยังพบเชื้อทั้ง ๆ ที่ได้รับการรักษามาแล้วถึง 22 วัน⁴⁰

1.1.4 Amoxicillin-clavulanic acid

มีการศึกษาเปรียบเทียบโดยใช้ยานี้ขนาด 160 มก/กก/วัน (แบ่งฉีดครั้งละ 1.2 กรัม ทุก 4 ชั่วโมง) ในการรักษา severe melioidosis พบว่าได้ผลพอๆ กับการใช้ ceftazidime อัตราตายของทั้งสองกลุ่มเท่ากับร้อยละ 47 แต่ผู้ป่วยต้องเปลี่ยนจากยานี้เป็น ceftazidime (เนื่องจากการตอบสนองต่อยาไม่ดีหลังจากให้การรักษาแล้วนานกว่า 72 ชั่วโมง) ร้อยละ 23 ในขณะที่ต้องเปลี่ยนจากยา ceftazidime เป็นยานี้เพียงร้อยละ 5 ($p = .004$)⁴¹ ดังนั้น regimen นี้ถือเป็นอีก regimens หนึ่งที่สามารถใช้รักษาโรคmelioidosis ในบริเวณที่เป็นแหล่งแพร่ระบาดของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ แต่ถ้าผู้ป่วยมีอาการหนักมากควรเริ่มด้วยยา ceftazidime เนื่องจากให้ผลการรักษาดีกว่า และช่วงเวลาในการให้ยาสะดวกกว่า ระยะเวลาเฉลี่ยที่ต้องให้ยาฉีดทางเส้นทึง 2 กลุ่ม

ประมาณ 14 วัน แต่พบว่าผู้ป่วยตอบสนองต่อการรักษาช้ามาก ทั้ง ๆ ที่ให้ยาไปแล้ว 2 อาทิตย์ก็ ยังพบเชื้อจากกระแสเลือดได้ถึงร้อยละ 9 ให้ยา 1 อาทิตย์ ยังพบเชื้อร้อยละ 18 บางรายยังพบเชื้อ ในเสมหะทั้ง ๆ ที่ได้ยามาแล้ว 2 อาทิตย์ เป็นต้น

มีการศึกษาการกลับเป็นซ้ำของโรค ผลจากการศึกษาพบว่าเมื่อได้รับยาน้อยกว่า 8 อาทิตย์ มีการกลับเป็นซ้ำถึง 25% และอัตราการตายในกลุ่มกลับเป็นซ้ำจะเท่ากับ primary infection นอกจากนี้ ยังพบการดื้อยา amoxicillin-clavulanic acid เกิดระหว่างการรักษา 8-10 วัน ประมาณร้อยละ 6.9 และการดื้อยานี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด treatment failure^{42, 43} บางรายมีการ ดื้อทั้งยานี้และยา chloramphenicol²⁰ ในออสเตรเลียก็พบเชื้อดื้อยานี้และผู้ป่วยกลับเป็นซ้ำจนเสียชีวิต⁴⁰

1.1.5 Imipenem

ยานี้เป็นยาที่ดีที่สุดที่ใช้กับเชื้อ *B. pseudomallei* โดยพบว่าในหลอดทดลองมี MIC₉₀ < 1 mg/ml^{44, 17} มีรายงานการใช้ยานี้ในผู้ป่วยเด็ก 2 ราย ที่มีการติดเชื้อเฉพาะที่ (suppurative parotitis), และที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดร่วมกับการอักเสบของทางเดินปัสสาวะ พบว่าได้ผลดีทั้ง 2 ราย²⁶ ในเวลา 10-14 วัน นอกจากนั้น ยังมีรายงานการรักษาโรคเมลิออย โดสิสที่มีอาการรุนแรงปานกลางจำนวน 10 ราย และได้ผลดี 9 ราย ยาที่ใช้ มีขนาด 60 มก/กก/วัน (แบ่งให้ครั้งละ 1 กรัมทุก 8 ชั่วโมง) เฉลี่ยระยะเวลาที่ได้รับยา 7-14 วัน⁴⁵ และยังไม่พบเชื้อ ดื้อยา หรือผู้ป่วยมีอาการข้างเคียงที่รุนแรง

