



โรคเมลิออยด์ในสัตว์

ISBN 978-616-629-729-4

MELIOIDOSIS

IN ANIMALS

สพ.ญ.ธรรมรัฐ สุจิต

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์





โรคเมลิออยด์ในสัตว์ MELIOIDOSIS IN ANIMALS

เรียบเรียงโดย

สพ.ญ.ธรรมรัฐ สุจิต

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

พิมพ์ครั้งที่ 1 จำนวน เล่ม

ปีที่พิมพ์ พ.ศ. 2568

ข้อมูลทางบรรณานุกรม

จัดทำโดย นางธรรมรัฐ สุจิต

เรื่อง โรคเมลิออยด์ในสัตว์

Melioidosis in animals

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2568, 65 หน้า

ISBN (e-book) 978-616-629-729-4

สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามคัดลอก จัดพิมพ์ หรือทำซ้ำรวมทั้งดัดแปลงเป็นสื่ออื่น ๆ ก่อนได้รับอนุญาต

คำนำ

คู่มือโรคเมลิออยด์ในสัตว์ฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อรวบรวมและเผยแพร่ข้อมูลทางวิชาการที่สำคัญเกี่ยวกับโรคเมลิออยด์ในสัตว์ ทั้งจากแหล่งข้อมูลภายในประเทศและต่างประเทศ โดยผู้เขียนได้ประมวลเนื้อหาจากเอกสารทางวิชาการ การฝึกอบรม ประสบการณ์ในการปฏิบัติงานด้านการชันสูตรโรคสัตว์ ตลอดจนการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ มาจัดเรียบเรียงให้มีความเข้าใจง่าย เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์

เนื้อหาในคู่มือเล่มนี้ประกอบด้วยข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลสำคัญของโรคเมลิออยด์ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ เทคนิคและวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในปัจจุบัน ข้อมูลทางระบาดวิทยา แนวทางการรักษา การควบคุมและการป้องกันโรค โดยมุ่งเน้นถึงความสำคัญของโรคในสัตว์และสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานด้านสุขภาพสัตว์ ตลอดจนการดำเนินงานของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องอย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ คู่มือเล่มนี้ยังได้รวบรวมเนื้อหาเกี่ยวกับความรู้ทั่วไปของโรคเมลิออยด์ในสัตว์ แนวทางการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจวินิจฉัย การดำเนินการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ มาตรการควบคุมและป้องกันโรคในสัตว์และเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์

ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่า คู่มือโรคเมลิออยด์ในสัตว์ ฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อบุคลากรที่ปฏิบัติงานด้านสัตวแพทย์ นักวิชาการ นิสิตนักศึกษา เกษตรกร และผู้สนใจทั่วไป ในการเพิ่มพูนความรู้ ความเข้าใจ และประสิทธิภาพในการปฏิบัติงานด้านการป้องกันและควบคุมโรคเมลิออยด์ในสัตว์ ตลอดจนการบูรณาการ “สุขภาพหนึ่งเดียว” เนื่องจากโรคเมลิออยด์เป็นโรคติดต่อที่สำคัญทั้งในสัตว์และมนุษย์ ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ด้านสุขภาพสัตว์ความปลอดภัยของมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน

สพ.ญ.ธรรมรัฐ สุจิต

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำ คู่มือโรคเมลิออยด์ในสัตว์ ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความร่วมมือ ตลอดจน การสนับสนุนจากหลายฝ่าย ผู้เขียนขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ ข้อเสนอแนะ และความร่วมมือในทุกขั้นตอนของการจัดทำเอกสารฉบับนี้ โดยเฉพาะบุคลากรกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งเครือข่ายห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยาซึ่งได้ อนุเคราะห์ข้อมูล และภาพถ่ายเพื่อใช้ประกอบในการจัดทำคู่มือ ตลอดจนพี่ ๆ อาวุโสที่ได้เกษียณอายุ ราชการไปแล้ว ซึ่งยังคงกรุณาใช้เวลาให้คำปรึกษาและถ่ายทอดประสบการณ์อันมีค่า เพื่อให้เนื้อหาของ คู่มือนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบคุณครอบครัวอันเป็นที่รัก พี่ ๆ และเพื่อนร่วมสายงานทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจ ให้การ สนับสนุนด้วยความเมตตาและปรารถนาดีตลอดระยะเวลาการดำเนินงาน

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ คุณชนกพร บุญศาสตร์ เจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบการตรวจสอบต้นฉบับ การจัดรูปแบบ และการจัดทำเล่ม ให้คู่มือเล่มนี้ออกมาสมบูรณ์ สวยงาม และพร้อมใช้งานได้อย่างมี ประสิทธิภาพ

ขอขอบพระคุณทุกท่าน
สพ.ญ.ธรรมรัฐ สุจิต

สารบัญ

บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	ลักษณะของเชื้อและกลไกการก่อโรค	4
บทที่ 3	ความรู้ทั่วไปของโรคเมลิออยด์ในสัตว์	11
บทที่ 4	สถานการณ์และระบาดวิทยาของโรคเมลิออยด์ในสัตว์	13
บทที่ 5	อาการทางคลินิกของโรคเมลิออยด์ในสัตว์	16
บทที่ 6	การเก็บตัวอย่าง บรรจุภัณฑ์และการขนส่งตัวอย่าง	21
บทที่ 7	การตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยด์ในสัตว์ทางห้องปฏิบัติการ	28
บทที่ 8	การรักษา ป้องกัน และควบคุมโรคเมลิออยด์ในสัตว์	43
บทที่ 9	แหล่งสืบค้นข้อมูลโรคเมลิออยด์	46
บทที่ 10	บรรณานุกรม	48
บทที่ 11	ภาคผนวก	60

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ปัจจัยสำคัญที่มีบทบาทในการก่อโรคของเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i>	10
ตารางที่ 2	อุบัติการณ์โรคmelioidosisในสัตว์ชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย	15
ตารางที่ 3	ลักษณะอาการทางคลินิกที่พบในสัตว์แต่ละชนิด	17
ตารางที่ 4	ลักษณะของโคลนเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	36
ตารางที่ 5	การระบุลักษณะเบื้องต้นและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>Burkholderia</i> และ <i>Pseudomonas</i> species ที่มีความสำคัญทางสัตวแพทย์	37
ตารางที่ 6	การแปลผลการทดสอบ Complement Fixation Test (CFT) และ Indirect Haemagglutination Assay (IHA) สำหรับการวินิจฉัยโรคมelioidosisในแพะ	39
ตารางที่ 7	ข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิค PCR และ Real-time PCR ในการตรวจวินิจฉัย <i>Burkholderia pseudomallei</i>	40
ตารางที่ 8	เปรียบเทียบสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i>	44

สารบัญรูป

รูปที่ 1	แผนที่แสดงการกระจายตัวของ <i>Burkholderia pseudomallei</i> ทั่วโลก ในช่วงมกราคม พ.ศ. 2453 ถึงกันยายน พ.ศ. 2565	1
รูปที่ 2	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการเพิ่มการแพร่ระบาดของโรคmelioidosis	3
รูปที่ 3	แสดงการแบ่งกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรมและนิเวศวิทยาของเชื้อสกุล <i>Burkholderia</i>	5
รูปที่ 4	แสดงสัญญาณวิทยาของ <i>Burkholderia pseudomallei</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar, MacConkey agar, chocolate agar และ Ashdown's agar	7
รูปที่ 5	แสดงลักษณะโคโลนีของ <i>Burkholderia pseudomallei</i> สายพันธุ์ E8 และ K96243 บน Ashdown's agar	7
รูปที่ 6	แสดงจีโนม <i>Burkholderia pseudomallei</i> ที่ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ และขนาดเล็ก	8
รูปที่ 7	แสดงกลไกที่ <i>Burkholderia pseudomallei</i> ใช้เพื่อความอยู่รอดภายในเซลล์	9
รูปที่ 8	แสดงประวัติที่สำคัญของโรคmelioidosis	12
รูปที่ 9	สัตว์ที่สามารถพบการติดเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i>	13
รูปที่ 10	แสดงลักษณะฟิล์มภายในตับสุกร และฟิล์มในน้ำมูกที่ป่วยตายด้วยโรคmelioidosis	18
รูปที่ 11	รอยโรคตุ่มหนองที่ปอดและตับในลิงที่ได้รับเชื้อ <i>B. pseudomallei</i>	19
รูปที่ 12	แสดงรอยโรคลูกจระเข้ที่ติดเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i>	20
รูปที่ 13	รอยโรคในนกแก้วปากเหลืองที่ตายด้วยโรคmelioidosis	20
รูปที่ 14	หลอดเก็บตัวอย่างเลือดชนิดแยกซีรัม (BD Vacutainer® SST)	22
รูปที่ 15	แสดงตัวอย่างการกำหนดจุดสำหรับการสุ่มเก็บตัวอย่างดินเพื่อตรวจหาเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i>	24
รูปที่ 16	ตัวอย่างเสากักตัวอย่างน้ำแบบยึดได้ และขวดปลอดเชื้อสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ ขนาด 1 ลิตร	25
รูปที่ 17	แสดงเครื่องเก็บตัวอย่างอากาศ MD8 Airport ที่เชื่อมต่อกับอาหารเลี้ยงเชื้อ	25
รูปที่ 18	แสดงการ swab รูปตัว 'S' ในแนวตั้งและในแนวเฉียง	26

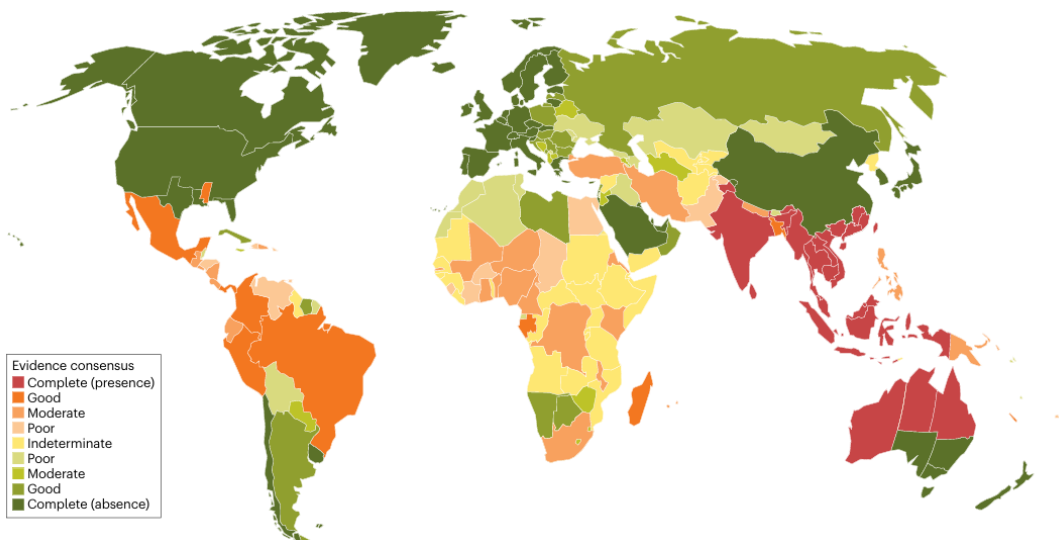
สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 19	แสดงตัวอย่างบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการขนส่งตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ	27
รูปที่ 20	เชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> จากการย้อมสีแกรม (Gram stain, 100x) แสดงลักษณะ “safety pin”	29
รูปที่ 21	ลักษณะโคโลนีเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	30
รูปที่ 22	ลักษณะ pellicle หรือฝ้าของ <i>Burkholderia pseudomallei</i> ที่ลอยอยู่ด้านบน selective broth	32
รูปที่ 23	แผนภาพแสดงขั้นตอนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการเพาะแยกเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> จากตัวอย่างน้ำ	33
รูปที่ 24	การเตรียม Moore’s swab	34
รูปที่ 25	ลักษณะโคโลนี <i>Burkholderia pseudomallei</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ และลักษณะรูปร่างเชื้อจากการย้อมสีแกรม	35
รูปที่ 26	การเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณวิทยาของ <i>Burkholderia pseudomallei</i> บน Ashdown’s agar	35
รูปที่ 27	ตัวอย่างชุดทดสอบสำเร็จรูป API®20NE	36
รูปที่ 28	แสดงข้อมูลในการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อกลุ่ม Bioterrorism: <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>Francisella tularensis</i> และ <i>Brucella</i> spp.	38
รูปที่ 29	หน้าเพจของ https://www.melioidosis.info/	46
รูปที่ 30	หน้าเพจ PubMLST ของเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i>	47

บทที่ 1

บทนำ

โรคเมลิออยด์ หรือโรคเมลิออยโดสิส (Meliodosis) หรือที่เกษตรกรรู้จักกันทั่วไปในชื่อ โรคไช้ดิน เป็นโรคในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 และเป็นโรคติดต่อที่ต้องเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาตามพระราชบัญญัติโรคติดต่อ พ.ศ. 2558 เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* ถูกจัดให้อยู่ในเชื้อโรคกลุ่มที่ 3 ภายใต้พระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 เป็นเชื้อโรคที่มีความเสี่ยงสูงหรืออันตรายสูง ซึ่งตามคำแนะนำของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) ถือเป็นเชื้อก่อโรคประเภท B (Category B) เป็นเชื้ออันตรายที่สามารถนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพได้ แพร่กระจายได้ค่อนข้างง่ายสามารถทำให้เกิดความพิการถาวร หรือคุกคามชีวิต หรือถึงแก่ชีวิตในมนุษย์หรือสัตว์เมื่อสัมผัสเชื่อดังกล่าว



