บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง เคลื่อนที่ได้ เป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิส พบเชื้อได้ทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีรายงานผู้ป่วยปีละประมาณ 2,000-3,000 คน (Leelarasamee, 2000) แหล่งธรรมชาติที่พบมากที่สุดคือดิน และปนเปื้อนไปยังน้ำ จากการสำรวจดินทั่วประเทศไทยพบว่า ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* สูงที่สุด คือ พบเชื้อถึง 50% ของบริเวณที่เก็บตัวอย่างดิน รองลงมาคือภาคกลาง ภาคใต้ และภาคเหนือ (Smith *et al*., 1995a; Vuddhakul *et al*., 1999) เชื้อนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (biotypes) ตามความสามารถในการใช้น้ำตาล L-arabinose คือ กลุ่มที่ไม่ใช้น้ำตาล (ara^- *B. pseudomallei*) และกลุ่มที่ใช้น้ำตาล (ara^+ *B. pseudomallei*) เชื้อ ara^+ *B. pseudomallei* ส่วนใหญ่จะพบในดิน ส่วนเชื้อ ara^- *B. pseudomallei* ส่วนใหญ่จะพบในผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส เชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้มีความแตกต่างกันทั้งความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและความแตกต่างของจีนส์ ผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสส่วนใหญ่เป็นชาวไร่ ชาวนาซึ่งมีโอกาสสัมผัสกับเชื้อได้สูง การติดเชื้อเกิดได้กับคนทุกวัย และผู้ติดเชื้อมีทั้งที่มีสุขภาพแข็งแรงและผู้ที่มีโรคเดิมแทรกอยู่ โรคนี้เป็นได้กับทุกอวัยวะที่ติดเชื้อ (สถิตย์ ศิริสิงห์ และคณะ, 2538) ผู้ป่วยมีอาการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตจะมีอัตราการตายสูง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบอัตราตายในพวกนี้สูงถึง 60-80% และสูงกว่าการติดเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญ (Chaowagul *et al*., 1989) ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเสียชีวิตภายใน 1-3 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยบางรายเมื่อได้รับการรักษาจนอาการดีขึ้น และติดตามไปอีกระยะหนึ่ง จะพบว่ามีการกลับเป็นซ้ำของโรคได้ถึง 23% โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ติดเชื้อที่อวัยวะหลายๆแห่ง หรือมีการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Chaowagul *et al*., 1993) จากการประชุมเชิงปฏิบัติการระดับชาติเกี่ยวกับโรคเมลิออยโดสิส ในปี ค.ศ. 1985 มีรายงานว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่พบโรคนี้สูงที่สุดใน

โลก (Proceeding of National Workshop on Melioidosis, 1985) ดังนั้นโรคเมลิออยโดสิสจึงเป็นปัญหาสำคัญควรได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน อย่างไรก็ตามงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นไปในด้านการวินิจฉัยโรคอย่างรวดเร็ว การหาความแตกต่างของตัวเชื้อและหาการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งล้วนเป็นการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุ ดังนั้นควรจะมีแนวทางแก้ปัญหาที่ต้นเหตุ ด้วยวิธีลดจำนวน *B. pseudomallei* ในดิน ซึ่งอาจทำได้โดยการปล่อยให้แบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งเข้าไปเจริญเติบโตครอบครองพื้นที่ และทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* ในขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นจะต้องไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ในบริเวณนั้น

Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา (ยกเว้น *Bacillus anthracis* และ *Bacillus mycoides*) สามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนได้ดี เป็น saprophyte พบอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ ดิน น้ำ ทนต่อสภาวะแวดล้อม เชื้อในจีนัสนี้ส่วนใหญ่ไม่เป็นอันตรายต่อคนหรือสัตว์ยกเว้น *Bacillus anthracis* ที่เป็นสาเหตุของโรค anthrax *Bacillus cereus* และ *Bacillus subtilis* ทำให้เกิดโรค food poisioning อย่างไรก็ตามเชื้อจีนัสนี้ได้ถูกนำมาใช้ในวงการอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ cellulase, lipase, amylase, protease และ glucose isomerase (Godfredsen, 1990; Jarnagin and Ferrari, 1992; Priest, 1989; Robson and Chambliss, 1989) นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (Bennett and Bentley, 1989; Priest, 1989; Zuker *et al*., 1993) ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ปรสิต และแมลง (Aliniazee, 1998; Kugler *et al*., 1990; Lebbadi *et al*., 1995; Munimbazi and Bullerman, 1997; Walker *et al*., 1998) Bacillus บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเปปไทด์ (peptide antibiotics) การสร้างสารเหล่านี้ของ Bacillus อาจมีความสำคัญมากต่อการอยู่รอดของเชื้อในระบบนิเวศน์ เนื่องจากสารเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นในสภาวะต่างๆ เช่น สภาวะที่ขาดแคลนอาหาร (nutritional stress) โดยจะถูกสร้างขึ้นจากแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ stationary phase ทำให้เกิดการแข่งขันเพื่อความอยู่รอดในสภาวะที่มีอาหารจำกัด (Katz and Demain, 1977) มีรายงานว่า *Bacillus licheniformis* สร้างสาร bacitracin เป็นสารประกอบ cyclic hexapeptide และ thiazoline ring มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยไปขัดขวางการสร้างผนังเซลล์

ของแบคทีเรีย *Bacillus brevis* สร้าง linear gramicidin และ gramicidin S ซึ่งมีโครงสร้างเป็น linear และ cyclic pentapeptide ผลของ linear gramicidin ทำให้เกิดรูที่ชั้นไขมันของเซลล์แบคทีเรีย gramicidin S ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเป็น surfactant (Kanda *et al*., 1981) *Bacillus subtilis* หลายสายพันธุ์สามารถสร้าง lipopeptides ซึ่งเป็นสารประกอบของ กรดอะมิโนจับกับสายของ fatty acid เช่น iturin เป็น antifungal agent (Vater, 1989) และ surfactin เป็น biosurfactant ที่รุนแรงสามารถยับยั้งเชื้อราและขัดขวางการทำงานของ cyclic-AMP-dependent phosphodiesterase Bacillus บางสายพันธุ์สามารถสร้าง dipeptides และ tripeptides เช่น bacilysin มีฤทธิ์ต่อ *S. aureus* และ *C. albicans* (Hilton *et al*., 1988; Rojer *et al*., 1965) โดยขัดขวางการทำงานของ glucosamine-6-phosphate synthetase ของแบคทีเรียและยีสต์ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ผนังเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า Bacillus สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านและทำลาย larvae ของยุงและแมลงหลายชนิด (Aronson *et al*., 1991; Aronson, 1993; Baumann *et al*., 1991) เช่น *Bacillus thuringiensis* สามารถสร้าง delta-endotoxin ซึ่งอยู่ในรูปผลึก เมื่อ larvae ของยุงกินเชื้อเข้าไป จะทำให้เป็นอัมพาตและตาย จะเห็นได้ว่า Bacillus สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเปปไทด์ซึ่งมีฤทธิ์เป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตหลายชนิด จึงน่าสนใจที่จะหา Bacillus สายพันธุ์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อ *B. pseudomallei* เพื่อควบคุมปริมาณ *B. pseudomallei* ในสิ่งแวดล้อม เนื่องจาก *Bacillus* เป็นเชื้อที่พบอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ โดยก่อผลกระทบน้อยมากต่อคน สัตว์ และพืช สามารถเข้าทำลายได้โดยตรงและสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ในขณะเดียวกันก็สามารถแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน และมีความสามารถในการปรับตัว ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แปรเปลี่ยนและวิกฤต โดยการสร้างสปอร์และทนต่อสภาพอากาศร้อนชื้นได้ดี

1.2 การตรวจเอกสาร

1.1.1 *Burkholderia pseudomallei*

B. pseudomallei เดิมชื่อ *Pseudomonas pseudomallei* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งเคลื่อนที่ได้ ย้อมติดสีเข้มที่หัวและท้าย (bipolar staining) ทำให้มองดูคล้ายเข็มกลัดซ่อนปลาย (safety pin) ขนาด 0.4-0.6x2-5 ไมโครเมตร จัดอยู่ในจีนัส *Burkholderia* (Yabuuchi and Arakawa, 1993) ด้วยการใช้วิธีการทางชีวเคมีร่วมกับอณูชีววิทยา เชื้อเป็น obligate aerobe สามารถเจริญได้ในอาหารธรรมดา ในสภาวะที่มีออกซิเจนได้แก่ Blood agar, MacConkey agar และ Eosin Methylene Blue (EMB) agar เป็นต้น เมื่อเลี้ยงบน Blood agar จะมี alpha hemolysis รอบๆโคโลนี มีกลิ่นคล้ายดินหลังฝนตก (musty odor) ใน 24 ชั่วโมงแรกโคโลนีมีขนาดเล็ก แต่ 2-3 วันต่อมา โคโลนีจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและเหี่ยวย่นมีลักษณะคล้ายดอกเดซี่ (daisy-head appearance) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อนี้ ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีหลายแบบ โคโลนีขรุขระ เรียบ หรือเยิ้ม และจากสีครีมเปลี่ยนเป็นสีส้ม และในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนสามารถเจริญในอาหารที่มีส่วนผสมของ nitrate *B. pseudomallei* มีการดำรงชีวิตแบบอิสระเป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิส พบเชื้อนี้ได้ในสภาวะแวดล้อมทั่วทุกภาคของประเทศไทยและประเทศอื่นๆที่ตั้งอยู่ระหว่างเส้นรุ้งขนาน 20 องศาเหนือและใต้เส้นศูนย์สูตร แหล่งธรรมชาติที่พบมากที่สุดคือในดินและน้ำนิ่ง (เช่น ในนาข้าว) เป็นเชื้อที่มีความคงทนต่อสภาวะแวดล้อมที่โดยปกติจะไม่ให้แบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์อื่นๆมีชีวิตอยู่ได้ เชื้อสามารถทนอุณหภูมิต่ำในตู้เย็นเป็นเวลานานหลายเดือน (Yabuuchi *et al*., 1993) และเชื้อสามารถปรับตัวเองให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ต่างๆกันได้เป็นอย่างดี โดยเชื้อสามารถเจริญในสภาวะแวดล้อมที่มีระดับออกซิเจนที่ต่างๆกัน สามารถเปลี่ยนจาก aerobic ไปเป็น anaerobic ได้ ทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้ในดินลึกๆ หรือในบาดแผลได้เป็นเวลานาน (สถิตย์ ศิริสิงห์ และคณะ, 2538) สามารถเจริญในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดได้ถึง pH 4.5 (Dejsirilert *et al.*, 1991) และที่อุณหภูมิ 15-42 องศาเซลเซียส จึงพบเชื้อมีชีวิตอยู่ในดินและน้ำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีทั้งความเป็นกรด ความเข้มข้นของเกลือสูง มีความชื้นต่ำและมีอุณหภูมิสูง ในประเทศไทยพบเชื้อนี้ในดินและน้ำทั่วประเทศ โดยเฉพาะตัวอย่างผิวดินในสวนพบเชื้อได้ 60% ดินทุ่งนาพบ 78% ดินจากภาคตะวันออก