มีการศึกษาเปรียบเทียบการรักษาด้วยยา Imipenem กับ ceftazidime ที่จังหวัด อุบลราชธานี แต่ผลการศึกษายังไม่เสร็จสมบูรณ์

บางคนจัดให้ยานี้เป็น second line drug หลังจากใช้ยา ceftazidime ไม่ได้ผล แล้ว หรือใช้ยานี้ในคนที่แพ้ penicillin และ cephalosporin. นอกจากนี้มีรายงานการใช้ยานี้ร่วมกับ chloramphenicol 6 กรัม/วันอีกด้วย

1.1.6 Piperacillin

ยานี้มี MIC₉₀ < 1 mg/ml. แต่มี inoculum effect สูง ในประเทศไทยมีการใช้ยานี้บ้างแต่ไม่มีรายงานละเอียดเหมือน regimen อื่น ๆ แต่ในออสเตรเลียมีรายงานการใช้ยานี้มา ตั้งแต่ปี 1984 โดยมักจะใช้ร่วมกับยารุ่นอื่น⁴⁶ ดังนี้

1.1.6.1 ปี 1984-1988 ใช้ piperacillin 12-18 กรัม/วัน + kanamycin หรือ tetracyclin หรือ chloramphenicol และ cotrimoxazole จำนวน 17 คน ได้ผลดี 88%

1.1.6.2 ปี 1986-1988 ใช้ piperacillin 12-18 กรัม/วัน + cefotaxime 6 กรัม/วัน (บางครั้ง + tetracycline หรือ chloramphenicol และ co-trimoxazole หรือ ceftazidime) จำนวน 14 คน ได้ผลดี 64%

เนื่องจากทั้ง piperacillin และ cefotaxime มีกลไกในการฆ่าเชื้อที่เหมือนกัน จึง อาจไม่มีฤทธิ์ที่มาส่งเสริมกัน ถ้าจะให้ดีควรใช้ยาที่ออกฤทธิ์ต่างตำแหน่งกัน เช่น การใช้

piperacillin และ ciprofloxacin ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของ bacterial DNA gyrase ซึ่งจะทำให้ยา 2 ตัวนี้ เสริมฤทธิ์กัน (ในหลอดทดลอง)

ในออสเตรเลียแพทย์บางรายก็เริ่มรักษาด้วยยา ceftazidime ร่วมกับ chloramphenicol หรือ co-trimoxazole หรือใช้ ceftazidime อย่างเดียว

1.2 Maintenance phase

เริ่มให้ยารับประทานหลังจากอาการโดยทั่วไปดีขึ้น และไข้ลดลง ตัวอย่างของ ยาที่ใช้มีดังนี้

1.2.1 Conventional ประกอบด้วย co-trimoxazole (8-12 มก/กก/วัน ของ trimetoprim) หรือ doxycycline 4-6 มก/กก/วัน (200 มก/วัน)

นอกจากนี้มีการให้ยาร่วมกัน 2 ตัว หรือ 3 ตัว โดยเพิ่ม chloramphenicol 50 มก/กก/วัน นาน 4 อาทิตย์ ส่วน doxycycline & co-trimoxazole ยังให้ต่ออีกจนครบ 20 อาทิตย์ มีบางรายให้นาน 6 สัปดาห์³⁷ ถึง 6 เดือน หรืออย่างน้อย 3 เดือน⁴⁰ การให้ยานานพอเป็นการป้องกันการกลับเป็นซ้ำ เพราะเชื่อนี้สามารถรอดชีวิตและแบ่งตัวใน phagocytes ถือเป็นเชื้อที่มีลักษณะเป็น facultative intracellular organism³⁸ นอกจากนั้น พยาธิสภาพของ โรคมักเป็นฝีอยู่ในอวัยวะภายในลึกๆ (deep seated abscess)

