บทที่ 1

บทนำ

เมลิออยโดซิสเป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งปัจจุบันนี้กำลังเป็นปัญหาสาธารณสุขในหลายประเทศที่อยู่ในพื้นที่เขตร้อน โดยเฉพาะประเทศในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย การแพร่ระบาดของเชื้อนอกจากจะพบในประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดแล้ว ยังสามารถพบได้ในนักท่องเที่ยว หรือคนที่เข้าไปในพื้นที่ที่เป็นถิ่นที่อยู่เชื้อ (endemic area) และยังส่งผลให้มีการกระจายเชื้อไปยังเขตพื้นที่ต่างๆ เช่นพบการติดเชื้อติดในประเทศกลุ่มยุโรป หรือในประเทศเขตหนาวต่างๆ ที่มีนักท่องเที่ยวเข้ามายังพื้นที่ที่มีการระบาด หรือพบการติดเชื้อในตัวนักท่องเที่ยวเอง (White, 2003) การติดเชื้อที่เกิดขึ้น พบว่ามาจากการสัมผัสและรับเชื้อเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านทางบาดแผล ซึ่งเชื้อจะปนเปื้อนอยู่ในดิน หรือน้ำ ที่ผู้ป่วยบังเอิญไปสัมผัสก็จะได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย และนอกจากนี้ *B. pseudomallei* ยังสามารถก่อโรคในสัตว์ได้อีกด้วยซึ่งเป็นปัญหาที่พบในตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย สัตว์ที่สัมผัสดิน น้ำที่ปนเปื้อนเชื้อสามารถเป็นโรคเมลิออยโดซิส ได้เช่นกัน และยังสามารถติดต่อระหว่างสัตว์สู่คนได้ (Zoonosis) ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญที่ไม่ควรมองข้าม

สำหรับในประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขจัดให้โรคเมลิออยโดซิสเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศเพราะพบว่าในแต่ละปีมีคนป่วยจากโรคนี้กว่า 2,000 คน โดยเฉพาะกลุ่มชาวไร่ชาวนาที่ต้องสัมผัสกับดินชื้นแฉะตามนาข้าว และหนองบึง ซึ่งมักจะมีเชื้อโรคอาศัยอยู่ โดยเชื้อผ่านเข้าทางบาดแผลหรือหายใจเอาฝุ่นที่เชื้อปนอยู่เข้าไป ซึ่งเป็นการยากที่จะป้องกันเชื้อโรคนี้เข้าสู่ร่างกายได้ อาการของโรคที่เกิดขึ้นคล้ายการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั่วๆ ไป แสดงอาการได้หลายแบบตั้งแต่อาการแบบเฉียบพลัน เรื้อรัง จนถึงไม่มีอาการ (Subclinical Melioidosis) ซึ่งทำให้ยากต่อการวินิจฉัยโรค และให้ยาที่ถูกกับเชื้อเพื่อรักษาได้ทันท่วงที และลดความรุนแรงของโรคลง ผู้ป่วยที่ติดเชื้อประมาณ 20% แสดงอาการแบบเฉียบพลันคล้ายกับคนเป็นไข้หวัด มีการติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) การวินิจฉัยอาการที่ติดเชื้อในกระแสเลือดนี้ ต้องใช้ระยะเวลานาน จึงส่งผลให้มีผู้ป่วยที่ติดเชื้อทางกระแสเลือด มีอัตราการตายสูงถึง 70-80% (Chaowakul *et al.,* 1989)

การวินิจฉัยผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* สามารถแบ่งได้ 3 ประเภท ตามวิธีการวินิจฉัยดังนี้ ทางแบคทีเรียวิทยา ทางภูมิคุ้มกันวิทยา ทางอณูชีววิทยา และแต่ละวิธีก็มีความแม่นยำ ความถูกต้อง และระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่เหมือนกัน และจากอาการที่แสดงออกที่คล้ายกับการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั่วๆไป ทำให้แพทย์ ไม่สามารถวินิจฉัยได้จากการสังเกตอาการผู้ป่วย ดังนั้นผลการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง อาการที่แสดงออกเมื่อติดเชื้อชนิดนี้มีได้ด้วยกันหลายแบบซึ่งคล้ายกับการติดเชื้อแกรมลบทั่วไป และแบบที่อันตรายซึ่งจำเป็นที่จะต้องได้รับการวินิจฉัยอย่างถูกต้อง และรวดเร็วคือ การติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งผู้ป่วยสามารถเสียชีวิตได้ภายใน 24-72 ชม. และแม้ว่าปัจจุบันนี้การพัฒนาการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสจะมีความก้าวหน้าไปมาก คือใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยลงจาก 3-4 วัน เหลือเพียง 18-36 ชม. แล้วก็ตาม แต่ผลการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการก็ยังคงมีความผิดพลาด และยังไม่มีความน่าเชื่อถือ ซึ่งเป็นผลจากการที่ยังไม่รู้กลไกการก่อโรคของเชื้อ ว่าแอนติเจนส่วนใดของเชื้อที่ก่อให้เกิดความรุนแรง ซึ่งปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด เพราะแอนติเจนที่พบนี้ พบได้ทั้งในผู้ป่วยและผู้ที่ไม่มีอาการ (Sirisinha *et al.,* 2000)

จากรายงานวิจัยของ Jitsurong และคณะ (2002) ด้วยการทำห้องสมุดดีเอ็นเอ ใน λ phage ZAP II vector เพื่อค้นหายีนที่มีการแสดงออกในผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดซิส พบว่ามีโคลนทั้งหมด 6 โคลน ที่แสดงออกต่อซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดซิส ได้แก่ ยีน *Bp7 bipD Bp3SC1 Bp3SC2 gmhA* และ *groEL* แต่เนื่องจากยีน *gmhA* และ *groEL* ได้มีการทดลองมาก่อนหน้านี้แล้ว งานวิจัยครั้งนี้เราจึงได้เลือกทำการทดลองเพียง 4 ยีน ได้แก่ *Bp7 bipD Bp3SC1* และ *Bp3SC2* โดยผลจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Hopp and Woods เพื่อดูความสามารถในการเป็นโปรตีนแอนติเจน พบว่ายีนทั้ง 4 ชนิด มีความสามารถในการเป็นโปรตีนแอนติเจน นอกจากนี้ ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในสายดีเอ็นเอของ *Bp7* ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีความคล้ายกับทรานเมมแบรนด์โปรตีน ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* โดยลักษณะโปรตีน Bp7 ของเชื้อ *B. pseudomallei* ประกอบด้วยสายโปรตีนที่แทรกอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อ 7 สาย และยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน นอกจากยีน *Bp7* แล้ว ยีน *BipD* (933 bp) ที่อยู่ในกลุ่มยีน Type III secretion system cluster 3 (TTSS3) ซึ่งมีความคล้ายกับกลุ่มยีน *Salmonella* SPI-1 ของเชื้อ *Salmonella* sp. โดยพบว่ากลุ่มยีน TTSS3 ของเชื้อ *B. pseudomallei* มีความสามารถต่อการก่อโรคในหนูแฮมสเตอร์ (hamster) (Warawa and Woods, 2005) รวมไปถึงการศึกษาของ Stevens และคณะ (2002) พบว่าโปรตีน BipD มีความจำเพาะกับซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดซิส และยีน *Bp3* ซึ่งประกอบด้วยสองยีนที่มีขนาดต่างกันคือ *Bp3SC1* (462 bp) และ *Bp3SC2* (738 bp) ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของโคลน Bp3

พบว่ามีความคล้ายกับ hypothetical protein ของ *Ralstonia solanacearum* เช่นเดียวกับ Bp7 โปรตีนจากโคลน Bp3 ก็ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน

การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาไปถึงความจำเพาะของโปรตีน Bp7 BipD Bp3SC1 และ Bp3SC2 ต่อซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดซิสกับซีรัมของคนที่ไม่ได้เป็นโรคเมลิออยโดซิส เพื่อพัฒนาไปสู่การตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสต่อไป

บทตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางแบคทีเรียวิทยาของ *Burkholderia pseudomallei*

เมลิออยโดซิส เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Burkholderia pseudomallei* มีรายงานการพบเชื้อครั้งแรกในประเทศพม่าปี ค.ศ. 1911 โดย Whitmore และ Krishnaswami ผู้ป่วยติดเชื้อมีลักษณะอาการคล้ายกับโรคมองคล่อในสัตว์ (glanders) ที่เกิดจากเชื้อ *Burkholderia mallei* แต่เนื่องจากเชื้อที่ได้แตกต่างกัน และสามารถก่อโรคได้ทั้ง ในคน และในสัตว์ จึงได้ให้ชื่อเป็น *Burkholderia pseudomallei* แต่เดิม *Burkholderia pseudomallei* จัดอยู่ในสกุล *Pseudomonas* sp. ในปี 1992 Yabuuchi และคณะได้อาศัยความแตกต่างของ ลำดับเบสบน 16S rRNA องค์ประกอบไขมัน และกรดไขมันของเซลล์ ลักษณะภายนอกของเชื้อ อัตราส่วนเบสด้วยการทำ DNA-DNA hybridization จึงได้เปลี่ยนจาก *Pseudomonas pseudomallei* ไปเป็น *Burkholderia pseudomallei* ในประเทศไทยมีการพบเชื้อนี้ในคนไข้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1955 และนอกจากนี้ยังได้พบเชื้อที่มี ลักษณะคล้ายคลึงกับ *B. pseudomallei* แต่มีความรุนแรงในการก่อโรคน้อยกว่า จึงเรียกว่า *B. pseudomallei*-like organisms ต่อมาได้เรียกเป็น *B. thailandensis* (Brett *et al.*, 1998)