รูปที่ 1 แผนที่แสดงการกระจายตัวของ *Burkholderia pseudomallei* ทั่วโลกในช่วงมกราคม พ.ศ. 2453 ถึงกันยายน พ.ศ. 2565 สีเขียวแสดงถึงการไม่พบ *B. pseudomallei* อย่างสมบูรณ์ และสีแดง แสดงถึงการพบ *B. pseudomallei* อย่างสมบูรณ์ (ที่มา: Meumann et al., 2024)

โรคเมลิอยด์ (Meliodosis) เป็นโรคติดต่อที่มีความสำคัญทั้งในมนุษย์และสัตว์ เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งพบได้ตามธรรมชาติในดินและน้ำ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีลักษณะภูมิอากาศร้อนชื้น ได้แก่ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ออสเตรเลียตอนเหนือ แอฟริกา และบางพื้นที่ในอเมริกา (MOPH, 2021; Sprague & Neubauer, 2004) โดยโรคนี้มีผลกระทบอย่างมากต่อสุขภาพของประชากรในพื้นที่ที่มีการระบาด

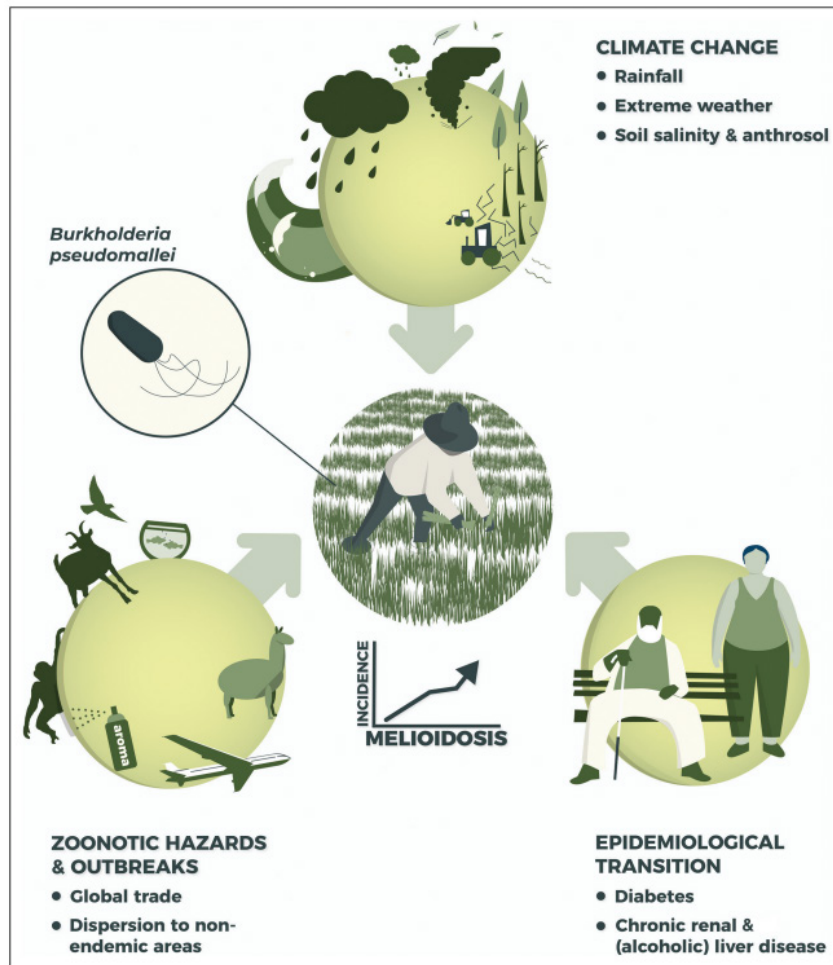
ลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อ *B. pseudomallei* เกิดได้หลายช่องทาง ทั้งจากการสัมผัสกับดินหรือน้ำที่ปนเปื้อน การรับเชื้อผ่านทางกราม ดม หรือหายใจ รวมถึงจากสัตว์ที่ติดเชื้อ โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนหรือหลังจากฝนตกหนัก ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีการรบกวนชั้นผิวดิน ทำให้เชื้อที่อยู่ใต้ผิวดินสามารถแพร่กระจายขึ้นสู่ผิวน้ำและเข้าสู่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ได้ (นราพร และ สลิษา, 2560) กลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่ เกษตรกรและชาวนา ซึ่งมักมีการสัมผัสกับดินโดยตรง การเคลื่อนย้ายสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ข้ามพรมแดน รวมถึงการขยายตัวของการท่องเที่ยวระหว่างประเทศ เป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดการแพร่กระจายของโรคเมลิอยด์จากพื้นที่ที่มีการระบาดไปยังพื้นที่ใหม่ที่ยังไม่เคยพบการติดเชื้อมาก่อน นอกจากนี้ กระแสโลกาภิวัตน์และความก้าวหน้าทางการคมนาคมยังส่งผลให้โรคติดเชื้ออุบัติใหม่สามารถแพร่กระจายได้รวดเร็วยิ่งขึ้น รวมถึงโรคเมลิอยด์ซึ่งมีแนวโน้มการระบาดเพิ่มขึ้นในหลายภูมิภาคทั่วโลก

ภาวะโลกร้อนยังเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่อาจเปลี่ยนแปลงรูปแบบการระบาดของโรค เนื่องจากส่งผลต่อระบบนิเวศและการกระจายตัวของเชื้อโรคในสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงนี้อาจทำให้พื้นที่ใหม่กลายเป็นแหล่งสะสมเชื้อ *B. pseudomallei* ได้อีกในอนาคต (Birnie et al., 2022) แม้การแพทย์ในยุคปัจจุบันจะมีความก้าวหน้าอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ประชากรมีอายุขัยเฉลี่ยที่ยืนยาวขึ้น แต่ในขณะเดียวกันกลับพบว่า ผู้สูงอายุมีแนวโน้มเกิดโรคร่วมได้มากขึ้น รวมถึงโรคเมลิอยด์ ซึ่งอาจมีอาการรุนแรงและเสี่ยงต่อการเสียชีวิตโดยเฉพาะในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (รูปที่ 2)

ประเทศไทยมีการรายงานผู้ป่วยโรคเมลิอยด์รายแรกเมื่อปี พ.ศ. 2498 Chittivej et al. (1955) โรคนี้ไม่ได้เป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวางจนกระทั่งช่วงสงครามเวียดนาม ซึ่งมีทหารอเมริกันเสียชีวิตจากโรคปอดอักเสบเฉียบพลัน (Weber et al., 1969) โดยโรคเมลิอยด์ในขณะนั้นเรียกว่า “โรคมงค่อเทียม” ตามชื่อโรค “มงค่อ” (โรค Glanders) ในภาษาพม่า (Jayanetra et al., 1974) ต่อมา มีการรายงานโรคในพื้นที่ต่าง ๆ ตามมา โดยเฉพาะผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ส่วนในสัตว์นั้นพบรายงานโรคเมลิอยด์ ระหว่างปี พ.ศ. 2549–2553 จากการยืนยันด้วยวิธีเพาะแยกเชื้อในสัตว์เลี้ยง และสัตว์ป่าในกรงเลี้ยง โดยพบอัตราการเกิดโรคสูงสุดในแพะ (Kongkaew et al., 2017; Limmathurotsakul et al., 2012) มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูลห้องปฏิบัติการด้านสุขภาพสัตว์ทั้งในส่วนกลางและส่วนภูมิภาค Tonpitak และคณะ (2014) รายงานโรคในแพะช่วงปี พ.ศ. 2549 ในพื้นที่กรุงเทพมหานครว่ามีความเกี่ยวข้องกับการพบผู้ป่วยโรคเมลิอยด์ หลังจากนั้นมีการรายงานโรคในสัตว์ทั้งในสัตว์เลี้ยง (Fungwithaya et al., 2024) ปศุสัตว์ (Limmathurotsakul et al., 2012; Tonpitak et al., 2014; Kwanhian et al., 2020) และในสัตว์ป่า (Kasantikul et al., 2016; Damrongsukij et al., 2021; Saechan et al., 2022) อย่างต่อเนื่อง

โรคเมลิอยด์ ชื่อนี้มีที่มาอย่างไร

ในปี พ.ศ. 2555 เครือข่ายโรคเมลิอยด์ในประเทศไทย ซึ่งประกอบด้วยแพทย์และนักวิจัยจากหลายสถาบัน ร่วมกับตัวแทนจากกระทรวงสาธารณสุข ได้เสนอให้ใช้ชื่อภาษาไทยว่า “โรคเมลิอยด์” เนื่องจากเป็นชื่อที่ง่ายต่อการสื่อสารและเข้าใจ โดยไม่สับสนว่าโรคนี้เกิดจากการติดเชื้อจากดินเพียงอย่างเดียว เพราะเชื้อสามารถพบในน้ำและสามารถติดต่อได้จากการรับประทานอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อน การใช้ชื่อทับศัพท์สามพยางค์ เช่น “โรคมเมลิอยด์” จึงสะดวกและเหมาะสมกับการประชาสัมพันธ์ รวมถึงเป็นชื่อที่ผู้ป่วยและแพทย์ส่วนใหญ่ใช้เรียกในปัจจุบัน ขณะที่ชื่อ “เมลิอยโดสิส” เหมาะสำหรับใช้ในทางการแพทย์ (Thailand Lao Melioidosis Network Meeting Minute, 2012)



รูปที่ 2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการเพิ่มการแพร่ระบาดของโรคเมลิออยด์: การเคลื่อนย้ายสัตว์หรือปศุสัตว์จากพื้นที่ระบาดเข้าสู่พื้นที่ใหม่ การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดินที่เอื้อต่อการแพร่กระจายเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* การเพิ่มขึ้นของโรคร่วมสำคัญในมนุษย์ เช่น เบาหวาน โรคไตเรื้อรัง และภาวะตับวาย (ที่มา: Birnie et al., 2022)

อุบัติการณ์ของโรคนี้มีแนวโน้มที่จะเกิดขึ้นในช่วงฤดูมรสุม และมักจำกัดอยู่ในพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่เคยมีการรายงานโรคมามาก่อนหน้านี้ การกระจายตัวของโรคนี้พบได้ในหลายภูมิภาคและแสดงความสัมพันธ์กับอุบัติการณ์ของโรคในมนุษย์อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น การดำเนินมาตรการเฝ้าระวังและการควบคุมโรคในประชากรสัตว์จึงมีความสำคัญยิ่งในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่สามารถติดต่อสู่มนุษย์ (zoonotic pathogen) ได้ การดำเนินการเฝ้าระวังโรคเมลิออยด์อย่างต่อเนื่องเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เสริมสร้างความปลอดภัยทางชีวภาพในฟาร์ม และสนับสนุนการประยุกต์ใช้แนวคิด “สุขภาพหนึ่งเดียว” ในการบูรณาการงานด้านสุขภาพเพื่อให้ความปลอดภัยของมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืนในทุกมิติ

บทที่ 2

ลักษณะของเชื้อ และกลไกการก่อโรค

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ถูกจัดอยู่ใน Phylum *Pseudomonadota*, Class *Betaproteobacteria*, Order *Burkholderiales*, Family *Burkholderiaceae*, Genus *Burkholderia* โดยเริ่มแรกถูกค้นพบและตั้งชื่อว่า *Bacillus pseudomallei* ในปี 1911 ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Pseudomonas pseudomallei* เมื่อมีการจัดกลุ่มใหม่ตามลักษณะทางชีวเคมีและพันธุกรรม และในปี 1992 ได้รับการจัดกลุ่มใหม่อีกครั้งเป็น *Burkholderia pseudomallei* ตามการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างจากกลุ่ม *Pseudomonas* อย่างชัดเจน (Meumann et al., 2024; Hall et al., 2022) เชื้ออยู่อาศัยได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์เจ้าบ้าน (facultative intracellular bacteria) ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต อาศัยอยู่ในดิน น้ำ และพืชในพื้นที่เฉพาะถิ่น เชื้อในสกุล *Burkholderia* สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรมและลักษณะทางนิเวศวิทยา (รูปที่ 3) โดยจัดแบ่งตามข้อมูลทางวิชาการในปัจจุบัน ได้ดังนี้

1. *Burkholderia pseudomallei* complex (Bpc) ประกอบด้วยเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์และสัตว์ เช่น *B. mallei*, *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* (Hall et al., 2022)
2. *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) เป็นกลุ่มเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อโรคในมนุษย์ พบในผู้ป่วยโรคปอดเรื้อรังหรือผู้ป่วยโรคซิสติกไฟโบรซิส เช่น *B. cenocepacia*, *B. multivorans* และ *B. vietnamiensis* (Sawana et al., 2014)
3. กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับพืชและสิ่งแวดล้อม เช่น *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, และ *Robbsia* ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความสัมพันธ์กับพืชในฐานะเชื้อที่เป็นประโยชน์หรือก่อโรคในพืช (Sawana et al., 2014)

กลุ่ม *Burkholderia pseudomallei* complex (Bpc) ประกอบด้วยแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม เช่น *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* และ *B. humptydooensis* โดยแม้จะมีลักษณะทางชีวเคมีและพันธุกรรมคล้ายคลึงกัน ในแต่ละสายพันธุ์กลับมีความสามารถในการก่อโรคและระดับความรุนแรงที่แตกต่างกัน (Tuanyok et al., 2017; Hall et al., 2022) จากข้อมูลการวิเคราะห์ระดับจีโนมไทป์และจีโนมไทป์ เช่น 16S rRNA, Multi-Locus Sequence Typing (MLST) และการถอดรหัสจีโนมทั้งชุด (whole-genome sequencing) ช่วยยืนยันความสัมพันธ์ภายในกลุ่มนี้ โดยพบว่า *B. pseudomallei* และ *B. mallei* มีความใกล้เคียงกัน