เฉียงเหนือพบเชื้อ 68% ของดินตัวอย่างที่เก็บ 167 แห่ง นอกจากนั้น ยังพบว่าอัตราการแยกเชื้อในผิวดินนาข้าวอยู่ในระดับต่ำ แต่จะสูงขึ้นในดินที่ลึกลงไปถึง 90 เซนติเมตร ในหน้าแล้งพบเชื้อได้บ่อยกว่าในหน้าฝน (Wuthiekanun *et al*., 1995) เชื้อมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีมาก เป็นไปได้ว่าเชื้อสามารถหลบซ่อนอยู่ในดินตลอดทั้งปี และในช่วงที่ฝนตกชุก น้ำใต้ดินจะนำเอาเชื้อมาอยู่ที่ผิวดิน ชาวนาชาวสวนสัมผัสกับดินและน้ำในฤดูฝนจึงมีความเสี่ยงในการรับเชื้อมาก และมีอุบัติการของการติดเชื้อและเกิดโรคสูงในฤดูฝน (Suputtamongkol *et al*., 1994a)

1.1.2 โรคเมลิออยโดสิส

โรคเมลิออยโดสิสมีรายงานครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1912 โดย Whitmore และ Krishnawamee ในประเทศพม่า และในปี ค.ศ. 1915 มีรายงานผู้ป่วยซึ่งเป็นคนไทยครั้งแรกและหลังจากนั้นไม่ค่อยมีผู้สนใจโรคนี้มากเท่าที่ควร (Leelarasamee and Bovornkitti, 1989) จนกระทั่งในช่วงสงครามเวียดนามในปี ค.ศ. 1960 มีรายงานจากคนไข้ที่เป็นทหารที่กลับจากสงครามเวียดนาม (Weber, *et al*., 1969; Sanford, 1977) และมีทหารอเมริกันที่เข้ามาประจำการได้ตายและล้มป่วยด้วยโรคนี้เป็นจำนวนมาก พบว่าผู้ป่วย 30% เป็นนักขับเครื่องบินและมีอาการทางปอด จึงสันนิษฐานว่าหายใจเอาฝุ่นที่ฟุ้งกระจายในสนามรบ เรียกโรคนี้ว่า Vietnam tuberculosis ยังพบว่ามีทหารบางรายที่ล้มป่วยด้วยโรคนี้หลังจากกลับไปประเทศอเมริกานานหลายปี จึงเรียกโรคนี้ว่า Time-bomb disease (Punyagupta *et al*., 1989) นอกจากนี้ยังมีรายงานผู้ป่วยเพิ่มขึ้นจากนักท่องเที่ยวที่เดินทางบริเวณแถวเส้นศูนย์สูตร การแสดงออกของผู้ที่ได้รับเชื้ออาจไม่มีอาการทางคลินิกที่เด่นชัดโดยเฉพาะ และในบางคนอาจมีอาการคล้ายกับโรคติดเชื้อชนิดอื่นได้อีกหลายโรค โรคนี้จึงเป็น The Great Immitator ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีประวัติเข้ามาในเขตที่มีการระบาดสัมผัสกับเชื้อและมีอาการในภายหลัง

1.1.2.1 กลไกการเกิดโรค โรคเมลิออยโดสิสมีกลไกการติดเชื้อ 2 วิธีหลัก

ก. การเกิดโรคเมลิออยโดสิสเป็นผลจากการติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อมอย่างเฉียบพลันเหมือนกับการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ โดยผู้ป่วยจำนวนหนึ่งเกิดโรคเมลิออยโดสิสหลังการสัมผัสเชื้อโดยตรง พบมากในฤดูฝนเนื่องจากเป็นช่วงทำนาชาวนาเกิดบาดแผลได้ระหว่างการทำงานและต้องสัมผัสเชื้อที่อยู่ในดิน นอกจากนี้ยังเกิด

ได้จากอุบัติเหตุจมน้ำ และสำลักน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปในปอด (สถิตย์ ศิริสิงห์ และคณะ, 2538)

ข. การเกิดโรคเมลิออยโดสิสเป็นผลจากการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่แอบแฝงอยู่ในร่างกายภายหลังการติดเชื้อครั้งแรก โดยเชื่อว่าการติดเชื้อส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อชนิดไม่มีอาการและผู้ที่อยู่ในเขตระบาดส่วนใหญ่เคยได้รับเชื้อแล้ว หลังจากนั้นเชื้อสามารถซ่อนตัวอยู่ในร่างกายได้เป็นเวลานาน เมื่อเกิดความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันหรือมีสาเหตุอื่นที่ยังไม่ทราบแน่ชัด จะทำให้เชื้อที่หลบซ่อนตัวสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นได้จนทำให้เกิดโรค เชื้อสามารถซ่อนตัวเป็นเวลานานหลายสิบปีโดยไม่ก่อให้เกิดโรคเช่นในกรณีทหารอเมริกันที่รบในสงครามเวียดนามอาจเกิดโรคเมลิออยโดสิสได้หลังจากกลับประเทศสหรัฐอเมริกาแล้วเป็นเวลานาน ผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสส่วนใหญ่จะมีโรคเดิมอยู่แล้ว เช่น เบาหวาน ไตวายเรื้อรัง ตับแข็ง มะเร็งของระบบโลหิต และพบผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสกลับเป็นซ้ำได้เป็นจำนวนมากภายหลังจากที่รักษาหายแล้วในครั้งแรก โดยเชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อที่มี ribotype เดียวกับการติดเชื้อครั้งแรก แสดงว่าเชื้อซ่อนอยู่ในร่างกายได้

โรคเมลิออยโดสิสเกิดได้กับคนทุกอายุตั้งแต่ทารกเกิดจนถึงอายุมากกว่า 80 ปี โดยมีอายุเฉลี่ย 42.7 ปี ช่วงอายุ 40-60 ปีพบมากที่สุดถึง 42% สำหรับเด็กพบเพียง 18% และช่วงอายุที่พบบ่อยคือ 5-9 ปี พบโรคได้ทั้ง 2 เพศโดยมีอัตราส่วนชายต่อหญิงเป็น 1.4-1 พบผู้ป่วยตลอดปีแต่จะพบมากที่สุดในฤดูฝนตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงพฤศจิกายนถึง 75% จำนวนผู้ป่วยจะสัมพันธ์กับปริมาณน้ำฝนในปีนั้นๆ (Suputtamongkol *et al*., 1994a) 64% ของผู้ที่ติดเชื้อเป็นผู้มีโรคเดิมหรือภาวะที่เอื้อต่อการติดเชื้อ เช่น โรคเบาหวาน โรคไตวาย นิ่วในไต โรคเลือดโดยเฉพาะธาลัสซีเมีย มะเร็งเม็ดเลือด SLE ตับแข็ง ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องจากยา เช่น สเตียรอยด์หรือสารเคมีบำบัด การมีโรคเดิมจะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเมลิออยโดสิสสูงกว่าคนปกติถึง 10 เท่า โดยเฉพาะโรคเบาหวานเป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดถึง 34% ของผู้ป่วยทั้งหมด (Suputtamongkol *et al*., 1994a)

1.1.2.2 ระบาดวิทยาของโรคเมลิออยโดสิส

B. pseudomallei ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ เช่น ปลาโลมา แกะ หมูและแพะ (Vendors *et al*., 1988; Dance 1991; Currie *et al*., 1994) โรคเมลิออยโดสิสพบใน มาเลเซีย ไทย เวียดนาม กัมพูชา พม่า อินโดนีเซีย จีนตอนใต้ อินเดีย แอฟริกา (Dance, 1991) ออสเตรเลียตอนเหนือ และอเมริกาตอนกลางและตอนใต้ ในเขตอบอุ่นมีรายงานของโรคเป็นครั้งคราว มีรายงานในกลางปี ค.ศ. 1970 เกิดการระบาดของโรคเมลิออยโดสิสที่สวนสัตว์ปารีสทำให้สัตว์ตายเป็นจำนวนมากและมีคนตาย 2 คน (Mollaret, 1988) ในประเทศสิงค์โปร์ (Heng *et al*., 1998) รายงานมีผู้ป่วยจำนวน 372 รายเสียชีวิต 147 ราย ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นชายอายุ 45 ปีหรือมากกว่า การเกิดโรคไม่สมพันธ์กับฤดูฝน ผู้ป่วย% 77 มีโรคประจำตัวที่พบบ่อยที่สุดคือโรคเบาหวาน เชื้อที่แยกได้ไวต่อยา imipenem, ceftazidime, amoxycillin-clavulanic acid และ tetracycline จากการสำรวจดินทางตอนใต้ของประเทศจีนจำนวน 1,366 ตัวอย่าง พบเชื้อ *B. pseudomallei* 4.3% (Yang *et al*., 1995) ในประเทศอินเดียตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* โดยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และ indirect hemagglutination test (IHA) พบว่าประชากรส่วนหนึ่งที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการทำนามีแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* แต่ตรวจไม่พบเชื้อในดินที่ความลึก 30 เซนติเมตร (Kang *et al*., 1996) ในประเทศออสเตรเลียมีการสำรวจเชื้อ *B. pseudomallei* จากดินที่ระดับความลึกต่างๆ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะและบ่งชี้เชื้อโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ 16s rRNA primers (Brook *et al*., 1997) พบว่าการใช้ PCR มีความไวและความจำเพาะมาก และสามารถตรวจสอบเชื้อได้ในปริมาณน้อยเพียง 10 cfu. /ดิน 1 กรัม ในประเทศไทยมีความชัดเจนมากว่าโรคนี้มีความชุกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมากกว่าในภาคอื่นๆ จากการสำรวจผลการเพาะเชื้อ *B. pseudomallei* จากสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาล 141 แห่งทั่วประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2537 และ 2538 (Leelarasamee *et al*., 1996) พบเชื้อในอัตรา 4.03 ต่อ 1,000 จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในขณะที่ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคใต้พบเพียง 0.45, 0.79 และ 0.81 ต่อ 1,000 ตามลำดับ จังหวัดที่พบเชื้อมากที่สุด คือ อุบลราชธานี นครราชสีมา บุรีรัมย์ ขอนแก่น และ อุดรธานี และจากการสำรวจความชุกของโรคนี้เมื่อปี พ.ศ. 2540 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบผู้ป่วย