มีการศึกษาการใช้ยา conventional 3 ตัว ในผู้ป่วย 52 ราย พบว่าร้อยละ 67 ได้รับยาอย่างน้อย 12 อาทิตย์ และร้อยละ 56 ได้รับยาครบ 20 อาทิตย์ เฉลี่ยระยะเวลาที่ได้ ยารับประทานคือ 18 อาทิตย์ พบว่าร้อยละ 67 หายดี ไม่มีอาการตลอดเวลาที่ติดตามเฉลี่ย 81 อาทิตย์ พบการกลับเป็นซ้ำ 4 ราย (2 ราย พบเชื้อ อีก 2 ราย มีแต่อาการ septicemia และ ตายโดยไม่ได้เพาะเชื้อ) เมื่อวิเคราะห์ที่ดูพบ relapse rate เท่ากับร้อยละ 4.9 ในผู้ที่ได้รับยา นานกว่า 12 อาทิตย์ ระยะเวลาเฉลี่ยจนเกิดมีอาการ relapse เท่ากับ 37 อาทิตย์ ผู้ป่วยที่ได้ รับยากลุ่มนี้จะมีโอกาสเกิด relapse น้อยกว่ากลุ่ม co-amoxycylav ถึงร้อยละ 20

อย่างไรก็ตาม มีรายงานเพิ่มเติมว่าพบการเกิดผลข้างเคียงที่รุนแรงจนต้องหยุด หรือเปลี่ยนยาได้ถึงร้อยละ 12⁴¹ นอกจากนั้นยังพบว่ายานี้ไม่เหมาะที่จะใช้ในหญิงตั้งครรภ์ หรือหญิงที่ให้นมลูก หรือในเด็กอายุน้อยกว่า 8 ปี

1.2.2 Amoxicillin-clavulanic acid

ใช้ขนาด 60 มก/15กก/วัน และเพื่อให้ได้อัตราส่วนของ amoxicillin: clavulanic acid เป็น 4:1 จึงเพิ่มขนาดของ amoxicillin อีก 30 มก/กก/วัน แบ่งให้วันละ 4 ครั้ง ได้มีการ ใช้ยานี้ในการรักษาเมลิออยโดสิสที่มีการติดเชื้อเฉพาะที่ หรือเป็น maintenance ตามหลังขาด พบว่าร้อยละ 67 ของผู้ป่วยที่ได้รับยาน้อยกว่า 8 อาทิตย์ ไม่มีอาการเมื่อติดตามนาน 6 เดือน และมีการกลับเป็นซ้ำร้อยละ 28⁴¹

ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบการใช้ยานี้กับยาในกลุ่ม conventional⁴² พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยา amoxicillin-clavulanic acid ร้อยละ 76 ได้รับยานานกว่า 12 อาทิตย์ และร้อยละ

ละ 51 ได้รับยานาน 20 อาทิตย์ เฉลี่ยระยะเวลาที่ได้รับยา คือ 18 อาทิตย์ เมื่อติดตามนาน 70 อาทิตย์ พบว่าร้อยละ 58 ไม่มีอาการการกลับเป็นซ้ำ แต่มี relapse rate เท่ากับร้อยละ 36 ในกลุ่มที่ได้รับยาน้อยกว่า 12 อาทิตย์ และร้อยละ 10 หากได้รับยานานกว่า 12 อาทิตย์ ผู้ป่วยที่ได้รับยาครบ 20 อาทิตย์ มี relapse เพียงร้อยละ 7.4 เท่ากับพวกที่ได้รับยา "combined" conventional regimen. แต่ถ้าได้ยาน้อยกว่า 20 อาทิตย์ จะมีโอกาสเกิด relapse มากกว่า

พวก severe melioidosis. (มีการติดเชื้อหลายอวัยวะ ร่วมหรือไม่ร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือด) จะมีโอกาสเกิด relapse มากกว่าพวกติดเชื้อเฉพาะที่ที่อวัยวะเดียวถึง 1.8 เท่า

การใช้ยา oral amoxicillin-clavulanic acid จะได้ผลและปลอดภัย โดยเฉพาะในเด็ก หญิงตั้งครรภ์ หรือเชื้อดื้อยาอื่น หรือผู้ป่วยแพ้ยา conventional มีอาการข้างเคียงหรือเป็นพิษมาก