มากที่สุด และเป็นสาเหตุหลักของการก่อโรครโรคในมนุษย์และสัตว์ ในขณะที่สายพันธุ์อื่น ๆ เช่น *B. thailandensis* และ *B. humptydooensis* มักไม่ก่อโรคในมนุษย์หรือมีความรุนแรงต่ำมาก (Lowe et al., 2016; Galyov et al., 2010) และแม้ *B. thailandensis* จะมีความใกล้เคียงกับ *B. pseudomallei* แต่โดยทั่วไปไม่ก่อโรคในมนุษย์ ยกเว้นบางสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของแคปซูลคล้าย *B. pseudomallei* ซึ่งอาจจะมีศักยภาพในการก่อโรคเพิ่มได้ (Janesomboon et al., 2021)

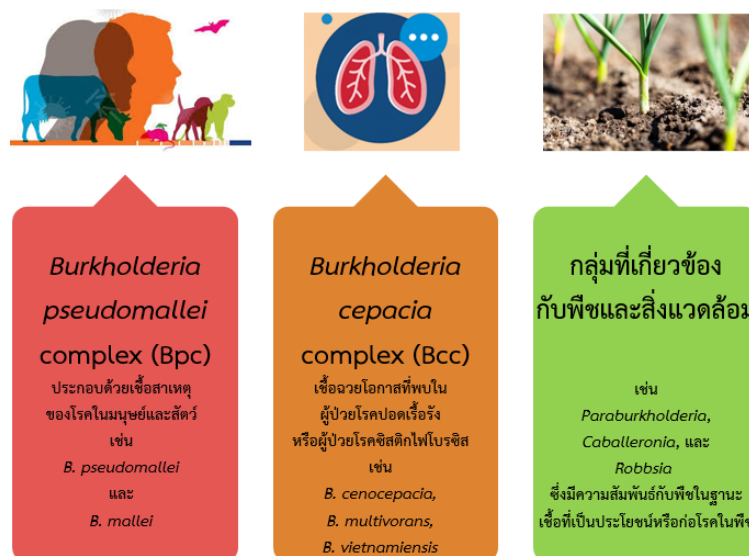
จากการวิเคราะห์การจัดลำดับจีโนมทั้งหมด พบว่าสายพันธุ์บรรพบุรุษของ *B. pseudomallei* เกิดขึ้นครั้งแรกในออสเตรเลีย จากนั้นจึงแพร่กระจายไปทั่วเอเชีย โดยมีวิวัฒนาการและแพร่กระจายไปทั่วโลก (Chewapreecha et al., 2017) *B. pseudomallei* จัดเป็นเชื้อก่อโรคที่มีความทนทานสูงต่อสภาพแวดล้อมที่ผันผวน ทั้งในสภาวะกรด-ด่าง และการสัมผัสสารฆ่าเชื้อ ความสามารถนี้สืบเนื่องมาจากการเป็นแบคทีเรียที่สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์โฮสต์ (facultative intracellular bacteria) นอกจากนี้ เชื้อยังมีกลไกเฉพาะในการหลบหลีกการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของโฮสต์ ช่วยให้สามารถดำรงชีวิตรอดภายในเซลล์ และแพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงต่อไปได้ รวมถึงสามารถสร้าง biofilm ที่ทำหน้าที่ป้องกันตัวเองจากระบบของโฮสต์และยาปฏิชีวนะ (Kong et al., 2023)

ปริมาณเชื้อในการก่อโรค

ปริมาณที่ก่อโรค (Lethal dose 50; LD50) ของ *B. pseudomallei* ในสัตว์

เชื้อ *B. pseudomallei* มี LD50 ต่ำมากในสัตว์ทดลอง เช่น หนู BALB/c, C57BL/6, หนูแฮมสเตอร์ และลิง โดย LD50 ในหนู BALB/c อยู่ที่ <10 CFU เมื่อให้เชื้อทาง intraperitoneal หรือ aerosol (Reckseidler et al., 2001; Wiersinga et al., 2007; Haraga et al., 2008; Titball et al., 2008; Welkos et al., 2015; Bearss et al., 2017; Trevino et al., 2018; Trevino et al., 2021) ในลิง African green monkey พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบทำให้เกิดโรคเฉียบพลันและตายได้ (Trevino et al., 2021) สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยหรือสัตว์มีความรุนแรงแตกต่างกันบ้าง แต่โดยรวมเชื่อมีความสามารถในการก่อโรคสูง (Lee et al., 2007; Welkos et al., 2015; Roe et al., 2022)

กลุ่มสำคัญของเชื้อในสกุล *Burkholderia* ตามลักษณะทางพันธุกรรมและนิเวศวิทยา



รูปที่ 3 แสดงการแบ่งกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรมและนิเวศวิทยาของเชื้อสกุล *Burkholderia* (ที่มา: Hall et al., 2022; Sawana et al., 2014)

ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรค

ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรค ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ สายพันธุ์ของสัตว์ที่ได้รับเชื้อ ช่องทางการได้รับเชื้อ inhalation, subcutaneous หรือ ingestion ภาวะภูมิคุ้มกันของสัตว์ และปัจจัยสิ่งแวดล้อม ซึ่งวัดได้จากปริมาณของความก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับการรุกราน และศักยภาพในการก่อพิษต่อสิ่งมีชีวิต ความรุนแรงของโรคสามารถวัดได้โดยการทดลอง โดยการกำหนดปริมาณที่ทำให้ถึงตาย 50% (Lethal dose 50; LD50) หรือปริมาณที่ทำให้ติดเชื้อ 50% (Infectious dose; ID50)

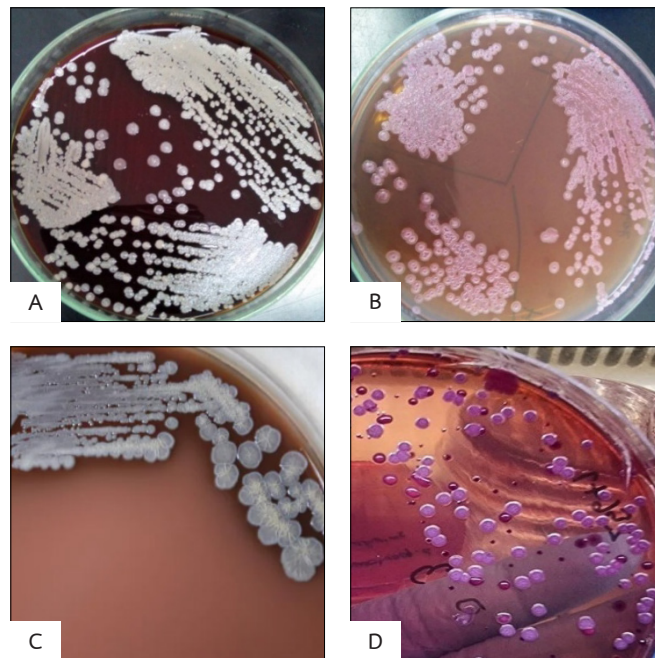
จากข้อมูลการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* มีความรุนแรงสูง และมีปริมาณที่ก่อโรค (infectious dose) ต่ำมากในสัตว์ทดลอง ในขณะที่ *B. thailandensis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกันแต่โดยทั่วไปถือว่าไม่ก่อโรคในมนุษย์ มี LD50 สูงกว่า *B. pseudomallei* อย่างน้อย 100-10,000 เท่า (เช่น $>10^5$ - 10^7 CFU ในหนู) แต่หากได้รับเชื้อในปริมาณสูงมากก็สามารถทำให้สัตว์ตายได้เช่นกัน ส่วน *B. vietnamiensis* มีความรุนแรงต่ำกว่า และมักพบในผู้ป่วยโรคปอดเรื้อรังหรือผู้มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเท่านั้น งานวิจัยเปรียบเทียบพบว่า *B. pseudomallei* มีความสามารถในการก่อโรคและกระตุ้นการอักเสบในสัตว์สูงกว่า *B. thailandensis* และ *B. vietnamiensis* อย่างชัดเจน (Trevino et al., 2021; Lennings et al., 2019; Wiersinga et al., 2007; O'Quinn et al., 2001; Hasselbring et al., 2011; Moore et al., 2004; Titball et al., 2008; Haraga et al., 2008; Scott et al., 2011)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

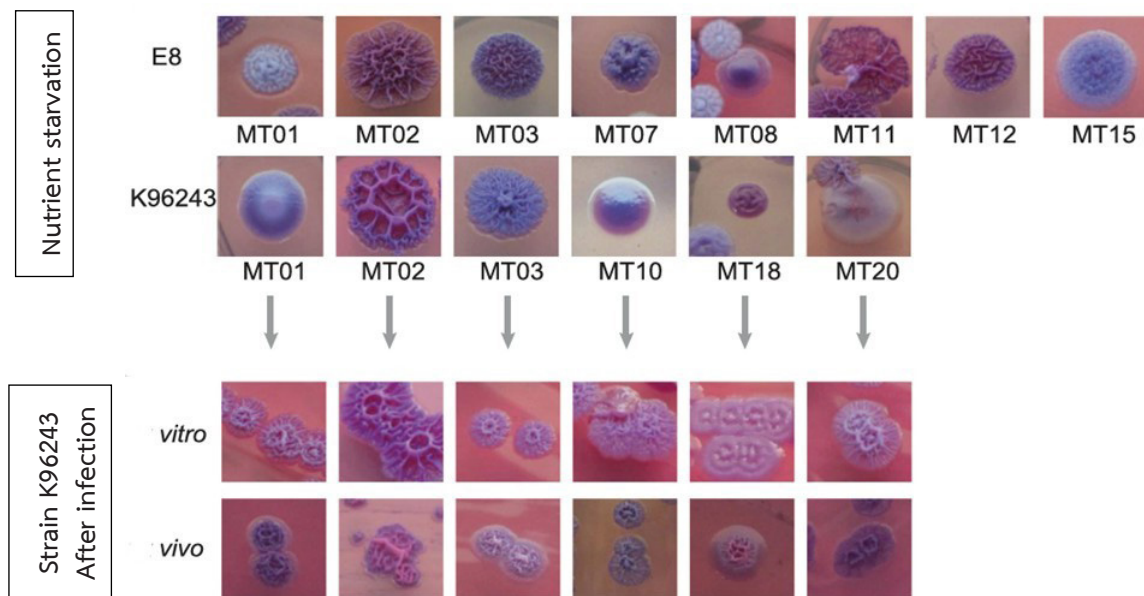
B. pseudomallei เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง ขนาดเล็ก ขนาดของเซลล์มีความยาวประมาณ 2 - 5 ไมโครเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4 - 0.8 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagella สัณฐานวิทยาของโคโลนีของ *B. pseudomallei* อาจมีลักษณะเรียบและเป็นเมือก (smooth and mucoid) หรืออาจมีลักษณะแห้งและย่น (dry and wrinkled) หลังจากบ่มเพาะเป็นเวลาสองถึงสามวัน ลักษณะสีของโคโลนีเชื้อจะแตกต่างกันไปตามอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หรือเพาะเชื้อใน cell line หรือหลังฉีดเชื้อในหนูทดลอง (รูปที่ 4 และรูปที่ 5)

B. pseudomallei เป็นแบคทีเรียชนิดที่สามารถเปลี่ยนรูปร่างได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่กดดัน จากรูปร่างแท่งทั่วไปเปลี่ยนเป็นรูปร่างทรงกลม (coccoid) ที่มีขนาดเล็กลง ซึ่งเกิดขึ้นจากเอนไซม์ปรับเปลี่ยนผนังเซลล์ ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารจำกัด อุณหภูมิต่ำ หรือความเค็มสูง รูปร่างทรงกลมที่เล็กลงเหล่านี้นักสัมพันธ์กับความคงทนต่อสภาพแวดล้อมที่เพิ่มขึ้น และมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการอยู่รอดของเชื้อในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรุนแรง และอาจเป็นความท้าทายในการเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ (Kamjumphol et al., 2015; Auty et al., 2022)

โดยทั่วไปรูปร่างของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีขนาดเล็กลง จะมีรูปแบบการใช้คาร์บอนที่คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ wild-type แต่สายพันธุ์ที่มีการปรับเปลี่ยนรูปร่างนี้อาจใช้สารตั้งต้นบางชนิดที่มีความเฉพาะเจาะจง และแสดงการเจริญเติบโตที่ผันแปรต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH (Zulkefli et al., 2021) นอกจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมจะทำให้เกิดความแตกต่างของรูปร่างลักษณะของเชื้อแล้ว ยังอาจพบความแตกต่างกันของเชื้อในสภาวะต่าง ๆ เช่น ความต้านทานต่อความเครียดออกซิเดชัน การยึดเกาะของเซลล์ และการเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ (Gierok et al., 2016; Lee et al., 2007; Zulkefli et al., 2021)



รูปที่ 4 แสดงลักษณะวิทยาของ *Burkholderia pseudomallei* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) blood agar (B) MacConkey agar (C) chocolate agar และ (D) Ashdown's agar



รูปที่ 5 แสดงลักษณะโคโลนีของ *Burkholderia pseudomallei* สายพันธุ์ E8 และ K96243 บน Ashdown's agar

