บทที่ 1

บทนำ

เชื้อ Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) เป็น opportunistic pathogen ที่พบได้บ่อย เนื่องจากเชื้อนี้มีอยู่ในสภาพแวดล้อมทั่วไป แม้แต่ในตัวคนไข้เอง สามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรง และมีอัตราตายสูง โดยเฉพาะในคนไข้ที่อ่อนแอ เช่น คนไข้ไฟไหม้ คนไข้ผ่าตัด หรือคนไข้ที่ได้รับ immunosuppressive agent เป็นต้น และการรักษาโรคติดเชื้อ Pseudomonas ทำได้ยากเนื่องจากเชื้อนี้มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีผู้คิดทำ vaccine และ immunoglobulin มาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อจาก P. aeruginosa ซึ่งได้ผลดีคือสามารถลดอัตราการตายของคนไข้ลงได้ การศึกษาในครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบคุณสมบัติของ vaccine ที่เตรียมจาก antigen ต่างกัน 2 ชนิด ซึ่งเตรียมจาก P. aeruginosa 3 immunotypes ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในประเทศและ Immunoglobulin ที่เตรียมได้มาศึกษาถึงความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ P. aeruginosa

ลักษณะของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa (1)

เป็น gram-negative rod ขนาด 0.5-0.8 × 1.5-3.0 µm อาจอยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือเป็นลูกโซ่สั้น ๆ เคลื่อนที่ด้วย flagella ที่ขั้ว 1 อัน flagella มากกว่า 1 อัน อาจพบได้แต่ไม่มากนัก ลักษณะโคโลนีกลม ขอบหยัก มีกลิ่น aromatic เป็น aerobic bacteria แต่บาง strain เจริญได้ใน anaerobic condition ที่มี nitrate

เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป และโตเร็วที่อุณหภูมิ 30° C - 37° C สามารถสร้าง bluish green pigment diffuse เข้าไปใน media pigment ที่สร้างมี 2 ชนิดคือ pyocyanin เป็นสารพวก phenanzine มีสีน้ำเงิน ละลายใน chloroform และน้ำ มีคุณสมบัติเป็น antimicrobial ด้วย และ pigment อีกชนิดหนึ่งคือ fluorescein เป็นสารสีเขียวเหลือง เหลือบแสง ละลายได้ในน้ำ แต่ไม่ละลายใน chloroform

คุณสมบัติทางชีวเคมีของ Pseudomonas aeruginosa

คุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้ในการพิสูจน์ P. aeruginosa ออกจาก species อื่น แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะสำคัญที่ใช้พิสูจน์เชื้อ P. aeruginosa (1-3)

Character	Reaction	Character	Reaction
Oxidase	+	Pigment Production	
O-F test	oxidative	King A	d
Motility	+	King B	+
Hydrolysis		Citrate	+
Gelatin	+	Oxalate	-
Starch	-	Glucose	+
Nitrate Reduction to		Mannose	+
Gas	+	Galactose	+
Lecithinase	-	Glycerol	+
Indole	-	Rhamnose	-
Gluconate	+	Lactose	-
H_2S	-	Lysine Decarboxylase	-
Urease	-	Ornithine Decarboxylase	-
		Arginine Decarboxylase	-

\+ = 90-100 % strains are positive

d = 10-< 90 % strains are positive

\- = 0- < 10 % strains are positive

โครงสร้าง cell ของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa มีลักษณะโครงสร้างส่วนใหญ่เหมือนกับของ gram-negative bacteria ทั่วไป (4, 5) ดังนั้นโครงสร้างของ cell ส่วนใหญ่ที่แสดงต่อไปนี้ จะเป็นของ gram-negative bacteria และจะมีรายละเอียดบางส่วนของเชื้อ P. aeruginosa ที่ได้มีการศึกษาไว้แล้วเพิ่มเติมเข้าไปบ้าง โครงสร้างของ cell gram-negative bacteria มีดังนี้

1. Cytoplasm

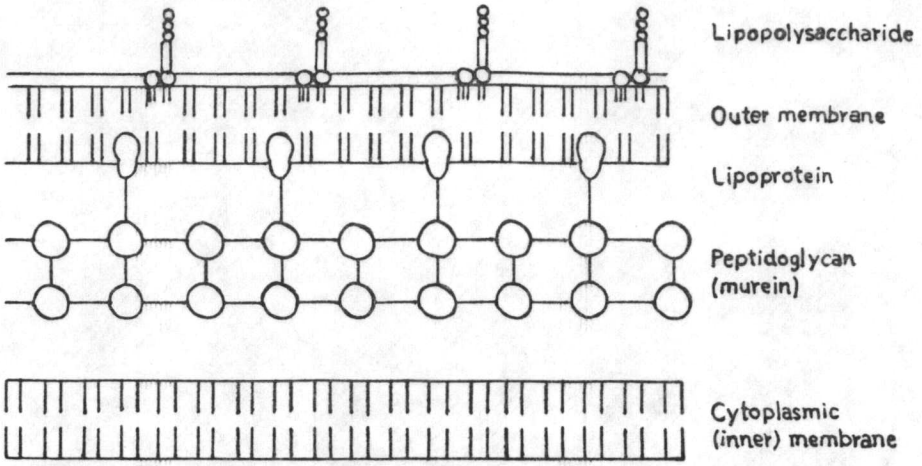
2. Cell envelope หมายถึง โครงสร้างซึ่งประกอบด้วย cytoplasmic membrane, peptidoglycan (murein) layer, outer membrane (cell wall) (รูปที่ 1) สำหรับ P. aeruginosa จะมี slime polysaccharide อยู่ต่อจาก cell wall ด้วย (6) ซึ่งใน gram-negative bacteria บางชนิดจะ form เป็น capsular polysaccharide (7)

2.1 Cytoplasmic membrane ประกอบด้วย phospholipid และ protein

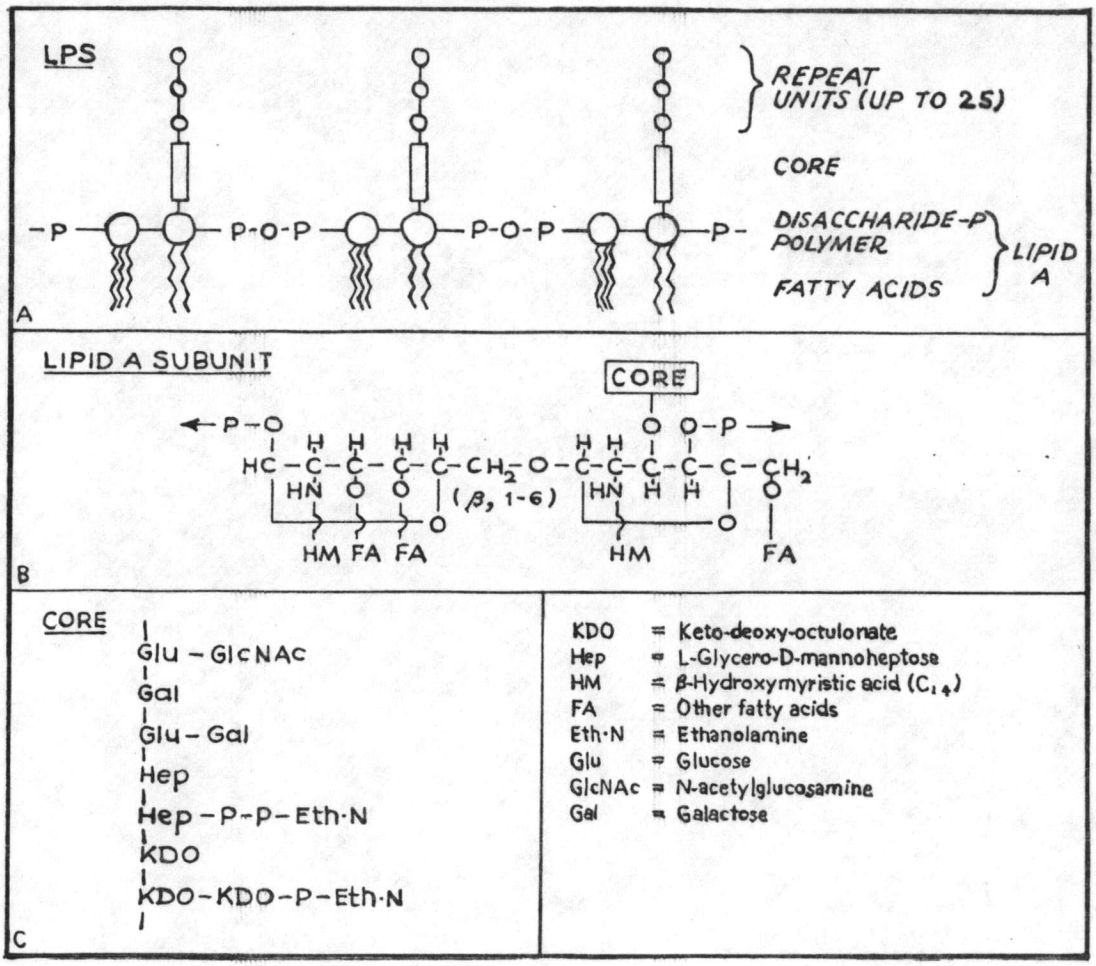
2.2 Peptidoglycan layer ประกอบด้วย complex polymer 3 ส่วนคือ ส่วนแรกเป็น back bone ประกอบด้วย N-acetylglucosamine และ N-acetylmuramic acid สลับกันไป ส่วนที่ 2 เป็นชุดของ tetrapeptide side chain ที่เหมือนกัน ซึ่งของ P. aeruginosa จะเป็น L-alanine (L-ala), D-glutamic acid (D-glu), 2,5-diaminopimelic acid (DAP) และ D-alanine (D-ala) (4) ต่อกับ N-acetylmuramic acid และส่วนสุดท้ายเป็นชุดของ peptide ที่เหมือน ๆ กันเป็น cross-bridge

2.3 Cell wall ประกอบด้วย 3 polymers อยู่ภายนอก

peptidoglycan layer ประกอบด้วย lipoprotein, outer membrane และ lipopolysaccharide (LPS) ส่วนที่เป็น lipoprotein จะเป็นตัวเชื่อม outer membrane และ peptidoglycan layer สำหรับส่วน outer membrane จะมี phospholipid 2 ชั้น ซึ่งยอมให้สารที่ละลายน้ำผ่านได้ เช่น amino acid, sugar, phosphate และ sulfate ส่วนที่เป็น LPS จะประกอบด้วย complex lipid คือ lipid A ซึ่งต่อกับ core polysaccharide และ terminal series ของ repeat unit (รูปที่ 2-A) ส่วน lipid A นั้นประกอบด้วย chain ของ glucosamine disaccharide units ซึ่งต่อกันด้วย pyrophosphate bridges และต่อด้วย long chain fatty acid จำนวนหนึ่ง (รูปที่ 2-B) ซึ่งจะพบเป็น β-hydroxymyristic acid และ C_{14} fatty acid ได้บ่อย ๆ ส่วน fatty acid อื่น ๆ เปลี่ยนไปตาม bacterial species แต่ P. aeruginosa จะไม่มี β-hydroxymyristic acid ซึ่งทำให้ LPS ของ P. aeruginosa toxic น้อยกว่า LPS ของ gram-negative bacteria ชนิดอื่น (8) สำหรับส่วน core polysaccharide (รูปที่ 2-C) จะคงที่ใน gram-negative ทุก species ซึ่งแต่ละ species จะประกอบด้วย repeat unit ที่เหมือนกันเป็นชุด ๆ LPS เป็นส่วนที่ toxic เรียกว่า endotoxin จะเกาะแน่นกับ cell surface และจะปล่อยออกมาเมื่อเกิด cell lysis เมื่อ LPS ถูก split ออกเป็น lipid A และ polysaccharide toxicity ทั้งหมดจะสัมพันธ์กับส่วน lipid A และส่วน polysaccharide จะเป็น surface antigen ซึ่งเรียกว่า O-Antigen โดย antigenic specificity ขึ้นกับ terminal repeat unit (ตารางที่ 2) ส่วน LPS นี้จะต่อกับ outer membrane ด้วย hydrophobic bond และ LPS เป็น heat-stable มี M.W. ระหว่าง 100,000-900,000



รูปที่ 1. โครงสร้าง cell envelope ของ gram-negative bacteria (2)



รูปที่ 2. A. LPS ของ gram-negative bacteria (2)

B. ส่วน lipid A ของ LPS

C. ส่วน core polysaccharide ของ LPS

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของ LPS "endotoxin" ใน cell wall ของ gram-negative bacteria และ common name ของแต่ละส่วน (2)

Chemistry	Common name
(a) Repeating oligosaccharide (eg, man-rha-gal) combination make up type specific haptenic determinants (outermost on cell wall)	(a) O-specific polysaccharide; "somatic antigen" of "smooth" colonies. Induce specific immunity
(b) (N-Acetylglucosamine, glucose, galactose, heptose) same in all gram-negative bacteria)	(b) Common core polysaccharide ("rough" colony antigen). Induce some non specific resistance to gram-negative sepsis.
(c) Backbone of alternating heptose and phosphate groups linked through KDO (2-keto-3-deoxy-octonic acid) to lipid. Lipid is linked to peptidoglycan (by glycoside bond)	(c) lipid A with KDO responsible for primary toxicity.

