บทที่ 2
ทบทวนเอกสาร

โรคเมลิออยโดซิสเกิดจากเชื้อ *B. pseudomallei* ปกติเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในดินและน้ำ (environmental saprophyte) อุบัติการณ์ของโรคจะเกิดมากที่สุดในช่วงที่มีมรสุม และฤดูฝน ซึ่งเชื่อว่าน้ำจะเป็นตัวพาเชื้อจากชั้นใต้ดินออกมาสู่ชั้นผิวดิน ทำให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์และสัตว์ได้ ซึ่งประเทศไทยมักจะเกิดขึ้นกับชาวนาเป็นส่วนมาก และเชื้อเหล่านี้สามารถติดได้โดยการสูดดม การกินน้ำและอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ การติดเชื้อทางบาดแผล การสำลักน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อน (Dance, 2000) ในกรณีที่ผู้ป่วยมีฝีที่ต่อมลูกหมาก จะสามารถแพร่เชื้อทางเพศสัมพันธ์ได้ (Haran *et al.*, 2001) ส่วนในสัตว์ทดลองมีการติดเชื้อโดยการกิน การหยอดจมูกหรือฉีดเข้าหลอดลม การฉีดเข้าในช่องท้อง ใต้ผิวหนังและทางแมลงกัด (Dance, 2000) แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาในแง่การติดต่อระหว่างมนุษย์และสัตว์ เมื่อทำการเก็บตัวอย่างจากดินและน้ำจากทุ่งนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าตัวอย่าง 2 ใน 3 ตัวอย่างจะมีเชื้อ *B. pseudomallei* ปนอยู่ นอกจากนี้มีรายงานว่าเด็กอายุตั้งแต่ 4 ปี กว่า 80 % มีระดับแอนติบอดีต่อเชื้อนี้ (Dance, 2000) ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเคยสัมผัสเชื้อ *B. thailandensis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคแต่มีปฏิกิริยาข้ามของระบบภูมิคุ้มกัน ปัจจัยเสี่ยงที่มีผลทำให้เกิดโรคเมลิออยโดซิสในมนุษย์ ได้ง่ายขึ้น ได้แก่ ภาวะที่ร่างกายมีกระบวนการเผาผลาญสารอาหาร (metabolism) ผิดปกติ โดยเฉพาะในภาวะที่ป่วยด้วยโรคเบาหวาน (diabetes mellitus) ไตวายเรื้อรัง พิษสุราเรื้อรัง (alcoholism) โรคปอดเรื้อรัง โรคหัวใจวายเรื้อรัง โรคที่ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติ เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) เนื้องอกที่ต่อมน้ำเหลือง (lymphoma) ภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunodeficiency) การได้รับการรักษาด้วยสเตียรอยด์เป็นเวลานานหรือในขนาดที่สูง โรคเนื้องอก เป็นต้น (Short, 2002)

อาการของโรคนี้ในมนุษย์เกิดได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังและมีระยะฟักตัวนานเป็นเดือนหรือปี อาการแบบเฉียบพลันมีได้หลายรูปแบบหรืออาจมีอาการหลายระบบร่วมกัน เช่น โลหิตเป็นพิษ ปอดบวม มีหนองในช่องอก (empyema) มีฝีเฉพาะที่ แผลติดเชื้อภายนอก ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ข้ออักเสบแบบติดเชื้อ (septic arthritis) ฝีในอวัยวะภายใน (visceral abscess) โดยเฉพาะที่ตับและม้าม เป็นต้น ส่วนอาการแบบเรื้อรัง มักพบปอดอักเสบหรือฝีในอวัยวะภายใน ตัวอย่างที่เก็บมาตรวจเพื่อวินิจฉัยได้แก่ เลือด เสมหะ สิ่งคัดหลั่งจากแผล หนอง ของเหลวจากร่างกาย (body fluid) ตัวอย่างที่ป้ายจากลำคอ (throat swab) ปัสสาวะ เป็นต้น โดยตัวอย่างจากเลือด ฝี และทางเดินปัสสาวะมักพบเชื้อ *B. pseudomallei* ค่อนข้างบริสุทธิ์ แต่ถ้าตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจ มักจะพบเชื้อหลายชนิดและเชื้อชนิดนี้มักเจริญเติบโตได้ช้าเมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ดังนั้นเมื่อคนไข้เข้ามารักษาในโรงพยาบาลควรเก็บตัวอย่างเพื่อทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก

เลือด เสมหะ ตัวอย่างจากการป้ายในลำคอ ปัสสาวะ และตัวอย่างอื่นๆ ร่วมด้วย นอกจากนี้ขณะทำการรักษาควรเก็บตัวอย่างเพาะเชื้อและทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะจากตำแหน่งที่ให้ผลบวกทุกสัปดาห์ เพื่อดูผลการรักษาและการดื้อยา (Sirisinha *et al.*, 2000)

อาการของโรคเมลิออยโดซิสจะไม่มีอาการจำเพาะ โดยทั่วไปจะมีอาการแบบการติดเชื้อแบคทีเรียทั่วไป ทำให้การวินิจฉัยโรคจากอาการทำไม่ได้ ลักษณะของอาการจะแบ่งออกเป็น 3 แบบคือ

1. แบบเฉียบพลัน (acute form)
2. แบบกึ่งเฉียบพลัน (subacute form)
3. แบบเรื้อรัง (chronic form)

ลักษณะของอาการแบบเฉียบพลันในมนุษย์ส่วนใหญ่มักพบได้ 2 ลักษณะ คือ อาการแบบเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจ (acute pulmonary form) และอาการติดเชื้อในกระแสโลหิตแบบเฉียบพลัน (acute septicemic form) ผู้ป่วยที่มีอาการแบบเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจ จะมีไข้สูงและหายใจลำบาก (pulmonary distress) พบฝีในอวัยวะภายใน (visceral abscesses) และเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว ถ้าไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม ส่วนลักษณะของการติดเชื้อในกระแสโลหิตแบบเฉียบพลันที่พบได้คือ ไม่สบายตัว (malaise) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) บางครั้งพบอาการอัมพาตของร่างกายส่วนล่างอย่างเฉียบพลัน (acute paraplegia) ไขสันหลังอักเสบ (myelitis) บางครั้งพบฝีที่ต่อมลูกหมาก (prostatic abscess) (Haran *et al.*, 2001) การป่วยแบบเฉียบพลันมีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูงมาก

ลักษณะการป่วยแบบกึ่งเฉียบพลันคือจะต้องมีไข้ติดต่อกันเป็นเวลานานหลายวัน (prolonged febrile illness) และมีฝีที่อวัยวะภายใน หรืออาจพบฝีที่สมอง (Currie *et al.*, 2000) ได้เช่นกัน จะสามารถเพาะเชื้อได้จากตัวอย่างเลือด หนอง ปัสสาวะ ตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกายและสิ่งคัดหลั่ง ผู้ป่วยอาจจะเสียชีวิตภายในไม่กี่สัปดาห์หรืออาจนานเป็นเดือน

ลักษณะการป่วยแบบเรื้อรัง บางครั้งไม่แสดงอาการ แต่จะพบฝีที่อวัยวะต่างๆ เช่น ปอด ตับ ม้าม ต่อมน้ำเหลือง ต่อมลูกหมาก สมอง ข้อต่อ กระดูก กล้ามเนื้อ ผิวหนัง อาจพบการอักเสบของกระดูกและไขสันหลัง (osteomyelitis) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เกิดพังผืดที่กระเพาะปัสสาวะ (cystic fibrosis) (Schulin and Steinmetz, 2001)

โรคเมลิออยโดซิสเป็นได้ทั้งในคนและสัตว์ เช่น สุนัข แมว หนู กระต่าย โค กระบือ แพะ แกะ ม้า ลา ฟ่อ กวาง ลิง นกแก้ว ไก่ เป็ด จระเข้ และสัตว์อีกหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานการตายของโลมาและวาฬที่เลี้ยงในเกาะฮ่องกง ประเทศจีน ด้วยโรคนี้ จำนวน 23 ตัว ในระหว่างปี 1982 - 1993 (Kinoshita, Ocean Park record) จากรายงานการเกิดโรคเมลิออยโดซิสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในทะเลของ Hicks และคณะ (2000) พบว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในทะเลหลายชนิดสามารถติดโรคนี้ได้ เช่น วาฬเพชรฆาต (Killer whale, *Orcinus orca*) วาฬเพชรฆาต เทียม (False