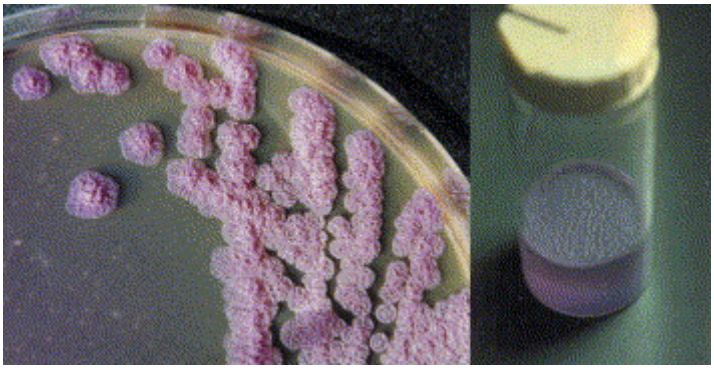
การศึกษาลักษณะจีโนมของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 พบว่ามีโครโมโซม 2 โครโมโซม ขนาด 4.07 Mb และ 3.17 Mb โครโมโซมขนาดใหญ่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและเมตาบอลิสมที่เกิดขึ้นตามปกติของเซลล์ โครโมโซมขนาดเล็กช่วยในการเติมเต็มหน้าที่ต่างๆ เพื่อใช้ในการเจริญในภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไป (Holden *et al.*, 2004)

เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง เชื้อไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยอาศัย flagella ที่ปลายข้างหนึ่งของเซลล์ จำนวน 3 เส้นหรือมากกว่า ขนาดของตัวเชื้อ มีขนาดประมาณ 0.5-1.0 x 1-2 ไมโครเมตร ติดสีเข้มเฉพาะด้านปลายทั้งสองข้าง (bipolar staining) ตรงกลางติดสีจางทำให้มองคล้ายเข็มกลัดซ่อนปลาย (closed safety pin) ดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของแบคทีเรียที่ย้อมด้วยสี Wright's strain หรือสี methylene blue แล้วเห็นเป็นรูปเข็มกลัด (safety pin) (ลูกศรชี้) (http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/bacterium.htm)

เชื้อสามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น blood agar, McConkey agar, EMB agar หรืออาหารสำหรับคัดเลือก Ashdown's selective agar ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร blood agar เมื่อเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบโคโลนี มีสีขาวนวลหรือสีครีม ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร กลม นูน ขอบเรียบและเปียกชื้นเล็กน้อย ดังรูปที่ 2 ถ้าเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมงจะเกิด α-hemolysis โคโลนีจะมีลักษณะหยาบ และเหี่ยวย่น (wrinkled) มีลักษณะเป็นเส้นนูนแผ่เป็นรัศมีออกจากจุดศูนย์กลางโคโลนี ส่วนลักษณะของเชื้อเมื่อเจริญบน McConkey agar เหมือนเชื้อในกลุ่ม non - Lactose fermenter ทั่วไปขนาดกลมเล็ก แห้งเล็กน้อย เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นจะมีโคโลนีสีชมพูอมม่วง และสีเข้มตามอายุของเชื้อโคโลนีมีกลิ่นเฉพาะเหมือนกลิ่นไอระเหยจากดินหลังฝนตกใหม่ๆ ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Ashdown's selective agar ซึ่งใช้แยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก โคโลนีมีลักษณะสีม่วง กลมเรียบ นูนเป็นรูปโดม เปียกชื้น และมีขนาด 0.8-1 มม. เมื่อเลี้ยงนาน 24 ชม. หากเลี้ยงนาน 72 ชม. โคโลนีจะมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีลักษณะเหี่ยวย่นดังรูปที่ 3 (ซ้ายมือ) ถ้าเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเช่น trypticase soy broth หรือ brain heart infusion broth เชื้อเจริญได้ดี พบลักษณะมีแผ่นฝ้าลอย ปิดอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อดังรูปที่ 3 (ขวามือ)

รูปที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่เจริญบนอาหารแข็ง Blood agar รูปซ้ายมือแสดงลักษณะโคโลนี สีขาว กลมเล็ก ที่เลี้ยงนาน 24 ชม. รูปขวามือ แสดงลักษณะโคโลนีที่เลี้ยงนาน 72 ชม. โคโลนีมีลักษณะหยาบ เหี่ยวย่น และเกิด α-hemolysis (http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/deliberate_release/Glanders/Homepage.asp#row1)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่เจริญบนอาหารแข็ง Ashdown's selective agar ดังรูปซ้ายมือ เป็นลักษณะโคโลนีที่เลี้ยงนาน 72 ชม. โคโลนีมีสีม่วง และมีลักษณะเหี่ยวย่น และอาหารเหลว รูปขวามือลักษณะการสร้าง biofilm บนอาหารเหลว (White , 2003)

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *B. pseudomallei* เชื้อจะให้ผลบวกต่อ oxidase และ catalase ใช้น้ำตาลกลูโคสแบบ oxidation และสามารถใช้น้ำตาลต่าง ๆ เช่น glucose xylose mamnitol lactose และ maltose สามารถเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ และก๊าซไนโตรเจน

นอกจากนี้ยังได้มีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *B. pseudomallei* เปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยกับเชื้อจากสิ่งแวดล้อม พบว่า เชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมสามารถใช้น้ำตาล L-arabinose ได้บางส่วน แต่เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose ได้เลย (Wuthiekanun *et al.*, 1996) คุณสมบัติปฏิกิริยาชีวเคมีนี้ได้นำมาใช้ในการศึกษาความรุนแรงของโรค (virulent) ของเชื้อที่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose (Ara^+) กับเชื้อที่ไม่สามารถใช้ Larabinose (Ara^-) วิเคราะห์ความความรุนแรงของโรคโดยวิธี LD50 (Lethal dose) พบว่า Ara^+ ไม่มีความรุนแรง (เนื่องจากให้ค่า LD50 > 10^9 colony forming units (CFU) ในหนู mice) ขณะที่ Ara^- มีความรุนแรง (LD50 ~ 10^2 CFU ในหนู mice) (Smith *et al.*, 1997) ดังนั้นคุณสมบัติการใช้น้ำตาล L-arabinose สามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการศึกษาการระบาดของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดโรคได้

2. นิเวศน์วิทยาและระบาดวิทยาของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (Cheng และ Currie, 2005)

2.1. นิเวศน์วิทยาของเชื้อ *B. pseudomallei*

พบเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ทั่วไปในภูมิประเทศที่อยู่ในเขตร้อน เชื้ออาศัยอยู่ได้ทั้งในดิน และในน้ำ สามารถอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ รวมไปถึงสภาพที่ขาดอาหารได้เป็นเวลานาน (ถึง 10 ปี) ทนต่อ antiseptic และสารซักล้างได้ อยู่ในสภาวะที่เป็นกรด (pH 4.5) ได้นาน 70 วัน เจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 24-32 ^{o}C และสามารถอยู่รอดได้ในดินที่มีความชื้นน้อยกว่า 10% ได้นาน 70 วัน แต่ไม่ทนต่อแสง UV การที่เชื้อสามารถทนต่อสภาวะที่รุนแรงต่างๆ ได้ จึงเป็นข้อได้เปรียบของเชื้อ ที่ส่งเสริมให้มีความอันตรายมาขึ้น ต่อการนำมาเป็นอาวุธชีวภาพ จากช่วงสภาวะสงครามเวียดนามพบว่าทหารอเมริกันมีอุบัติการณ์เกิดโรคเมริออยโดซิส อันมีสาเหตุมาจากการหายใจเอาเชื้อซึ่งลอยอยู่ในอากาศ เพราะการพัดของใบพัดเฮลิคอบเตอร์ ซึ่งพัดเอาเชื้อที่อยู่บนผิวดินฟุ้งกระจายขึ้นมา ตามมาด้วยรายงานซึ่งพบว่า จะพบเชื้อในปริมาณสูงที่บริเวณผิวดินที่มีความชื้นสูง หรือผิวน้ำ

ความสามารถอีกอย่างของเชื้อคือ สามารถปรับตัวเอง ให้สามารถอยู่ภายในต้นพืชหรืออยู่ร่วมกับจุลชีพประจำถิ่นได้ ในออสเตรเลียพบโปรโตซัว และ *B. pseudomallei* ในน้ำดื่ม และในสิ่งแวดล้อม (โปรโตซัวที่พบคือ *Acanthamoeba* sp. ร่วมไปถึงเชื้ออื่นๆ เช่น *Legionella pneumophila*) *B. pseudomallei* สามารถอยู่ภายในเซลล์ของโปรโตซัวได้ ดังนั้นหากร่างกายได้รับ

โปรโตซัวที่มีเชื้ออยู่ อาจทำให้เป็นโรคได้ และความสามารถในการปรับตัวเองให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมภายนอก เกี่ยวข้องกับปัจจัยภายในของตัวเชื้อ ที่ทำให้เชื้อมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งปัจจัยภายในต่างๆ ของเชื้อ ยังต้องการการศึกษาต่อไป

2.2. ระบาดวิทยาของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (Ceng และ Currie, 2005)

เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบในภูมิประเทศร้อนแถบเส้นศูนย์สูตร ละติจูด 20 องศาเหนือ ไปจนถึง 20 องศาใต้ เป็นพื้นที่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ไปจนถึงทางภาคเหนือของออสเตรเลีย ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์เกิดโรคเมลิออยโดซิสสูง ประกอบกับเป็นพื้นที่ที่มีการพบตัวเชื้อในสิ่งแวดล้อมด้วย ส่วนพื้นที่อื่นๆ ที่มีการการเกิดโรคก็เนื่องมาจากการได้รับเชื้อจากถิ่นที่มีการระบาด พบการระบาดได้สูงในประเทศไทย ตอนเหนือของออสเตรเลีย มาเลเซีย สิงคโปร์ เวียดนาม และพม่า ส่วน อินเดียตอนใต้ จีนตอนใต้ ฮ่องกง ไต้หวัน บรูไน ลาว และกัมพูชา นอกจากนั้นยังพบใน ทวีปอเมริกา ประเทศในกลุ่มทะเลคาริเบียน ประเทศในมหาสมุทรแปซิฟิก แอฟริกา และตะวันออกกลาง