2.4 Slime เป็นสารพวก polysaccharide ซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่อยู่ภายนอก cell wall มีหน้าที่ป้องกัน phagocytosis และเพิ่ม virulence ของเชื้อด้วย slime ของ P. aeruginosa เป็น antigen ที่ดี และมี type specific (10) antibody ที่เกิดจากการ immunized ด้วย slime ของ P. aeruginosa สามารถเกิด agglutination กับตัวเชื้อได้ และป้องกันการติดเชื้อที่เป็น type เดียวกันได้ (10-13) จากการเปรียบเทียบพบว่า slime toxic มากกว่า LPS 2-3 เท่า (12) และส่วน glycolipoprotein (GLP) ของ slime ซึ่งประกอบด้วย hexose, hexosamine, lipid และ protein เป็นส่วนทำให้เกิดความรุนแรงจากการติดเชื้อ P. aeruginosa ด้วย (10-12) จากการทดลองฉีด purified slime เข้าในหนูถีบจักร สามารถทำให้เกิด lethal infection ซึ่งมีลักษณะเดียวกับที่เกิดจาก viable cell (12,15) คือเกิด pathogenic effect ของ cell, inhibit phagocytosis, leukopenia และตายในที่สุด โดยส่วน carbohydrate ของ GLP จะทำหน้าที่เป็น antigen และ inhibit phagocytosis และส่วน lipid ทำให้เกิด leukopenia และ lethal effect (11,15,16)

การจำแนกชนิดของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa (Typing)

การจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อใช้ประกอบการศึกษาทางระบาดวิทยามีหลายแบบด้วยกัน แต่ที่นิยมใช้กันทั่วไป มีอยู่ 3 แบบคือ

1. Pyocin typing

โดยอาศัยคุณสมบัติการผลิต pyocin เช่น วิธีของ Gillies และ Govan (17) สามารถ type ได้เป็น 37 pyocin types คือ type 1-37 ส่วน pyocin subtyping ทำตามวิธีของ Govan

และ Gillies (18) สามารถแยกเป็น pyocin subtype ได้ 8 subtypes คือ a-h

2. Serological typing

การจำแนกเชื้อโดยวิธีนี้มีผู้ศึกษาและรายงานกันมาก เช่น Verder และ Evans (19) ได้ทำการศึกษาถึง serological schema ของ P. aeruginosa แต่ละ type โดยใช้ heat stable O-antigen และ heat labile H-antigen โดยอาศัยหลัก agglutination และ agglutination absorption test แยกได้เป็น 29 serotypes และ Homma (20) ทำการแยกโดยอาศัยหลัก agglutination และ agglutination absorption test เช่นเดียวกัน สามารถจำแนกได้เป็น 10 serological types คือ type 1-10

3. Immunological typing

จากการศึกษาของ Fisher (21) โดยใช้ antigen ที่เป็น killed whole cell และทำโดยอาศัยหลัก agglutination และ challenge protection ได้เป็น 7 immunotypes และจากการศึกษาต่อมาของ Fisher พบว่า protective antigen ของแต่ละ immunotype คือ LPS (22)

Habitat

สามารถพบเชื้อ P. aeruginosa ได้ในลำไส้ของคนและสัตว์ปกติ (normal intestinal flora) และพบได้ในธรรมชาติทั่วไป เพราะเชื้อใน genus Pseudomonas สามารถใช้ organic material เป็นแหล่งของ carbon และ energy ได้มากมายหลายชนิด (2,23) P. aeruginosa อาจพบได้ตามภาชนะ เครื่องใช้ น้ำดื่ม อาหาร พืชผัก

ต่าง ๆ ในดิน ในน้ำทะเล ของเสีย และอากาศ (1,2,23,24) และแม้แต่ในสภาพที่ขาดอาหาร เช่น ในน้ำกลั่นที่ใช้ในโรงพยาบาลพบมีเชื้อ P. aeruginosa ถึงประมาณ 10^7 viable cells/ml เมื่อเอาน้ำกลั่นนี้ไปทำให้เจือจางลงด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนเหลือปริมาณเชื้อ 10^3 cells/ml แล้วเอาไป incubate 48 ชั่วโมง จะพบว่ามีเชื้อเพิ่มเป็น 10^7 cells/ml และอยู่ในระดับนี้ได้เป็นเวลานานถึง 42 วัน (25)

การติดเชื้อและความรุนแรงของเชื้อ

การติดเชื้อ P. aeruginosa พบได้ในคนไข้ที่มีร่างกายอ่อนแอ เช่น คนไข้ไฟไหม้ คนไข้ที่มีบาดแผลรุนแรง คนไข้ผ่าตัด คนไข้เนื้องอก คนไข้ที่มีการสอดใส่เครื่องมือลงไปในช่องและทางผ่านภายในร่างกาย เช่น ทางเดินอาหาร, ทางเดินหายใจ, หรือในเส้นเลือดดำ, คนไข้เบาหวานที่ไม่ได้รับการรักษา คนไข้ไตวาย และคนไข้ที่ได้รับ steroids, cytotoxic agents, immunosuppressants อื่น ๆ หรือได้รับการฉายรังสี เช่น คนไข้ leukemia, lymphoma, cancer เป็นต้น (26-32)