killer whale, *Pseudoorca crassidens*) โลมาปากขวด (*Tursiops truncatus* ทั้งชนิดย่อย *aduncus* และ *gilli*) โลมา Pacific white - side (*Lagenorhynchus obliquidens*) โดยจะพบว่ามีการเกิดโรคในฤดูที่มีมรสุม ซึ่งอาจทำให้เชื้อที่อยู่ในดินปนเปื้อนลงสู่ทะเลหรือฟุ้งกระจายในอากาศ ในสัตว์เหล่านี้ส่วนมากพบอาการแบบเฉียบพลัน โดยจะแสดงอาการไม่จำเพาะคือ ซึม เบื่ออาหาร อ่อนแรง โดยจะแสดงอาการเป็นเวลา 0 - 19 วัน (เฉลี่ย 4 วัน) ก่อนเสียชีวิต มักพบว่ามีไข้ 2 - 3 วัน และมีอาการหายใจลำบากประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนเสียชีวิต ส่วนกรณีโลมาที่ป่วยแบบเรื้อรังพบว่าแสดงอาการเป็นเวลาประมาณ 10 เดือน โดยมีอาการอ่อนแรง พฤติกรรมเปลี่ยนแปลง ก่อนเสียชีวิต 5 เดือน แสดงอาการเบื่ออาหารและแสดงอาการป่วยแบบเฉียบพลัน 2 - 3 วันก่อนเสียชีวิต รอยโรคที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า (gross lesion) จากการผ่าซากที่พบคือการบวมน้ำ มีเลือดออก มีจุดหรือตุ่ม (nodule) สีขาวถึงเหลืองที่ปอด ตับขยายใหญ่ และมีฝีขนาดเล็ก ส่วนในม้ามมักพบจุดเลือดออก และมีการขยายใหญ่และอาจพบฝีได้บ้างแต่ไม่บ่อย บางครั้งพบการคั่งของเลือด (hyperemia) และจุดเลือดออกในผนังกระเพาะอาหารส่วนที่ 2 และ 3 (second and third compartment of stomach) ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบจุดเนื้อตายเป็นหย่อม (focal necrosis) และฝีขนาดเล็ก (microabscess) และผลการเพาะเชื้อพบว่าเป็น *B. pseudomallei* โดยพบฝีมากที่ปอด ตับ และม้าม บางครั้งพบได้ที่ต่อมน้ำเหลือง ต่อมหมวกไต แต่ไม่พบที่ไตและกล้ามเนื้อหัวใจ ที่ตำแหน่งเนื้อตายจะพบการเพิ่มของ eosinophil พบเศษนิวเคลียส (nuclear debris) ของเหลวที่มีไฟบริน (fibrin exudates) และการมีเลือดออก (hemorrhage) มีการรวมตัวกันของนิวโทรฟิล ไม่เกิด encapsulate รอบรอยโรค พบโคโลนีของ *B. pseudomallei* ในบางตัวอย่าง บางครั้งพบก้อนลิ่มเลือดขนาดเล็กที่มีไฟบริน (fibrinous microthrombi) แสดงถึงการเกิด Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) ในเส้นเลือดที่ต่อมหมวกไต ตับ ม้าม และต่อมน้ำเหลือง (Hicks *et al.*, 2000)

B. pseudomallei จัดเป็น facultative intracellular organism เนื่องจากว่าเชื้อจะสามารถผ่านผนังเซลล์เข้าไปอยู่ในเซลล์ได้ทั้งในเซลล์ที่สามารถเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic cell) และเซลล์ที่ไม่สามารถเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (non - phagocytic cell)โดยเชื้อสามารถเข้าสู่เซลล์ alveolar macrophage ของหนู rat และพบใน vacuoles ของ human monocyte - like U937 cell (Jones *et al.*, 1996) *B. pseudomallei* สามารถทำลายเซลเป้าหมายโดยวิธีเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ทั้งใน phagocytic และ non - phagocytic cell ได้ (Kespichayawattana *et al.*, 2000) มีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ และเหนี่ยวนำทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ (cell fusion) เกิดเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (multinucleated giant cell) ได้ (Harley *et al.*,1998) นอกจากนี้ยังพบว่า*B. pseudomallei* มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งจะมีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลง blast cell ของ lymphocyte และลดจำนวนของ T - helper cell (Kalachev *et al.*, 1997)