สภาพอากาศในเขตเส้นศูนย์สูตร ที่ซึ่งมีฤดูฝน รวมไปถึงวิถีชีวิตของประชากรในพื้นที่ประจำถิ่นของเชื้อเช่น การเพาะปลูกข้าวของชาวนาที่ต้องเดินลุยน้ำ ซึ่งหากสวมรองเท้าก็จะช่วยลดการเกิดแผลที่เท้าลงได้ ทำให้ลดโอกาสการเกิดติดเชื้อได้ การมีฤดูฝนที่ยาวนาน ประกอบกับมีลมพัดแรงก็เป็นสภาพที่ส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญเติบโต และแพร่กระจายได้ดีในสิ่งแวดล้อม ผลก็คือพบการเกิดโรคเพิ่มสูงขึ้นในช่วงฤดูฝน

ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ได้รับเชื้อ ทางภาคเหนือของประเทศไทย ครอบครัวชาวนาประมาณ 80% มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* และประมาณ 20%ของผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดซิส พบว่าเป็นเด็กที่อายุต่ำกว่า 14 ปี จากนั้นอุบัติการณ์เกิดโรคก็ค่อยๆลดลงเรื่อยๆ ในแต่ละช่วงอายุ จนเพิ่มสูงขึ้นในช่วงอายุ 50-60 ปี และในผู้ใหญ่มากกว่า 80% ที่เป็นโรคเมลิออยโดซิส ก็พบว่าเป็นโรคอื่นๆ อยู่ก่อนแล้ว เช่น เบาหวาน หรือโรคไต ซึ่งตรงข้ามกับในเด็ก เด็กน้อยกว่า 30% พบว่าเป็นโรคเมลิออยโดซิส เนื่องจากมีโรคอื่นอยู่ก่อนแล้ว เหตุผลที่ส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อในเด็กคือการมีบาดแผล

การก่อโรคในคนและในสัตว์ โรคเมลิออยโดซิสสามารถเกิดได้ทั้งในคนและสัตว์ การติดเชื้อในสัตว์จะเกิดกับประเภทสัตว์ที่มีเท้าเป็นกีบ เช่น แพะ แกะ อูฐ หมู เป็นต้น ประเทศที่มีการระบาดในสัตว์สูงจะอยู่ที่ออสเตรเลียตอนเหนือ ส่วนในประเทศไทยไม่ค่อยมีรายงานการระบาดของเชื้อในสัตว์และไม่ใช่เชื้อติดต่อร้ายแรงในปศุสัตว์ของประเทศไทย

3. การติดเชื้อ และกลไกการก่อโรค (Pathogenesis and Clinical manifestation)

3.1. การก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *B. pseudomallei*

การติดเชื้อสามารถติดต่อได้ทางบาดแผล และระบบทางเดินหายใจ การได้รับเชื้อเข้าทางบาดแผล ถ้าอยู่บริเวณผิวหนังโดยไม่เข้าสู่กระแสเลือดก็จะเกิดอาการอักเสบบริเวณผิวหนัง (เป็นฝี/หนอง) หรือเข้าสู่กระแสเลือด ถ้าไม่มีการเพิ่มจำนวนก็ยังไม่มีการแสดงอาการจนกว่าจะมีการเพิ่มจำนวนมากเกินกว่าที่ระบบภูมิคุ้มกันจะป้องกันได้ก็จะมีการแสดงอาการ ส่วนในกรณีติดเชื้อที่ปอด ภูมิคุ้มกันจะเข้าไปทำลายเชื้อจนเกิดการอักเสบที่ปอด และมีการแพร่กระจายไปทั่วปอด จึงเริ่มมีการแสดงอาการ ถ้าการติดเชื้อเริ่มรุนแรงขึ้นจนแพร่เข้าสู่กระแสเลือด นำไปสู่การติดเชื้อไปยังอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย เกิดอาการโลหิตเป็นพิษขึ้นมา ถ้ารุนแรงมากอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ลักษณะพยาธิสภาพ หลังการติดเชื้อมีการแสดงอาการทั้งชนิดเฉียบพลัน และเรื้อรัง

3.2. ปัจจัยความรุนแรงของตัวเชื้อ (Wiersinga *et al.*, 2006)

การศึกษาในปัจจุบันนี้ยังไม่เพียงพอที่จะอธิบายถึงปัจจัยความรุนแรงของตัวเชื้อเมื่อเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ปัจจัยที่จะได้อธิบายต่อไปนี้ยังเป็นความรู้ที่มาจากการเปรียบเทียบและอ้างถึงเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ และเป็นการศึกษาที่อยู่ในขั้นทดลอง จึงได้จัดกลุ่มตามลักษณะของกลไกการผลิต และความรุนแรงของแอนติเจน

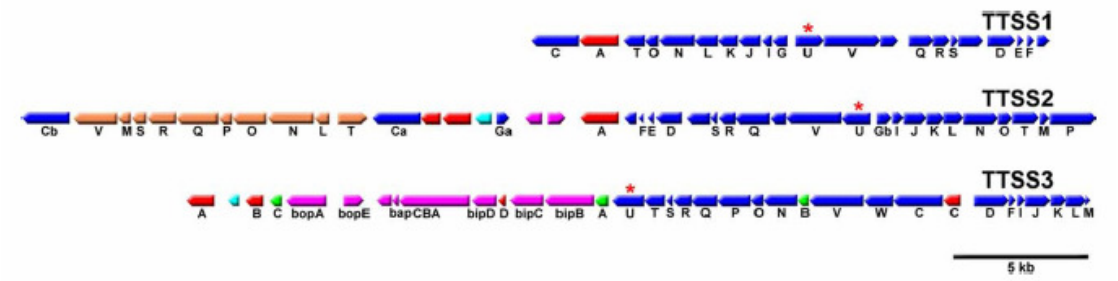
3.2.1. แอนติเจนที่คาดว่ามีความรุนแรงสูง

1) Quorum sensing เป็นระบบที่สื่อสารระหว่างเซลล์หนึ่งกับเซลล์หนึ่ง พบได้ในแบคทีเรียแกรมลบ การผลิตสารสื่อสารในระบบนี้จะเกี่ยวข้องกับยีนสองชนิดคือ ยีน *LuxI* และ *LuxR* โดยการแสดงออกของยีน *LuxI* จะสร้างสาร *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) ซึ่งโครงสร้างของ AHL ในแบคทีเรียแกรมลบแต่ละชนิดอาจแตกต่างกัน ปริมาณสาร AHL ที่ถูกสร้างออกมาจะไปมีผลต่อการแสดงออกของยีน *LuxR* โดยปริมาณ AHL จะควบคุมการสร้างสาย mRNA ของยีน *LuxR* ถ้าปริมาณ AHL น้อย จะยับยั้งการสร้างสาย mRNA ของยีน *LuxI* แต่ถ้าปริมาณ AHL มาก จะส่งเสริมให้มีการสร้างสาย mRNA ของยีน *LuxR* การศึกษาโครโมโซมของ *B. pseudomallei* ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ มีสารพันธุกรรมที่มีลักษณะคล้ายยีน *LuxI* จำนวน 3 สาย และยีน *LuxR* 5 สาย

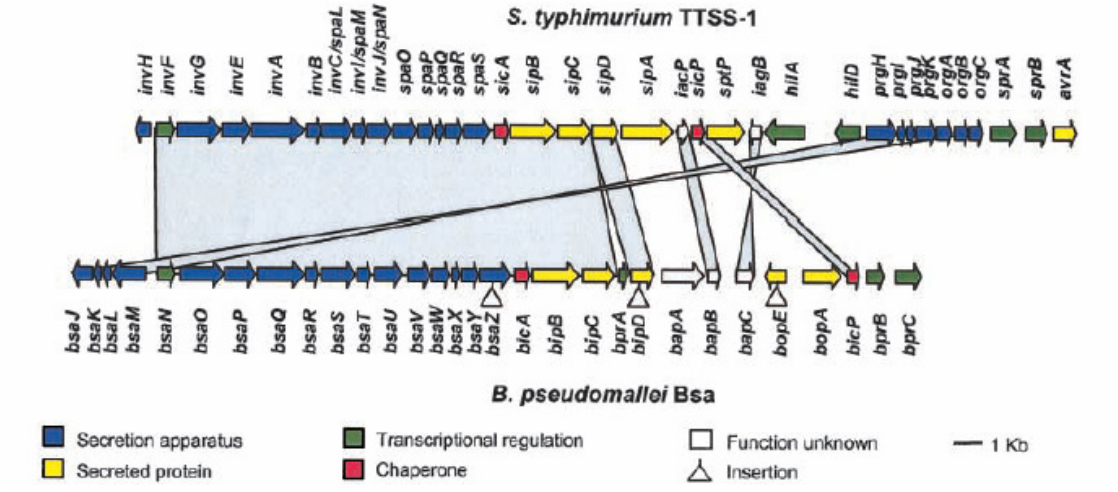
และสำหรับสาร AHL ใน *B. pseudomallei* มีโครงสร้างเป็น *N*-octanoyl-homoserine lactone,*N*-decanoyl-homoserine lactone, *N*-(3-hydroxyoctanoyl)-L-homoserine lactone, *N*-(3-hydroxydecanoyl)-L-homoserine lactone และ *N*-(3-oxotetradecanoyl)-L-homoserine lactone (Ulrch *et al.*, 2004)

จากการทดลองโดยการกลายพันธุ์ยีน *LuxI* และ *LuxR* ใน *B. pseudomallei* พบว่าต้องใช้ปริมาณเชื้อมากขึ้นกว่าเดิม เพื่อที่จะทำให้เกิดการตายของหนูเฮมสเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง และนอกจากยีนทั้งสองชนิดจะเกี่ยวข้องกับการสร้าง AHL โดยตรงแล้ว การศึกษาใน *Burkholderia* sp. ยังพบว่ามีผลต่อการควบคุมการสร้าง metalloprotease ซึ่งมีความสำคัญต่อการส่งเสริมให้เชื้อมีความรุนแรงต่อสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการผลิต siderophores, phospholipaseC และการสร้าง biofilm