1.2.3 Oral Quinolone

Ciprofloxacin หรือ ofloxacin มี MIC₉₀ ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ระหว่าง 0.125-16 mg/ml จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้รักษาโรคmelioidosis²⁸ แต่เนื่องจากยาซึมผ่านเข้าไปใน phagocytes ได้ดี¹⁹ จึงมีการนำเอามาใช้รักษา lymphadenitis ในเด็กได้สำเร็จ⁴⁶ อย่างไรก็ตามยานี้ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้รักษาในเด็กเล็ก เพราะยาในกลุ่มนี้มีผลเสียต่อกระดูกอ่อนเมื่อนำมาทดสอบในสัตว์ทดลอง⁴⁸

อย่างไรก็ตาม ได้มีการนำ ciprofloxacin 5 มก/กก/วัน และ ofloxacin ชนิดรับประทานมาใช้รักษาโรคmelioidosisที่เป็นการติดเชื้อเฉพาะที่ และใช้เป็น maintenance หลังได้รับยาฉีดแล้ว จากจำนวนผู้ป่วย 41 ราย พบมี relapse ร้อยละ 24.4 มี clinical failure ร้อยละ 19.5 ได้ผลดีเพียงร้อยละ 56 ระยะเวลาเฉลี่ยที่ได้รับยา คือ 14 อาทิตย์

2. การรักษา chronic หรือ localised melioidosis (ที่มีอาการไม่รุนแรง)

ให้ยารับประทานดังนี้

2.1 conventional ประกอบด้วย doxycycline หรือ co-trimoxazole หรือรวมกัน 2 ขนาน หรือรวมกัน 3 ขนานโดยเพิ่ม chloramphenicol (นาน 4 อาทิตย์) หรือ

2.2 amoxicillin-clavulanic acid (ขนาดตามข้อ 1.2.2) หรือ

2.3 ciprofloxacin (ขนาดตามข้อ 1.2.3)

จะต้องให้การรักษาานาน 12 อาทิตย์ ถึง 20 อาทิตย์ และต้องติดตามผู้ป่วยเพื่อให้แน่ใจว่าหายขาดจริง

นอกจากนั้นในกรณีที่มีหนองมีจำเป็นต้องมีการรักษาอย่างอื่นร่วมด้วย เช่น การระบายหนอง โดยการผ่าตัดหรือเจาะดูด หรือการผ่าตัด เช่น splenectomy และ debridement เป็นต้น

สรุป

การใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคเม็ดเลือดแดงในปอดในปัจจุบัน ถือหลักดังนี้คือ ในกรณีที่ เป็นมากไม่ว่าจะเป็น disseminated septicemic melioidosis, non disseminated septicemia หรือ multifocal localised melioidosis หรือ localised ที่มีอาการรุนแรง เช่น มีในตับ หรือปอด จะแบ่งการรักษาเป็น 2 ระยะ คือ acute และ maintenance

ระยะ acute เริ่มด้วยยาฉีดเข้าเส้นกลุ่มที่ 1 คือ ceftazidime (monotherapy) หรือ ceftazidime ร่วมกับ co-trimoxazole หรือ amoxicillin-clavulanic acid ในกรณีที่เชื้อดื้อยา หรือผู้ป่วยแพ้ยา หรือการรักษาด้วยยากลุ่มที่ 1 นี้แล้วไม่ได้ผล ให้เลือกใช้ยากลุ่มที่ 2 คือ imipenem หรือ piperacillin ระยะเวลาที่ให้ยาเข้าเส้นจนอาการดีขึ้นเฉลี่ย 14 วัน บางรายอาจ ต้องให้ยาวนานถึง 1 เดือน

ระยะ maintenance จะตามด้วยยารับประทานกลุ่มที่ 1 คือ conventional ที่ประกอบด้วย ยา 1, 2 หรือ 3 ชนิด หรือ amoxicillin-clavulanic acid หรือ ciprofloxacin ซึ่งจัดเป็นยา รับประทานกลุ่มที่ 2 สำหรับยารับประทานจะต้องให้นานอย่างน้อย 12 อาทิตย์ ถึง 20 อาทิตย์ เพื่อป้องกันการกลับเป็นซ้ำ