เชื้อ *B. pseudomallei* สามารถสร้าง potential virulent factor หลายชนิดคือ mucoid, endotoxin, protease, lecithinase, lipase, siderophore, hemolysin, flagellin protein, outer membrane protein, lipopolysaccharide (LPS), capsule หรือ exopolysaccharide (EPS) ซึ่งมีหน้าที่ป้องกันเชื้อจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย host และอื่น ๆ เป็นต้น (Piven and Iliuknin, 2000) และจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการตรวจหาระดับของ cytolethal toxin (CLT) จากดิน มนุษย์ที่ป่วยด้วยอาการ encephalitis และในแพะ พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากดินมีระดับของ cytotoxin ที่ต่ำ ส่วนในมนุษย์ที่ป่วยจะมี cytotoxin ในระดับที่สูงและในแพะจะมีระดับที่สูงที่สุด (Haase *et al.*,1997) เมื่อทำการวิเคราะห์กรดอะมิโนของ flagellin protein ด้าน N - terminus พบว่ามีลักษณะ (homology) เหมือนกับ flagellin ของ *Proteus mirabilis, Bordetella bronchiseptica* และ *Pseudomonas aeruginosa* แต่ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่และบทบาทต่อกลไกการก่อโรค (สมหญิง , 2541) ส่วนของ lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อประกอบด้วยน้ำตาลหลัก ๆ คือ D - glucose, L - glycerol - D - manno - heptose, D - glycosamide และ 3 - hydroxypalmitic acid เป็น amide - lined fatty acid ไม่พบ 2 - keto - 3 - deoxyoctanoic acid และเมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของ O - polysaccharide (OPS) พบว่ามี 2 ชนิดคือ OPS type I และ OPS type II จากการศึกษาพบว่า O - PS type I มีองค์ประกอบเป็น 1,3 - linked homopolymer ของ 2 - O - acetylated - 6 - deoxy - ß - D - manno - heptopyranosyl residue ส่วน OPS type II มีองค์ประกอบของ O - PS เป็น repeating disaccharide unit ซึ่งมีโครงสร้างเป็น 3 - ß - D - glycopyranose - (1 - 3) - 6 - deoxy - α - L - talopyranose (สมหญิง, 2541) Gauthier และคณะ (2000) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิต protease และพบว่า proteolytic activity ไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงโดยดูค่า LD_{50} ในหนู mice เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ 6068 VIR มีการผลิต protease มากกว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำถึง 17 เท่า ในเชื้ออื่นๆจะพบ protease จากเชื้อบางชนิดมีผลสำคัญต่อกลไกการเกิดโรค เช่นprotease ที่ผลิตโดยเชื้อ *Legonella pneumophilia* เชื่อว่าอาจทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการแพร่เชื้อสู่เนื้อเยื่อ และ protease บางชนิดอาจเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียใน macrophage

จากการศึกษาพบว่าเชื้อนี้มี 2 สายพันธุ์ย่อย ซึ่งมีลักษณะภายนอกและคุณลักษณะทางชีวเคมีเหมือนกันทุกประการ แตกต่างกันที่ความสามารถในการใช้น้ำตาล L - arabinose ทำให้แยกได้เป็น 2 สายพันธุ์ย่อย คือ สายพันธุ์ที่สามารถใช้ L - arabinose ได้ (Ara^+) เป็นเชื้อที่พบได้ในดินไม่ก่อให้เกิดโรค (avilurent) ปัจจุบันเรียกอีกชื่อว่า *B. thailandensis* (Brett *et al.*,1998) และสายพันธุ์ที่ไม่สามารถใช้ L - arabinose ได้ (Ara^-) คือ *B. pseudomallei* ซึ่งแยกได้จากดินและตัวอย่างจากผู้ป่วย มีความสามารถก่อให้เกิดโรคเมลิออยโดซิสได้ (virulent) เมื่อนำเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มาศึกษาด้วยวิธี SDS - PAGE และ Lectin - binding profile พบว่าเชื้อทั้ง 2 มี antigenicity แตกต่างกัน คือ