บน: การเพาะเชื้อหลังจากการจำกัดสารอาหารเป็นเวลา 28 วัน

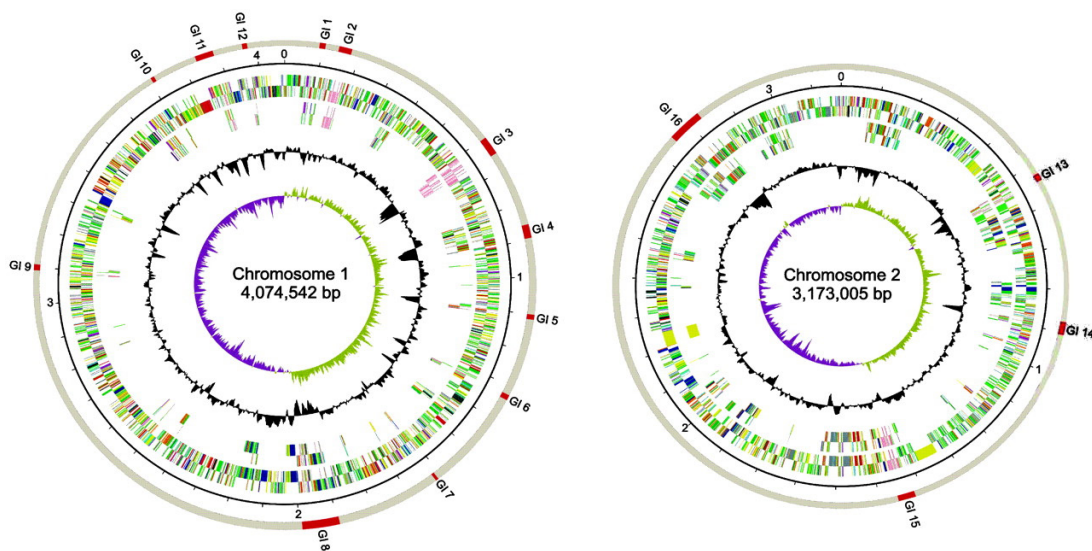
ล่าง: การเพาะเชื้อหลังจากเลี้ยงเชื้อใน cell line (vitro) และหลังจากฉีดเชื้อในหนูทดลอง (vivo)

(ที่มา: Gierok et al., 2016)

ลักษณะทางอนุชีวโมเลกุล (Molecular characteristics)

จีโนมของ *B. pseudomallei* มีขนาดใหญ่ประมาณ 7.24 Mb ประกอบด้วย 2 โครโมโซมที่มีขนาด 4.07 และ 3.17 Mbp (รูปที่ 6) มีปริมาณ guanine-cytosine (GC) สูงประมาณ 68% โดยโครโมโซมขนาดใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตพื้นฐาน ส่วนโครโมโซมเล็กเกี่ยวข้องกับการปรับตัวและความอยู่รอดในสิ่งแวดล้อม (Holden et al., 2004; Ghazali et al., 2021) และประกอบไปด้วยยีนที่เป็นปัจจัยก่อโรคหลายชนิด รวมถึง polysaccharide บนพื้นผิว เช่น capsule polysaccharide (CPS) และ lipopolysaccharide (LPS) ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการยับยั้ง opsonophagocytosis และทำให้มีความต้านทานต่อการฆ่าเชื้อโดยคอมพลีเมนต์ของโฮสต์ (Stone et al., 2014; Bzdyl et al., 2022;)

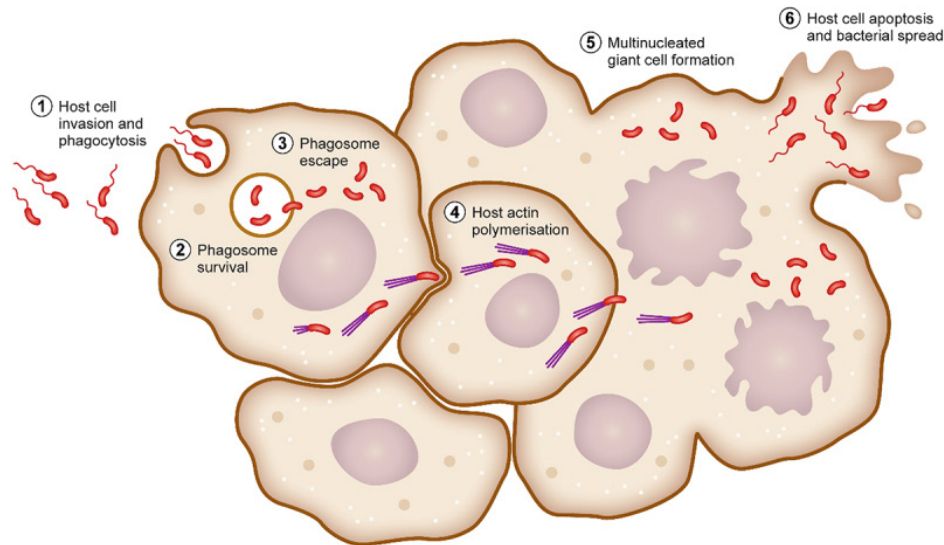
ข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของ *B. pseudomallei* จากการศึกษาก่อนหน้าพบความหลากหลายของ sequence types (STs) และ genotype ของเชื้อสูงมากในแต่ละภูมิภาค เช่น การศึกษาในประเทศจีนและประเทศไทย พบ STs และ Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis genotypes ที่หลากหลายสะท้อนถึงการแพร่กระจายและวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่องของเชื้อ (Mukhopadhyay et al., 2011; Balaji et al., 2018; Zhu et al., 2020; Roe et al., 2022; Shafiq et al., 2022; Laklaeng et al., 2024) และพบ genomic islands ของเชื้อและการถ่ายทอดยีนแนวนอน (horizontal gene transfer) ซึ่งช่วยเพิ่มความหลากหลาย รวมทั้งความสามารถในการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมของเชื้อตลอดจนความสามารถในการต่อสู้กับเซลล์ป้องกันของโฮสต์ได้อีกด้วย (Holden et al., 2004; Varshith et al., 2024; Ghazali et al., 2021)



รูปที่ 6 แสดงจีโนม *Burkholderia pseudomallei* ที่ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่และขนาดเล็ก (ที่มา: Holden et al., 2004)

กลไกการก่อโรค (Pathogenic mechanisms)

B. pseudomallei สามารถติดต่อกับโฮสต์ได้หลายช่องทาง โดยผ่านทางหายใจ ทางผิวหนัง และทางระบบทางเดินอาหาร เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ เชื้อสามารถอยู่อาศัยได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์โฮสต์ทั้ง phagocytic cell และ non-phagocytic cell โดยใช้กลไกในการอยู่รอดในแต่ละสภาวะต่าง ๆ และมีกลไกหลายชนิดในการก่อโรค (รูปที่ 7) ซึ่งมีโครงสร้างและกลไกพิเศษที่เป็นปัจจัยการก่อโรค อาทิ แคปซูล ระบบการสื่อสารระหว่าง



รูปที่ 7 แสดงกลไกที่ *Burkholderia pseudomallei* ใช้เพื่อความอยู่รอดภายในเซลล์ (ที่มา: Bzdyl et al., 2022)

เซลล์ (quorum sensing) และระบบหลังโปรตีนต่าง ๆ เช่น Type III secretion system (T3SS) และ Type VI secretion system (T6SS) โปรตีนเฉพาะทาง และ toxin-antitoxin systems โดยโครงสร้างเหล่านี้จะมีส่วนสำคัญในการก่อโรค และขัดขวางการทำลายจากเซลล์โฮสต์ ซึ่งนำไปสู่การติดเชื้อรุนแรงและเรื้อรัง นอกจากนี้ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อก็มีส่วนสำคัญต่อความรุนแรงและอาการของโรคด้วยเช่นกัน

กลไกการก่อโรคหลักของ *B. pseudomallei* มีดังนี้

- การบุกรุกและอยู่รอดในเซลล์: *B. pseudomallei* สามารถบุกรุกเซลล์ทั้ง phagocytic และ non-phagocytic แล้วหลบหนีจาก phagosome โดยใช้ระบบ Type III Secretion System (T3SS) เพื่อหลีกเลี่ยงการถูกทำลายจากเซลล์โฮสต์ (Willcocks et al., 2016; Broek & Stevens, 2017; Bzdyl et al., 2022; Kaewpan et al., 2022)
- การเพิ่มจำนวนและแพร่กระจาย: เชื้อจะเพิ่มจำนวนในไซโตพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ และใช้ actin polymerization สร้าง “actin tails” เพื่อเคลื่อนที่ในไซโตพลาสซึมพร้อมกับใช้ Type VI Secretion System (T6SS) กระตุ้นให้การหลอมรวมของเซลล์โฮสต์เป็น multinucleated giant cells (MNGCs) เพื่อทำให้เกิดแพร่กระจายระหว่างเซลล์ที่อยู่ข้างเคียง (Willcocks et al., 2016; Whiteley et al., 2017; Lennings et al., 2019; Bzdyl et al., 2022; Kaewpan et al., 2022)
- การหลบหลีกภูมิคุ้มกัน: มีการผลิต virulence factors หลายชนิด เช่น LPS/O-antigen, quorum sensing molecules, toxin-antitoxin systems และการปรับเปลี่ยน metabolism เพื่อหลบหลีกและยับยั้งการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Ulrich et al., 2004; Galyov et al., 2010; Loaiza et al., 2021; Yip et al., 2020; Mariappan et al., 2021; Bzdyl et al., 2022; Li et al., 2024; Chapartegui-González et al., 2024)
- การกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอักเสบ (pyroptosis): เชื้อสามารถกระตุ้น pyroptosis ใน monocytes ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) ในผู้ป่วยเมลิออยด์เฉียบพลัน (Khongpraphan et al., 2024)

ตารางที่ 1 ปัจจัยสำคัญที่มีบทบาทในการก่อโรคของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

ปัจจัยการก่อโรค	บทบาทหน้าที่ในการก่อโรค
T3SS	การหลบหนี phagosome, invasion
T6SS	การสร้าง multinucleated giant cells (MNGCs), การแพร่กระจายระหว่างเซลล์
Actin polymerization (BimA)	การเคลื่อนที่ในเซลล์ การแพร่กระจายระหว่างเซลล์
LPS/O-antigen	การกระตุ้น/หลบหลีกภูมิคุ้มกันโฮสต์
Quorum sensing	การควบคุมการแสดงออกของ virulence genes
Toxin-antitoxin	การติดเชื้อ persistence, chronic infection
Pyroptosis induction	การกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอักเสบ/ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis)
Biofilm	ป้องกันยาปฏิชีวนะ/ภูมิคุ้มกัน

สรุปได้ว่า *B. pseudomallei* อาศัยกลไกหลากหลายในการสร้างความสามารถเฉพาะตัวเพื่อเข้าสู่เซลล์โฮสต์ของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงการรุกรานเซลล์ (cell invasion) การหลบหนีออกจากถุงฟาโกโซม (phagosome escape) และการแพร่กระจายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง (cell-to-cell spread) กลไกเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ส่งเสริมให้แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายไปตามอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย ซึ่งนำไปสู่การแสดงอาการทางคลินิกที่แตกต่างหลากหลาย และมีศักยภาพในการพัฒนาไปสู่ภาวะร้ายแรงอย่างรวดเร็ว เช่น การอักเสบเฉพาะที่ การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) และอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้

บทที่ 3

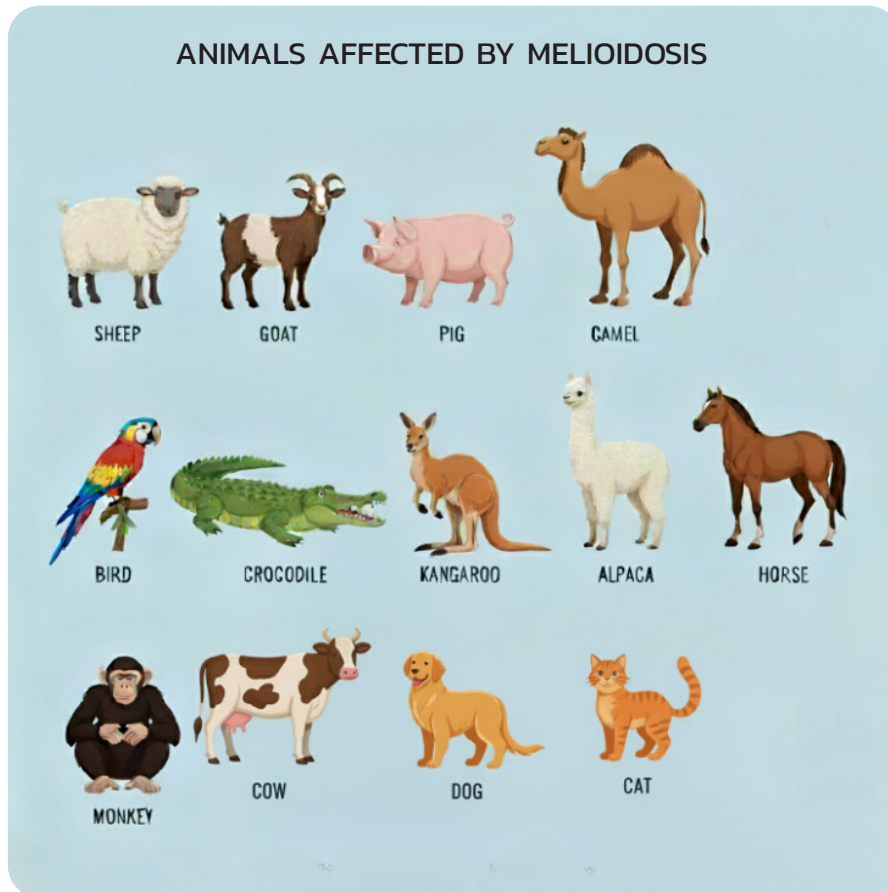
ความรู้ทั่วไป ของโรคเมลิออยด์ในสัตว์

โรคเมลิออยด์จัดเป็นโรคติดเชื้อสำคัญทั้งในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *B. pseudomallei* เชื้อดังกล่าวสามารถพบได้ในดินและแหล่งน้ำ โดยเฉพาะในภูมิภาคเขตร้อนชื้น เช่น เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และออสเตรเลียเหนือ โรคนี้ก่อให้เกิดปัญหาสาธารณสุขในพื้นที่ระบาด เนื่องจากสัตว์ที่ติดเชื้อมีความเสี่ยงที่จะเป็นแหล่งแพร่เชื้อสู่มนุษย์ โดยมีสิ่งแวดล้อมเป็นสื่อกลางในการแพร่เชื้อ

โรคเมลิออยด์ ส่งผลกระทบต่อสัตว์หลากหลายชนิด และหลากหลายสายพันธุ์ มีรายงานของโรคเมลิออยด์ทั่วโลก ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น แพะ แกะ สุกร โค ม้า ลิง สุนัข แมว สัตว์ป่า สัตว์เลี้ยงคลาน นก และปลา (Choy et al., 2000; Sprague & Neubauer, 2004; Warawa, 2010; Rachlin et al., 2019; Ariyanti & Noor, 2022; Desoutter et al., 2024) รวมถึงสัตว์ในตระกูลอูฐ และอัลปากา ที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อนี้เป็นพิเศษ (Janmaat et al., 2004; Sprague & Neubauer, 2004) ในโค และนกถือว่ามี ความต้านทานต่อโรคเมลิออยด์ได้ค่อนข้างดี (Janmaat et al., 2004; Cheng & Currie, 2005) ในกระซู่ ซึ่งก่อนหน้านี้มีข้อมูลว่ามีความต้านทานต่อโรคนี้สูง ปัจจุบันพบการติดเชื้อเมลิออยด์แบบกลุ่มในกระซู่ที่เค็มพื้นที่ออสเตรเลียตอนเหนือ (Rachlin et al., 2019) สำหรับสัตว์เลี้ยง การติดเชื้อตามธรรมชาติมักพบมากที่สุดที่แพะ แกะ และสุกร (Sprague & Neubauer, 2004 และ WOA, 2024) และสัตว์เลี้ยงบางชนิด เช่น สุนัข และแมวที่อาจติดเชื้อได้เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันที่อ่อนแอลง โดยปกติแล้วการติดเชื้อจะติดต่อจากสิ่งแวดล้อมสู่สัตว์ ไม่ใช่จากสัตว์สู่สัตว์

การติดเชื้อในสัตว์โดยทั่วไปเกิดจากการสัมผัสกับดินหรือน้ำที่ปนเปื้อนการกิน ผ่านทางบาดแผล หรือการหายใจเอาเชื้อเข้าไป (Warawa, 2010; Rachlin et al., 2019; Desoutter et al., 2024) สัตว์บางชนิด (แพะ แกะ หนู) มีความไวรับในการติดเชื้อสูงกว่าสัตว์ชนิดอื่น และสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องมีความเสี่ยงสูงในการติดเชื้อ การแพร่เชื้อจากสัตว์สู่มนุษย์นั้นพบได้น้อยแต่ก็เป็นไปได้

อาการทางคลินิกในสัตว์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน โดยสัตว์แต่ละชนิดจะมีความไวรับในการติดเชื้อแตกต่างกัน อาการสำคัญที่มักพบ ได้แก่ ไข้ ซึม น้ำหนักลด ขาอ่อนแรง ช้อบวม เกิดฝีในอวัยวะต่าง ๆ และอาจเสียชีวิตอย่างเฉียบพลัน (Sprague & Neubauer, 2004; Kasantikul et al., 2016; Rachlin et al., 2019; Choy et al., 2000; Hussein, 2021; Ariyanti & Noor, 2022; Desoutter et al., 2024) โรคนี้อาจแฝงตัวในสัตว์ได้นานโดยไม่แสดงอาการ และอาจกลับมาแสดงอาการในภายหลัง (Sprague & Neubauer, 2004) ซึ่งการวินิจฉัยโรคที่ล่าช้าจะทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของเชื้อในพื้นที่ที่ยังไม่เคยมีการระบาด และอาจทำให้สัตว์ตายได้ หากไม่ได้รับการรักษา



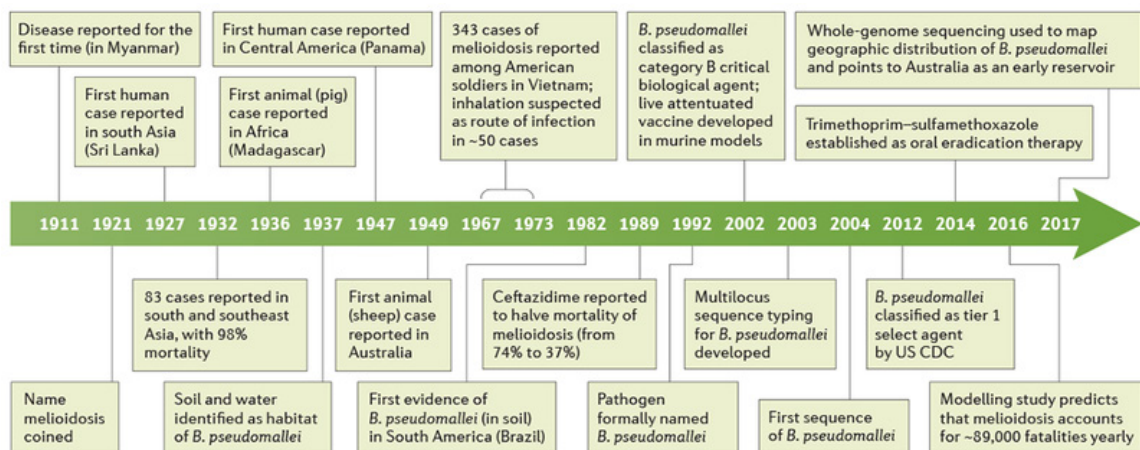
รูปที่ 8 สัตว์ที่สามารถพบการติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

บทที่ 4

สถานการณ์และระบาดวิทยา ของโรคเมลิออยด์ในสัตว์

การกระจายของเชื้อ *B. pseudomallei* ข้อมูลที่แน่นอนนั้นไม่แน่ชัด เนื่องจากมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น การตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ หรือลักษณะอาการทางคลินิกของสัตว์ที่ปรากฏ อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบโรคส่วนใหญ่ในเอเชีย ได้แก่ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียใต้ นอกจากนี้ยังพบในสาธารณรัฐประชาชนจีน สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน) ออสเตรเลียตอนเหนือ ตะวันออกกลาง แอฟริกา อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ อเมริกากลาง และประเทศที่มีหมู่เกาะต่าง ๆ ได้แก่ ฟิลิปปินส์ เปอโตริโก แคริเบียน และมอร์เชียส

โรคเมลิออยด์มีการรายงานเป็นครั้งแรกในประเทศพม่าในปี ค.ศ. 1911 (Whitmore & Krishnaswami, 1912) โดยพบผู้ป่วยติดเชื้อเรื้อรังชนิดรุนแรง ซึ่งต่อมาได้รับการยืนยันว่าเกิดจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* (Whitmore, 1913) และหลังจากนั้นได้มีรายงานการแยกเชื้อได้จากสัตว์หลายชนิดในหลายภูมิภาค โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น เช่น ประเทศไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ และออสเตรเลียตอนเหนือ ในประเทศไทยโดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้รับการยอมรับว่าเป็นพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของโรคในมนุษย์สูงที่สุดแห่งหนึ่งของโลก (Limmathurotsakul et al., 2010; Bhengsri et al., 2011; Tanwisaid & Surin, 2017; Wongbutdee et al., 2024)



รูปที่ 9 แสดงประวัติที่สำคัญของโรคเมลิออยด์ (ที่มา: Wiersinga et al., 2018)

โรคเมลิออยด์ในสัตว์มีหลักฐานรายงานการระบาดครั้งแรกที่กัวลาแลมเปอร์ในปี ค.ศ. 1913 ในกลุ่มหนูตะเภาที่เป็นสัตว์ทดลองโดย Fletcher ซึ่งขณะนั้นปฏิบัติงานอยู่ที่สถาบันวิจัยการแพทย์ กัวลาแลมเปอร์ พบอาการเริ่มแรกคือมีของเหลวข้นคล้ายน้ำมันไหลออกจากตาและจมูก ต่อมาเมื่อการทางระบบทางเดินหายใจซึ่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และทุกตัวตายในที่สุด แต่ในขณะนั้นยังไม่สามารถเชื่อมโยงกับโรคที่ Whitmore (1912) เคยรายงานไว้ (Stanton & Fletcher, 1925) Fletcher และ Stanton ได้บัญญัติคำว่า “Meliodosis” ขึ้นในปี ค.ศ. 1921 โดยมีรากศัพท์จากภาษากรีก melis (โรคลำไส้อักเสบของลา) และ eidos (รูปลักษณะ) เพื่ออธิบายลักษณะของโรค และเรียกโรคนี้ว่า “meliodosis” (Stanton and Fletcher, 1921) การศึกษาของ Stanton และ Fletcher ถือเป็นรากฐานสำคัญของความเข้าใจเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดและการแพร่กระจายของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมลิออยด์ ซึ่งต่อมาได้มีการยืนยันว่าเชื้อที่ Stanton and Fletcher พบเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* (อ้างอิงโดย: Rush & Thomas, 2012)

ปัจจุบันมีรายงานการติดเชื้อเมลิออยด์ในสัตว์หลากหลายชนิด ได้แก่ แกะ แพะ สุกร อูฐ อัลปากา นก จระเข้ และจิ้งจอก โดยความไวต่อเชื้อและอาการทางคลินิกแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดสัตว์ (Choy et al., 2000; Sprague & Neubauer, 2004; Hussein, 2021) โดยแพะและแกะมีความไวรับเป็นพิเศษ โดยมักจะเกิดโรครุนแรง ในขณะที่สุกรอาจพบที่อวัยวะภายใน โดยที่ไม่แสดงอาการ และโคค่อนข้างพบโรคได้น้อย (Choy et al., 2000; Limmathurotsakul et al., 2012; Hussein, 2021)

สำหรับประเทศไทย พบรายงานกรณีโรคเมลิออยด์ในโคครั้งแรกในปี พ.ศ. 2527 (Uptoom et al., 1984) โดยแยกเชื้อได้จากตัวอย่างน้ำมันของโคนมที่มีภาวะเต้านมอักเสบทางคลินิก มีรายงานพบโรคในแพะ (Wongwong and Vitoorakool, 1999) และโคนมในจังหวัดเชียงใหม่ (Srikitjakarn et al., 2002) การศึกษาช่วงปี พ.ศ. 2549–2553 พบว่าแพะมีอัตราการเกิดโรคสูงสุด (1.63 ต่อ 100,000 ตัว/ปี) รองลงมาคือสุกร (0.02 ต่อ 100,000 ตัว/ปี) และโค (0.01 ต่อ 100,000 ตัว/ปี) โดยมักพบการระบาดในฤดูฝน (Limmathurotsakul et al., 2015) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการเกิดโรคในสัตว์สวนสัตว์ โดยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ โดยเฉพาะในสัตว์กินพืชและลิง และมักพบในฤดูฝน ทั้งนี้ เส้นทางการติดเชื้อและระยะฟักตัวยังคงไม่ชัดเจน (Kasantikul et al., 2016)

การแพร่เชื้อในสัตว์ เชื้อ *B. pseudomallei* สามารถแพร่ผ่านทางปัสสาวะ อุจจาระ น้ำมัน หรือบาดแผลและสารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ เส้นทางการติดเชื้อที่พบได้ในสัตว์ ได้แก่ ผ่านทางบาดแผล การกินดินหรืออาหารที่ปนเปื้อน หรือการกินซากสัตว์ที่ติดเชื้อ การหายใจ มีรายงานการติดเชื้อผ่านรก ที่เป็นสาเหตุการแท้งในแพะและสุกร จากข้อมูลการศึกษาในน้ำมันแพะ เชื้อสามารถแยกได้จากน้ำมันในแพะปกติ และแพะที่เต้านมอักเสบ การติดต่อผ่านการผสมพันธุ์ และช่องทางอื่น ๆ อาจแพร่เชื้อจากสัตว์สู่สัตว์ได้แต่ยังไม่พบการรายงาน การติดเชื้อผ่านสัตว์พาหะ เช่น หมัดหนูดูดเลือด (*Xenopsylla cheopis*) และยุง (*Aedes aegypti*) สามารถแพร่เชื้อ *B. pseudomallei* จากหนูตะเภาทดลองตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่งได้ (Rush & Thomas, 2012) นอกจากนี้ยังพบรายงานการแพร่เชื้อ *B. pseudomallei* ในโรงพยาบาลสัตว์จากแมวป่วยที่เข้ามาทำการรักษา (Choy et al., 2000)

รายงานทางระบาดวิทยาระบุว่า การติดเชื้อในสัตว์มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนเชื้อในดินหรือน้ำ โดยการระบาดในสัตว์เศรษฐกิจ เช่น โค กระบือ และสุกร มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อเศรษฐกิจในชนบท ขณะที่การติดเชื้อในสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัขและแมว มักมีความสัมพันธ์กับการสัมผัสโดยตรงกับดินหรือแหล่งน้ำธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีการรายงานการติดเชื้อในสัตว์ป่า และสัตว์ในสวนสัตว์ในหลายประเทศ รวมถึงการพบโรคในพื้นที่ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน เช่น อินเดีย แอฟริกา และอเมริกาใต้ ในพื้นที่หมู่เกาะแคริเบียนมีรายงานการพบ