ในกรณีที่เป็นการติดเชื้อเฉพาะที่และอาการไม่รุนแรง อาจเริ่มรักษาด้วยยารับประทาน แบบ maintenance และให้นานเช่นเดียวกัน

Research questions

1. ยาใหม่ๆ อะไรบ้างที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่อยู่ใน phagocytes
2. ยานิดใดลดการสร้าง biofilm ของเชื้อทั้งใน และนอก cell
3. ปัจจุบันอะไรที่เกี่ยวข้องหรือมีอิทธิพลต่อผลการรักษา นอกจากยาต้านจุลชีพแล้ว การใช้ยาพวก anti-TNF และ PAF antagonist หรือการใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพ จะช่วยทำให้ อัตราตายใน septicemic melioidosis ดีขึ้นหรือไม่
4. ยา piperacillin สามารถใช้รักษาภาวะ septicemic melioidosis ได้ดีเท่า ceftazidime หรือไม่ ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบ และจำเป็นต้องใช้ combined กับ tazobactam หรือไม่
5. splenic aspiration และ splenectomy มีผลดีผลเสียอย่างไรในการรักษา splenic abscess ควรมี long term follow up นานเท่าใด
6. มีการกล่าวว่า การเกิด septicemia ตามหลัง aspiration นอกจากบริเวณที่เป็น deep seated abscess ที่มีสภาวะคล้าย ๆ กับ anaerobiosis เป็นเพราะการ aspiration ทำให้ abscess นั้น มีสภาวะเปลี่ยนเป็น aerobiosis ทำให้เชื้อสามารถเจริญแบ่งตัว มีการสร้าง exotoxin มากจนเกิด septic shock ขึ้นได้ น่าจะมีการศึกษาเพื่อดูว่าเป็นความจริงหรือไม่

7. การใช้ยา oral treatment หลายๆขนานร่วมกันจะช่วยลด relapse ได้ดีกว่าการใช้ยาขนานเดียวหรือไม่ oral doxycycline อย่างเดียวทำให้เกิด fatal relapse มากกว่าการใช้ยาร่วมกันหรือไม่

8. ยา co-trimoxazole ซึ่งจาก disc susceptibility มี sensitivity สูงประมาณร้อยละ 60 แต่เมื่อนำมาใช้ร่วมกับยาอื่นทางคลินิกกลับได้ผลดี สามารถลด relapse ได้จริงหรือไม่ ยานี้มี intracellular concentration เป็นอย่างไร. รวมทั้งผลต่อการสร้าง biofilm ด้วย

9. concomittant disease มีผลต่อ relapse หรือไม่ โรคอะไรที่มีอัตราเสี่ยงมากที่สุด

10. meropenem ใช้รักษาโรคเมลิออยโดสิสได้ดีเท่ากับ ceftazidime หรือไม่

11. ทาวิธีการทดสอบใหม่ ๆ สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการที่จะให้ผลที่มีความสัมพันธ์กับการใช้สารต้านจุลชีพในผู้ป่วย

เอกสารอ้างอิง:

1. Krogstad DJ, Moellering RC. Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine 2nd edn (Lorian VE ed.) 1986; Williams & Wilkins, Baltimore, MD. pp 537-595.
2. Sanford JP. Pseudomonas species (including melioidosis and glanders). Principles and practice of infectious disease, 2nd edn (Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, ed.). John Wiley, New York: pp 1250-1254.
3. Smith SM, Suwanagool S, Eng RHK. *Pseudomonas pseudomallei* susceptibility to five beta-lactams and five quinolones. Abstract for the 26th ICAAC, New Orleans, Louisiana 1986: Abstract 358: 161.
4. Dance DAB, Wuthiekanun V, Chaowagul W et al. The antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei*. Emergence of resistance in vitro and during treatment. J Antimicrob Chemother 1989; 24: 295-309.
5. Aswapokee N, Pruksachartvudhi S, Liangpibul P et al. Susceptibility of *P. pseudomallei* against conventional antimicrobial agents. J Inf Dis Antimicrob Agents (Thailand) 1985; 2: 127-130.
6. Fuller PB, Fisk DE, Byrd RB et al. Treatment of pulmonary melioidosis with combination of trimethoprim and sulphamethoxazol. Chest; 74: 222-224.
7. Eickhoff TC, Bennett JV, Hayes PS et al. *Pseudomonas pseudomallei* susceptibility to chemotherapeutic agents. J Inf Dis 1970; 121: 95-102.
8. Calabi O. Bactericidal synergism of novobiocin and tetracycline against *Pseudomonas pseudomallei*. J Med Microbiol 1973; 6: 293-306.