เชื้อสายพันธุ์ Ara $^{-}$ จะมี 200-kDa surface antigen (exopolysaccharide ; EPS) ขณะที่เชื้อสายพันธุ์ Ara^{+} ไม่มี โดยคาดว่า EPS จะมีผลต่อความรุนแรงของเชื้อ เนื่องจากทำหน้าที่คล้าย capsule ป้องกันเชื้อจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย host เช่น complement activation, phagocyte - mediated killing และเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรค โดยกระตุ้นการสร้าง cytokine (TNF, IL-8, IL-10) ในเม็ดเลือดขาวหลายชนิด จากการวิเคราะห์ EPS ด้วยวิธี mass spectrometric และ NMR spectroscopic technique ร่วมกัน พบลักษณะ linear tetrasaccharide repeating unit ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส 3 residue , 2 - linked O - acetyl group และ KDO (3 - deoxy - D - manno - 2 - octalasonic acid) ซึ่งต่างจากองค์ประกอบน้ำตาลของ LPS ส่วนความไวต่อยาปฏิชีวนะ และการเกิดปฏิกิริยากับ polyclonal antibody ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน (Sirisinha *et al.*, 1998) จากการเก็บตัวอย่างจากดินในประเทศไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าตัวอย่างเชื้อ *B. pseudomallei* ประมาณ 75 % เป็นสายพันธุ์ Ara^{-} ขณะที่เชื้อที่เก็บจากผู้ป่วย 100 % เป็นสายพันธุ์ Ara^{-} ทั้งหมด เชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด TBSS (Basal Salt Solution contain L - threonine + colistin) จะให้ผลอัตราการแยกเชื้อ (isolation rate) และการยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่นดีที่สุด และเมื่อขุดดินในนาข้าวลึกลงจะมีอัตราการแยกเชื้อเพิ่มขึ้น (Wuthiekanun *et al.*, 1995)

จากการศึกษาของ Anuntagool และคณะ (2000) ทำการเพาะแยกเชื้อจากหลายประเทศที่เกิดโรค คือเชื้อจากผู้ป่วยจากไทย จีน กัมพูชา บังคลาเทศ เชื้อจากสัตว์จากฮ่องกง และมาเลเซีย พบว่าเชื้อมีลักษณะภายนอก (morphology) และลักษณะทางชีวเคมีเหมือนกันแต่สามารถแยก LPS ได้ 2 ชนิด ซึ่งต่างกันที่โครงสร้างทางเคมีของ O - polysaccharide (O-PS) โดยใช้วิธี SDS - PAGE ในการศึกษา heterogenicity พบว่าสามารถแยก LPS ได้ 3 รูปแบบ คือ typical ladder, atypical ladder และ no ladder โดยดูจากลักษณะและ electrical mobility ของ band ซึ่งย้อมด้วย silver stain LPS จากเชื้อส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นขั้นบันได (ladder) แบบถี่ แต่เชื้อทั้ง 3 รูปแบบมี endotoxic activity เหมือนกันโดยใช้ *Limulus amebocyte* lysate assay เมื่อทำการศึกษาชนิดของ LPS 2 ชนิด ด้วยวิธี Immunoblot ใช้ 9D5 MAb (monoclonal antibody) ต่อ LPS พบว่า LPS typical pattern เกิดปฏิกิริยากับ MAb ได้ 2 รูปแบบ คือ type A และ type B โดย LPS type A จะเกิดปฏิกิริยาที่ O - PS repeating unit ตำแหน่ง 29 - 68 kDa ขณะที่ type B จะเกิดที่ตำแหน่ง 18 - 43 kDa เชื้อทั้งหมดที่ศึกษาพบว่าเป็น type A 99.44 %, type B 0.56% ซึ่ง type B พบเฉพาะเชื้อที่ได้จากตัวอย่างสัตว์ป่วยในฮ่องกงเท่านั้น (Anuntagool *et al.*, 2000) เมื่อใช้ immune sera จากเลือดของผู้ป่วยและหนูmice ใน indirect ELISA พบว่า LPS จากเชื้อ Ara^{+} และ Ara^{-} ให้ผลเหมือนกัน ดังนั้น LPS จึงอาจไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงและกลไกการก่อโรคก็ได้ (Anuntagool *et al.*,