2) Type III secretion systems (T3SSs หรือ TTSSs) ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่สองของเชื้อ *B. pseudomallei* กลุ่มยีน T3SSs ของเชื้อตัวนี้มีอยู่ทั้งหมด 3 แบบ ดังรูปที่ 4 คือ TTSS1 และ TTSS2 มีความคล้ายกับ TTSS ที่พบในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคในพืช สำหรับ TTSS3 ของ *B. pseudomallei* ซึ่งพบว่าก่อให้เกิดความรุนแรงในสัตว์ทดลอง มีลำดับยีนคล้ายกับ TTSS ของเชื้อ *inv/spa/prg* TTSS *Salmonella* sp. ดังรูปที่ 5 และ *ipa/mxi/spa* TTSS *Shigella* sp. โดยได้แสดงให้เห็น ลำดับของยีนที่มีการแสดงออกเป็นโปรตีน กลุ่มยีน TTSS นี้สร้างเครื่องมือนำส่ง (translocators) มีลักษณะคล้ายเข็มฉีดยา องค์ประกอบโดยทั่วไปของมหโมเลกุล TTSS มีความคล้ายกับองค์ประกอบของแฟลคเจลลา (flagella) ดังรูปที่ 6 แตกต่างกันที่ขนาดโมเลกุล ซึ่งแฟลคเจลลามีขนาดใหญ่กว่ามาก และหน้าที่ของมหโมเลกุล คือ TTSS จะนำส่งโปรตีนออกจากไซโทพลาสซึมของเชื้อ เข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน (host) เมื่อปลายของ TTSS ไปสัมผัสกับผิวเซลล์เจ้าบ้าน และโปรตีนที่ถูกส่งผ่านโดยเครื่องมือชนิดนี้ จะไปมีผลบางอย่างต่อเซลล์ที่เชื้อรุกราน เรียกโปรตีนนี้ว่า effector

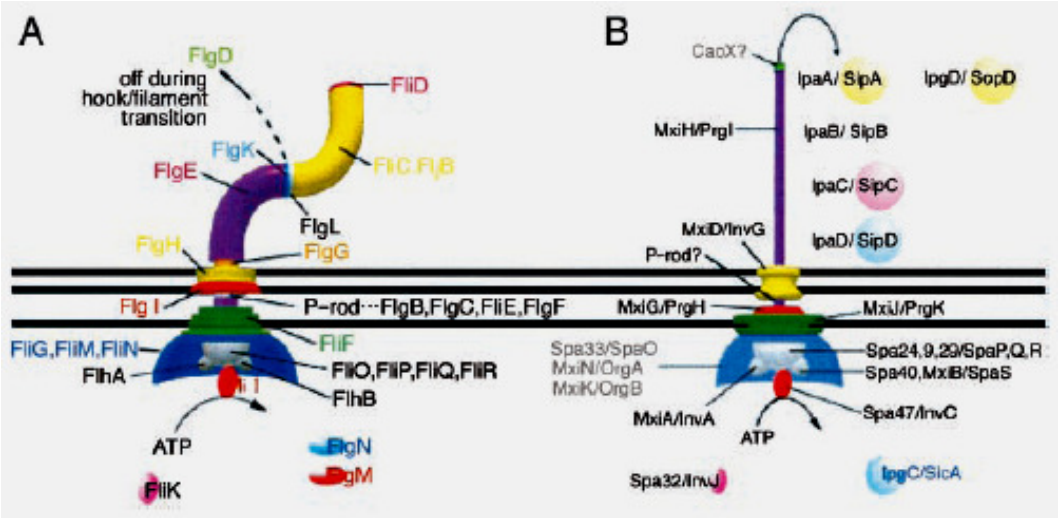


รูปที่ 4 ลักษณะของกลุ่มยีน TTSSs หรือ T3SSs ทั้ง 3 กลุ่ม ที่พบในโครโมโซมของเชื้อ *B. pseudomallei* พร้อมกับได้แสดงลำดับของยีนที่มีอยู่ใน TTSS ของแต่ละกลุ่ม สมาชิกในยีน *bsa* หรือในรายงานนี้จะใช้ชื่อว่า *sct* (secretion and cellular translocation) จะให้สีน้ำเงิน (blue) สมาชิกของยีน *rts* (regulation of type three secretion) จะให้สีแดง (red) ส่วน cts (chaperone of type three secretion) จะให้สีเขียว green ส่วนโมเลกุล effector แสดงด้วยสีม่วง (magenta) และในกลุ่มของ TTSS2 จะมีกลุ่มยีนที่สัมพันธุ์กับการสร้าง pilli กลุ่มยีนนี้จะแสดงด้วยสีส้ม (orange) และสีเขียว (cyan) เป็นยีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (unknown putative) ในรูปจะเห็นเครื่องหมายดอกจันทร์สีแดง ซึ่งแสดงตำแหน่งของการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการแสดงออกของ TTSS3 เป็นกลุ่มยีนที่ก่อให้เกิดการตายในสัตว์ทดลอง (Wawara and Woods, 2005)



รูปที่ 5 แสดงความคล้ายกันของลำดับการเรียงตัวของยีนใน TTSS3 ของเชื้อ *B. pseudomallei* กับ inv/spa/prg TTSS ที่พบในเชื้อ *Salmonella typhimurium* ในรายงานนี้นอกเหนือไปจากการพบว่ามีลำดับยีนที่คล้ายกันแล้ว ผู้ทดลองยังได้มีการศึกษาหน้าที่ของยีน *bsaZ*, *bipD* และ

bopE พบว่าที่การแสดงออกที่คล้ายกับยีนที่พบใน inv/spa/prg TTSS ของเชื้อ *S. typhimurium* (Stevens *et al.*, 2004)



รูปที่ 6 เปรียบเทียบโครงสร้างของ flagella (A) กับ TTSS (B) มหโมเลกุลทั้ง 2 มีองค์ประกอบของโปรตีนคล้ายกัน แต่ขนาดของโปรตีนแตกต่างกัน และความแตกต่างที่เห็นได้ชัดเจนคือความยาวของ flagella ซึ่งแตกต่างกับ TTSS ประมาณ 10-100 เท่า รวมไปถึงหน้าที่ของมหโมเลกุลที่แตกต่างกัน ในรูปแสดงตำแหน่งของโปรตีน และองค์ประกอบของโปรตีนที่มีใน flagella และ TTSS ส่วนที่มีความคล้ายกัน จะแสดงด้วยสีที่เหมือนกัน ส่วนที่แตกต่างกันก็จะใช้สีที่ต่างกัน (Blocker *et al.*, 2003)

การศึกษาลักษณะความเป็นอยู่ของเชื้อ *B. pseudomallei* ภายในเซลล์จับกิน พบว่าการแสดงออกของกลุ่มยีน TTSS3 มีบทบาทสำคัญดังนี้ หลังจากที่มีการจับกินตัวเชื้อเข้าไป *B. pseudomallei* จะอยู่ในเยื่อหุ้ม endocytic vacuoles เชื้อสามารถรอดพ้นจากการทำลายของสารเคมีได้ ด้วยการรบกวนการสร้าง nitric-oxide synthase (iNOS) และทำให้เกิดการแตกของ endosome ด้วยการเจาะผ่านเยื่อหุ้มด้วยวิธี coiling phagocytosis นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถเพิ่มจำนวนตัวมันเอง และอยู่รอดภายในไซโทพลาสซึม การเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง actin ที่ด้านใดด้านหนึ่งของตัวเชื้อ เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ เชื้อจะเคลื่อนตัวไปที่เซลล์ด้านใดด้านหนึ่งโดยการสร้าง actin ที่ปลายของตัวเชื้อทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นหาง (comat-tail) เพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย การแพร่กระจายตัวของเชื้อจากเซลล์หนึ่ง สู่อีกเซลล์หนึ่ง ด้วยการเหนี่ยวนำให้มีการยื่นของเยื่อหุ้มออกไป เพื่อจะไปรวมกับอีกเซลล์แล้วเกิดเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ การศึกษาโดยกลายพันธุ์ยีน *bsa* ใน T3SS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งคาดว่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้อง

กับการสร้าง translocator ผลการทดลองพบว่ามีลักษณะการทำงานเหมือนกับเชื้อ *Salmonella* sp. และ *Shigella* sp. คือ ช่วยในการแทรกผ่าน หลบหลีกจากการทำลายใน endocytic vacuoles ช่วยในการแพร่กระจายเชื้อภายในเซลล์ และใช้ในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์เจ้าบ้านเชื้อ นอกจากนี้เชื้อ *B. pseudomallei* ที่ถูกกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งยีน *bsa* ยังแสดงให้เห็นว่า เชื้อไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ภายในเซลล์ และไม่รอดพ้นจากการถูกทำลายภายในเซลล์ รวมถึงไม่สามารถสร้าง actin ขึ้นมาได้ การกลายพันธุ์ที่ยีน *bopE* ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเข้าเซลล์เจ้าบ้านได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การมีอยู่ของยีน *bopE* ทำให้ง่ายต่อการหลบหลีกต่อการทำลายที่เกิดก่อภายในเซลล์ และพบว่าโมเลกุล effector ที่พบในกลุ่มยีน T3SS3 ได้แก่ *bipB*, *bipC* และ *bipD* เป็นโปรตีนที่จะถูกส่งเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน และสำหรับการศึกษาหน้าที่ของยีน *bipB* พบว่า *bipB* ทำให้เกิดการรวมกันของเซลล์เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (multinucleated giant cell) ก่อให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อไปสู่เซลล์ข้างเคียง และก่อให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis

3) Capsular polysaccharide เป็น polysaccharide ที่ผลิตออกมานอกเซลล์มีโครงสร้างเป็น -3)-2-*O*-acetyl-6-deoxy-β-D-manno-heptopyranose-(1- โดยลักษณะที่เคยมีรายงานไปก่อนหน้านี้จะมีโครงสร้างเป็น type I O-polysaccharide แต่เมื่อพิจารณาให้ดีจะเห็นว่ามีขนาดโมเลกุลใหญ่ และมีลักษณะพันธุกรรมที่คล้ายกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ คือมี 3 capsular polysaccharide ต่อหนึ่งโมเลกุล จากการทดสอบพบว่า capsular polysaccharide จำเป็นต่อการเกิดความรุนแรงของเชื้อในสัตว์ทดลอง การกลายพันธุ์ *B. pseudomallei* ไม่ให้มีการผลิต capsule พบว่าเชื้อสามารถถูกจับกินได้โดยง่าย และตรวจพบว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อ capsule ในซีรัมของผู้ป่วย

3.2.2. แอนติเจนที่คาดว่าช่วยเสริมความสามารถของเชื้อ

1) Lipopolysaccharide (LPS) หรือ type II O-antigenic polysaccharide ของเชื้อ *B. pseudomallei* มีลักษณะที่แตกต่างจากแกรมลบอื่นๆ LPS มีการแสดงออกน้อยในหนูทดลองที่เป็นโรค เมื่อเทียบกับ LPS ที่แสดงออกในเชื้ออื่นๆ แต่แสดงออกมาในหนูที่มีการตัดแต่งพันธุกรรม และเมื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างในเซลล์ทดลอง (*in vitro*) ก็พบว่ามีการสร้าง LPS ออกมาน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการสร้างใน *E. coli* แต่พบว่า การจดจำของระบบภูมิคุ้มกันแรกเริ่มของผู้ติดเชื้อแกรมลบอื่นๆ ต่อ LPS มีมาก ซึ่งปรากฏในรูปแบบที่เรียกว่า Toll-like receptor (TLR)4 แต่ในเชื้อ *B. pseudomallei* LPS กลับไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแรกเริ่มแบบ TRL4

สำหรับการทดสอบการแสดงออกของ LPS ในซีรัม พบว่า LPS ที่พบใน *B. pseudomallei* มีความใกล้เคียงกับ LPS ที่พบในเชื้อสกุล *Burkholderia* sp. มากกว่า 700 ตัวอย่าง แต่ก็พบว่ามีความแตกต่างในการทดสอบกับซีรัมด้วยวิธี Western blot ระดับของภูมิคุ้มกันต่อ LPS ที่พบในผู้ป่วยที่หายจากการเป็นโรค และผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อทางกระแสเลือด พบว่ามีระดับภูมิคุ้มกันที่สูงมาก ซึ่งอาจจะช่วยป้องกันการตายที่เกิดจากการติดเชื้อของผู้ป่วยได้ การเปรียบเทียบการแสดงออกของ LPS ในผู้ป่วยระหว่างผู้ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* และผู้ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis* พบว่ามีรูปแบบที่เหมือนกัน

2) Flagella แบคทีเรีย *B. pseudomallei* มีแฟลคเจลลา และเคลื่อนที่ได้ แต่มีรายงานพบว่า การสร้างหรือไม่สร้างแฟลคเจลลา เชื้อก็ยังคงมีความสามารถในการรุกราน และเจริญในเซลล์ในห้องทดลอง ซึ่งสนับสนุนการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่า เชื้อที่กลายพันธุ์ยีนที่สร้างแฟลคเจลลา และสายพันธุ์ปกติ ทำให้หนูติดเชื้อไม่แตกต่างกัน และในการทดลองที่ทำให้หนูติดเชื้อที่ปอด พบว่าปริมาณเชื้อที่กลายพันธุ์ไม่สร้างแฟลคเจลลาลดลง เมื่อเทียบกับเชื้อปกติ และเชื้อกลายพันธุ์ที่ทำให้มีความรุนแรงน้อยลง

3) Type IV pili-mediated adherence การเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้านเป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคที่สำคัญอย่างหนึ่ง เกี่ยวเนื่องกับโมเลกุลคาร์โบไฮเดรต ที่ต่อกับโปรตีน adhesin การมีอยู่ของ Type IV pili สำคัญต่อการก่อโรคในแบคทีเรียแกรมลบหลายๆ สกุล และการหาลำดับเบสในโครโมโซมของ *B. pseudomallei* ก็พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง pili คือยีน *pilA* เชื้อที่กลายพันธุ์โดยตัดยีน *pilA* ออก พบว่าความสามารถในการเกาะติดเซลล์ลดลง และความรุนแรงลดลงด้วยเมื่อทดลองกับหนอน (nematode) และในหนู จึงสนับสนุนบทบาทของ type IV pili ใน *B. pseudomallei*

4) แอนติเจนอื่นๆ ที่พบว่าสามารถก่อให้เกิดความรุนแรง ใน *B. pseudomallei* ได้แก่ siderophore และโปรตีนคัดหลั่งเช่น hemolysin lipase และ protease

3.3. การตอบสนองของร่างกายต่อเชื้อ

3.3.1. การตอบสนองด้วยระบบภูมิคุ้มกันแรกเริ่ม

เมื่อมีการรุกรานของเชื้อ ร่างกายจะผลิตภูมิคุ้มกันแรกเริ่ม (innate immune system) เพื่อใช้ในการต่อต้านเชื้อ ภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นก็จะเข้าจับเชื้อ เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเชื้อ ตำแหน่งการเข้าจับเชื้อของภูมิคุ้มกันแรกเริ่ม มีการจดจำลักษณะโมเลกุลของเชื้อที่ไม่จำเพาะ และโมเลกุลที่ผิวเซลล์แบคทีเรียโดยทั่วไปมีตำแหน่งสำหรับการจดจำหลักๆ ได้แก่ Toll-like receptors (TLRs), lectins, mannose receptors และ scavenger receptors

โมเลกุลที่อยู่ที่ผิวเซลล์ของ *B. pseudomallei* จะแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมที่เชื้ออาศัย โมเลกุลที่มีการศึกษาได้แก่ โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ Toll-like receptor4 (TLR4) ได้แก่ Lipopolysaccharide ที่พบใน *B. pseudomallei* จะมีผลต่อการขัดขวางการสร้าง tomor necrosis factor: TNF-α และ nitric oxide ในเซลล์มาโครฟาจ การทดลองในเซลล์เยื่อบุผิวที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่ามีการสร้าง interleukin-8(IL-8) ในปริมาณที่ต่ำ กลไกการรบกวนนี้อาจนำไปสู่การอยู่รอดภายในเซลล์ของ *B. pseudomallei*

Capsular polysaccharide ใน *B. pseudomallei* ทำให้ complement factor C3b เสียหน้าที่ ส่งผลให้แบคทีเรียไม่ถูกทำลายภายในมาโครฟาจ ซึ่งผลของ capsule ที่เชื้อสร้างขึ้นก็ป้องกันตัวเองจากยาฏิชีวนะ (protamine และ defensin human neutrophil peptide-1) ด้วยเช่นกัน

3.3.2. การตอบสนองด้วยภูมิคุ้มกันเสริม

ร่างกายจึงมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเกิดทั้งระบบ humoral immunity กับ cellular immunity ในระบบ humoral immunity จากการศึกษาพบว่า 90% ของผู้ป่วยจะมีการผลิตแอนติบอดี immunoglobulin G (IgG) และ IgM นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า ยังได้มีการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์โดยทาง alternative pathway (Egan *et al.*, 1996) กลไกการตอบสนองยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า exotoxin (smith *et al.*, 1987) และ lipopolysaccharide (Bryan *et al.*, 1994) สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ดังนั้นแอนติเจนเหล่านี้อาจเป็นตัวกระตุ้นหลักในการตอบสนองของระบบ humoral immunity

ส่วนในระบบ cellular immunity พบว่า interleukin มีบทบาทในระบบนี้ interferon-γ จะอยู่ในระดับที่สูง (Brown *et al.*, 1991) และจะสามารถต้านทานการติดเชื้อที่มีความรุนแรงสูงในสัตว์ทดลอง (Santanirand *et al.*,1999) interferon-γ จะไปกระตุ้น มาโครฟาจ ในการจับกินเชื้อกับ natural killer cell ในส่วนของ มาโครฟาจ หลังจากการจับกินแล้วจะปล่อย nitric oxide ออกมาทำลายเชื้อที่ถูกจับกิน (Miyaki *et al.*, 1997) แต่ก็มีเซลล์บางส่วนที่สามารถอยู่ภายในเซลล์ มาโครฟาจ ได้ (Jones *et al.*,1996) เป็นไปได้ว่าจะมีการผลิต antioxidant ออกมาต่อต้าน nitric oxide และ hydrogen peroxide ที่จะเข้าไปทำลายเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการกระตุ้น tumor necrosis factor ไปกระตุ้น polymorphonuclear phagocyte และ neutrophil เข้าไปในบริเวณที่มีการอักเสบเพื่อจับกินเซลล์ กลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการเกิดโรค เมลิออยโดซิส ยังไม่ทราบชัดเจนนัก แต่จากการศึกษาพบว่า interferon-γ ช่วยในเสริมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดการตายในสัตว์ทดลองลดลง สิ่งนี้อาจเป็นแนวทางใหม่ในการรักษาโรค เมลิออยโดซิสต่อไป

4. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ (Diagnosis)

การตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส ทางคลินิกทำได้ยากเนื่องจาก เชื้อก่อโรคนี้สามารถก่อโรคได้กับทุกระบบอวัยวะ เช่น ทางเดินหายใจ, ผิวหนังและเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง, กระดูกและข้อ, ตับ, ม้าม, ทางเดินปัสสาวะ และระบบสืบพันธุ์, น้ำเหลือง, หัวใจและหลอดเลือด และระบบประสาท เป็นต้น อาการแสดงทางคลินิกพบได้ตั้งแต่ติดเชื้อโดยไม่แสดงอาการ จนถึงติดเชื้อในกระแสเลือดแบบเฉียบพลัน ซึ่งทำให้อัตราการตายจากการติดเชื้อนี้สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย มีการพบโรคนี้สูงกว่าภูมิภาคอื่นเนื่องจากเชื้อก่อโรคนี้ สามารถทำให้เกิดการตายได้ภายใน 24-48 ชั่วโมง ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุของโรคจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง วิธีมาตรฐานที่ยอมรับกันคือ การเพาะเชื้อซึ่งจำเป็นต้องใช้เวลา 3-4 วัน จึงจะได้ทราบผล ซึ่งช้าไป สำหรับการรักษาโรคชนิดนี้ การตรวจทางภูมิคุ้มกัน และทางอณูชีววิทยา ได้มีการพัฒนาขึ้นมามากมาย เพื่อช่วยให้การวินิจฉัยได้เร็วขึ้นแต่ก็ยังไม่สามารถใช้แทนที่การเพาะเชื้อได้

4.1. การตรวจโดยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จากสิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจที่พบได้มีตั้งแต่จากเลือด, หนอง, ปัสสาวะ, เสมหะ และน้ำคัดหลั่งจากที่ต่าง ๆ ของร่างกาย การตรวจที่ง่ายคือการย้อมสีแกรม เชื้อนี้จะติดสีแกรมลบรูปแท่ง โดยจะติดสีเข้มที่ปลายทั้ง 2 ด้าน เหมือนเข็มกลัดซ่อนปลาย (bipolar staining) เมื่อย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูจะพบลักษณะดังกล่าวได้ชัดขึ้น แต่ลักษณะดังกล่าวไม่จำเพาะต่อเชื้อนี้ โดยอาจจะพบได้ในเชื้ออื่น ๆ เช่น เชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* อื่นๆ และ *Pasteurella pestis* การย้อมสีแกรมพบว่า มีความไวเพียงร้อยละ 55

4.2. การเพาะเชื้อและพิสูจน์เชื้อ

การเพาะเลี้ยงเชื้อในงานตรวจวินิจฉัยโรค เชื้อสามารถเจริญได้ภายใน 24 ชั่วโมง บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา เช่น blood agar, McConkey agar, cystine-lactose-electrolyte-deficient (CLED) agars และ routine blood culture broth โดยโคโลนีที่ขึ้นบนวุ้น จะมีลักษณะที่จำเพาะเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง ขึ้นไป และการสังเกตลักษณะโคโลนีก็ต้องอาศัยความชำนาญเฉพาะบุคคลในการแปลผล ในกรณีที่ตัวอย่างที่ส่งตรวจที่มีแบคทีเรียประจำถิ่นอาศัยอยู่มาก เช่น เสมหะจากทางเดินหายใจ หรือปัสสาวะ อาจใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษคือ Selective media, Ashdown's agar หรือ selective broth เข้าช่วย (Walsh and Wuthiekanun, 1996) การวินิจฉัยโรคโดยวิธีนี้ยังต้องอาศัยวิธีทดสอบทางชีวเคมีอีกขั้นตอน เพื่อพิสูจน์ลักษณะของเชื้อ โดยทั่วไปใช้เวลา 24-36 ชม. แต่สำหรับคนไข้ที่ติดเชื้อในกระแสเลือด ความเร็วในการตรวจและวินิจฉัยเชื้อมีความสำคัญต่อการรักษาเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะการให้ยาสำหรับฆ่าเชื้อ หากให้ยาไม่ตรงกับเชื้อ อาจทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา รวมไปถึงผลการรักษา ที่อาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้หลังจากได้รับการรักษาที่ไม่ถูกวิธี ซึ่งมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึง 50% ของผู้ป่วยทั้งหมดที่ได้รับการรักษา ในงานตรวจประจำวัน การเพาะเชื้อจากกระแสเลือดมักจะใช้เวลานานตั้งแต่ 3 วัน ถึง มากกว่า 7 วัน (Wuthiekanun *et al.*, 1990) เพราะเชื้อในกระแสเลือดมักจะน้อยกว่า 1 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงได้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงโดยใช้เครื่องตรวจทางแบคทีเรียในเลือดแบบอัตโนมัติ (automated blood culture system) เพื่อลดเวลาในการตรวจหาเชื้อในเลือด เช่น Bactec, BacT/Alert จากการใช้ BacT/Alert system พบว่า ประมาณ 62% ของตัวอย่างที่มีเชื้อสามารถตรวจพบภายใน 24 ชั่วโมง และประมาณ 93% ของตัวอย่างที่มีเชื้อตรวจพบได้ภายใน 48 ชั่วโมง อัตราการตายลดจาก 74% เหลือเพียง 41% เมื่อพบเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง (Tiangpitayakorn *et al.*, 1997) แต่การเลี้ยงโดยวิธีนี้ ก็ยังต้องอาศัยการพิสูจน์เชื้อจาก

ผลทดสอบทางชีวเคมี การวินิจฉัยด้วยเครื่องนี้แม้ว่าจะสามารถลดอัตราการตายลงได้ แต่ข้อเสียก็คือ ค่าใช้จ่ายสูง การตรวจด้วยวิธีนี้จึงมีเฉพาะโรงพยาบาลใหญ่เท่านั้น ซึ่งก็เป็นความจำเป็นสำหรับการส่งตัวอย่างตรวจ จากโรงพยาบาลท้องถิ่นมาที่โรงพยาบาลศูนย์ นอกจากนี้ยังได้มีการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปมาใช้ช่วยพิสูจน์เชื้อ เช่น API 20E, Microbact 24E และ Minitek disc อย่างไรก็ตาม มีการทดสอบพบว่า API 20 NE ไม่สามารถแยกระหว่าง *B. pseudomallei* กับ *Chromobacterium violacium* ได้ (Inglis *et al.*, 1998)

แม้ว่าการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อจะเป็นวิธีมาตรฐาน(gold standard method) ของห้องปฏิบัติการ และแม้ว่าจะมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงให้ใช้ระยะเวลาน้อยมากเท่าใดก็ตาม นั่นก็หมายความว่า ค่าใช้จ่ายในการตรวจก็จะสูงตามไปด้วย และก็ยังมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพิสูจน์เชื้อทางชีวเคมีเช่นเดิม ซึ่งจำเป็นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 24-36 ชม.

4.3. การตรวจทางห้องภูมิคุ้มกันวิทยา

การวินิจฉัยด้วยวิธีทางอิมมูน (Immunological assays) ได้รับการพัฒนาขึ้นสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นหลังจากการติดเชื้อ และ/หรือ ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อที่เข้าสู่ร่างกาย เช่น การตรวจหาแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect hemagglutination (IHA) เป็นวิธีที่พื้นฐาน ซึ่งใช้ประสบการณ์ และเครื่องมือในการตรวจน้อย ผลที่ได้ก็รวดเร็วกว่า แต่อย่างไรก็ดีการตรวจด้วยวิธีนี้ต้องรู้ แอนติเจน หรือแอนติบอดีที่จำเพาะ ซึ่งเป็นข้อเสียอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นกับการตรวจด้วยวิธีนี้ เพราะวิธีนี้ยังไม่สามารถแยกผลบวกเทียม ที่เกิดขึ้นจากผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อได้ การตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อก่อโรค มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยเมลิออยโดซิสได้เร็วขึ้น และใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ

4.3.1. การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ

การทดลองเพื่อหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *B. pseudomallei* ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาขึ้นหลายวิธี เช่น complement fixation (CF) ซึ่งก็ไม่ได้นำมาใช้มากนัก และ indirect hemagglutination (IHA) โดยในปี 1970 Alexander และคณะ ได้ทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการใช้วิธี CF กับวิธี IHA ในการตรวจวินิจฉัยเมลิออยโดซิส แต่เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของคนที่สร้างขึ้นจากการติดเชื้อ มีความแตกต่างกันตามอายุ เพศ และถิ่นที่อยู่อาศัย ทำให้ยากต่อการกำหนดค่า cut-off มาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยในถิ่นที่มีการระบาด และการศึกษาในประเทศไทยด้วยวิธี