ประมาณ 138 รายต่อผู้ป่วยที่รับไว้รักษาในโรงพยาบาล 100,000 ราย ในขณะที่ความชุกของโรคนี้ในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทยมีผู้ป่วยประมาณ 13-18 รายต่อผู้ป่วยที่รับไว้รักษาในโรงพยาบาล 100,000 ราย ซึ่งความชุกของโรคที่พบใน 3 ภาคของประเทศไทยนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ความชุกของโรคเมลิออยโดสิส ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ มากกว่าภาคอื่นของประเทศไทยประมาณ 8-10 เท่า (Vuddahakul *et al*., 1999) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจึงเป็นภาคที่พบโรคนี้มากที่สุด รองลงมาคือภาคใต้และภาคเหนือ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อุบลราชธานีพบผู้ป่วยโรคนี้ปีละ 150-170 คน มีรายงานผู้ป่วย septicemia จากโรคเมลิออยโดสิสที่ติดเชื้อจากชุมชนถึง 20% และภาวะนี้มีความรุนแรงโดยมีอัตราตายสูงถึง 60-80% (Chaowagul *et al*., 1989) การติดเชื้อเกิดขึ้นตั้งแต่วัยเด็ก คนที่เข้ามาอยู่ในถิ่นระบาดเป็นเวลาไม่นานเช่น 6 เดือนถึง 1 ปี มีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อเข้าไปในร่างกายแต่ไม่มีอาการทางคลินิก นอกจากมีผลบวกของการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ จำนวนของผู้ที่มีแอนติบอดีจะค่อยๆสูงตามอายุ ระดับของแอนติบอดีจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่อายุ 6 เดือนเป็นต้นไป (McCormmic *et al*., 1975) ยังไม่สามารถตรวจหรือแยกเชื้อจากคนหรือสัตว์ปกติในถิ่นระบาด เช่น จากคอหอยหรือทวารหนักได้ ปัจจัยสำคัญที่ทำให้พบโรคนี้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมากกว่าภาคอื่นของประเทศไทยได้แก่ ความชุกของการตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* จากดินที่เก็บจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย สูงกว่าดินที่เก็บจากภาคอื่น (Vuddahakul *et al*., 1999; Wuthieknan *et al*., 1995) ปริมาณของเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินที่เก็บจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีมากกว่าดินที่เก็บจากภาคอื่นประมาณ 20 เท่า (Smith *et al*., 1995a) และเชื้อ *B. pseudomallei* ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากดินที่เก็บจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นเชื้อประเภท ara^{-} *B. pseudomallei* ซึ่งเป็นเชื้อที่มี virulence สูงและเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในคน ในขณะที่เชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้จากดินที่เก็บได้จากดินจากภาคอื่นๆ ของประเทศไทยเป็นเชื้อประเภท ara^{+} *B. pseudomallei* ซึ่งเป็นเชื้อที่มี virulence ต่ำและมักจะไม่ก่อให้เกิดโรคในคน (Smith *et al*., 1997; Trakulsomboon *et al*., 1999; Wuthiekanun *et al*., 1996) จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ pH ปริมาณน้ำในดิน และแสงอัลตร้าไวโอเลท ที่อาจจะมีผลต่อการ

ดำรงชีวิตของเชื้อ *B. pseudomallei* ในสิ่งแวดล้อมที่ประเทศจีน (Tong *et al*.,1996) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-32 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมคือ 5-8 ปริมาณน้ำในดินมากกว่า 40% ทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 726 วัน ส่วนปริมาณน้ำในดิน 10% ทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 70 วัน เชื้อจะถูกทำลายได้ด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลท ที่ 465 muW/cm^2 นาน 7.75 นาที ในขณะที่เชื้ออื่นในดินถูกทำลายที่ 1,860 muW/cm^2 นาน 31 นาที แสดงว่าอุณหภูมิ pH ปริมาณน้ำในดิน และแสงอัลตร้าไวโอเลท ในปริมาณที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญต่อการมีชีวิตอยู่ของเชื้อ *B. pseudomallei* ในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในดิน ประเทศไทยเป็นประเทศที่พบโรคนี้สูงที่สุดในโลก (Proceeding of National Workshop on Melioidosis, 1985) ดังนั้นโรคเมลิออยโดสิสเป็นปัญหาสำคัญของประเทศซึ่งจำเป็นจะต้องหาทางแก้ไข

1.1.1.3 ลักษณะทางคลินิกของโรคเมลิออยโดสิส (วิภาดา เชาวกุล และผกากรอง ลุมพิกานนท์, 2540,

โรคเมลิออยโดสิสเกิดได้กับทุกระบบอวัยวะ เช่นทางเดินหายใจ ผิวหนัง เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง กระดูกและข้อ ตับ ม้าม ทางเดินปัสสาวะ ระบบสืบพันธุ์ น้ำเหลือง หัวใจ หลอดเลือดและระบบประสาท (Dance *et al*., 1989a) ระยะฟักตัวของโรคในคนส่วนใหญ่ประมาณ 2-3 วัน แต่บางรายงานพบระยะฟักตัวตั้งแต่ 6-26 ปีหลังจากสัมผัสกับเชื้อ (Arakawa, 1990) อาการแสดงออกทางคลินิก (clinical manifestation) ของโรคมีได้มากมายหลายแบบขึ้นกับอวัยวะที่เกิดโรค ตั้งแต่การติดเชื้อโดยไม่มีอาการ หรือติดเชื้อเฉพาะที่ในอวัยวะหนึ่งที่อาจเป็นเรื้อรังไปจนถึงรุนแรง มีการติดเชื้อเฉียบพลันในกระแสเลือดและเสียชีวิตในเวลาเพียง 1-3 วันในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าโรคนี้เป็นสาเหตุการตายที่สำคัญที่สุดของการติดเชื้อในกระแสเลือด (Chaowagul *et al*., 1989) การจัดจำแนกลักษณะทางคลินิก (clinical features) ของโรคมีหลายแบบ ตัวอย่างเช่น สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย ได้จัดจำแนกลักษณะทางคลินิกของโรค โดยอาศัยการแสดงออกทางคลินิกเป็น 5 แบบ คือ subclinical, transient bacterimic, localized, non disseminated และ disseminated septicemic melioidosis (Leelarasamee and Bovornkitti, 1989) แต่โดยทั่วไปสามารถจัดกลุ่มทางคลินิกของโรคเมลิออยโดสิสได้ดังนี้ (วิภาดา เชาวกุล และผกากรอง ลุมพิกานนท์, 2540) (ตารางที่ 1.1)

ก. Disseminated septicemic melioidosis ผู้ป่วยจะมีไข้สูงเฉียบพลัน มีการติดเชื้อในอวัยวะต่างๆ หลายแห่งโดยมักมีอาการทางปอดบ่อยที่สุด อาจมีหนองฝีที่อวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ม้าม ผิวหนังหรืออวัยวะอื่น อาการจะรุนแรงขึ้นภายใน 24-48 ชั่วโมง มีการติดเชื้อในกระแสเลือดและช็อกร่วมด้วยบ่อย% 89 ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตภายใน 2-3 วันที่รับไว้ในโรงพยาบาลอัตราตายสูง% 87 สามารถแยกเชื้อได้จากเลือด และอาจแยกได้จากหนองฝีที่อวัยวะอื่นด้วย

ข. Non-disseminated septicemia ผู้ป่วยจะมีอาการค่อยเป็นค่อยไป โดยมีไข้ มีหนองฝีที่อวัยวะต่างๆ เพียง 1-2 แห่ง มีการติดเชื้อในกระแสเลือด มีช็อกได้บ้าง% 5 อัตราตายต่ำ% 17 แต่ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้อง บางครั้งอาการอาจเลวลง และเชื้อจะลุกลามไปยังอวัยวะอื่นกลายเป็นรูปแบบ disseminated ได้

ค. Localized melioidosis ผู้ป่วยมีการติดเชื้ออยู่ที่อวัยวะเพียง 1-2 แห่ง อาการค่อยๆเป็น โดยอาจมีอาการมานานเป็นเดือนหรือปีอาการมักไม่หนัก แยกเชื้อจากเลือดไม่ได้ ในผู้ป่วยผู้ใหญ่จะพบการติดเชื้อเฉพาะที่ปอดบ่อยที่สุด มักไม่มีช็อก อัตราตายต่ำมาก

ง. Transient bacteremia ผู้ป่วยที่แยกเชื้อ *B. pseudomallei* ได้จากเลือด โดยไม่มีอาการแสดงของโรคเมลิออยโดสิส และเชื้อในเลือดหายไปเองโดยไม่ได้รับยาปฏิชีวนะที่ถูกต้อง มีรายงานผู้ป่วยกลุ่มนี้เพียง 5 ราย

จ. Probable melioidosis ผู้ป่วยมีลักษณะทางคลินิกเหมือนโรคเมลิออยโดสิส เช่น มีฝีหนองที่อวัยวะต่างๆ การตรวจทางห้องปฏิบัติการไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้ ไม่สามารถแยกเชื้อ *B. pseudomallei* หรือเชื้ออื่นได้ แต่การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา พบว่ามีแอนติบอดี IHA ต่อ *B. pseudomallei* สูง ถ้าให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ได้ผลต่อเชื้อนี้แล้วผู้ป่วยจะตอบสนองต่อการรักษา

ฉ. Subclinical melioidosis บุคคลที่ไม่มีอาการของโรคแต่ตรวจพบทางภูมิคุ้มกันวิทยาพบว่าให้ผลบวกต่อเชื้อ *B. pseudomallei*

ตารางที่ 1.1 การจัดกลุ่มทางคลินิกของโรคเมลิออยโดสิส

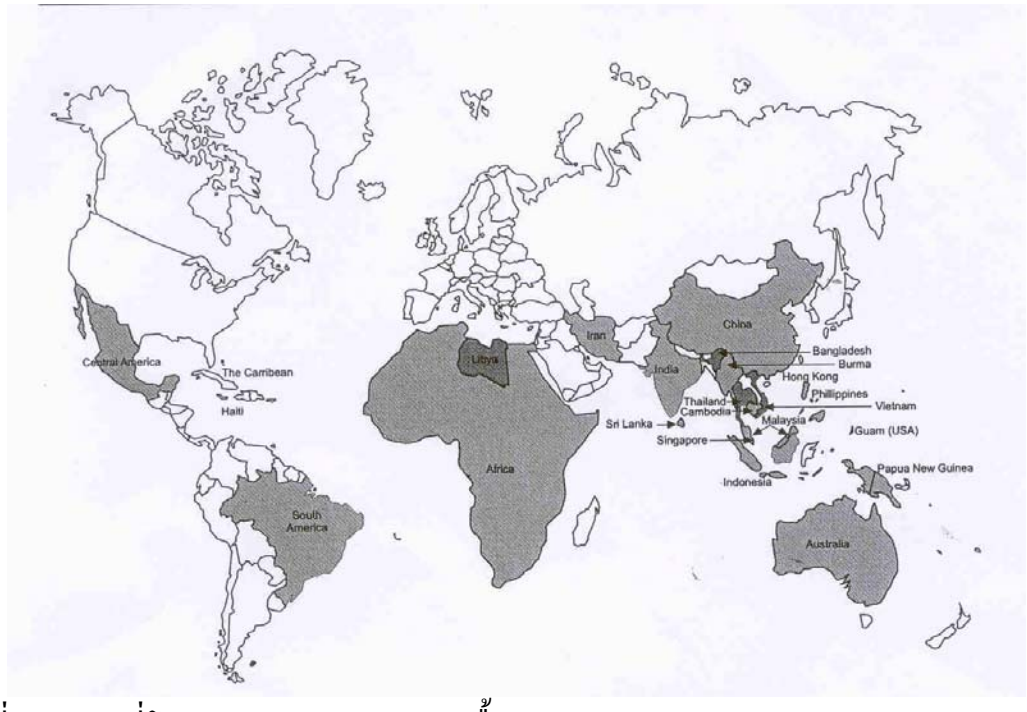
Clasification	Blood+ve	Shock	Organ involvement	Progression	Mortality rate
Disseminated	++++	+ + + + (89%)	Disseminated	Rapid	High (87%)
Non-disseminated	++	++ 5%)	0-few	Days-week	Low (17%)
Localized	0	+,-	1-2	Slow	Low (9%)
Transient bacteremic	+-0	0	0	0	0
Probable*	-	-	Varies	Varies	?
Subclinical *	-	-	-	-	-

*พบแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei*

ที่มา : วิภาดา เชาวกุล และผกากรอง ลุมพิกานนท์, 2540

1.1.1.4 การติดต่อ

ในเขตระบาด (รูปที่ 1.1) กลไกการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สำคัญที่สุด คือทางผิวหนัง โดยปนเปื้อนเชื้อจากดินและน้ำทางบาดแผล นอกจากนี้พบการติดต่อทางการหายใจ เอาฝุ่นที่ปลิวอยู่ในถิ่นระบาด การเกิด aerosol ที่เกิดจากอุบัติเหตุในห้องทดลองและการดูแลผู้ป่วยอย่างใกล้ชิด มีรายงานเกี่ยวกับการติดเชื้อในสามีและภรรยา ซึ่งบ่งชี้ว่าโรคนี้อาจติดต่อกันได้ทางเพศสัมพันธ์ (McCormick *et al*., 1975) ในเด็กทารกอาจได้รับเชื้อจากช่องคลอด น้ำคร่ำที่ติดเชื้อ หรือเครื่องมือที่ใช้ในการหายใจ ในธรรมชาติไม่พบรายงานการติดเชื้อจากแมลง แต่ในการทดลองพบว่าเชื้อสามารถติดต่อผ่านทางหมัดหนู (*Xenopsylla* cheopsis) และยุง (*Aedes aegypti*) (Ellis and Titball, 1999)



รูปที่ 1.1 แผนที่โลกแสดงเขตระบาดของเชื้อ *B. pseudomallei*

ที่มา : Ellis and Titball, 1999

1.1.1.5 Biotypes, Genotypes และ Genome ของเชื้อ *B. pseudomallei*

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 213 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย และเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 140 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินที่เก็บจากภาคกลาง (25 สายพันธุ์) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (115 สายพันธุ์) ของประเทศไทยพบความแตกต่างทางชีวเคมี ที่สำคัญ คือ เชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้งหมดไม่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose ได้ (ara^-) ส่วนเชื้อที่แยกได้จากดินนั้นมีเพียง 52.2% เท่านั้นที่เป็น ara^- โดยเชื้อที่เก็บจากดินในภาคกลางทั้งหมดเป็น ara^+ ส่วนเชื้อที่เก็บจากดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็น ara^+ 25% เชื้อทั้งสองประเภทนี้มีความไวต่อยาต้านจุลชีพ ceftazidime, chloramphenicol, co-amoxiclav และ doxycyclin ที่คล้ายคลึงกัน และสามารถ recognize specific polyclonal antibody ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ (Wuthiekanun *et al*., 1996) แสดงว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ที่พบในผู้ป่วยและที่พบในดินส่วนหนึ่งมีลักษณะ biotype ที่แตกต่างกันและอาจจะเป็นคนละ species กัน จึงแบ่งเชื้อออกเป็น 2 biotypes ตามความสามารถในการใช้น้ำตาล L-arabinose คือ ara^- *B. pseudomallei* และ ara^+ *B. pseudomallei* ความแตกต่างของเชื้อ

B. pseudomallei ประเภท ara$^+$ และ ara$^-$ มีความสำคัญเนื่องจากมีการศึกษา virulence ของเชื้อทั้ง 2 ประเภทนี้โดยการฉีดเชื้อ ara$^+$ *B. pseudomallei* และ ara$^-$ *B. pseudomallei* เข้าไปในหนูแล้วหา 50% Lethal Dose (LD_{50}) พบว่าค่าเฉลี่ยของ LD_{50} ของเชื้อ ara$^-$ *B. pseudomallei* (ทั้งสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนและดิน) เป็น 182 cfu./หนู 1 ตัว LD_{50} ของ ara$^+$ *B. pseudomallei* เป็น 10^9 cfu./หนู 1 ตัว แสดงว่าเชื้อ ara$^-$ *B. pseudomallei* มี virulence สูงในขณะที่เชื้อ ara$^+$ *B. pseudomallei* มี virulence ต่ำ (Smith *et al.*, 1997) และการตรวจความสามารถในการใช้น้ำตาล arabinose อาจจะใช้ในการทำนายว่าเชื้อที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล arabinose ได้นั้นเป็นเชื้อก่อโรค อย่างไรก็ตามเชื้อ ara$^+$ *B. pseudomallei* ก็มีรายงานว่าสามารถก่อให้เกิดโรคในคนได้ (Smith *et al.*, 1997) แต่พบได้น้อยมาก นอกจากนี้ไม่สามารถที่จะเปลี่ยน biotype ของเชื้อ ara$^-$ *B. pseudomallei* ให้กลายเป็น ara$^+$ *B. pseudomallei* ด้วยวิธีต่างๆ แสดงว่าคุณสมบัติในการใช้น้ำตาล arabinose นั้นเป็นคุณสมบัติเฉพาะและคงที่ถาวรของเชื้อไม่พบว่าเชื้อมีการเปลี่ยนแปลง biotype เมื่อเก็บเชื้อไว้นานเป็นปี หรือระหว่างการ subculture นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของจีนส์ระหว่างเชื้อทั้งสอง คือจีน flagellin (Wajanarogana *et al.*, 1999) และจีน 16S rRNA โดยมีลำดับ nucleotide ต่างกัน (Dhrarakul *et al.*, 1999b) ทั้ง ara$^-$ และ ara$^+$ *B. pseudomallei* มีโครโมโซม 2 ชุด แต่ขนาดต่างกัน (Songsivilai *et al.*, 2000) คือ ara$^-$ มีโครโมโซมขนาด ~3.8 และ ~ 2.4 Mb และ ara$^+$ มีโครโมโซมขนาด ~3.4 และ ~ 2 Mb ในการทำ genomic macrorestriction pattern โดยใช้ pulsed field gel electrophoresis เพื่อศึกษา DNA ที่ตัดด้วย Nco I พบว่า ara$^-$ biotype ให้ macrorestriction pattern I (MP I) และ ara$^+$ biotype ให้ MP II (Chaiyaroj *et al.*, 1999) จากลักษณะที่ต่างกันจึงมีผู้เสนอให้จัด ara$^+$ biotype เป็นสปีชีส์ใหม่ชื่อ *B. thailandensis* (Brett *et al.*, 1998)

1.1.1.6 ปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรค

ก. Lipopolysaccharide

จากการศึกษา *B. pseudomallei* จำนวน 702 ไอโซเลทที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศไทยพบว่าส่วนประกอบ lipopolysaccharide (LPS) ของผนังเซลล์มีความแตกต่าง ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 typical พบอยู่ 96.3% เชื้อในกลุ่มนี้มีรูปแบบจำเพาะที่ได้จากการทำ SDS-PAGE และสามารทำปฏิกิริยากับซีรั่มของผู้ป่วยรวม

ทั้ง monoclonal antiobody ต่อ LPS กลุ่มที่ 2 atypical พบ 2.8% ไม่ทำปฏิกิริยากับ monoclonal antibody ต่อ LPS และซีรั่มของผู้ป่วยกลุ่มอื่น ยกเว้นซีรั่มในกลุ่มที่ 2 ด้วยกัน กลุ่มที่ 3 no ladder พบอยู่ 0.9% ไม่พบรูปแบบใดๆในการทำ SDS-PAGE และไม่ทำปฏิกิริยากับซีรั่มผู้ป่วยใดๆ (Chantratita *et al*., 2001) และจากการศึกษาเพิ่มเติมในเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศออสเตรเลียก็พบว่าแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มเช่นเดียวกัน โดยพบเชื้อกลุ่ม 1 กลุ่ม 2 และกลุ่ม 3 เท่ากับ 71% 17% และ 12% ตามลำดับ LPS ที่แตกต่างกันในเชื้อ *B. pseudomallei* นี้อาจมีผลต่อการวินิจฉัยและการก่อโรค ซึ่งขณะนี้กำลังศึกษาอยู่

ข. Exotoxin (Haase *et al*., 1997)

(1) Cytolethal toxin (CLT) เป็นเปปไทด์ขนาดประมาณ 3 kDa ทนต่อการถูกทำลายด้วยความร้อน ออกฤทธิ์ไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และดีเอ็นเอ (Mohammed *et al*., 1989) การออกฤทธิ์เกิดเร็ว (1 ชม. ยับยั้ง 90%) ดังนั้นอาจเป็นผลของสารพิษต่อเซลล์เมมเบรนโดยตรง เชื้อจากดินจะมี CLT น้อยกว่าเชื้อจากผู้ป่วย การศึกษาสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคเมลิออยโดสิสในสัตว์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่แยกได้จากดิน และสัตว์มีการสร้าง CLT ที่ต่างกัน โดยเชื้อสายพันธุ์ที่แยกจากดินมี cytolethal activity น้อยกว่าเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากสัตว์ แสดงว่า CLT เป็นสาเหตุหนึ่งในการทำให้การดำเนินโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว และรุนแรงในกรณีของ septicemic melioidosis อย่างไรก็ตามยังต้องศึกษาต่อไปในสัตว์ทดลองเพื่ออธิบายบทบาทของ toxin นี้ในการก่อโรค

(2) Extracellular glycolipid toxin (Haussler *et al*., 1998) โครงสร้างประกอบด้วย rhamnolipid 2 โมเลกุลและ β-hydroxytetradecanoate 2 โมเลกุล ขนาด 762 ดาลตัน ทนต่อการถูกทำลายด้วยความร้อน กรด และด่าง ออกฤทธิ์ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง (HL60 และ Hela) เกิด cytotoxic effect และ hemolytic activity การออกฤทธิ์ถูก neutralize ได้ด้วยอัลบูมิน บทบาทในการทำให้เกิดโรคในสัตว์ทดลองและในคนยังต้องศึกษาต่อไป

ค. Exopolysaccharides (capsular polysaccharides, CPS) การศึกษาโดยใช้ mass-spectrophotometric techniques และ NMR method (Steinmetz *et al*., 1999)

พบว่าโครงสร้างของ CPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* เป็น linear tetrasaccharide repeating units ประกอบด้วย galactose, 3-deoxy-D-manno-2 octulosonic acid (KDO) เชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีโคโลนีแบบขรุขระ เรียบและเยิ้มสามารถทำปฏิกิริยากับ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ exopolysaccharide เนื่องจากซีรั่มของผู้ป่วยสามารถทำปฏิกิริยากับ CPS ได้ แสดงว่า CPS มีคุณสมบัติเป็น immunogen จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในการเตรียมวัคซีน และ diagnostic agents (Masoud *et al*., 1997) มีการทดลองให้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ *B. pseudomallei* exopolysaccharide เป็น passive immunization กับหนู mice ที่ทำให้เป็นโรคเมลิออยโดสิส จะช่วยลดปริมาณเชื้อ *B. pseudomallei* ในอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ทดลอง

ง. Flagellin จากการศึกษาจีนที่กำหนดการสร้าง flagellin ของ *B. pseudomallei* ทั้ง ara^+ และ ara^- พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน (Wajanarogana *et al*., 1999) โดย ara^+ มีนิวคลีโอไทด์หายไป 15 bp (~5 amino acid) จากการทำ PCR โดยอาศัย 15 bp ที่หายไปเป็น primer สามารถแยก *B. pseudomallei* (PCR product 191) และ *B. thailandensis* (PCR product 176) ออกจากกันได้ (Sonthayanon *et al*., 2002) ดังนั้น flagellin จึงมีประโยชน์ใช้ในการบ่งชี้เชื้อ *B. pseudomallei*

จ. Extracellular enzyme

(1) Protease, Lipase และ Phospholipase C (PLC) จากการศึกษาโดยทำให้เชื้อ *B. pseudomallei* เกิด mutagenesis และไม่สามารถหลั่งเอนไซม์ protease, lipase และ phospholipase C (Deshazer *et al*., 1999) พบว่าการหลั่งเอนไซม์ทั้ง 3 ของเชื้อ *B. pseudomallei* ใช้ pathway เดียวกัน protease และ PLC เป็น cell-associated enzyme การ หลั่งถูกควบคุมโดย type II secretion pathway gene เชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ทั้ง 3 ยังคงก่อโรคในสัตว์ทดลองได้ แสดงว่า extracellular product ที่หลั่งโดย type II pathway มีบทบาทน้อยในการทำให้เกิดโรค protease มีน้ำหนักโมเลกุล 36,000 ดาลตัน เป็น alkaline metalloprotease มี optimal pH ที่ 8.0 (Sexton *et al*., 1994)

(2) Phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C (PC-PLC) เป็น acidic protein ทนต่อการทำลายด้วยความร้อนได้ถึง 65 องศาเซลเซียส ออกฤทธิ์ได้ที่ pH 2-8 มีขนาด 73 - kDa สามารถกระตุ้นร่างกายให้สร้าง IgM (Korbsrisate *et*

al., 1999) PC-PLC อาจจะเกี่ยวข้องกับการที่เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ใน phagocyte ของคน บทบาทในการก่อโรคของ PC-PLC ยังต้องศึกษาต่อไป

1.2.2.7 การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยโรคทางคลินิกทำได้ยาก เนื่องจากลักษณะทางคลินิกของโรคคล้ายคลึงกับโรคอื่นๆมาก การวินิจฉัยโรคอาจอาศัยลักษณะทางคลินิกข้างต้น และพิสูจน์ว่าโรคเกิดจากเชื้อ *B. pseudomallei* แน่นอนโดยการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจเช่น เสมหะ หนอง เลือด ปัสสาวะ throat swab และสารน้ำที่เจาะจากอวัยวะต่างๆ โดยทั่วไปการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการทำได้ 3 วิธี

ก. การวินิจฉัยทางจุลชีววิทยา

(1) การย้อมสีแกรม โดยย้อมแกรมจากสิ่งส่งตรวจ ได้แก่เลือด เสมหะ หนองจากฝีต่างๆ จะพบแบคทีเรียรูปแท่งซึ่งติดสีแกรมลบ โดยติดสีเข้มที่ปลายทั้งสองข้าง (bipolar staining) แต่ลักษณะการติดสีดังกล่าวไม่จำเพาะสำหรับเชื้อนี้

(2) การเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar, MacConkey agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เมื่อเพาะเชื้อขึ้นให้สังเกตลักษณะโคโลนีที่เหี่ยวย่น (ถ้ามีอายุมากขึ้น) และอาจมีกลิ่นของไอระเหยของดินหลังฝนตก จากนั้นทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี เช่น oxidase, motility, nitrate reduction การเกิดกรดใน OF glucose, OF maltose และ OF lactose มีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะสำหรับแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยการเติมสารเคมีหรือยาต้านจุลชีพ เช่น Farkas-Himsley (Farkas- Himsley, 1968) Ashdown's selective medium (Ashdown, 1979) พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Ashdown จะให้ผลดีกว่า Blood agar และ MacConkey agar (Wuthiekanun *et al*., 1990) นอกจากนั้นยังมีการนำ API20NE kit มาช่วยในการทดสอบทางชีวเคมี (Dance *et al*., 1989b) ต่อมามีการใช้ Minitek disc system มาใช้แยกเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. cepacia* โดยอาศัยเอนไซม์ arginine dehydrolase, lysine decarboxylase, orthonitrophenyl-β-galactopyranosidase และ nitrate reductase อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยโรคโดยวิธีการเพาะเชื้อใช้เวลาอย่างน้อย 2 - 3 วัน จึงจะได้ผลการตรวจ

ข. การวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันวิทยา

(1) การทดสอบ latex agglutination (LA) (Dharakul *et al*., 1999a) เป็นการตรวจโดยใช้ *B. pseudomallei*-specific monoclonal antibody ที่ recognize ส่วน lipolysaccharide ของเชื้อมาเตรียม latex นำไปทดสอบกับ blood culture วิธี LA มีความไวและความจำเพาะถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาเพียง 2 นาที

(2) วิธี indirect hemagglutination (IHA) เป็นวิธีที่ใช้แพร่หลาย ทำง่าย ให้ผลรวดเร็ว โดยนำแอนติเจนจากส่วนน้ำใสของ *B. pseudomallei* เคลือบบนเม็ดเลือดแดงแกะทดสอบกับซีรั่มของผู้ป่วย ความไวและความจำเพาะของการทดสอบนี้จะเปลี่ยนไปตามค่าจุดตัด (cut off titer) ที่ใช้ในแต่ละแห่ง ค่าจุดตัด 1:160 จะให้ความไวและความจำเพาะ% 77.8 และ 78.3 ตามลำดับ (Phung *et al*., 1995)

(3) Indirect fluorescent Ab staining (IFA) สามารถตรวจหาได้ทั้ง IgM และ IgG และมีความจำเพาะกับ IgM หรือ IgG โดยดูจากการเรืองแสงของเชื้อโดยใช้กล้อง fluorescence มีความไว ความจำเพาะสูงกว่า IHA สามารถแยกได้ว่าผู้ป่วยกำลังเป็นโรคอยู่ หรือเคยป่วยด้วยโรคนี้มาก่อนแล้วหาย

(4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELIZA) ตรวจหาได้ทั้ง IgG และ IgM ความไวในการทดสอบหา IgG และ IgM เป็น% 85.7 และ 63.5 ตามลำดับและความจำเพาะ% 82.5 และ 81.8 ตามลำดับ (Dharakul *et al*., 1997)

(5) Gold blot (Kunakorn *et al*., 1991)ใช้ crude antigen ของ *B. pseudomallei* ตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG และ IgM การตรวจหา IgM มีความไว% 87.5 และความจำเพาะ% 88 ในขณะที่การตรวจหา IgG มีความไวและความจำเพาะ% 100 และ 91 ตามลำดับ

ค. การวินิจฉัยโรคทางอณูวิทยา

(1) Nucleic acid hybridization ใช้ DNA probe ที่จำเพาะสำหรับเชื้อ *B. pseudomallei* มีชื่อเรียกว่า pKKU-S23L (Sermswan *et al*., 1994) วิธีนี้สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อโดยมีความไว 1.5 นาโนกรัม หรือ 40,000 เซลล์ และไม่มีปฏิกิริยาข้ามพวกกับดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น

(2) Polymerase chain reaction (PCR) (Lew and Dermarchelier, 1994) ใช้ primer (18bp) จาก 23S ribosomal DNA ให้ความไวเท่ากับ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ถ้านำเลือดไปเพาะเชื้อไว้ก่อน 24 ชั่วโมง เพิ่มความไวเท่ากับ 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีการพัฒนาวิธี seminested PCR และตรวจหาปริมาณด้วยเทคนิค enzyme immuno assay (EIA) (Kunakorn and Markham, 1995) ซึ่งทำเป็น 2 แบบคือแบบ solution hybridization assay EIA (SHEIA) และ primer-labeled EIA (PLEIA) ความไวในการตรวจด้วย SHEIA และ PLEIA เป็น 75 และ 300 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

1.2.2.8 การรักษา

การรักษาผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสนั้น ความสำคัญอยู่ที่การวินิจฉัยให้ได้ถูกต้องรวดเร็วที่สุดและตัดสินว่าผู้ป่วยอยู่ในระยะใด ถ้าผู้ป่วยที่สงสัยมีการติดเชื้อซึ่งลุกลามรวดเร็วโดยมิได้เกิดจากการติดเชื้อในโรงพยาบาลหรือมีการพบรอยโรคมากกว่าหนึ่งแห่งซึ่งอาจมีรอยโรคเดิมแล้วแพร่กระจายไปอวัยวะอื่น และ/หรือมีโรคเดิม เช่น เบาหวานหรือโรคเลือด และถ้าระดับ IHA สูงกว่า 1:320 ให้สงสัยว่าผู้ป่วยนั้นจะเป็นโรคเมลิออยโดสิสเป็นอันดับแรก

ก. การรักษาผู้ป่วย septicemic melioidosis เนื่องจากผู้ป่วยที่อยู่ในระยะนี้มีอัตราตายสูง การใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมจะทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสหายจากโรค ยาที่มีการศึกษายืนยันว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาได้แก่

(1) ยากลุ่ม conventional คือการใช้ยาร่วมกัน 3 ชนิดคือ chloramphenicol (100 มก./กก./วัน) doxycycline (4 มก./กก./วัน) และ cotrimoxazole (trimethoprim 8 มก./กก./วัน หรือ sulfamethoxazole 40 มก./กก./วัน) แต่ผลการรักษาไม่ดีมีอัตราตายสูงประมาณ 74-8%0 (Sookpranee *et al*., 1992) ปัจจุบันไม่แนะนำใช้ยากลุ่มนี้

(2) Ceftazidime ขนาด 120 มก./กก./วัน สามารถลดอัตราการตายจากเมลิออยโดสิกลุ่มรุนแรงจาก 74% เหลือ 37% ปัจจุบันนี้ถือว่า ceftazidime เป็นยาเลือกตัวแรกสำหรับเมลิออยโดสิสที่มีอาการรุนแรง อาจใช้ยา ceftazidime เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ TMP-SMX สามารถลดอัตราตายของ septicemia ได้ถึง 56.6% (Sookpranee *et al*., 1992)

(3) Amoxycillin-clavulanic acid ขนาด 160 มก./กก./วัน ให้ผลใกล้เคียงกับการใช้ ceftazidime อัตราตายของทั้ง 2 กลุ่มเท่ากับ 47% แต่ผู้ป่วย 23% ต้องเปลี่ยนจากยานี้เป็นยา ceftazidime เนื่องจากการตอบสนองต่อยาไม่ดีหลังจากให้การรักษานานกว่า 72 ชั่วโมง ในขณะที่ต้องเปลี่ยนจากยา ceftazidime เป็นยา amoxycillin-clavulanic acid เพียง 5% (P=0.004) (Suputtamongkol *et al*., 1994b)

(4) Imipenem ขนาด 60 มก./กก./วัน ยานี้เป็นยาที่ดีที่สุดที่ใช้กับเชื้อ *B. pseudomallei* โดยพบว่าในหลอดทดลองมี MIC_{90} < 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Smith *et al*., 1994) ยังไม่พบเชื้อดื้อยาระหว่างรักษา หรือปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์ที่ไม่รุนแรง

(5) Piperacillin มี MIC_{90} < 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มี inoculum effect สูง มีการใช้ยานี้ในประเทศไทยบ้างแต่ไม่มีรายงานการศึกษาเหมือนยาอื่น แต่ในประเทศออสเตรเลียมีรายงานการใช้ยานี้ในขนาด 12-18 กรัมต่อวันร่วมกับยาตัวอื่น เช่น kanamycin, tetracycline, cloramphenicol และ TMP-SMX

ข. การใช้ยาในระยะ maintenance เริ่มให้ยาปฏิชีวนะชนิดกินหลังจากอาการโดยทั่วไปดีขึ้นและไข้ลดลงเป็นเวลาอย่างน้อย 48-72 ชั่วโมงยาที่ใช้มีดังนี้