การติดเชื้อ P. aeruginosa ในที่ต่าง ๆ เช่น ที่บาดแผลจะให้ blue-green pus เมื่อเข้าใน lumbar puncture เกิด meningitis การติดเชื้อที่ urinary tract เกิดขึ้นได้โดยการติดเชื้อจาก Catheters และเครื่องมืออื่น หรือจาก irrigating solution การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเกิดจาก contaminated respiratorsทำให้เกิด necrotizing pneumonia, pulmonary cystic fibrosis การติดเชื้อที่ตาจะทำให้ eye ball ถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ซึ่งเกิดบ่อยมากหลังมีแผลหรือผ่าตัดที่ตา (2) พบว่า การติดเชื้อ P. aeruginosa ในคนไข้ burn เกิดขึ้นได้รุนแรง เนื่องจากมีการขาด immunity เช่น มีความผิดปกติใน alternate pathway

ของ complement และใน antibacterial function ของ neutrophil (33) ในคนไข้เด็กและคนไข้อ่อนแอ เชื้อ P. aeruginosa จะเข้ากระแสเลือดและเกิด fatal sepsis จะมีคนไข้รอดตายจากการติดเชื้อนี้เพียง 50 % เท่านั้น (34) เนื่องจากเชื้อนี้มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ส่วนมาก (35-39)

toxin, enzymes และส่วนประกอบของ cell บางส่วนเป็นส่วนที่มีบทบาทในการทำให้เกิดโรคของ P. aeruginosa ดังนี้

1. Outer slime layer เป็นส่วนที่ทำให้เกิดความรุนแรงมากกว่าส่วนอื่น (40-46) คือ ทำให้เกิด pathogenic effect ของ viable cell, leukopenia และ inhibit phagocytosis และเกิด lethal effect (16)

2. Exotoxin เป็น heat-labile protein สามารถ inhibit protein synthesis และทำให้เกิด tissue necrosis (2,29,45) แต่ antitoxin ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ (39)

3. Proteolytic enzymes เมื่อฉีด protease เข้าในผิวหนังสัตว์ จะเกิด hemorrhagic lesion ภายใน 2-3 นาที (44) และแผลนี้ไม่มีลักษณะเฉพาะ เพราะอาจเกิดลักษณะแผลเช่นนี้ได้เมื่อใช้ proteolytic enzymes ตัวอื่น เช่น trypsin และ proteolytic enzymes ของ Pseudomonas aeruginosa เหล่านี้ เป็นตัวทำลายเนื้อเยื่อ cornea ในการเกิดการติดเชื้อ P. aeruginosa ที่ตา (47,48) แต่ผลของ protease เหล่านี้จะมีผลเฉพาะที่ และจากการตรวจ autopsy ของคนหรือสัตว์ที่ตายด้วย Pseudomonas infection จะมีลักษณะต่างจากที่พบได้ในสัตว์ทดลองที่ตายด้วยการฉีด protease ซึ่งต้องใช้ปริมาณมาก ฉะนั้น protease จึงไม่ใช่ส่วนที่ทำให้ตายได้ในการติดเชื้อนี้ (49) และ antibody ที่ได้จากการ immunized สัตว์ทดลองด้วยส่วนนี้ ก็ไม่สามารถป้องกันหนูถีบจักรจากการติดเชื้อได้ (10)

4. Hemolytic substance Pseudomonas aeruginosa สามารถจะผลิต hemolytic substances 2 ชนิดคือ heat-labile phospholipase C และ heat-resistant glycolipid (49) เมื่อฉีดสารนี้เข้าในสัตว์ทดลองจะทำให้เกิดผื่นแดงใน 5 นาที และสารนี้ไม่เป็นตัวสำคัญที่ทำให้ตายได้ในการติดเชื้อ P. aeruginosa (10,45)

5. Enterotoxin ทำให้เกิด diarrhea เรียก "five-days-fever" หรือ "Shanghai fever" เป็น heat-labile protein (50)

การรักษาและป้องกันการติดเชื้อ Pseudomonas aeruginosa

การรักษาการติดเชื้อ Pseudomonas aeruginosa โดยใช้ยาปฏิชีวนะ มีแนวโน้มได้ผลลดลง เนื่องจากเชื้อนี้มีความต้านทานต่อยาที่ใช้ส่วนมาก (35-39) เช่น Kanamycin, Bacitracin, Tetracyclin เชื้อจะต่อต้านมากที่สุด และยาปฏิชีวนะอื่น ๆ เช่น Amicacin, Tobramycin, Ampicillin, Colymycin และ Polymyxin เชื้อมีความต้านยาน้อยกว่า (3) แต่การต้านยามีแนวโน้มสูงขึ้นตามชนิด และความถี่ของการใช้ยาปฏิชีวนะในแต่ละแห่ง (51) ทำให้การรักษาไม่ค่อยได้ผล อาจต้องใช้ยาปฏิชีวนะ 2 อย่างร่วมกันไป เช่น Gentamycin คู่กับ Carbenicillin (36,38) หรือ Carbenicillin คู่กับ Tobramycin ซึ่งก็หวังผลไม่ได้มากนัก (37) ในคนไข้ที่ถูกไฟไหม้ได้มีการใช้ยาทาป้องกันการติดเชื้อที่แผลร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะด้วย เช่น Mafenide cream (52), 0.5 % Silver nitrate, Gentamycin, Silver Sulfadiazine (53), Silver nitrate chlorhexidine cream และ Sulfonamide (54) แต่ยาทาภายนอกพวกนี้จะใช้ไม่ได้ผลในคนไข้ที่มีแผลไฟไหม้มาก ๆ หรือที่มี sepsis (54) ดังนั้นจึงมีผู้พยายามทำ vaccine และ hyperimmune globulin มาใช้ในการควบคุมการติดเชื้อนี้

การติดเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ในประเทศไทย

ในปี 2509 โสภณ และอิทธิพันธ์ (55) ได้รายงานถึงเชื้อที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่บาดแผลในโรงพยาบาลศิริราช โดยทำสถิติการติดเชื้อใน ward ต่าง ๆ 3 ward คือ แผนกกุมารเวชศาสตร์ แผนกอายุรศาสตร์ และแผนกศัลยศาสตร์ ตั้งแต่ปี 2504, 2506 ถึงปี 2508 พบว่า อัตราการติดเชื้อ P. aeruginosa ได้เพิ่มขึ้นทุกปี โดยเพิ่มจาก 10 % ในปี 2504 เป็น 20 % ในปี 2506 และ 30 % ในปี 2508 เนื่องจากการให้ยาปฏิชีวนะมีผลยับยั้งพวก gram-positive ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการติดเชื้อจาก P. aeruginosa ได้ ซึ่งต่อมาในปี 2513 โสภณ และรจิต (56) ได้ศึกษาถึงการระบาดของเชื้อ P. aeruginosa ในโรงพยาบาลศิริราชอีกครั้งหนึ่ง ปรากฏว่า เชื้อนี้พบได้มากขึ้นในเกือบทุก ward ผู้ป่วยด้านโรงพยาบาลจุฬาฯ ก็ได้มีผู้สำรวจการติดเชื้อนี้เช่นเดียวกัน โดยฉวีวัณณ์และคณะ (57) ในปี 2517 พบว่าการติดเชื้อในทารกแรกเกิด 44 ราย 12 ราย จะติดเชื้อ P. aeruginosa ซึ่งรองจาก S. aureus ซึ่งมี 21 ราย และมีอัตราตายทั้งหมด 16 ราย 8 รายจะตายจากเชื้อ P. aeruginosa ซึ่งคิดเป็น 50 % นอกจากนี้มีรายงานการติดเชื้อในคนไข้ที่ถูกไฟไหม้ ซึ่งพบว่าพบได้บ่อยและมีอาการรุนแรงเป็นปัญหาในการรักษาอย่างมาก และมีอัตราการตายสูงประมาณร้อยละ 50 หรือมากกว่า (58-60) และ P. aeruginosa มักทำให้เกิดโรคในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ ซึ่งอาจเกิดจากโรคเรื้อรังที่เป็นอยู่แล้ว เช่น เบาหวาน, โรคไต, โรคตับ, มะเร็ง, โรคของเม็ดโลหิตต่าง ๆ โดยเฉพาะพวกที่ได้รับ immunosuppressive drugs, cytotoxic agent ซึ่งมีผลทำให้ความต้านทานลดลง (61,62) เชื้อ P. aeruginosa จะเข้าสู่ร่างกายได้ทางบาดแผล หลอดลมจากการเจาะคอหรือใส่ท่อใด ๆ เข้าสู่ร่างกายอีกด้วย นอกจากนี้การติดเชื้อนี้ที่ตาดำ อาจพบได้ และถือเป็นภาวะฉุกเฉินอันหนึ่ง เนื่องจากมีการดำเนินของโรครวดเร็วกว่าโรคติดเชื้ออื่น ๆ ของตา ผู้ป่วยจะตาบอดภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง (63) เนื่องจากการติดเชื้อส่วน

ใหญ่มักจะเกิดในโรงพยาบาล ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงแหล่งที่มาของเชื้อ P. aeruginosa ในโรงพยาบาลซึ่งสรุปได้ดังนี้