9. Smith KV, Grimmond T, Monk I. Chronic melioidosis. *Med J Aust* 1975; 200: 479-480.
10. John JF. Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy of pulmonary melioidosis. *Am Rev Respir Dis* 1976; 114: 1021-1025.
11. Buse PJ, Henderson A, White M. Melioidosis in a child in a Papua New Guinea successful treatment with kanamycin and trimethoprim-sulphamethoxazole. *Med J Aust* 1975; 2: 476-478.
12. Morrison RE, Young EJ, Harper WK et al. Chronic prostatic melioidosis treated with trimethoprim-sulfamethoxazole. *JAMA* 1979; 241: 500-501.
13. Jegathesan M, Chye GH, Chik T et al. A case of chronic melioidosis responding to tetracycline therapy. *Med J Malaysia* 1972; 27: 150-152.
14. Vorachit M, Lam K, Jayanetra P et al. Resistance of *Pseudomonas pseudomallei* growing as a biofilm on silastic discs to ceftazidime and cotrimoxazole. *J Antimicrob Chemother* 1993; 168: 1181-1185.
15. Winto MD, Everett ED, Dolan SA. Activities of five new fluoroquinolones against *Pseudomonas pseudomallei*. *J Antimicrob Chemother* 1988; 32: 928-929.
16. So SY, Chau PY, Leung YK et al. Successful treatment of melioidosis caused by a multiresistant strain in an immunocompromised host with third generation cephalosporins. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127: 650-654.
17. Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh AL et al. Susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei* to some newer beta-lactam antibiotics and antibiotic combinations using time - kill studies. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33: 145-149.
18. Sookpranee T, Sookpranee M, Mellencamp A et al. *Pseudomonas pseudomallei*, a common pathogen in Thailand that is resistant to the bactericidal effects of many antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1991; 35: 484-489.
19. Van der Auwera P, Matsumoto T, Husson M. Intraphagocytic penetration of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22: 185-192.
20. Dance DA, Wuthiekanun V, Chaowagul W et al. Interactions in vitro between agents used to treat melioidosis. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24: 311-316.

- 3 21. French GL, Ling TKW, Davies DP et al. Antagonism of ceftazidime by chloramphenicol in vitro and in vivo during treatment of gram negative meningitis. *Brit Med J* 1985; 291: 636-637.
- 3 22. Livermore DM, Chau PY, Wong AW et al. Beta-lactamase of *Pseudomonas pseudomallei* and its contribution to antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20: 313-321.
- 3 23. Supputamongkol Y, Dance DA, Chaowagul W et al. Amoxycillin-clavulanic acid treatment of melioidosis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1991; 85: 672-675.
- 3 24. Tanphaichitra D, Vanwari S, Siristonpun Y et al. Melioidosis: therapy with multiple antimicrobial agents and cellular immunity. *Chest* 1979 ; 75: 646-647.
- 3 25. Mc Eniry DW, Gillespie SH, Felmingham D. Susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei* to new beta - lactam and aminoglycoside antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1988; 21: 171-175.
- 3 26. Lumbiganon P, Saengsa-Ard S, Wilailuckana C. Imipenem therapy for melioidosis in two children. *J Ped Inf Dis* 1992; 11: 414 - 416
- 3 27. Godfrey AJ, Wong S, Dance DA et al. *Pseudomonas pseudomallei* resistance to beta-lactam antibiotics due to alterations in the chromosomally encoded beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1991; 35: 1625-1640.
- 3 28. Chau PY, Ng WS, Leung YK et al. In vitro susceptibility of strains of *Pseudomonas pseudomallei* isolated in Thailand and HongKong to some newer beta-lactam antibiotics and quinolone derivatives. *J Inf Dis* 1986; 153: 167-170.
- 3 29. Gillespie SH, McEniry DW, Felmingham D. In vitro susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei* to DNA gyrase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20: 612-614.
- 3 30. Lolekha S, Charoenpipop D, Doenchau S. In vitro susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei* to new antimicrobial agents. *Proceedings of Symposium on Bacterial and Parasitic Drug Resistance, Bangkok, 1986.*
- 3 31. Aswapokee N. Role of antimicrobial agents in treatment of melioidosis: Analysis of cases series from other countries. *J Infect Dis Antimicrob Agents (Thailand)* 1986; 3: 123-126.