(1) ยากลุ่ม conventional ประกอบด้วย TMP-SMX (ขนาดของ TMP 8-12 มก./กก./วัน) ร่วมกับยา doxycycline 4-6 มก./กก./วัน อาจให้ยา chloramphenicol ร่วมด้วยในระยะ 1 เดือนแรก การใช้ยาทั้ง 3 ตัวนี้ร่วมกันได้ผลการรักษาดีที่สุดในปัจจุบัน (Chaowagul *et al*., 1990; Rajchanuvong *et al*., 1995) ในประเทศออสเตรเลียนิยมใช้ยาชนิดเดียว คือ TMP-SMX หรือ doxycycline เป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือน (Currie, 1994) เพื่อป้องกันการกลับซ้ำ เนื่องจากเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถรอดชีวิตแบ่งตัวใน phagocyte ได้ อัตราการกลับซ้ำเท่ากับ 4.9% ในผู้ที่ได้รับยานานกว่า 12 สัปดาห์ ผู้ป่วยที่ได้รับยากลุ่มนี้จะมีความเสี่ยงในการกลับซ้ำน้อยกว่ากลุ่มที่ได้ยา amoxicillin-clavulanic acid ถึง 20% ผลข้างเคียงที่พบได้บ่อย คือ การมีปฏิกิริยาแพ้แสงจากยา doxycycline โดยพบอาการจมูกแดง เล็บสีดำเป็นต้น ทำให้ต้องหยุดหรือเปลี่ยนยาสูงถึง 12% (Suputtamongkol *et al*., 1991) ยานี้ไม่เหมาะที่จะใช้ในหญิงตั้งครรภ์ หรือหญิงที่ให้นมบุตรหรือในเด็กอายุน้อยกว่า 8 ปี

(2) Amoxicillin-clavulanic acid มีการใช้ยานี้ในการรักษาโรคเมลิออยโดสิสที่มีการติดเชื้อเฉพาะที่ หรือเป็น maintenance ตามหลังยาฉีด พบว่า 67% ของผู้ป่วยที่ได้รับยาน้อยกว่า 8 สัปดาห์มีการกลับซ้ำ 28% (Suputtamongkol *et al*., 1991)

(3) Quinolone ชนิดกิน เช่น ciprofloxacin 5 มก./กก./วัน ได้มีการนำมารักษาโรคเมลิออยโดสิสที่เป็นการติดเชื้อเฉพาะที่และใช้เป็นยา maintenance หลังจากได้รับยาฉีดแล้ว พบการกลับซ้ำ 24.4% มีความล้มเหลวในการรักษา 19.4% และได้ผลดีเพียง 56% ระยะเวลาเฉลี่ยที่ได้รับยาคือ 14 อาทิตย์ (สถิตย์ ศิริสิงห์ และคณะ, 2538)

1.2.3 *Bacillus* spp.

เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมบวก ขนาด 0.5x1.2–2.5x10 ไมโครเมตร สร้าง endospore เคลื่อนที่ได้ เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อย ทดสอบคะตะเลสให้ผลบวก ทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี เจริญได้ในอาหารหลายชนิด โคโลนีลักษณะกลมหรือมีรูปร่างไม่แน่นอน สมาชิกในจีนัส Bacillus สามารถผลิตสารปฏิชีวนะมากกว่า 167 ชนิด (Berdy, 1974)

1.2.4 สารปฏิชีวนะ (Antibiotics) หมายถึง สารประกอบที่ผลิตหรือสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่ง อาจเป็นแบคทีเรีย หรือเชื้อรา สารที่ผลิตขึ้นได้นี้สามารถไปยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของจุลลินทรีย์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง หรือไปมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์กลุ่มนั้นๆได้โดยใช้ในปริมาณน้อย สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นส่วนใหญ่เป็นสารเมตาโบไลท์ขั้นที่สอง (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารเมตาโบไลท์ที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญ แต่ถ้ามีอาจก่อให้เกิดประโยชน์ต่อเซลล์ที่ผลิต ส่วนใหญ่จะสร้างในช่วง late log phase จนถึงช่วง stationary phase อันเป็นช่วงที่จุลินทรีย์เริ่มมีการเจริญคงที่ สารปฏิชีวนะที่ถูกผลิตขึ้นในช่วงนี้มีประโยชน์เพราะยับยั้งการสร้างสารโมเลกุลใหญ่บางชนิดในเซลล์ได้ อันจะช่วยรักษาพลังงานส่วนหนึ่งไว้ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นจะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงไปได้ จึงช่วยยืดชีวิตของจุลินทรีย์ที่ผลิตอยู่ให้นานขึ้น สารปฏิชีวนะที่ Bacillus สร้างส่วนใหญ่เป็นสารโพลีเปปไทด์ บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ได้แก่ *B. subtilis* ผลิตสารปฏิชีวนะ

เปปไทด์ได้ 66 ชนิด และ *B. brevis* ผลิตได้ 23 ชนิด (Katz and Demain, 1977 ; Lee *et al*., 1985)

1.2.5 สารปฏิชีวนะเปปไทด์ (Peptide antibiotic) (Hancock and Chapple, 1999)

สารปฏิชีวนะถูกสร้างขึ้นได้จากเชื้อจุลินทรีย์ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แมลงและพืชเพื่อต่อต้านสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย (McCafferty *et al*., 1999) ดังนั้นจึงพบว่าสารเหล่านี้มีความแตกต่างและประกอบด้วยสารต่างๆหลายร้อยชนิด อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งตามการสร้างได้ 2 กลุ่มใหญ่คือ

1.2.5.1 สารปฏิชีวนะเปปไทด์ที่สร้างจากไรโบโซม สร้างได้จากสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เช่นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ แมลง พืช รวมทั้งแบคทีเรีย และไวรัส สารในกลุ่มนี้กำลังเป็นที่สนใจและมีการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ เปปไทด์ที่สร้างจากไรโบโซมสามารถแบ่งตามสิ่งมีชีวิตที่สร้างได้ดังนี้

ก. Mammalian peptides พบใน แกรนูลของนิวโตรฟิล และสารคัดหลั่งบริเวณเยื่อเมือก (Boman, 1995) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย รา ไวรัส ยกตัวอย่างเช่น bactericidal permeability increasing protein, cationic protein, lysozyme, lactoferrin, bactenecins, defensins, indolicidins และ cathelicidins

ข. Amphibian peptide ได้แก่ dermaseptins ที่พบในกบ *Phylomedusa sauvagii* มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Mor and Nicolas, 1994)

ค. Insect peptides ได้แก่ cecropins พบใน cecropia moth มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Hultmark *et al*., 1980)

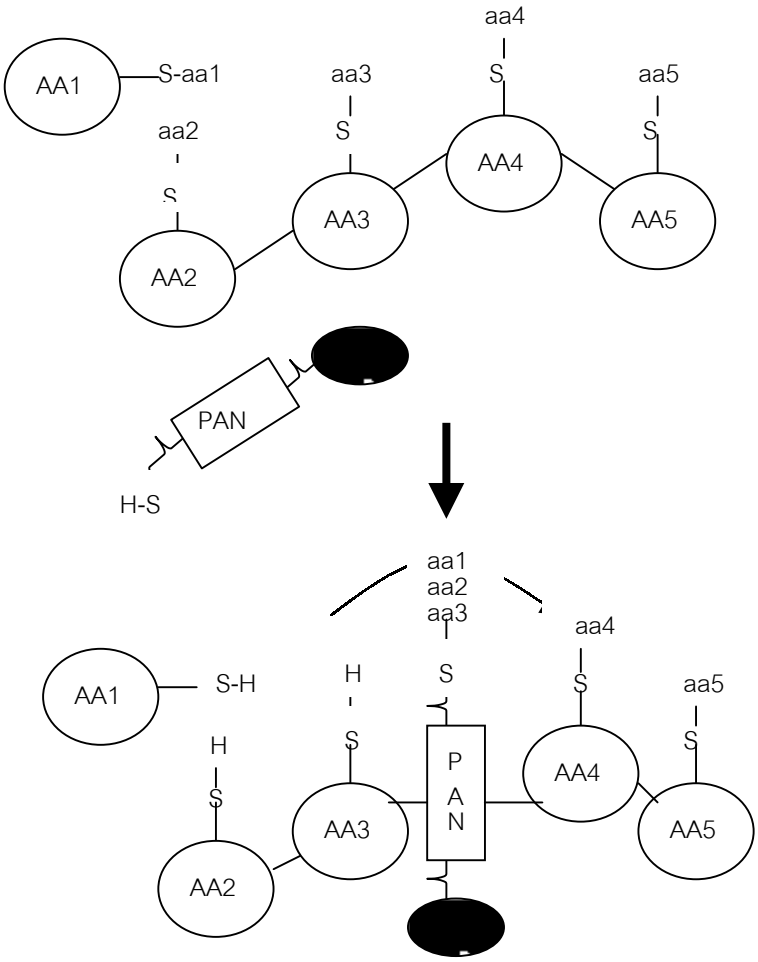
ง. Plants peptides สารต้านเชื้อแบคทีเรียตัวแรกที่พบจากพืช คือ thionins มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อรา ยีสต์ และ mammalian cell นอกจากนี้ยังพบ plant defensins ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Thevissen *et al*., 1997)

จ. Bacterial peptides เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่นในดินและน้ำ สามารถสร้างสารจำนวนมากที่ทำให้มีชีวิตรอด (Bu'lock, 1961; , Katz and Demain, 1977) พบว่าสารเหล่านี้มีประโยชน์ในทางการแพทย์และอุต

สาหกรรมเป็นกลุ่ม secondary metabolite ประกอบด้วย aminoglycoside, β-lactams, polyketides และ polypeptide ขนาดเล็ก สารเหล่านี้ไม่มีความสำคัญต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่สร้าง โดยถูกสร้างขึ้นในภาวะขาดแคลนอาหาร เนื่องจากพบในช่วง stationary phase เพื่อช่วยเชื้อที่สร้างในการแข่งขันในสภาวะที่อาหารมีจำกัด (Vining, 1990) เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบสร้างสารจัดอยู่ในกลุ่ม bacteriocin เช่น microcin C7 จาก *E.coli* ยับยั้งการสร้างโปรตีน mersacidin จาก *Lactococcus* ยับยั้งการสร้าง peptidoglycan แบคทีเรียแกรมบวกสร้างสารปฏิชีวนะเรียกว่า lantibiotic ซึ่งใช้เป็นยาปฏิชีวนะและสารเติมในอาหาร เช่น nisin สร้างจาก *Lactococcus lactis* ใช้เป็น food preservative สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวก เช่น *Clostridium* spp. และ subtilin (Baneljee and Bansen, 1988) subtilosin สร้างจาก *B. subtilis* (Babasaki *et al*., 1985) epidermin (Schnell *et al*., 1988) สร้างจาก *Staphylococcus epidermidis* และ gallidermin สร้างจาก *S. gallinarum* (Kellner *et al*., 1988)

ฉ. Viral peptides เป็นโปรตีนพบอยู่ในส่วนของ cytoplasm ของไวรัส HIV-1 (Eisenberg and Wesson, 1990) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

1.2.5.2 สารปฏิชีวนะที่ไม่ได้สร้างจากไรโบโซม สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่สร้างได้จากแบคทีเรีย เชื้อรา และ Streptomyces ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2 โมเลกุลหรือมากกว่า ถูกสร้างโดยสารประกอบเอนไซม์ (multienzyme complex) การสร้างส่วนใหญ่เป็นแบบ multienzyme thiotemplate (Zuber *et al*., 1993) โดยมีกลุ่มเอนไซม์ (AA1, AA2, AA3, AA4 และ AA5) (รูปที่ 1.2) ไปกระตุ้นและจับกับกรดอะมิโน (aa1, aa2, aa3, aa4 และ aa5) โดยพันธะ thioester ทำให้มีการเรียงลำดับกรดอะมิโน จากนั้นจะเกิด transpeptidation โดย pantetheine cofacter (pan) ทำให้ได้สายเปปไทด์ ตัวอย่างสารปฏิชีวนะเปปไทด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ polymyxin B และ gramicidin S บางตัวมีคุณสมบัติเป็นประจุบวก (cation) เช่น polymyxin และ gramicidin S มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบโดยไปออกฤทธิ์ที่ cytoplasmic membrane เพิ่มการนำสารเข้าสู่เซลล์



รูปที่ 1.2 แผนภูมิแสดงการสังเคราะห์เปปไทด์โดยกลไก multienzyme thiotemplate กลุ่มเอนไซม์ (AA1, AA2, AA3, AA4 และ AA5) ที่กระตุ้นและเชื่อมกับกรดอะมิโน (aa1, aa2, aa3, aa4 และ aa5) โดยเชื่อมด้วย thioester (s). กลุ่มเอนไซม์เรียงตัวตามลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ เกิด transpeptidation โดย pantethine cofactor (pan) ติดกับหน่วยย่อยของเอนไซม์ ลูกศรแสดงทิศทางที่โคแฟกเตอร์เคลื่อนที่เพื่อที่จะย้ายสายเปปไทด์ที่ต่อแล้วไปตำแหน่งต่อไป (Zuber *et al*., 1993)

1.2.6 สารปฏิชีวนะเปปไทด์ที่สร้างจาก *Bacillus* spp.