1998) เมื่อศึกษาถึงการหลั่ง LPS สู่อาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อทั้ง 2 biotype มีการหลั่ง LPS เหมือนกัน (Anuntagool *et al.*, 2000)

เมื่อศึกษาถึง genome ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยวิธี Pulse field gel electrophoresis พบว่า Ara^- มี 2 replicon (2 chromosome) ขนาด 3562 $\pm$ 73 และ 2974 + 40 kilobasepair (kbp) รวมแล้วมี 6.5 ล้านคู่เบส ขณะที่เชื้อสายพันธุ์ Ara^+ มี 2 replicon เช่นกัน แต่ขนาดเล็กกว่า เมื่อศึกษาถึงลำดับ nucleotide พบว่าโดยเฉลี่ยยีน ของ *B. pseudomallei* มีขนาดประมาณ 1031 คู่เบส , G+C content 65.7% มี genome ที่มียีนมากถึง 89% coding capacity แสดงว่าน่าจะมี ประมาณ 5600 ยีน (Songsivilai and Dharakul, 2000) และเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์แตกต่างกันเล็กน้อยที่ลำดับ rRNA, DNA hybridization และ positive transformation ของ DNA auxotrophic mutant (Iliukhin *et al.*, 2002)

การวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสปัจจุบันทำได้หลายวิธี คือ การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา วิธีทางอณูชีวโมเลกุล เป็นต้น แต่วิธีที่ถือเป็นมาตรฐานในปัจจุบัน คือการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย (bacterial culture) โดยขึ้นกับระบบหรืออวัยวะที่ติดเชื้อซึ่งอยู่ในตำแหน่งที่สามารถเก็บตัวอย่างได้ ชนิดของตัวอย่างที่ใช้ในการวินิจฉัยโรค ได้แก่ เลือด ปัสสาวะ เสมหะ สิ่งคัดหลั่งต่างๆ หนองจากฝีหรือแผล เป็นต้น แต่ใช้เวลานานอย่างน้อย 3 - 4 วัน ในการแยกเชื้อ อีกปัญหาคืออาจมีความคล้ายกันของ *B. pseudomallei* กับ *Pseudomanas spp.* อื่นหรือเชื้อกลุ่มอื่น เช่น *Bacillus spp.* (Sirisinha *et al.*, 2000) เชื้อ *B. pseudomallei* ปกติเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ในสิ่งแวดล้อม (sarprophyte) สามารถขึ้นได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป ดังนั้นในการเพาะเชื้อจากตัวอย่างควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน เช่น Blood agar (BA), MacConkey agar, Cystine - lactose - electrolyte deficient (CLED) agar หรืออาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะคือ Ashdown's agar (ASH) และ Selective broth (SB) ในกรณีเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะ (non - selective plate) ควรบ่มที่ 37 - 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนจะ subculture ลง Ashdown's agar หรือ BA เนื่องจากถ้ามีเชื้อปริมาณน้อยและเชื้อเจริญเติบโตได้ช้ากว่าเชื้อชนิดอื่นบางชนิด หรือบางกรณีเช่น เกิดฝีที่ตับหรือม้าม มักมีเชื้อจำนวนน้อยในกระแสเลือด ดังนั้นจึงต้องบ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึง subculture ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะต่อไป จึงจะพบเชื้อขึ้น เมื่อย้อมสีแบคทีเรียจากตัวอย่างโดยตรง เช่น Gram stain จะพบแบคทีเรียรูปแท่ง (rod) ติดสีแกรมลบ เมื่อย้อมด้วย neutral red เป็นเวลา 5 นาที จะพบแบคทีเรียรูปท่อนยาว (slender bacilli) ติดสีจางขอบมน อาจติดสีเข้มที่ขั้วทั้ง 2 (bipolar staining) แต่ในตัวอย่างที่เป็นหนองมักมองเห็นตัวเชื้อได้ยาก

หลังจากที่เชื้อแบคทีเรียขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 24 - 48 ชั่วโมง ควรย้อมสี Gram เพื่อดูลักษณะการติดสี การแปลผล ASH ต้องดูผล 4 วัน ก่อนสรุปว่าผลเป็นลบ การเพาะเชื้อด้วย SB เชื้ออาจขึ้นช้าจะทำให้เกิดสีขาวขุ่น มีลักษณะยับย่นบนผิวหน้า แต่เชื้ออื่นอาจเจริญบนผิวหน้าได้เช่นกัน