1. Airborn route พบเชื้อที่ติดได้ง่ายคือ Staphylococcus aureus และ Pseudomonas aeruginosa(62) พบได้มากในศัลยกรรม (64)

2. Contaminated hospital equipment and solutions เชื้อที่พบได้มากที่สุดคือ P. aeruginosa ซึ่งพบได้ทั้งในน้ำเกลือ น้ำกลั่น และน้ำต้มตาม ward (62) เชื้อนี้พบว่าอยู่ในน้ำบาดาลได้เป็นเวลากว่า 2 เดือน และยังเพิ่มจำนวนได้ใน NS (65) นอกจากนี้ที่ต้องระวังอีกอย่างคือ ยาหยอดตา ยาชาใช้เฉพาะที่ ยาฉีดแบบ multiple dose ซึ่งเคยตรวจพบว่ามี contaminate และเกิดติดเชื้อจากการใช้ยาเหล่านี้ในคนไข้ที่ ร.พ.ศิริราช (62) นอกจากนี้ในเครื่องช่วยหายใจ, การให้ออกซิเจน, กระบวนการต่าง ๆ ที่ต้องใช้ gas ผ่านน้ำ, การ dialysis, cardiac catheterization, การสวนคาท่อปัสสาวะ และการเจาะคอ โดยเฉพาะผู้ป่วยเจาะคอเกือบทุกคนต้องติดเชื้อ P. aeruginosa ซึ่งอาจเกิดจาก self infection หรือติดเชื้อจากเครื่องมือก็ได้ (62)

3. บุคลากรทางแพทย์เป็นพาหะ พบได้มากทั้ง S. aureus และ P. aeruginosa (62,66)

การใช้ vaccine และ hyperimmune globulin ในการป้องกันการติดเชื้อ P. aeruginosa

ความต้านยาระดับสูงซึ่งเกิดใน P. aeruginosa ได้ทำให้เกิดความสนใจในการพัฒนา vaccine และ immunoglobulin มาใช้ เพื่อป้องกันและรักษาการติดเชื้อนี้ในคนไข้ที่มีการเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง (26-32)

vaccine ที่ได้ทดลองทำขึ้นใช้กันและได้ผลดี ได้จากการใช้ Immunogen ต่าง ๆ กันหลายชนิด เช่น

1. Vaccine ที่เตรียมจาก LPS

ในปี 1969 Fisher (21) ได้ทำการจำแนกเชื้อ P. aeruginosa โดยอาศัยหลักการ gglutination และป้องกันโรค แยกได้เป็น 7 immunotypes ซึ่งทั้ง 7 immunotypes นี้พบว่า สามารถจำแนกเชื้อมากกว่า 95 % ที่เป็น pathogenic strain ของ P. aeruginosa ได้ โดยมี protective antigen เป็น LPS ต่อมาได้มีการทำ heptavalent Pseudomonas vaccine จาก purified soluble antigen (22) คือ LPS ของ killed bacteria ทั้ง 7 immunotypes และได้นำ vaccine นี้มาทดลองใช้กับคนไข้ที่ถูกไฟไหม้ พบว่าสามารถลดการติดเชื้อ และการตายได้ในอัตราสูง (67-69) และเมื่อใช้ heptavalent Pseudomonas vaccine ร่วมกับ immunoglobulinซึ่งได้จาก donor ที่ได้รับการฉีด vaccine นี้ พบว่าสามารถลดอัตราการตายของคนไข้ที่ถูกไฟไหม้ที่มี bacteremia หรือ sepsis ได้ในอัตราสูงเช่นกัน (70,71) แต่การใช้ vaccine นี้ในคนไข้ lymphoma และ leukemia (72) โดยเปรียบเทียบการลดลงของการตายจาก Pseudomonas เทียบกับกลุ่ม control ที่ไม่ได้รับ vaccine พบว่าไม่สามารถลดอัตราการตายลงได้ และจากการใช้ vaccine นี้ในคนไข้ เด็กที่เป็น acute leukemia (73) ก็พบว่าไม่มีการลดของอัตราการติดเชื้อและการตายลงได้ แต่จากการศึกษาของ Pennington (34) ในคนไข้ leukemia โดยให้ vaccine ในช่วงที่ไม่ได้ให้ยา immunosuppressive ซึ่งต่างจาก 2 การทดลองแรก ซึ่งให้ vaccine ในช่วงที่ให้ยาด้วย พบว่าการทดลองใช้ในครั้งนี้ได้ titer ของ antibody สูงกว่า และสามารถลดอัตราการตายเนื่องจาก P. aeruginosa ได้ ส่วนในคนไข้ cystic fibrosis การใช้ vaccine นี้ไม่ได้ผล เนื่องจากไม่สามารถกระตุ้นให้สร้าง secretory -

007440

i 17211918

antibody จึงไม่สามารถทำลาย P. aeruginosa ที่ colonized ที่ respiratory tract ได้ จึงเกิด bronchitis, obstruction ที่ bronchus tree มีการคั่งของ secretion เกิด pulmonary - infection และเกิด fatal pneumonitis (34, 74)