โรคเมลิออยด์ในโลมาปากขวด (*Tursiops truncatus*) ที่เสียชีวิตหลังจากพายุเฮอริเคน โดยตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* ในเนื้อเยื่อของโลมา นับเป็นรายงานแรกของโรคนี้ในสัตว์ทะเลเลี้ยงลูกด้วยนมในแคริบเบียน และเน้นย้ำถึงความท้าทายในการวินิจฉัยโรค และความสำคัญของการเฝ้าระวังโรคในภูมิภาคเขตร้อนที่อาจมีการรายงานโรคต่ำกว่าความเป็นจริง (Canales et al., 2020) ซึ่งแสดงถึงแนวโน้มการกระจายตัวของโรคที่อาจจะกว้างขวางมากขึ้นในระดับโลก

ตารางที่ 2 อุบัติการณ์โรคเมลิออยด์ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย

ชนิดสัตว์	อุบัติการณ์/ Seroprevalence	พื้นที่หลัก	หมายเหตุ	ที่มา
แพะ	1.63/100,000/ปี	ทั่วประเทศ สูงสุดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	เสียชีวิตสูง เสี่ยงต่อเกษตรกร	Limmathurtsakul et al., 2012; Kwanhian et al., 2020; Tonpitak et al., 2014
สุกร	0.02/100,000/ปี (ระบาด)	ภาคใต้	แหล่งน้ำปนเปื้อน	Limmathurtsakul et al., 2012; Kwanhian et al., 2020; Limmathurtsakul et al., 2012
โค	0.01/100,000/ปี	ทั่วประเทศ	อุบัติการณ์ต่ำ	Limmathurtsakul et al., 2012
สุนัข	5.77% (seroprevalence)	ภาคใต้	ศึกษาในศูนย์พักพิง	Fungwithaya et al., 2024
ลิงแสม	14.35–57.1% (seroprevalence)	ภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	พบในลิงป่าและ ลิงสวนสัตว์	Saechan et al., 2022; Damrongsukij et al., 2021; Kasantikul et al., 2016
สัตว์สวนสัตว์	32 ราย (59% herbivores, 28% primates)	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้	พบมากฤดูฝน	Kasantikul et al., 2016

บทที่ 5

อาการทางคลินิก ของโรคmelioidosisในสัตว์

อาการทางคลินิกของโรคmelioidosisในสัตว์อาจแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับบริเวณหรืออวัยวะที่เกิดการติดเชื้อ อาจพบสัตว์มีอาการไข้ เบื่ออาหาร หรือพบต่อมน้ำเหลืองภายนอกมีการบวม การติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ มักพบได้บ่อย ดังตารางที่ 3

ระยะฟักตัว (incubation period) ของโรคmelioidosisในสัตว์ยังไม่ชัดเจนเนื่องจากข้อมูลยังมีจำกัดและอาจแตกต่างกันไปตามชนิดสัตว์และเส้นทางการติดเชื้อ จึงยังคงเป็นประเด็นที่ต้องการการศึกษาเพิ่มเติม (Kasantikul et al., 2016; Taetzsch et al., 2022) ในกรณีของสัตว์ทดลอง เช่น หนูและลิง พบว่าอาการของโรคสามารถเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ 24 - 48 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อ และสัตว์ที่ไม่ได้รับการรักษามักเสียชีวิตภายใน 5 วัน (Sivalingam et al., 2008) อย่างไรก็ตาม ในลิงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด อาจมีระยะฟักตัวที่ยาวนานหลายเดือนหรือเป็นปี โดยสัตว์อาจไม่แสดงอาการในช่วงแรก แต่สามารถแพร่เชื้อได้ (Taetzsch et al., 2022) เชื้อ *B. pseudomallei* สามารถอยู่ในร่างกายสัตว์โดยสงบได้หลายปีก่อนที่จะแสดงอาการของการเจ็บป่วย ส่วนในมนุษย์มีรายงานว่าระยะฟักตัวของโรคmelioidosis อยู่ที่ประมาณ 1-21 วัน (เฉลี่ย 9 วัน) (Currie et al., 2000)

รอยโรคในสัตว์ชนิดต่าง ๆ

มักพบรอยโรคผิวหนังที่มีขนาดแตกต่างกันและอาจมีขนาดใหญ่ได้ถึงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร (Department of Industry, Tourism and Trade, 2022) การติดเชื้ออาจพบตุ่มหนองเพียงตุ่มเดียว หรือหลายตุ่ม ซึ่งอาจจะอยู่ในอวัยวะใดก็ได้ อวัยวะที่ได้รับผลกระทบมากที่สุด ได้แก่ ปอด ม้าม ตับ และต่อมน้ำเหลืองที่เกี่ยวข้อง (Warawa, 2010; Rachlin et al., 2019; Desoutter et al., 2024)

แพะ

ในแพะที่ติดเชื้อโรคmelioidosis พบรอยโรคที่เด่นชัดในหลอดเลือดแดงใหญ่ (aortic lesions) ซึ่งมีรายงานการชันสูตรซากแพะที่ตรวจพบรอยโรคนี้อยู่ถึง 21% (Hambali et al., 2018) นอกจากนี้ยังพบผิวหนังในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ปอด ม้าม ตับ ต่อมน้ำเหลือง และเต้านม (Choy et al., 2000; Rush & Thomas, 2012; Hambali et al., 2018) โดยการติดเชื้อที่กระจายไปทั่วร่างกายนั้นพบได้น้อยในแพะเมื่อเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น

ตารางที่ 3 ลักษณะอาการทางคลินิกของโรคเมลิออยด์ที่พบในสัตว์แต่ละชนิด

ชนิดสัตว์	ลักษณะอาการทางคลินิก
แพะ	- แสดงอาการระบบทางเดินหายใจ ซึ่งพบหรือไม่พบร่วมกับอาการไอก็ได้ หากปอดอักเสบ มักมีอาการไอรุนแรง หายใจลำบาก - มักพบอาการเจ็บกับขาหลัง เบื่ออาหาร ผอมลงเรื่อย ๆ มีอาการทางระบบประสาท และเดินไม่สะดวกบ่อยครั้ง - พบการแท้งในสัตว์ตั้งท้อง
แกะ	- โดยทั่วไปพบอาการขาหลังเจ็บ เดินกะเผลก ขอบวมอักเสบ และอาการทางระบบประสาท - อาการระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ ไออย่างรุนแรง หายใจลำบาก และมีสิ่งคัดหลั่งจากจมูกและตา ร่วมกับการมีไข้
สุกร	- ในสุกรโตเต็มวัยมักเป็นแบบเรื้อรัง หรือไม่มีอาการ - ลูกสุกรอาจเกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดเฉียบพลัน ร่วมกับมีไข้ เบื่ออาหาร ไอ และมีสิ่งคัดหลั่งจากจมูกและตา - ไข้สูง (40 - 42°C; 104 - 108°F) - พอมแห้งอย่างรุนแรง มีอาการทางระบบประสาทร่วมกับการเดินไม่สัมพันธ์กัน เดินกะเผลกหรืออ่อนแรง ผิวหนังเป็นแผลหลุม อาการบวมใต้ผิวหนังส่วนขา และท้องเสีย - สุกรตัวผู้อาจพบภาวะอัมพาตอักเสบ สุกรตั้งท้องอาจพบการแท้งลูก และพบสิ่งคัดหลั่งผิดปกติจากระบบสืบพันธุ์
โค - กระบือ	- พบการรายงานน้อยมาก - มักเป็นโรคแบบเรื้อรังและอาจมีไข้ที่ผิวหนัง ไข้ พุติกรรมก้าวร้าว หายใจหอบ น้ำลายไหลมากอย่างต่อเนื่อง และเดินเซ อาจพบโรคข้ออักเสบเฉียบพลันได้
สัตว์กินเนื้อ (สุนัข แมว หมู และพังพอน)	- ในสุนัขและแมวพบได้น้อยมาก ในแมวอาจมีอาการตาอักเสบ โลหิตจาง และดีซ่าน - แสดงอาการระบบทางเดินหายใจร่วมกับอาการไอ มีน้ำมูก หายใจลำบาก - ขาหลังอ่อนแรง หรือ เดินไม่สัมพันธ์กัน และพอมแห้ง - มีอาการระบบทางเดินอาหารร่วมกับอาการปวดท้อง และพบฝีหนองที่เยื่อเมือก - พบการตายกะทันหันในรายที่เป็นโรคแบบเฉียบพลัน
ม้า	- อ่อนแรง พอมแห้ง ขาบวม ท้องอืด ท้องเสีย ไอ และมีน้ำมูก - การติดเชื้อที่ผิวหนังในระยะแรกจะคล้ายกับโรคกลากที่เกิดจากเชื้อรา แต่ต่อมาจะกลายเป็นตุ่มลักษณะใส - ในรายที่เป็นโรคแบบเฉียบพลันจะมีไข้สูง ขาบวม ท้องเสีย และตาย
สัตว์ตระกูลอุฐู (อุฐู ลามะ อัลปากา)	- โดยสัตว์ที่อยู่ตามธรรมชาติจะเป็นโรคได้ยาก แต่หากย้ายถิ่นที่อยู่ตามธรรมชาติไปยังพื้นที่เขตร้อนขึ้นจะเพิ่มความเสี่ยงในการติดเชื้อ - มักแสดงอาการระบบทางเดินหายใจ ร่วมกับอาการไอ และหายใจลำบาก - ขาหลังอ่อนแรง ขาเดินไม่สัมพันธ์กัน และพอมแห้ง - ในรายเฉียบพลันมักจะพบการตายในอุฐู และอัลปากา
สัตว์ตระกูลไพรเมต	- ส่วนใหญ่ไม่มีอาการทางคลินิก - สัตว์ที่แสดงอาการ อาจพบ การพอมแห้ง ซึม อ่อนเพลีย ไอเป็นพัก ๆ น้ำมูกไหล และมีอาการระบบทางเดินหายใจเล็กน้อย ซึ่งอาจนำไปสู่ภาวะปอดบวมเฉียบพลัน - การวินิจฉัยแยกกับโรควัณโรค และการติดเชื้อโครโมแบคทีเรีย
สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในทะเล (โลมา วาฬเพชฌฆาต แมวน้ำ)	- พบรายงานไม่บ่อยนัก อาการที่พบ ได้แก่ เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย มีไข้ ลำไส้อักเสบ ท้องเสีย และหายใจลำบาก - มีอาการทั้งแบบเรื้อรัง และเฉียบพลัน - พบภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด
จระเข้	อ่อนแรง ไม่กินอาหาร และเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว
นก	- ค่อนข้างมีความต้านทานต่อโรคเมลิออยด์ พบได้ไม่บ่อยในนกป่า แต่พบในนกเลี้ยงหรือนกต่างถิ่นในพื้นที่ที่มีโรคเมลิออยด์ประจำถิ่น - บางครั้งพบอาการซึม เบื่ออาหาร ท้องเสีย และอาจตายได้

ที่มา: Sprague & Neubauer, 2004; Rush & Thomas, 2012; Tonpitak et al., 2014; Merck Vet Manual, 2016; Choy et al., 2000

แกะ

รอยโรคในแกะมักประกอบด้วยฝีในปอด ม้าม ตับ และต่อมน้ำเหลือง ซึ่งคล้ายคลึงกับโรคในมนุษย์และสัตว์ชนิดอื่น นอกจากนี้ ยังพบหนองและแผลในเยื่อโพรงจมูกคล้าย Glanders ในม้า รวมถึงข้ออักเสบแบบมีหนอง (suppurative polyarthritis) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningoencephalitis)

สุกร

โดยทั่วไปจะพบฝีหนองที่อวัยวะภายใน ซึ่งฝีหนองมักพบในม้าม ตับ (รูปที่ 10) ปอด และต่อมน้ำเหลืองในปอด (Rush & Thomas, 2012) มักตรวจพบรอยโรคในการชำแหละที่โรงฆ่าสัตว์ (Ketterer et al., 1986; Choy et al., 2000) รอยโรคยังสามารถเกิดขึ้นที่ต่อมน้ำลายข้างหู (parotid glands) บ่งชี้ถึงการติดเชื้อในช่องปาก และมักพบรอยโรคที่ผิวหนัง ในบางกรณีอาจพบการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย โดยเฉพาะในลูกสุกร (Millan et al., 2007) การติดเชื้อมักเกี่ยวข้องกับการสัมผัสสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนเชื้อ โดยเฉพาะจากแหล่งน้ำ เช่น แม่น้ำหรือน้ำบาดาล และการระบาดมีความเชื่อมโยงกับการเกิดฝนตกหนักและน้ำท่วม (Ketterer et al., 1986; Millan et al., 2007; Kwanhian et al., 2020) (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงลักษณะฝีที่พบภายในตับสุกร (a) และฝีในม้ามโค (b) และ (c) ที่ป่วยตายด้วยโรคmelioidosis

โคกระบือ

รอยโรคที่พบ ได้แก่ ตุ่มหนองที่ผิวหนัง ฝีในม้าม (รูปที่ 10) และต่อมหมวกไต รวมถึงพบเยื่อหุ้มสมองอักเสบในกรณีติดเชื้อเรื้อรังมักพบหนองที่ปอด และข้ออักเสบแบบมีหนอง (Rush & Thomas, 2012)