indirect hemagglutination (IHA) พบว่าที่ cut-off ไตเตอร์ > 1 : 160 มีความไว 77%, ความจำเพาะ 92% (Appassakij *et al.*, 1990) ข้อเสียของการตรวจด้วยวิธีนี้คือ ไม่สามารถแยกระหว่างผู้ป่วย และคนปกติที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคได้ เนื่องจากประชากรส่วนใหญ่ในพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อ จะมีแอนติบอดีต่อเชื้อ สำหรับการศึกษาการระบาดในประเทศไทย พบว่าประชากรส่วนใหญ่ที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* มากถึง 30-47% ของจำนวนประชากรทั้งหมด ดังนั้นวิธี IHA จึงเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ แต่สำหรับการนำมาใช้ในการตรวจโรค ควรใช้กับประชากรซึ่งไม่ได้อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อ และเพื่อที่จะลดข้อผิดพลาดของวิธีนี้ ในปี 1981 Ashdown และคณะ จึงได้มีการทดลองใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเช่น IgM แต่ก็ยังไม่ได้มีการพัฒนามาใช้กับการตรวจในประชากรกลุ่มใหญ่ และปัญหาของวิธี IHA อีกอย่างหนึ่งก็คือความไวในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งมีระดับแอนติบอดีในปริมาณน้อย ผลการตรวจผู้ติดเชื้อในกระแสเลือดด้วยวิธีนี้จึงให้ผลเป็นลบ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าระดับแอนติบอดีที่สูงขึ้น(ซึ่งให้ผลลบ) อาจเกิดจากแอนติบอดีไปทำปฏิกิริยา (cross reaction) กับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ และกับเชื้อ *B. pseudomallei* ดังนั้นจึงได้มีการพยายามหาแอนติเจนของเชื้อที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้น เพื่อนำมาใช้ในวิธี IHA เช่น lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งจากการทดลองของ Anuntagool และคณะ (1998) พบว่า LPS ที่ได้มาจากเชื้อที่ก่อโรคในผู้ป่วยมีรูปแบบที่ต่างจาก LPS จากเชื้อในธรรมชาติเมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE อีกทั้ง LPS ปกติยังไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วย ซึ่งหากนำมาทดลองจริงๆ ก็คาดหวังได้ว่าน่าจะให้ผลการทดลองที่มีความไวสูง เมื่อทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือด นอกจากนี้ก็พบแอนติเจนที่มีความจำเพาะของเชื้ออีกหลายตัว เช่น 36-kDa exotoxin (Ismail *et al.*,1987) 19.5-kDa (Anuntagool *et al.*,1993) 40-kDa (Wongratanacheewin *et al.*, 1993) และ LPS (Petkanjanapong *et al.*, 1992) แต่แอนติเจนที่พบเหล่านี้ก็ยังไม่ได้มีการทดลองกับซีรัมของผู้ติดเชื้อกลุ่มใหญ่ นอกจากนี้ยังสามารถทำบริสุทธิ์โปรตีนแอนติเจนจากเชื้อ *B. pseudomallei* ขนาด 200-kDa ซึ่งแยกโดยใช้ monoclonal antibody (5F8) และได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี indirect ELISA พบว่ามีความจำเพาะต่อแอนติบอดีของเชื้อ *B. pseudomallei* (Rugdech *et al.*, 1995) ต่อจากนั้นได้มีการนำไปทดสอบทางคลินิกกับผู้ติดเชื้อแบบแสดงอาการเฉียบพลันที่อาศัยในพื้นที่แพร่ระบาด (Dharakul *et al.*, 1997) พบว่าแอนติเจนที่ทำบริสุทธิ์ได้นั้นมีความจำเพาะต่อแอนติบอดี IgG แต่มีความจำเพาะน้อยกับแอนติบอดี IgM ซึ่งผลที่ได้ขัดแย้งกับการทดลองที่ผ่านมา โดย IgM มีความจำเพาะ และพบได้มากกว่า IgG สำหรับผู้ที่ติดเชื้อแบบแสดงอาการเฉียบพลัน การใช้การตรวจหาแอนติเจนผสมกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* จะให้ผลการวินิจฉัยที่ดีกว่าการใช้แอนติเจนเพียงชนิดเดียว ผลการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธีต่างๆ แสดงในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธีต่างๆ (Sirisinha *et al.*, 2000)

Performance of various antibody detection assays in 101 patients[a]

Method	Antigen	%			
		Sensitivity	Specificity	Positive predictive	Negative predictive
Indirect ELISA	Affinity-purified (200 kDa)	74	75	79	69
Indirect ELISA	LPS	70	77	80	67
Indirect ELISA	CCF (30 kDa)	82	80	84	78
Western blot	Recombinant	70	91	91	70
Dot immunoassay	CF (40 kDa)	72	64	72	64
IHA	Melioidin	93	34	65	79
IHA	Secreted protein	54	61	65	51
IHA	LPS	46	82	76	54
Immunochromatography[b]	Crude antigen	23	89	76	47

[a] 57 Patients were culture positive for *B. pseudomallei* and 44 patients were culture positive for organisms other than *B. pseudomallei*.
[b] Detecting only IgM antibody.

ตารางที่ 2 แสดงผลการวินิจฉัยโรคด้วยการใช้แอนติเจนผสมกับแอนติบอดี สำหรับการตรวจโรคเมลิออยโดซิส (Sirisinha *et al.*, 2000)

Performance of a combined antibody and antigen detection assays of specimens from the same patients

No of patients	Antibody detection	Antigen detection	%			
			Sensitivity	Specificity	Positive predictive	Negative predictive
83[a]	Affinity purified 200-kDa antigen (ELISA)	5F8 (ELISA)	80	51	65	69
83[a]	Recombinant antigen (Western blot)	Bps L2 (LA)	84	59	70	77
82[b]	Bacterial cell (IM)	5F8 (IM)	48	90	83	62

[a] 44 Patients were culture positive for *B. pseudomallei* and 39 patients were culture positive for organisms other than *B. pseudomallei*.
[b] 42 Patients were culture positive for *B. pseudomallei* and 40 patients were culture positive for organisms other than *B. pseudomallei*. IM, immunochromatography.

จากการศึกษาชุดทดสอบแบบรวดเร็ว (rapid immunochromogenic test) ในประเทศออสเตรเลีย ต่อแอนติบอดี IgM และ IgG กับผู้ป่วยจำนวน 121 ราย พบว่าชุดทดสอบดังกล่าว ให้ค่าความไวต่อการตรวจหาแอนติบอดี IgG เป็น 100% และ IgM เป็น 93% ส่วนค่าความจำเพาะต่อแอนติบอดี IgG และ IgM มีค่าเท่ากันคือ 95% โดยเป็นการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี IHA และ การเพาะเชื้อ ผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับ IHA บ่งชี้ว่ามีประสิทธิภาพเหมือนกัน แต่เมื่อนำชุดทดสอบดังกล่าวมาศึกษาในประเทศไทยพบว่าค่าความไว ต่อการตรวจหาแอนติบอดิ IgG เป็น 79% และค่าความจำเพาะ (90%) ซึ่งเป็นค่าที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับการตรวจด้วย IHA แต่สำหรับการตรวจหาแอนติบอดี IgM แล้วพบว่าค่าความไว และความจำเพาะไม่เป็นที่น่าพอใจเมื่อเทียบกับ การ

เพาะเชื้อ (Wuthiekanun *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามเมื่อนำชุดทดสอบดังกล่าวมาทดลองใช้ในพื้นที่ที่เป็นแหล่งแพร่ระบาด ทางภาคอีสานของประเทศไทย พบว่า มีค่าความไว และความจำเพาะต่อการตรวจหา IgG เป็น 86% และ 47% ซึ่งใกล้เคียงกับการตรวจหาแอนติบอดี IgM (Cheng *et al.*, 2006) ผลการทดสอบดังกล่าวทำให้ชุดทดสอบนี้ ไม่สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสได้กับประชากรที่อาศัยในพื้นที่ที่เป็นแหล่งแพร่ระบาด

4.3.2. การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ

การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อจะมี ประสิทธิภาพที่ดีกว่าการตรวจหาแอนติบอดี เพราะว่าการตรวจด้วยวิธีนี้แสดงให้เห็นถึงการเกิดโรค และเมื่อนำไปใช้ในพื้นที่ที่มีการระบาด วิธีนี้จะสามารถเพิ่มความจำเพาะมากขึ้น ซึ่งจะลดแอนติบอดีที่ไม่เกี่ยวข้องออกไป วิธีการตรวจทางระบบภูมิคุ้มกัน ส่วนใหญ่แล้วได้รับการพัฒนาขึ้น เพื่อการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจเช่น เลือด หรือปัสสาวะ และการตรวจหาตัวเชื้อในตัวอย่างทางคลินิกเช่น หนอง เสมหะ บาดแผล และสารคัดหลั่งอื่นๆ (Sirisinha *et al.*, 2000) การพัฒนาวิธีการนี้เริ่มครั้งแรกในปี 1987 Ismail และคณะ ได้พัฒนา monoclonal antibody-based สำหรับการตรวจหา exotoxin ซึ่งสามารถตรวจหา toxin ได้ในปริมาณ 16 ng/ml จากน้ำเลี้ยงเซลล์ เช่นเดียวกัน ในปี 1990 Wongratanacheewin และคณะ ได้พัฒนาวิธี ELISA โดยใช้ polyclonal antibody-based ที่จับกับ avidin-biotin ซึ่งสามารถตรวจพบแอนติเจนได้ในปริมาณ 4 ng/ml ในน้ำเลี้ยงเซลล์ และพบว่าแอนติเจนที่อยู่ในน้ำเลี้ยงมีขนาด 40 kDa (Wongratanacheewin *et al.*, 1993) แต่อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีที่กล่าวมาแล้วยังไม่มีการทดลองกับตัวอย่างทางคลินิก ในปี 1994 Desakorn และคณะ ได้พัฒนาวิธี ELISA ให้มีความไวมากขึ้น โดยใช้ FITC conjugated rabbit antibody ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* และ horseradish peroxidase conjugated mouse monoclonal antibody ต่อ FITC สำหรับการตรวจหา LPS ของ *B. pseudomallei* ในปัสสาวะของผู้ป่วยที่ติดเชื้อทั่วร่างกาย และติดเชื้อเฉพาะที่ ซึ่งสามารถตรวจ LPS ได้ในปริมาณ 12.2 ng/ml และเมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิก พบว่าให้ความไว และความจำเพาะ 81 และ 96% ผลที่ผิดพลาดนั้นเกิดจากการที่ผู้ป่วยติดเชื้อแกรมลบในช่องทางเดินปัสสาวะ และข้อดีของวิธีนี้คือสามารถตรวจได้ในปริมาณน้อย ซึ่งในทางปฏิบัติการจะต้องมีการเจือจางปัสสาวะลงอีก อย่างไรก็ตามความยุ่งยากละซับซ้อนของวิธีนี้ทำให้ยากต่อการใช้ตรวจในงานประจำวัน และไม่เหมาะสำหรับโรงพยาบาลเล็กที่มีเงินงบประมาณน้อย นอกจากนี้ยังมีการตรวจโดยใช้ monoclonal antibody ต่อแอนติเจน *B. pseudomallei* ขนาด 200 kDa (Anuntagool *et al.*, 1996) โดยใช้ sandwich ELISA พบว่าสามารถตรวจวัดได้ในระดับสูง กับสิ่งส่ง

ตรวจทางคลินิกเช่น หนอง เสมหะ และน้ำจากปอด ซึ่งให้ความไว และความจำเพาะ 75 และ 98% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการอื่นอีก เช่น latex agglutination และ Immunofluorescence แต่วิธีการเหล่านี้ยังไม่เหมาะกับการตรวจในงานประจำวันเพราะมีความไวต่ำ และโรงพยาบาลบางแห่งก็ไม่มีกล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescent การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อด้วยวิธีต่างๆ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *B. pseudomallei* (Sirisinha *et al.*, 2000)

Performance of antigen detection assays in 120 patients[a]

Method	Antibody	%			
		Sensitivity	Specificity	Positive predictive	Negative predictive
Sandwich ELISA	MAb 5F8	59	56	58	57
Latex agglutination	Bps L2	23	80	54	50
Immunochromatography	MAb 5F8	23	95	82	54

[a] 61 Patients were culture positive for *B. pseudomallei* and 59 patients were culture positive for organisms other than *B. pseudomallei*.