เช่น *Pseudomonas aeruginosa* หรือเชื้อรา เชื้อ *B. pseudomallei* จะให้ผล oxidase (+), ADH (+), Nitrate (+), LDC (-),ONPG (-) Adonitol (+), 5 - ketogluconate (+), D - xylase (+), Dulcitol (-), Erythritol (-), Trehalose (-) ถ้าเพาะเชื้อบน Columbia agar ที่มีส่วนผสมของ Gentamicin และ Colistin (อย่างละ10 ไมโครกรัม) เชื้อ *B. pseudomallei* จะมีลักษณะ metallic sheen แม้ว่าวิธีตรวจแยกทางชีวเคมีธรรมดาจะสามารถแยกเชื้อได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แต่หากใช้ API 20 NE (BioMerieux, France) ในการแยก เชื้อ *B. pseudomallei* ได้ (Wuthiekanun *et al.*, 1996) ซึ่งมีความสะดวกและแม่นยำกว่า แต่มีราคาค่อนข้างสูง การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ไวต่อ third และ fourth generation cephalosporin ได้แก่ ceftazidime, ceftriaxone และ cefotaxime ยากลุ่ม imipenem, meropenem, piperacillin, amoxicillin - clavulonic acid, ticarcillin - clavulonic acid, tetracycline, doxycycline, azlocillin, aztreonam, sulfamethoxazole - trimethoprim ในการรักษาผู้ป่วยควรทำ sensitivity test ของเชื้อจากตำแหน่งต่าง ๆ และที่ระยะเวลาต่างๆ เพื่อเฝ้าระวังการดื้อยา (Walsh and Wuthiekanun, 1996)

เนื่องจากข้อด้อยเรื่องระยะเวลานานที่ใช้ในการเพาะแยกเชื้อ ขณะที่ผู้ป่วยต้องการการรักษาอย่างทันที และเชื้อนี้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั่วไป ต้องใช้ยาปฏิชีวนะที่มีราคาสูงและรักษาเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีวินิจฉัยขึ้นมาหลายวิธี เพื่อให้สามารถวินิจฉัยได้รวดเร็วและแม่นยำที่สุด ส่วนมากจะใช้วิธีในทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น การตรวจหา antigen, antibody วิธีทางอณูชีวโมเลกุล (molecular biology) โดยวิธีต่าง ๆ มีข้อดีและข้อด้อยต่างกัน วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสเนื่องจากสามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็ว โดยมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาได้ทั้ง antigen และantibody การตรวจหา antigen มีข้อดีคือเป็นการบ่งถึงภาวะการติดเชื้อในเวลานั้น ซึ่งทำให้สามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้อง โดยไม่มีปัญหาเกี่ยวกับ background antibody เหมือนการตรวจหา antibody ในพื้นที่มีโรคชุกชุม วิธีการตรวจหา antigen มีการพัฒนาขึ้นมาหลายวิธี ตั้งแต่การตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* โดยตรงจากหนอง แผล เสมหะ การตรวจหาผลิตภัณฑ์ที่หลั่งออกมาโดยเชื้อ *B. pseudomallei* เช่น endotoxin, lipase, protease, lecithinase, exotoxin, protein, LPS, exopolysaccharide, enzyme ต่าง ๆ ในเลือด ปัสสาวะ ตัวอย่างที่ป้ายจากลำคอ เป็นต้น การตรวจหา antigen สามารถใช้วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาเช่น ELISA, IHA, Latex agglutination, Immunofluorescence เป็นต้น แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน วิธี ELISA บางวิธียังมีความไวต่ำหรือบางวิธียังไม่เคยทำการประเมินด้วยตัวอย่างทางคลินิก (clinical sample) วิธี sandwich ELISA ซึ่งพัฒนาเพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะแต่มีข้อจำกัดมาก และราคาสูงกว่าวิธี Latex agglutination มีความไวไม่สูงพอเมื่อใช้ตรวจจากตัวอย่างทางคลินิกและต้องมีความเข้มข้นของเชื้อมากพอจึงให้ผลบวก ส่วนวิธี Fluorescence ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescent microscope) ซึ่งมีราคาสูงและต้องใช้ประสบการณ์ในการแปลผล