2. Vaccine ที่เตรียมจาก slime glycolipoprotein

Slime GLP เป็นส่วนสำคัญที่สุดในการเกิด pathogenesis จากการติดเชื้อ P. aeruginosa (43-46) จากการฉีดส่วนนี้เข้าในหนูถีบจักร พบว่าผลที่เกิดขึ้นในหนูเหมือนกับที่พบได้ในการติดเชื้อ P. aeruginosa คือเกิด toxic manifestations, leukopenia และตายในที่สุด (15,16,75) และได้มีการทดลองใช้ส่วน slime GLP นี้ในการทำ vaccine (13,77,78) เพื่อป้องกันการติดเชื้อ P. aeruginosa พบว่า สามารถป้องกันสิ่งเหล่านี้ได้ (15) โดยสามารถป้องกันหนูถีบจักรจากการ challenge ด้วย homologous strain ได้ 70-90 % (11) และอาจมี cross protection ระหว่าง type บ้าง และที่สำคัญที่สุดคือ สามารถ protect lethal challenge ด้วย viable P. aeruginosa untreated suspension ซึ่งอาจมี labile toxic substances เช่น exotoxin A และ proteolytic enzymes อื่น ๆ ถ้าสิ่งเหล่านี้ได้ถูกสร้างขึ้นใน suspension นี้จริง (5)

3. Cell wall lipid-protein carbohydrate complexes vaccine

Vaccine นี้เตรียมโดย extract immunogen จาก cell wall ของ P. aeruginosa (79) ซึ่งเลี้ยงใน condition ที่มี ammonium lactate เป็น nitrogen source และควบคุมปริมาณของ Mg^{+2} และ Ca^{+2} ใน medium และสกัดเอา immunogen ออกจาก cell wall ของ living bacteria ในระยะ log phase ของการเจริญเติบโต โดยให้ทำปฏิกริยากับ EDTA-glycine mixture เป็น

เวลา 2-3 นาที จะได้ immunogen ประกอบด้วย protein และ Carbohydrate อย่างละ 13 % และ lipid 20 % (79) เมื่อฉีด vaccine นี้ในหนูถีบจักรพบว่าสามารถ protect เชื้อที่ challenge เข้าไปได้ภายใน 3 วันหลังฉีด (79,80) และได้ใช้กับคนไข้ burn ใน Birmingham และ New Delhi พบว่าสามารถป้องกันการตายจากการติดเชื้อนี้ได้ (81,82) ซึ่งก่อนหน้านี้อัตราการตายของคนไข้ burn ใน New Delhi มีมากกว่าครึ่ง และจะตายภายใน 10 วันหลังเข้าอยู่ในโรงพยาบาล

4. Vaccine จาก large molecular fractions of culture filtrate ของ P. aeruginosa

Vaccine นี้มีส่วนประกอบหลายอย่าง ซึ่งอยู่ใน culture filtrate ของ P. aeruginosa และเป็นสารพวกโมเลกุลใหญ่ที่ไม่ผ่าน dialyse tube (41) vaccine นี้สามารถป้องกัน rats และ mice จาก lethal infection ด้วยหลาย serotype ต่าง ๆ กันได้ และสามารถป้องกันการติดเชื้อจาก E. coli และ Listeria monocytogenes ด้วย

จากความรู้เกี่ยวกับ Pseudomonas vaccine ดังกล่าวจะเห็นได้ว่า vaccine แต่ละชนิดต่างก็ใช้ได้ผลดี แต่ไม่เคยมีการนำ vaccine แต่ละอย่างมาศึกษาเปรียบเทียบใช้ใน condition เดียวกัน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบ vaccine 2 ชนิดคือ จาก LPS และ slime โดยส่วน slime จะเตรียมโดยใช้ whole cell ซึ่งเลี้ยงใน condition ที่จะให้ slime ได้มากที่สุดแทน (83) และเนื่องจากในประเทศไทย immunotype 1, 2 และ 4 จะพบมากที่สุดในผู้ป่วย (3) จึงได้นำเอาเชื้อเหล่านี้มาทำการวิจัยโดยมีจุดมุ่งหมายของการวิจัยคือ

1. เพื่อศึกษาคุณภาพของวัคซีน 2 ชนิดคือ whole cell และ LPS vaccine ซึ่งเตรียมจากเชื้อ P. aeruginosa 3 immunotypes คือ 1, 2 และ 4 ว่าจะสามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้าง antibody ได้ต่างกันหรือไม่

2. เพื่อศึกษาว่า vaccine แบบ monovalent และ trivalent จะมีผลต่อการกระตุ้นให้เกิด antibody ได้แตกต่างกันหรือไม่

3. เพื่อทดสอบว่า immunoglobulin ทั้งแบบ monovalent และ trivalent จะใช้ทำ passive protection ในหนูถีบจักรได้ต่างกันหรือไม่

4. เพื่อทดสอบว่าเชื้อ P. aeruginosa ทั้ง 3 immunotypes มี cross antigenicity ต่อกันหรือไม่