4.4. การตรวจทางอณูชีววิทยา (review by Sirisinha *et al.*, 2000 และ Chang A. C. and Currie B. J., 2005)

การพัฒนาวิธีตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* ในสิ่งส่งตรวจทางคลินิก เพื่อนำมาวินิจฉัยสิ่งส่งตรวจจากคน และสัตว์ที่เป็นโรคเมลิออยโดซิสได้เกิดขึ้นอย่างมาก ทั้งการใช้เทคนิค DNA probe hybridization และเทคนิคการเพิ่มจำนวน DNA (polymerase chain reaction: PCR) ด้วยการใช้ชุด primer ที่แตกต่างกัน ได้มีการพัฒนาขึ้นมาเพื่อการวิจัย และการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ แต่เทคนิค hybridization ไม่สามารถแยกระหว่างผู้ป่วยโรคเมลิออยโดซิสกับโรคติดเชื้ออื่นๆ ได้ดีเพียงพอ (Sermswan *et al.*, 1994) ปัจจุบัน การวินิจฉัยด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา จึงให้ความสนใจกับวิธีทาง PCR ด้วยชุด primers ที่แตกต่างกัน ถูกออกแบบมาเพื่อให้ครอบคลุมบริเวณ 23S rRNA, 16S RNA, บริเวณเชื่อมต่อระหว่าง 16S และ 23S RNA และส่วนของสารพันธุกรรมที่จำเพาะจาก DNA probe จากการทดลองพบว่า primers ดังกล่าวสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ และจากการทดลองกับตัวอย่างทางคลินิกจำนวนหนึ่งเพื่อทดอบดูความน่าจะเป็นด้วยการใช้ primer ของ 16S RNA ต่อการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส พบว่า มีค่าความไว (sensitivity) 100% แต่เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ แล้วพบว่า ค่าความจำเพาะยังไม่ดีพอที่จะนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย คือประมาณ 1/3 ของคนไข้ที่เป็นโรคอื่น ๆ ก็สามารถให้

ผลบวกกับวิธีเหล่านี้ได้ (Haase *et al.*, 1998) นอกจากนี้ การใช้ primers ที่จำเพาะต่อ ยีนในกลุ่ม type III secretion system เพื่อตรวจหาเชื้อทั้งจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก และสิ่งแวดล้อม ก็พบว่าได้ผลดี เช่นเดียวกับการใช้ primers ที่จำเพาะต่อ 16S mRNA โดย 16S mRNA ได้ใช้สำหรับแยกสปีชีส์ของแบคทีเรีย แต่ก็พบว่าใช้ได้กับการแยกสปีชีส์ของ *Burkholderia* spp. จากตัวอย่างทางคลินิก และยีน *groEL* ก็อาจจะใช้ในการวินิจฉัยได้ แต่ไม่สามารถแยก *B. mallei* ออกจาก *B. pseudomallei* ได้

5. การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส

5.1. โปรตีนที่คาดว่า สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องมือในการวินิจฉัย

เนื่องจากผู้ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดอย่างเฉียบพลัน อาจทำให้เสียชีวิตได้ภายในระยะเวลาอันสั้น จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีวิธีการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ ด้วยวิธีการที่รวดเร็วซึ่งได้แก่ การตรวจหาเชื้อด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกัน หรือวิธีทางอณูชีววิทยา ซึ่งวิธีการดังกล่าวต้องการแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ ในปัจจุบันวิธีการดังที่กล่าวมา เมื่อนำมาทดสอบในพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อ ยังไม่สามารถแยกผู้ป่วย และผู้ที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ได้

การทดลองต่างๆ ที่เกิดขึ้นเพื่อการค้นหายีนที่จำเพาะของเชื้อ หรือเพื่อศึกษากลไกการก่อให้เกิดความรุนแรงของเชื้อ เช่น การศึกษาเปรียบเทียบยีนในกลุ่ม TTSSs ของเชื้อ *B. pseudomallei* กับ inv/spa/prg TTSS ที่พบในเชื้อ *Salmonella typhimurium* ทำให้ทราบว่ายีนในกลุ่ม TTSSs น่าจะมีความสำคัญต่อการก่อให้เกิดความรุนแรงในผู้ที่ติดเชื้อ ด้วยการทดสอบโปรตีน *bipB bipC* และ *bipD* กับซีรัมของผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสที่กลับมาเป็นซ้ำ ซึ่งยีน *bipD* ให้ผลสอดคล้อง กับการทำห้องสมุดดีเอ็นเอ เพื่อค้นหายีนที่มีการแสดงออกในผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส โดยให้มีการแสดงออกของยีนใน λ ZAPII เวคเตอร์ และนำไปทดสอบ กับซีรัมรวมของผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ที่ดูดซับเอาแอนติบอดีต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว พบว่ายีน *Bp7 bipD Bp3SC1* และ *Bp3SC2* ที่เกี่ยวข้องกับทดลองในครั้งนี้มีการแสดงออกกับซีรัมรวมดังกล่าว (Jitsurong *et al.*, 2002) และประกอบกับการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน *Bp7 bipD Bp3SC1* และ *Bp3SC2* ด้วยโปรแกรม Macvector V7.0.1. แสดงการวิเคราะห์ด้วยสเกลของ Hopp and Woods และ Kyte/Doolittle แล้วพบว่าสายกรดอะมิโน Bp7 ขนาด 270 กรดอะมิโน มีขนาดโมเลกุล 28.8 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) 76% เมื่อวิเคราะห์ด้วย

PHDhtm พบว่าสายกรดอะมิโน Bp7 มีลักษณะเป็นโปรตีนที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (tranmembrane protein) ประกอบด้วยสายอะมิโน 7 สายที่แทรกอยู่ในระหว่างเยื่อหุ้ม โดยมีตำแหน่งของสายกรดอะมิโนที่แทรกอยู่ดังนี้ 28-52, 57-74, 106-126, 148-167, 172-189, 198-217 และ 225-242

สำหรับโปรตีน BipD (invasion protein) ซึ่งมีจำนวนกรดอะมิโน 310 กรดอะมิโน มีขนาดโมเลกุล 35 kDa มีความเหมือนกับโปรตีน IpaD ของเชื้อ *Shigella flexneri* 36% และเหมือนกับโปรตีน SipD เชื้อ *Salmonella enterica* 34% โปรตีน BipD เป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นภายในไซโทพลาสมของแบคทีเรีย และถูกขนส่งผ่านทางโครงสร้างโปรตีนที่เรียกว่า TTSS ไปสู่ไซโทพลาสมอีกเซลล์หนึ่ง เพื่อไปทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ที่เชื้อจะบุกรุกเกิดพยาธิสภาพบางอย่าง ทำให้ง่ายต่อการเข้าสู่เซลล์ หรือหลบหลีกออกจากเวคคิวโอล (vacuole) และจากการทดลองโดยการกลายพันธุ์ยีน *bipD* ทำให้เห็นว่าโปรตีน BipD มีความจำเป็นสำหรับเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อการก่อให้เกิดความรุนแรงในหนูทดลอง

และจากการทำห้องสมุดดีเอ็นเอของ Jitsurong และคณะ (2002) ทำให้ได้โปรตีนอีกสองชนิดคือ Bp3SC1 (321 bp) มีขนาดโมเลกุล 17 kDa และ Bp3SC2 (738 bp) มีขนาดโมเลกุล 25 kDa ซึ่งมีการแสดงออกในซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดซิส โดยที่ขนาดของยีนสายเต็มของ Bp3SC1 มีจำนวนเบสดีเอ็นเอ 462 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ และจากการประเมินความสามารถในการเป็นแอนติเจนด้วยโปรแกรม Macvector V7.0.1. ในสเกลของ Hopp and woods เพื่อวิเคราะห์ความสามารถต่อการเป็นแอนติเจนของสายกรดอะมิโน ทำให้ทราบว่ายีน *Bp3SC1* และ *Bp3SC2* น่าจะมีความเป็นไปได้ สำหรับการนำมาศึกษา เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส

การที่พบว่าโปรตีน Bp7 BipD Bp3SC1 และ Bp3SC2 ของเชื้อ *B. pseudomallei* มีการแสดงออกในซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดซิสทำให้ ทางคณะผู้วิจัยเลือกที่จะศึกษาโปรตีนดังกล่าวทั้งสี่ชนิด กับตัวอย่างซีรัมทั้งหมด 117 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นซีรัมของผู้ที่เป็นโรคเมลิออยโดซิส 27 ตัวอย่าง และซีรัมของผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคเมลิออยโดซิส 90 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาว่าโปรตีนชนิดใดบ้างที่สามารถนำมาพัฒนา ต่อการนำไปใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อโคลน และผลิตโปรตีนจากยีน *Bp7 bipD Bp3SC1* และ *Bp3SC2*
2. เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ที่จะใช้โปรตีน Bp7 BipD Bp3SC1 และ Bp3SC2 ในการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส