

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 เขาวกุลและคณะ²² 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 genotyping พบว่าในผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากการติดเชื้อครั้งแรก มักเป็นเชื้อที่มี genotype 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* (Basonym: *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 ให้ผลเท่ากันแต่สำหรับวิธี 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 เพื่อตรวจหา 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 Wongratanaacheewin 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. แต่ถ้านำเลือดตั้งกลั่นไป 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 ซึ่งจะแก้ปัญหของโรคนี้โดยตรง 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) | |

ลักษณะทางคลินิกและการแสดงของโรคเมลิออยโดสิส

อาการและการแสดงของโรคมีทุกแบบ^{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

ข้ามพบว่าระดับของ 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 อาจพบร่วมกับเมดิออยโคสิสของปอด⁴⁹ 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 ถือว่าเป็นโรคเมดิออยโคสิส⁵³ แต่ในผู้ใหญ่ซึ่งเพาะเชื้อจากสำคอตมักพบร่วมกับการเพาะเชื้อจากอวัยวะอื่น เช่น จากปอดหรือเลือดถือเป็น colonization

ต่อมน้ำลาย parotid มักอักเสบจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* พบได้ร้อยละ 7 ซึ่งเกือบทั้งหมดจะพบในเด็ก และเป็นลักษณะจำเพาะช่วยในการวินิจฉัยโรคเมดิออยโคสิสในเด็ก 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

ผู้ป่วยโรคเมดิออยโคสิสเมื่อได้รับการรักษาจนอาการดีขึ้น 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 ผู้ป่วยเมดิออยโคสิสที่มีโรคเดิมอยู่ไม่ว่าจะเป็นเบาหวานหรือภาวะอื่นไม่เป็นปัจจัยเสี่ยงของการกลับเป็นซ้ำ 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 septicemic 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. เหล่าไพบุญย์ จ., ไชยคำ จ., ฉมาต 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 และในการติดเชื้อของต่อมลูกหมากอักเสบ 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 ร่วมกับยาอื่นโดยใช้วิธี 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 ยาก้าวผ่านเข้า 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 ทำให้เชื้อต้องดื้อยา 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) พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่เอนามาทดสอบกับ 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

การรักษาผู้ป่วยโรคmelioidosis ความสำคัญอยู่ที่การวินิจฉัยโรคให้ได้ถูกต้องรวดเร็วที่สุด และตัดสินใจว่าผู้ป่วยอยู่ในระยะใด ถ้ามีการติดเชื้อซึ่งลุกลามเร็วโดยมิได้เกิดจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล หรือการพบรอยโรคมากกว่าหนึ่งแห่งซึ่งอาจมีรอยโรคเดิมแล้วแพร่กระจายไปอวัยวะอื่น ให้สงสัยว่าจะเป็นโรคmelioidosisเป็นอันดับแรก ต้องให้การรักษาแบบ septicemic melioidosis ไปเต็มที่ก่อนจนกว่าจะพิสูจน์ได้ว่าไม่เป็นmelioidosisจึงค่อยเปลี่ยนยา แต่ถ้าเป็นการติดเชื้อเฉพาะที่ เช่น ที่ผิวหนัง กล้ามเนื้อ มีในปอดหรือตับที่อาการไม่รุนแรง 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 ระหว่างที่ใช้ยานี้จนใช้ลงเฉลี่ย 14 วัน ขณะนี้ยา ceftazidime ถือเป็น drug of choice สำหรับmelioidosisที่มีอาการรุนแรง และมักใช้ยานี้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลการรักษากับยาด้านจุลชีพตัวอื่น ๆ นอกจากนั้นมียางานการใช้ยานี้ขนานเดียวรักษาผู้ป่วยโรคmelioidosisของปอดในนักท่องเที่ยวชาวต่างประเทศและมีอาการหลังเดินทางกลับจากประเทศไทย³⁵

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 ซึ่งจะช่วยให้ยา 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 trimethoprim) 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 จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้รักษาโรคเมลิออยโดสิส²⁸ แต่เนื่องจากยาซึมผ่านเข้าไปใน phagocytes ได้ดี¹⁹ จึงมีการนำเอามาใช้รักษา lymphadenitis ในเด็กได้สำเร็จ⁴⁶ อย่างไรก็ตามยานี้ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้รักษาในเด็กเล็ก เพราะยาในกลุ่มนี้มีผลเสียต่อกระดูกอ่อนเมื่อนำมาทดสอบในสัตว์ทดลอง⁴⁸

อย่างไรก็ตาม ได้มีการนำ ciprofloxacin 5 มก/กก/วัน และ ofloxacin ชนิดรับประทานมาใช้รักษาโรคเมลิออยโดสิสที่เป็นการติดเชื้อเฉพาะที่ 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-timoxazole 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.