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีตรวจหา antibody ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* หลายวิธี วิธีเก่าที่เคยใช้ในอดีต เช่น Complement fixation ปัจจุบันไม่ใช้ แต่บางวิธีเช่น Indirect hemagglutination (IHA) ซึ่งอาศัยหลักการเคลือบแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงของแกะ ถ้าในตัวอย่างมี antibody ต่อ *B. pseudomallei* จะเกิดการจับกันเป็นร่างแหและตกตะกอนให้เห็น วิธีการนี้ยังมีการใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากข้อดี คือทำได้ง่าย สะดวก ไม่ต้องใช้อุปกรณ์หรือเครื่องมือที่ยุ่งยาก อ่านผลได้อย่างรวดเร็ว และไม่ต้องใช้ประสบการณ์และความชำนาญสูง แต่การแปลผลยังมีปัญหาในกรณีของผู้ที่เคยสัมผัสเชื้อมาก่อนจะมี background antibody โดยเฉพาะผู้ที่อยู่ในพื้นที่มีโรคชุกชุม นอกจากนี้ความไวและความจำเพาะยังต่ำ (Sirisinha *et al.*, 2000) เนื่องจากความแตกต่างระหว่าง *B. thailandensis* กับ *B. pseudomallei* ที่การมีหรือไม่มี EPSทำให้มีการพัฒนา MAbหลาย clone เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแยกการติดเชื้อ*B. thailandensis* กับ *B. pseudomallei* เช่น clone 3015 ซึ่งผลิต IgG_1 จะทำปฏิกิริยากับ EPS ที่พบในเชื้อสายพันธุ์ Ara^- เท่านั้น การจดจำ epitope ของ MAb 3015 นี้ไม่สัมพันธ์กับลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งการเจริญแบบหยาบ (rough), เรียบ (smooth) และแบบเยิ้ม (mucoid growth) ทุกสายพันธุ์สามารถเกิดปฏิกิริยากับ MAb 3015 หรือ MAb 5F8 ซึ่งผลิต IgM ได้ ซึ่งเมื่อใช้ในการทำ indirect ELISA พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง (Rugdech *et al.*, 1995) ส่วน MAb 4B11 ซึ่งผลิต IgG_2 สามารถเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะกับ 200 kDa EPS เมื่อศึกษาด้วยวิธี Immunoblot analysis (Anuntagool and Sirisinha, 2002) อีกวิธีที่มีการพัฒนาขึ้นมาเพื่อวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสในมนุษย์โดย Rugdech และคณะ (1995) คือ indirect ELISA ที่ใช้ 200 kDa exopolysaccharide (EPS) เป็น antigen ซึ่งพบเฉพาะในเชื้อสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคได้ (Ara^-) พบว่ามีความจำเพาะต่อ antibody ของ *B. pseudomallei* สูง และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนของเชื้อชนิดอื่น

วิธีตรวจหาในทางอณูชีวโมเลกุล เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งมีความแม่นยำค่อนข้างสูง เช่นวิธี Hybridization และ Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งวิธี Hybridization ยังมีความไวค่อนข้างต่ำ ขณะที่ PCR มีความแม่นยำดีกว่า แต่มีข้อจำกัดเรื่องเครื่องมือที่มีราคาสูง ส่วนที่ใช้เป็น primer ในการตรวจหาคือ 23sribosomal RNA, 16sRNA รอยต่อระหว่าง 16s และ 23sRNA และ DNA probe การใช้ primer หลายชนิดร่วมกันสามารถตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* ได้แม้มีเชื้อเพียง 1 เซลล์ แต่ยังไม่มีการประเมินวิธีเหล่านี้ในสถานการณ์จริงทางคลินิก จากการศึกษาการใช้ 16sRNA เป็น PCR primer พบว่ามีความไวสูงถึง 100% แต่ความจำเพาะค่อนข้างต่ำ พบว่า 1 ใน 3 ของผู้ที่ติดเชื้ออื่นให้ผลบวกต่อวิธีนี้ ซึ่งทำการศึกษากับตัวอย่างจำนวนน้อย (Sirisinha *et al.*, 2000)