Bacillus ที่ถูกเลี้ยงและอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตเริ่มขาดแคลน จะเข้าสู่ระยะ stationary phase และจะเริ่มมีการสร้างสปอร์ extracellular enzyme และสารปฏิชีวนะ (Losick *et al*., 1986) เพื่อปรับตัวเองให้มีชีวิตรอดในสภาพแวดล้อมที่จำกัด การสร้างสารปฏิชีวนะของ Bacillus เกิดจากความจำเป็นต้องแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Zuber *et al*., 1993) และอาจเป็นสารที่ทำหน้าที่เป็นสัญญาณ (intercellular signals) ที่ส่งต่อกันเป็นลำดับให้ตอบสนองต่อสิ่งเร้าในสภาวะแวดล้อม (Modest, 1984; Horinuchi and Beppu, 1990; Willey, 1991) พบว่าการสร้างสารปฏิชีวนะเปปไทด์ของ Bacillus มีความสัมพันธ์กับการสร้างสปอร์ เนื่องจาก Bacillus สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ไม่สร้างสปอร์ จะไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเปปไทด์ (Piggot and Coote, 1976) และการผลิตสารทั้งหมดถูกควบคุมโดยจีน ซึ่งถูกกระตุ้นให้ทำงานในสภาวะแวดล้อมที่ขาดแคลนอาหาร (Losick *et al*., 1986) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะเปปไทด์ที่สร้างจาก Bacillus ได้แก่ bacitracin สร้างจาก *B. licheniformis* polymyxin สร้างจาก *B. polymyxa* iturin สร้างจาก *B. subtilis* gramicidin S สร้างจาก *B. brevis* (ตารางที่ 1.2) (Katz and Demain, 1977) สารปฏิชีวนะจาก Bacillus ส่วนใหญ่มีการสร้างแบบ multienzyme thiotemplate

1.2.6.1 คุณสมบัติโดยทั่วไปของสารปฏิชีวนะเปปไทด์ (Katz and Demain, 1977)

ก. ขนาดเล็กกว่าโปรตีนทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในระหว่าง 270-4500 ดาลตัน

ข. ในเชื้อตัวหนึ่งมักจะสร้างเปปไทด์หลายชนิดที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกัน โดยที่โครงสร้างของเปปไทด์อาจจะมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1 ตัว หรือ 2-3 ตัว ยกตัวอย่างเช่น linear gramicidins (A, B และ C) และ cyclic tyrocidines (A, B และ C) สร้างจาก *B. brevis* ในเวลาเดียวกัน linear gramicidins (pentadecapeptides) และ tyrocidines (decapeptides) มีส่วนประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน แต่ทั้งสองอยู่ในกลุ่มเดียวกันเพียงแต่มีการแทนที่ของ aromatic amino acid ต่างกัน

ค. ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด แต่จะมีบางชนิดที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนร่วมกับสารประกอบอื่น เช่น edeine A ประกอบด้วย spermidine ร่วมกับกรด อะมิโน 5 ชนิด polymyxin ประกอบด้วย 6-methyloctanoic acid หรือ 6-methylheptanoic acid ซึ่งเป็นกรดไขมันร่วมกับกรดอะมิโน

ง. กรดอะมิโนที่ประกอบเป็นสารปฏิชีวนะเปปไทด์ที่ได้จาก Bacillus เป็นกรดอะมิโนที่มีลักษณะเฉพาะคือไม่มี N-methylamino acid และไม่พบในโปรตีนปกติ ได้แก่กรดอะมิโนที่เป็น D-amino acid หรือ basic amino acid เช่น ornithine, diaminobutyric acid, β-amino acid, dehydroamino acid และ sulfur containing amino acid ซึ่งแตกต่างจากสารปฏิชีวนะเปปไทด์ ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes

จ. มีลักษณะโครงสร้างเป็นวง (cyclic) และมีบ้างที่โครงสร้างเป็นเส้นตรง (linear) ลักษณะโครงสร้างที่เป็นวงมีทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและอาจเกิดจากการจัดตัวกันใหม่ของกรดอะมิโน เช่น bacitracin จะมี thiazoline ring ที่เกิดจากการรวมตัวของ cysteine และ isoleucine โดย thiazoline ring นี้เป็น cyclic hexapeptide ที่มีพันธะระหว่าง β-carbonyl group ของ aspartic acid กับ δ -amino group ของ lysine

ฉ. ทนต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของเอนไซม์ peptidase และ protease จากพืชและสัตว์ แต่ก็มีบางชนิดที่ไวต่อเอนไซม์อื่น เช่น polymyxin B ไวต่อเอนไซม์ ficin และ papain, edeine A และ B ไวต่อเอนไซม์ carboxypeptidase, bacilysin ไวต่อเอนไซม์ leucine aminopeptidase และ pronase และ gramicidin S ไวต่อเอนไซม์ subtilopeptidase A

ตารางที่ 1.2 สารปฏิชีวนะบางชนิดที่สร้างจากจีนัส Bacillus (Katz and Demain, 1977)

Species	Antibiotic
Bacillus brevis	Gramicidin S, Tyrocidine, Linear gramicidins, Brevin, Edeine, Eseine, Bresseine, Brevistin
Bacillus subtilis	Mycobacillin, Subtilin, Bacilysin, Bacillomycin, Fungisattin, Bulbiformin, Bacillin, Subsporin, Bacillocin, Mycosubtilin, Fungocin, Iturin, Neocidin, Eumycin
Bacillus pumilus	Micrococcin P, Pumilin, Tetain
Bacillus mesentericus	Esperin
Bacillus thiaminolyticus	Octopytin(Thianosine), Baciphelacin
Bacillus licheniformis	Bacitracin, Licheniformin, Proticin
Bacillus polymyxa	Polymyxin, Colistin, Gatavalin, Jolipeptin
Bacillus circulans	Butirosin, Circulin, Polypeptin, EM-49, Xylostatin
Bacillus laterosporus	Laterosporamine, Laterosporin
Bacillus cereus	Biocerin, Cerexin, Thiocillin

1.2.6.2 การสร้างสารปฏิชีวนะกับการเจริญ (Katz and Demain, 1977)

การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเปปไทด์เริ่มต้นขึ้นหลังจากเชื้อแบคทีเรียผ่านระยะ rapid growth phase โดยศึกษาจากการสร้าง gramicidin S, tyrocidine, polymyxin, edeine, bacitracin, mycobacillin และ bacilysin โดย Tomino และคณะ (1967) พบว่า *B. brevis* สร้าง gramicidin S และเอนไซม์ที่จำเป็นในการสร้างช่วง late logarithmic phase โดยกิจกรรมของเอนไซม์ในการสร้างสารปฏิชีวนะจะหายไปภายใน 2-3 ชั่วโมงและพบลักษณะเดียวกันในการสร้าง tyrocidine synthetase (Fujikawa *et al*., 1968) ยังไม่มีข้อสรุปของกิจกรรมของเอนไซม์ที่หายไป แต่ต่อมา Lee และคณะ (1975) พบว่าเอนไซม์ในการสร้าง tyrocidine (trocidine-forming enzymes) หายไปโดยไปรวมกับ membrane ของโครงสร้างที่กำลังจะเปลี่ยนเป็นสปอร์ ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงเวลาการสร้างสปอร์ Demain และคณะ (1976) พบว่าการหายไปของ gramicidin

S synthetase ใน *B. brevis* ขึ้นกับ oxygen-dependent inactivation โดยปกติการสร้างสารปฏิชีวนะจะเกิดในระยะหลัง logarithmic phase (บางชนิดอาจมีข้อยกเว้น) ระหว่างการเจริญพันธุกรรมของเชื้อและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปอาจเป็นตัวเร่งหรือชะลอการสร้างสารปฏิชีวนะ การสร้างสารปฏิชีวนะเปปไทด์อาจถูกควบคุมโดย carbon และ nitrogen catabolite repression หรืออยู่ภายใต้การควบคุมของอัตราการแบ่งตัว (Matteo *et al*., 1976) มีรายงานว่าการสร้าง bacitracin จาก *B. licheniformis* ถูกยับยั้งระหว่างสองสามชั่วโมงแรกของการเจริญเมื่อเติม glucose ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Haavik, 1974) แสดงว่าการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะที่ลดลงนี้ไม่เกี่ยวกับ carbon catabolite repression แต่เกี่ยวข้องกับ pH ที่ต่ำเนื่องจากเมตาบอลิสม แต่ต่อมาพบว่าการลดลงในการสังเคราะห์ bacitracin ไม่ขึ้นกับ pH แต่เกี่ยวกับ acetic acids และ pyruvic acids ที่เกิดจาก glucose ไปยับยั้งการสร้างโดยตรง เช่นเดียวกันกับการสร้าง tyrocidine, linear gramicidins และ polymyxin E (colistin) เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญของเชื้อ *Bacilluis* และพบว่า gramicidin S และ gramicidin synthetase (Matteo *et al*., 1976) ถูกสร้างช่วง exponential phase เมื่อทำ continuous culture จึงสรุปว่าสารปฏิชีวนะเปปไทด์ถูกสังเคราะห์ระหว่างขั้นตอนการเจริญของเชื้อ (active growth) การสังเคราะห์ gramicidin S, tyrocidine, linear gramicidin, edeine, bacitracin, colistin และ mycobacillin แตกต่างจากการสังเคราะห์โปรตีน และกระบวนการการสร้างสารปฏิชีวนะไม่ไวต่อ chloramphenicol, puromycin, deoxyribonuclease และ ribonuclease (Rnase) นอกจากนี้พบว่า transfer ribonucleic acid (tRNA), messenger RNA(mRNA) และไรโบโซมไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง

1.2.6.3 โครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะเปปไทด์ แบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ (Shoji, 1978) (รูปที่ 1.3)

ก. โครงสร้างทางเคมีเป็นเส้น (linear peptide) ได้แก่ bacilysin, linear gramicidins, edeines, cererins (A, B, C และ D) และสารปฏิชีวนะกลุ่ม tridecaptin เช่น tridecaptin A