32. White NJ, Dance DA, Chaowagul W et al. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. *Lancet* 1989; 1: 697-701.
33. Sookpranee M, Boonma P, Susaengrat W et al. Multicenter prospective randomized trial comparing ceftazidime plus co-trimoxazole with cholramphenicol plus doxycycline and co-trimoxazole for treatment of severe melioidosis. *J Antimicrob Chemother* 1992; 36: 158-162.
34. Chaowagul W, White NJ, Dance DA et al. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicaemia in northeastern Thailand. *J Inf Dis* 1989;159: 890-899.
35. Sauerwein RW, Lammers JW, Horrevorts AM. Ceftazidime monotherapy for pulmonary melioidosis in a traveler returning from Thailand. *Chest* 1992; 101: 555-557.
36. 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* 1987; 33: 467-473.
37. เจริญชัยมงคล ว, สุวรรณกุล พ. Melioidosis. *จุฬาลงกรณ์สาร* 2537; 761: 33-44.
38. Aswapokee N, Pruksachatvuthi S, Aswapokee P. Killing activity of ceftazidime and sulfamethoxazole-trimethoprim against *P. pseudomallei*. *J Infect Dis Antimicrob Agents (Thailand)* 1990; 7: 147-148.
39. So SY. Melioidosis in Hong Kong. *Intern Med* 1986; 2: 168-170.
40. Currie D, Howard D, Vinh N et al. The 1990-1991 outbreak of melioidosis in the northern territory of Australia : clinical aspect . *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1993; 24: 436-443.
41. Suputtamongkol Y, Dance DA, Chaowagul W et al. Amoxycillin-clavulanic acid treatment of melioidosis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1991; 85: 672-675.
42. Dance DA, Wuthiekanun V, White NJ et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas pseudomallei*. *Lancet* 1988; 1: 994-995.
43. Dance DA, Wuthiekanon V, Chaowagul W et al . Development of resistance to ceftazidime and co-amoxiclav in *Pseudomonas pseudomallei*. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28: 321-324.
44. Pruksachatvuthi S, Aswapokee N, Charoengsuk B. In vitro activities of new antibiotics against clinically important bacterial isolates. *J Infect Dis Antimicrob Agents (Thailand)* 1987; 4: 157-161.

- 3 45/ Boonma P, Boonsavat W, Patjanasoonorn B et al. The efficacy of imipenem/cilastatin in the treatment of melioidosis: A preliminary report from Srinagarind Hospital. *J Infect Dis Antimicrob Agents (Thailand)* 1990; 7: 65-69.
- 3 46/ Lumbiganon P, Sookpranee T. Ciprofloxacin therapy for localized melioidosis. *J Ped Inf Dis* 1992; 11: 418-418.
- 3 47/ Rajchanuvong A, Chaowagul W, Suputtamongkol Y et al . A prospective comparison of co-amoxyclav and the combination of chloramphenicol, doxycycline, and co-trimoxazole for the oral maintenance treatment of melioidosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (in press).
- 3 48/ Christ W, Lehnert T, Ulbrich B. Specific toxicologic aspects of the quinolones. *Rev Infect Dis* 1988; 10 (Suppl.1): S 141-144.