ข. โครงสร้างทางเคมีเป็นวง (cyclic peptide) ได้แก่ gramicidins, tyrocidines, bacitracin, mycobacillin, iturin A, mycosubtilin, bacillomycin, polymyxins

เช่น polymyxin F, colistin และกลุ่ม octapeptin เช่น EM-49, 333-25, BU-1880, TM-473, Y-8495 และ AB-1

ค. เปปไทด์ แลคโตน (Peptide lactone) ได้แก่ esperin, surfactin, brevistin, TL-119 และ 3302-A

1.2.6.4 กลไกการออกฤทธิ์

ก. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (cell wall) ได้แก่ พวก cyclic peptide เช่น bacitracin จะมีฤทธิ์ต่อการสังเคราะห์ peptidoglycan ของ *Staphylococcus aureus* ทำให้เกิด การสะสมของ N-acetylmuramyl pentapeptides ซึ่งเป็น peptidoglycan precursor และเข้าไปรบกวนกระบวนการ dephosphorylation โดยมีไขมันเป็นพาหะ ทำให้เกิดการขัดขวางการขนส่งไขมันที่จะไปเชื่อมกับ UDP-muraminic-N-acetyl pentapeptide ในกระบวนการสร้างผนังเซลล์ (Klienkauf and Dohren, 1985 ; Klienkauf, 1988) นอกจากนี้ยังมี bacilysin และพวก linear peptides ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนเชื่อมอยู่กับ cyclic peptide

ข. ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยออกฤทธิ์ขัดขวางการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เช่น edeines

ค. ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ได้แก่ พวก linear peptide หรือ cyclic peptide เช่น tyrocidines และ gramicidins โดยไปทำให้ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติมีผลทำให้ กรดอะมิโนและฟอสเฟตภายในเซลล์แบคทีเรีย และอิออนต่างๆ ที่เป็นอิเลคโตรไลท์ ที่ใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติ (Wolin, 1979) กลุ่ม polymyxins ซึ่งมีกรดไขมันเป็นส่วนประกอบ พบว่ากรดไขมันของ polymyxins จะแทรกเข้าไปยังชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้การเรียงตัวของส่วนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ มีผลทำให้เกิดการรั่วไหลของเปนโตนฟอสเฟต และสารโมเลกุลเล็กๆ ออกนอกเซลล์ เป็นเหตุให้เมตาบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติ (มาลินี ลิ้มโภคา, 2525)

แบคทีเรียในกลุ่ม Bacillus นอกจากสามารถผลิตสารปฏิชีวนะพวกเปปไทด์ได้เป็นส่วนใหญ่แล้ว ยังพบว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะกลุ่มอื่นที่น่าสนใจ ได้แก่สารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside เช่น butirosin สร้างจาก *B. circulans* (Howell

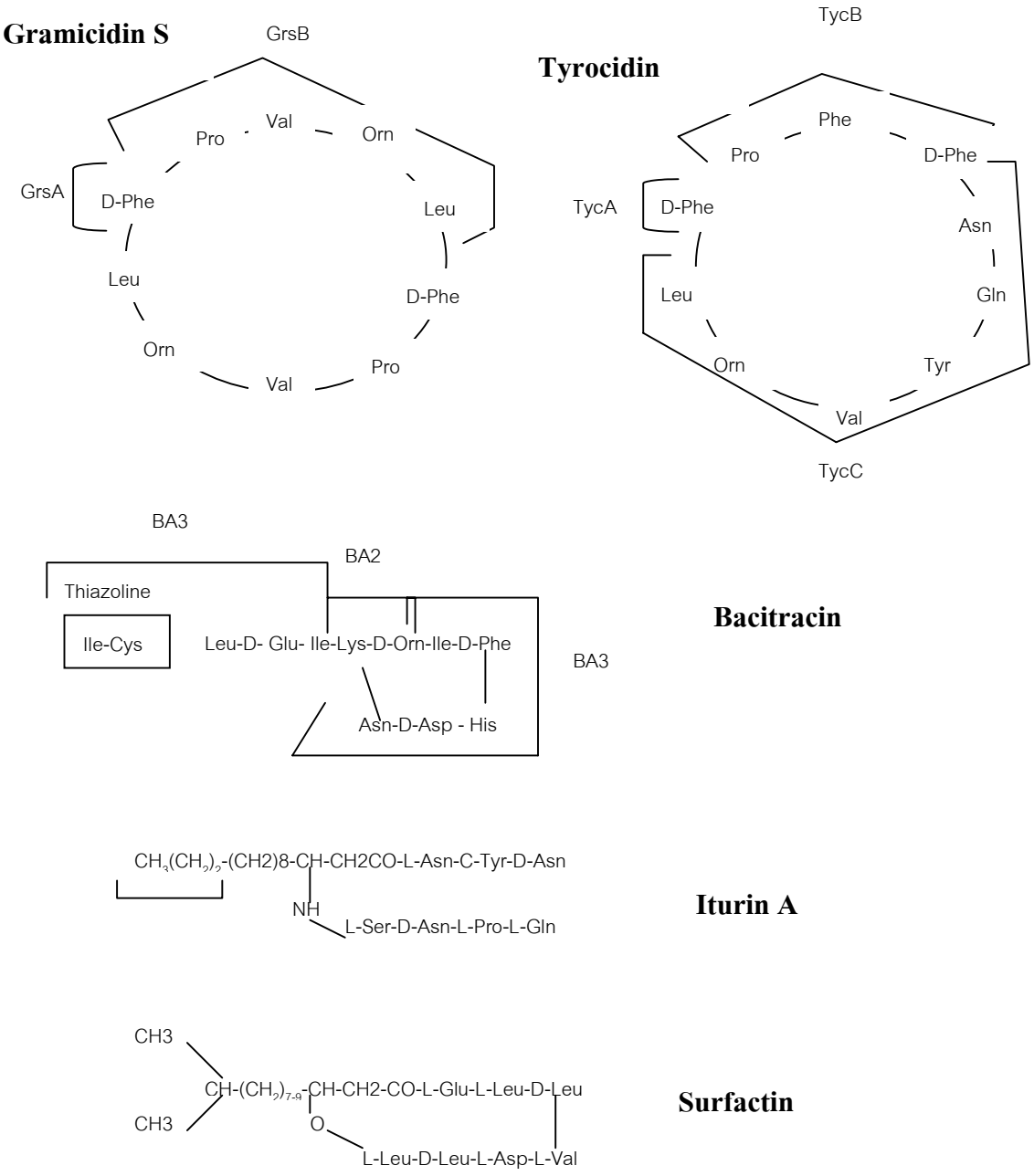
et al., 1972) amicoumacin สร้างจาก *B. licheniformis* (Nesemann *et al*., 1972) สารยับยั้งเชื้อราและปรสิต ได้แก่ cycloheximide สร้างจาก *B. griseus* (มาลิน จุลศิริ, 2532) และ 6-aminopenicillanic acid จาก penicillin A และ penicillin V ที่ผลิตจาก *B. megaterium* (Vandamme, 1984) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะกลุ่ม penicillin สารปฏิชีวนะเปปไทด์จาก Bacillus หลายชนิด เช่น colistin bacitracin ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค เนื่องจากออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด ในขณะเดียวกันสารปฏิชีวนะเปปไทด์บางชนิดก็มีฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น แบคทีเรียหรือเชื้อราที่เป็นศัตรูพืช ปรสิต ยุง เป็นต้น ดังนั้นจึงนิยมใช้ Bacillus เป็น ตัวควบคุมชีวภาพ (biological control) เชื้อมีชีวิตชนิดอื่น

1.2.7 การใช้ Bacillus เป็นตัวควบคุมชีวภาพ (biological control)

มีรายงานการใช้ *B. subtilis* ต่อต้าน *Botrytis cinera* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคที่เกิดกับองุ่นและลูกเบอรี่ (Silva, 1992) Podile และคณะ (1988) ใช้ *B. subtilis* ต่อต้านเชื้อรา *Rhizoctonia solani*, *Sclerocium rolfsii* และ *Fusarium solani* Kado Clarens และคณะ (1987) พบ *Bacillus polymyxa* 9A สามารถต่อต้าน *Verticillium* wilt ในการปลูกมันฝรั่ง Safiyazov และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษา *Bacillus* และ *Pseudomonas* ในการควบคุมโรคของฝ้ายและพบว่า *B. subtilis* 23 และ *P. fluorescens* มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการ*ยับยั้ง* *Xanthomonas malvacearum*, *Rhozoctonia solani*, *Fusarium vasinfectum* *และ* *Verticillium dahliae* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถใช้ Bacillus ในการควบคุมลูกน้ำยุง โดยพบว่า *B. sphearicus* สามารถสังเคราะห์ผลิตโปรตีนซึ่งเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง ซึ่งนำมาใช้ในการกำจัดยุงซึ่งเป็นพาหะนำโรค มีการใช้ *B. papillae* เพื่อควบคุม japanese beetle แมลงก่อให้เกิดโรคกับสนามหญ้า โดยทำให้เกิดโรค milky กับตัวอ่อนของแมลง เมื่อแมลงมากิน สปอร์ สปอร์จะงอกภายใน 3-5 วันและแทรกเข้าไปในผนังกระเพาะและโตในน้ำเหลืองเพิ่มจำนวนทำให้ตัวอ่อนตาย (Deacon, 1983) Sharga และ Lyon (1998) พบว่าสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* BS107 สามารถยับยั้ง *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica* และ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* เชื้อสาเหตุของโรค potato blackleg และ tuber soft rot *B. thuringiensis* (Bt) ใช้กันแพร่หลายในอเมริกาเหนือ ใช้ในพืช canola, cruciferous crops ฝ้าย ข้าวโพด มันฝรั่ง ผลไม้และยาสูบ

ใช้ยับยั้งยุงและ black flies และสามารถฆ่า nematodes (Edward *et al*., 1988) โดยภายในสปอร์มี δ-endotoxin เป็นพิษต่อทางเดินอาหารของตัวอ่อนของแมลง *B. coagulans* ใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium* spp. โดยวัดจากจำนวนโคโลนี น้ำหนักแห้ง และระดับ ergosterol (Czacyzk *et al*., 2002) *B. amyloliquefaciens* B94 สามารถยับยั้ง *Rhizoctonia solani* และเชื้อราก่อโรคพืชชนิดอื่นโดยสร้างสารต้านเชื้อรา iturin A (Yu *et al*., 2002) *B. mojavensis* (*B. subtilis* subgroup) เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium moniliforme* (Bacon and Hinton, 2001)

จากคุณสมบัตินี้ Bacillus หลายสปีชีส์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเปปไทด์ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้าน จุลินทรีย์หลายชนิด และได้มีการนำ Bacillus มาใช้เป็นตัวควบคุมชีวภาพในด้านต่างๆ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาหาสายพันธุ์ของ Bacillus ที่มีความสามารถสามารถต่อต้านเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมโดยสามารถทำลายหรือลดจำนวน *B. pseudomallei* ในพื้นที่ที่มีการระบาดสูงซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณผู้ติดเชื้อโรคเมลิออยโดสิสน้อยลง



รูปที่1.3 ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะเปปไทด์บางชนิดที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. (Zuber *et al*., 1993)

1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ต่างๆจากดิน

1.3.2 ศึกษาผลของ *Bacillus* spp. ต่อการเจริญของเชื้อ *B. pseudomallei*

1.3.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อ *Bacillus* spp. ในการสร้างสารยับยั้ง

1.3.4 ศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้ง