สุนัขและแมว

สุนัขที่ติดเชื้อโรคมะลิออยด์ พบฝีหลายจุดบนผิวหนัง ปอด ตับ และต่อมน้ำเหลืองอักเสบ หลังการเสียชีวิต ส่วนในแมวพบฝีหนองที่ใบหน้า (Parkes et al., 2009) พบฝีที่ตับ ม้าม และต่อมน้ำเหลือง พบเนื้อตายเฉพาะที่ในไขสันหลัง ก้านสมอง และเยื่อหุ้มไขสันหลัง ร่วมกับการอักเสบแบบมีหนอง (O'Brien, 2003)

ม้า

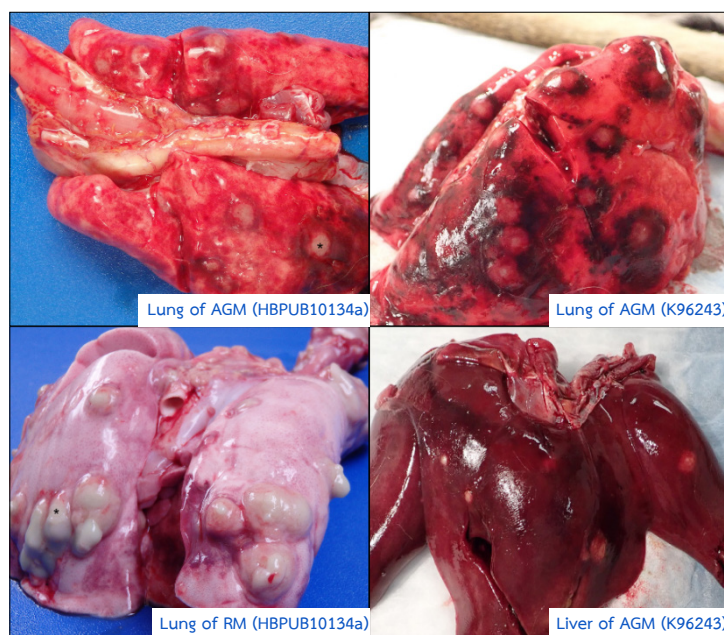
รอยโรคคล้ายในสัตว์ชนิดอื่น มักพบฝีหนองในปอด ตับ ไต และสมอง รวมถึงเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Rush & Thomas, 2012)

สัตว์ตระกูลอุฐ (อุฐ ลามะ อัลปากา)

โรคนี้พบได้ยากในอุฐที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติ แต่สัตว์ที่ติดเชื้อมีรอยโรคที่ปอดและการอักเสบเป็นหนองอย่างรุนแรง (Rush & Thomas, 2012)

สัตว์ตระกูลไพรเมต

มักพบฝี และก้อนหนองกระจายในหลายอวัยวะ ร่วมกับเนื้อเยื่อบวม ซึ่งมักพบในปอด ม้าม ตับ และบางครั้งพบในกระดูก และอาจพบความเสียหายของเส้นประสาท และสัตว์เป็นอัมพาต (Rush & Thomas, 2012; Trevino et al., 2021)



รูปที่ 11 รอยโรคตุ่มหนองที่ปอดและตับในลิง (African green monkey; AGM และ rhesus macaque; RM) ที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ HB PUB10134a (Thailand) และ K96243 (Thailand) (ที่มา: Trevino et al., 2021)

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในทะเล

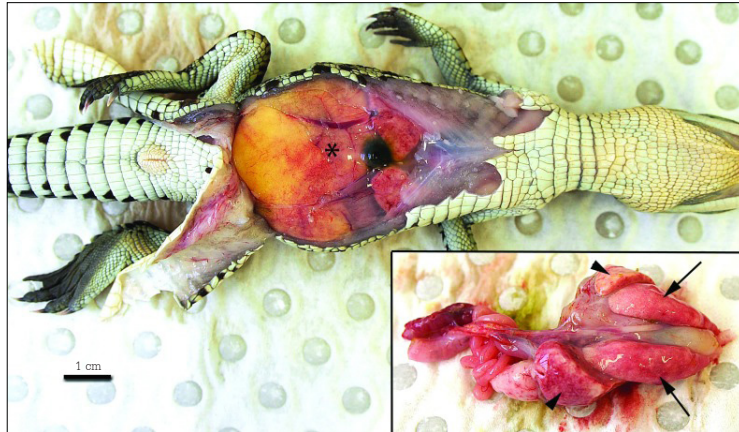
รอยโรคมีความรุนแรงแตกต่างกันไป รอยโรคที่พบได้บ่อยที่สุด ได้แก่ พบลักษณะบวม น้ำ เลือดออก และก้อนเนื้อสีขาวหรือเหลืองกระจายทั่วปอด นอกจากนี้ พบฝีขนาดเล็กและภาวะตับโต ส่วนฝีในม้ามพบได้น้อย และอาจพบฝีในกระดูก ต่อมไขมัน หรือเนื้อตายเฉพาะที่ในอวัยวะอื่น ๆ (Rush & Thomas, 2012)

สัตว์มีกระเปาะน้ำท้อง

อาจพบตุ่มหนองหรือฝีหนองเพียงตุ่มเดียวหรือหลายตุ่มที่อวัยวะภายใน ได้แก่ ปอด ม้าม ตับ และต่อ, น้ำเหลืองที่เกี่ยวข้อง (Ladds et al., 1990; Rush & Thomas, 2012)

จระเข้

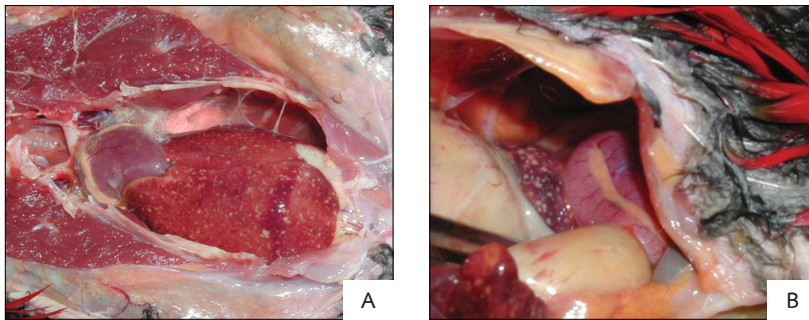
ลักษณะรอยโรคภายนอก หรือผิวหนังของจระเข้ที่เกิดจากเมลิออยด์ยังมีข้อมูลจำกัด ที่พบจากรายงานการตายด้วยโรคนี้ของลูกจระเข้ในน้ำเค็มในออสเตรเลีย พบถุงไข่แดงขนาดใหญ่ปกคลุมด้วยเยื่อเมือก กับมีจุดแดงหรือชมพูและปอดมีสีชมพูอ่อนมันวาว นอกจากนี้ยังพบ ฝีในอวัยวะภายใน และการติดเชื้อที่แพร่กระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต (Rachlin et al., 2019)



รูปที่ 12 แสดงรอยโรคลูกจระเข้ในน้ำเค็มที่ติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* พบถุงไข่แดงขนาดใหญ่ มีเยื่อเมือกอยู่ด้านบน (เครื่องหมายดอกจัน) ภาพเล็ก: แสดงด้านหลังของอวัยวะภายในที่ผ่าออก และถุงไข่แดงที่ถูกเอาออก ตับมีจุดสีแดงและชมพู (หัวลูกศร) และปอดมีสีชมพูอ่อนและวาว (ลูกศร) (ที่มา: Rachlin et al., 2019)

นก

รอยโรคที่มักพบ คือพบตุ่มหนองขนาดเล็กกระจายทั่วร่างกาย และตับ (Hamton et al., 2011)



รูปที่ 13 รอยโรคในนกแก้วปากเหลืองที่ตายด้วยโรคเมลิออยด์ แสดงรอยโรค (A) ตุ่มหนองขนาดเล็กกระจายในตับ และ (B) ม้าม (ที่มา: Hamton et al., 2011)

จากข้อมูลเกี่ยวกับอาการทางคลินิกและรอยโรคที่มีรายงานในสัตว์แต่ละชนิด ซึ่งมีความหลากหลาย การวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้องและแม่นยำนั้น จึงจำเป็นต้องพึ่งพาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ โดยการวินิจฉัยส่วนใหญ่จะใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล เพื่อระบุและจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุ (Choy et al., 2000; Hambali et al., 2018)

บทที่ 6

การเก็บตัวอย่าง บรรจุภัณฑ์และการขนส่งตัวอย่าง (Sample collection, Sample packaging and transportation)

การทดสอบทางห้องปฏิบัติการจะประสบความสำเร็จได้ นอกจากการปฏิบัติการทดสอบที่ถูกต้องแล้ว วิธีการเก็บตัวอย่าง ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง และการส่งตัวอย่างที่เหมาะสม ล้วนเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องมีการดำเนินการให้ถูกต้อง และเหมาะสมตามหลักวิชาการ และเนื่องจากเชื้อ *B. pseudomallei* มีความเสี่ยงสูงในการก่อโรคในมนุษย์ ดังนั้นการจัดการตัวอย่าง การเพาะเชื้อ และการทดสอบอื่น ๆ เพิ่มเติม ต้องดำเนินการด้วยความระมัดระวังสูงสุดเพื่อป้องกันการติดเชื้อในบุคลากรทางห้องปฏิบัติการ และเพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

การเก็บตัวอย่าง (Sample collection) ก่อนการเก็บตัวอย่าง สิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณา ได้แก่

1. การใช้ภาชนะ/หลอดเก็บตัวอย่าง บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการบรรจุตัวอย่างส่งตรวจห้องปฏิบัติการ
2. การจัดเก็บตัวอย่างแต่ละชนิดอย่างถูกต้อง
3. ข้อกำหนดในการขนส่งตัวอย่างทดสอบ: อุณหภูมิขณะขนส่ง และความปลอดภัยทางชีวภาพ
4. การให้ข้อมูลทางคลินิกที่ถูกต้องและเกี่ยวข้องกับตัวอย่างส่งตรวจ

การเก็บตัวอย่างจากสัตว์

โดยส่วนใหญ่การวินิจฉัยโรคเมลิออยด์ในสัตว์มักจะดำเนินการหลังจากสัตว์ตาย ยกเว้นในกรณีที่สัตว์แสดงอาการทางคลินิก หรือสัตว์มีรอยโรคที่ยังดำเนินอยู่ เช่น บาดแผลหรือฝีหนองบนผิวหนัง ซึ่งอาจจะสามารถแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ได้จากตัวอย่างเสมหะ หรือสิ่งคัดหลั่งของระบบทางเดินหายใจ เลือด ฝัหรือของเหลวจากบาดแผล ในกรณีที่สัตว์ตายพบว่าอวัยวะที่ได้รับผลกระทบและมีรอยโรคมากที่สุด ได้แก่ ปอด ม้าม ตับ ต่อม้ำเหลืองที่เกี่ยวข้อ และโพรงจุก ส่วนน้ำนม อูจระะ เลือด ปัสสาวะ สามารถเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจแยกเชื้อได้ ในสัตว์บางชนิดอาจมีการเก็บซีรัมเพื่อทดสอบทางซีรั่มวิทยาด้วย (Sim et al. 2018; Sprague & Neubauer, 2004)

การเก็บตัวอย่างควรทำโดยเร็วที่สุดหลังจากสัตว์ตาย เนื่องจากระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างหลังสัตว์ตายมีความสำคัญ ตัวอย่างเลือดจากสัตว์ที่ตายแล้วไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีคลินิก เนื้อเยื่อที่เริ่มเน่าเสียจะไม่สามารถทำการตรวจจุลพยาธิวิทยาได้ การเปิดผ่าซากต้องใช้วิธีปลอดเชื้อ และตัวอย่างควรนำส่งห้องปฏิบัติการโดยทันทีเพื่อผลการวินิจฉัยที่แม่นยำที่สุด ทั้งนี้ควรสวมอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (Personal Protective Equipment, PPE) ที่เหมาะสมทุกครั้งที่ทำกรเก็บตัวอย่างทางคลินิก

ขั้นตอนการเก็บเลือด

1. เตรียมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดลงในหลอดเก็บตัวอย่าง เพื่อป้องกันการเกิดลิ่มเลือด หรือใช้หลอดเก็บเลือดสำเร็จรูป
2. เก็บเลือดจากหลอดเลือดดำ (jugular vein) ในโค กระบือ แกะ สุกร และม้า หลอดเลือดดำที่ทางโค หลอดเลือดดำที่หูในสุกร หรือหลอดเลือดดำที่ปีกหรือหัวใจในสัตว์ปีก

ขั้นตอนการเก็บซีรัม

ใช้หลอดธรรมดาหรือหลอดแยกซีรัม (Serum separator tube; SST) (รูปที่ 14) ขนาดไม่น้อยกว่า 5 มิลลิลิตร ที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เก็บเลือดให้ได้อย่างน้อย 2/3 ของความจุเพื่อให้ได้ซีรัมอย่างน้อย 2 มิลลิลิตร ปลอ่ยให้เลือดในหลอดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และแยกซีรัมออกโดยการเทหรือปั่นเหวี่ยงก่อนนำส่งห้องปฏิบัติการ (หากไม่สามารถส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการได้ทันที)

การขนส่งตัวอย่าง

ขนส่งตัวอย่างเลือดและซีรัมไปยังห้องปฏิบัติการโดยบรรจุในบรรจุภัณฑ์สามชั้น ป้องกันการกระแทกและรั่วซึม ที่อุณหภูมิ 4 °C ภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บตัวอย่าง พร้อมแนบใบประวัติตัวอย่างที่กรอกข้อมูลครบถ้วนไปกับตัวอย่าง และระบุอย่างชัดเจนว่าสงสัยว่าเป็นโรคเมลิออยด์



รูปที่ 14 หลอดแยกซีรัม (BD Vacutainer® SST™)

การเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม

เมื่อยืนยันการตรวจพบโรคแล้ว แนะนำให้เก็บตัวอย่างดิน และน้ำจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่โดยรอบบริเวณที่เลี้ยงสัตว์ที่พบการติดเชื้อเพื่อระบุแหล่งที่ปนเปื้อน (Sim et al., 2018; Sprague & Neubauer, 2004) นอกจากนี้ การเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมยังอาจเก็บจากอากาศ และการ swab พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมที่สงสัยการปนเปื้อนเชื้อได้อีกด้วย (Menzies School of Health Research, 2022)

การเก็บตัวอย่างจากดิน

การเก็บตัวอย่างดินเพื่อตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* มีข้อแนะนำเกี่ยวกับความลึกที่เหมาะสมแตกต่างกันไปตามฤดูกาลและลักษณะพื้นที่ โดยทั่วไปการเก็บตัวอย่างที่ความลึก 30 เซนติเมตร เป็นมาตรฐานที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และสามารถตรวจพบเชื้อได้ดีในหลายพื้นที่ (Palasatien et al., 2008; Rattanavong et al., 2010; Limmathurotsakul et al., 2013a; Swe et al., 2021; Roe et al., 2022) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยล่าสุดพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* อาจพบมากขึ้นที่ความลึกมากกว่า 30 เซนติเมตร โดยเฉพาะในช่วงที่มีความชื้นสูงหรือใกล้ระดับน้ำใต้ดิน เช่น ที่ความลึก 60 เซนติเมตร หรือแม้แต่ 100-200 เซนติเมตร ในบางพื้นที่ (Manivanh et al., 2017; Pongmala et al., 2022; Swe et al., 2021) ฤดูกาลมีผลต่อการตรวจพบเชื้อ โดยพบว่าในฤดูฝนหรือช่วงมรสุมมีโอกาสตรวจพบเชื้อสูงขึ้น แม้ความสัมพันธ์นี้อาจไม่ชัดเจนทางสถิติ (Swe et al., 2021; Brook et al., 1997)

วิธีการเก็บตัวอย่างดินตามคู่มือการปฏิบัติงาน Standard Operating Procedure (SOP) ของหน่วยวิจัยโรคเขตร้อนมหิดล-อ็อกฟอร์ด (MORU, 2021) ซึ่งใช้แนวทางของคณะทำงานระหว่างประเทศ Detection of Environmental *Burkholderia pseudomallei* Working Party (DEBWorP)

อุปกรณ์ที่ต้องเตรียมเพื่อใช้ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างดิน ได้แก่ ถุงมือยางแบบใช้แล้วทิ้ง หน้ากากอนามัย รองเท้าบูท สเปรย์แอลกอฮอล์ 70% กระดาษเช็ดมือ เชือกและหลัก พลับ สายวัด (ยาวอย่างน้อย 5 เมตร) หลอดปลอดเชื้อขนาด 25 มิลลิลิตรสำหรับเก็บตัวอย่าง เครื่องชั่งหากต้องการชั่งดินในพื้นที่ ปากกาเคมีชนิดหมึกถาวร และกล่องพลาสติกกันแสงหรือกล่องโฟม (Menzies School of Health Research, 2022) ดำเนินการเก็บตัวอย่างดังนี้

1. เลือกสถานที่ในการเก็บดินตามวัตถุประสงค์การตรวจ เช่น เพื่อยืนยันแหล่งเชื้อที่ปนเปื้อนกรณีเกิดการติดเชื้อในสัตว์หรือคน แล้วทำการกำหนดบริเวณที่จะเก็บตัวอย่าง
2. ทำการเก็บดินเป็นตารางลักษณะรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส โดยเก็บดินจำนวน 100 ตัวอย่าง (10x10 จุด) ในพื้นที่ 50 ตารางเมตรโดยมีระยะห่างของแต่ละหลุม 5 เมตร เก็บดินที่ความลึก 30 เซนติเมตร (สามารถปรับระดับความลึก ตามความชื้นและฤดูกาล) ใช้สายวัดและทำเครื่องหมายด้วยหลักและเชือก (รูปที่ 15)
3. เก็บตัวอย่างดินโดยใช้พลั่วขนาดเล็กประมาณ 20 - 40 กรัม หรือทำการชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในหลอดปลอดเชื้อขนาด 25 มิลลิลิตร
4. ปิดฝาหลอด ระบุเบอร์หลุมที่เก็บ วัน เวลา ช่างหลอด และเก็บหลอดตัวอย่างในกล่องพลาสติกที่สามารถป้องกันแสงแดดเพื่อป้องกันดินแห้งและเชื้อตาย
5. ควรเก็บตัวอย่างดินไว้ที่อุณหภูมิห้อง (24 - 32 °C) และหลีกเลี่ยงแสงแดดโดยตรงในระหว่างการขนส่ง และส่งตรวจห้องปฏิบัติการโดยเร็ว

ข้อแนะนำ ควรเก็บตัวอย่างดินที่ความลึกอย่างน้อย 30 - 60 เซนติเมตร และหากต้องการเพิ่มโอกาสการตรวจพบ ควรเก็บตัวอย่างที่หลายระดับความลึก (Manivanh et al., 2017; Pongmala et al., 2022; Swe et al., 2021; Limmathurotsakul et al., 2013a)



รูปที่ 15 แสดงตัวอย่างการกำหนดจุดสำหรับการสุ่มเก็บตัวอย่างดินเพื่อตรวจหาเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

การเก็บตัวอย่างน้ำ

จากการสำรวจสิ่งแวดล้อมมีหลายรายงานชี้ให้เห็นว่าน้ำเป็นแหล่งกักเก็บที่สำคัญของเชื้อ *B. pseudomallei* (Vongphayloth et al. 2012; Ribolzi et al. 2016; Zimmermann et al. 2018) เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าน้ำฝนสามารถดักจับและชะล้างสิ่งที่อยู่ในดิน รวมถึงอนุภาค สิ่งปนเปื้อน และแบคทีเรีย น้ำจึงอาจบ่งชี้การกระจายตัวและการปรากฏตัวของเชื้อ *B. pseudomallei* ในภูมิภาคได้อย่างแม่นยำ นอกจากนี้ยังมีรายงานเชื้อ *B. pseudomallei* ถูกแยกได้จากน้ำใต้ดินและน้ำบาดาลในครัวเรือน ในออสเตรเลียตอนเหนือ (Draper et al. 2010; Baker et al. 2011) และเชื้อที่แยกได้เหล่านี้มีความเชื่อมโยงกับเชื้อที่แยกได้ทางคลินิกโดยใช้วิธีการตรวจทางอณูชีวโมเลกุล (Baker et al. 2011)

ดังนั้นเพื่อตรวจสอบแหล่งที่มาของการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ของสัตว์ที่อาจเกี่ยวข้องกับแหล่งน้ำ จึงควรมีการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อตรวจหาเชื้อ ตัวอย่างน้ำที่ควรเก็บส่งตรวจ ควรมาจากแหล่งน้ำใกล้ทุ่งหญ้าหากินของสัตว์ หรือเป็นแหล่งน้ำที่ใช้ในฟาร์มปศุสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน ถึงเก็บน้ำหรือน้ำบาดาลที่ไม่ผ่านคลอรีน (จากถังโดยตรงหรือจากก๊อก) น้ำนิ่งที่ขังในดิน น้ำในลำธารหรือหนองน้ำ และน้ำผิวดิน เช่น น้ำทิ้งจากชุมชนหรือโรงงาน (Draper et al., 2010; Limmathurotsakul et al., 2013a) เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* ควรเก็บตัวอย่างน้ำอย่างน้อย 3-5 ตัวอย่างต่อพื้นที่ หากพื้นที่มีขนาดใหญ่หรือมีแหล่งน้ำหลายแห่งในพื้นที่เดียวกัน (เช่น ก๊อกน้ำ ท่อระบายน้ำ หัวเจาะ น้ำบาดาล/น้ำจากถังเก็บน้ำที่ยังไม่ได้บำบัด ฯลฯ) ควรเก็บตัวอย่างน้ำเพิ่ม (>10 ตัวอย่าง) (Menzies School of Health Research, 2022)

อุปกรณ์ที่ต้องเตรียมเพื่อใช้ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำ ได้แก่ ถุงมือยางแบบใช้แล้วทิ้ง รองเท้าบูท สบู หรือสเปรย์แอลกอฮอล์ 70% สำหรับทำความสะอาดมือและแขน ขวดหรือภาชนะฝาเกลียวปลอดเชื้อขนาด 1 ลิตร เสากเก็บตัวอย่างแบบยึดได้ (รูปที่ 16) (หากเก็บน้ำจากลำธาร/ท่อระบายน้ำ) ปากกาเคมีชนิดหมึกถาวร กล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์ระบุ GPS แบบฟอร์มบันทึกประวัติตัวอย่าง (ถ้ามี) และกล่องพลาสติก (Menzies School of Health Research, 2022) โดยดำเนินการเก็บตัวอย่างดังนี้

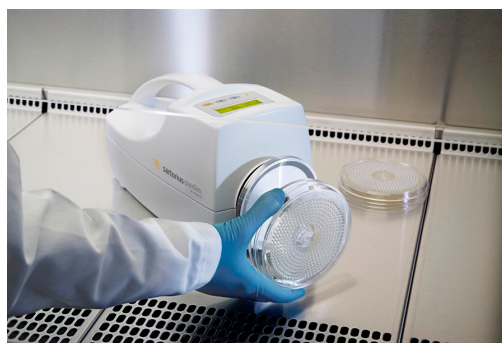
1. ตีฉลากภาชนะด้วยปากกาเคมีชนิดหมึกถาวร ระบุวันที่เก็บตัวอย่าง และหมายเลขตัวอย่าง
2. บันทึกข้อมูลประวัติตัวอย่างลงแบบฟอร์ม (ถ้ามี) พร้อมถ่ายภาพและบันทึกตำแหน่ง GPS ของจุดเก็บ
3. เก็บตัวอย่างน้ำลงขวดปลอดเชื้อขนาด 1 ลิตร (หรืออย่างน้อย 300 มิลลิลิตร) หลีกเลี่ยงการตกจากผิวน้ำโดยตรง
4. เก็บรักษาตัวอย่างในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง และดำเนินการส่งตรวจภายใน 1 สัปดาห์
5. ทำความสะอาดอุปกรณ์ ด้วยน้ำและสเปรย์แอลกอฮอล์ 70% ระหว่างใช้งานเพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้าม (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 ตัวอย่างเสาเก็บตัวอย่างน้ำแบบยึดได้ และขวดปลอดเชื้อสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 1 ลิตร

การเก็บตัวอย่างอากาศ

B. pseudomallei เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถแพร่กระจายทางอากาศได้ โดยเฉพาะในช่วงที่มีสภาพอากาศรุนแรง เช่น ฤดูมรสุมหรือเกิดพายุ ซึ่งมีรายงานการหายใจเอาเชื้อเข้าสู่ร่างกายหลังฝนตกหนักและลมแรง อาจเป็นปัจจัยสำคัญของการเกิดโรคเมลิออยด์ ซึ่งปัจจุบันมีเทคโนโลยีในการเก็บตัวอย่างจากอากาศด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างจากอากาศแบบพกพาที่มีแผ่นกรองดักจับอนุภาคที่อยู่ในอากาศ (รูปที่ 17) ซึ่งจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการตรวจแยกเชื้อในอากาศดีขึ้น โดยนำแผ่นกรองอากาศที่อยู่ภายในมาทำการเพาะแยกเชื้อหรือตรวจทางอณูชีวโมเลกุล (Chen et al., 2015; Currie et al., 2015)



รูปที่ 17 แสดงเครื่องเก็บตัวอย่างอากาศ MD8 Airport ที่เชื่อมต่อกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (ที่มา: <https://www.sartorius.hr/en/products/>)

ในกรณีที่ไม่มีอุปกรณ์เฉพาะทางอาจใช้เพลทอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะสำหรับ *B. pseudomallei* ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววางไว้ในระดับที่สูงพอสามารถรับลมที่พัดผ่านบริเวณเป้าหมาย โดยแนะนำให้เก็บตัวอย่างอากาศในช่วงที่มีพายุหรือมีกิจกรรมที่มีแนวโน้มก่อให้เกิดละอองลอยของแบคทีเรีย เช่น การฉีดล้างด้วยสายยางแรงดันสูงเพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่ของการเก็บตัวอย่างอากาศนั้นเพื่อทำการศึกษาวิจัย เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างหลายชั่วโมงต่อเนื่องในแต่ละครั้ง

การเก็บตัวอย่างจาก Swab

ตัวอย่าง swab ใช้ในการเก็บตัวอย่างพื้นผิวสิ่งแวดล้อมเพื่อตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* มีประโยชน์ในการเก็บตัวอย่างจากพื้นผิวหรือวัตถุขนาดเล็กที่ไม่มีรูพรุน ซึ่งมีแนวโน้มว่าจะเกิดการปนเปื้อนหรือมีการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* รวมถึงบริเวณภายในท่อน้ำหรือบ่อน้ำ/บ่อบาดาล และยังใช้ในการแยกเชื้อ *B. pseudomallei* จากกรงเลี้ยงสัตว์ ตู้อุณหภูมิ และถังน้ำ (McRobb et al., 2013; Kaestli et al., 2019; Rachlin et al., 2019; Dawson et al., 2020)

อุปกรณ์ที่ต้องเตรียมเพื่อใช้ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง swab ได้แก่ ถุงมือยางแบบใช้แล้วทิ้ง สบู่หรือสเปรย์แอลกอฮอล์ 70% สำหรับทำความสะอาดมือ sterile non-cotton swabs (เช่น rayon หรือ polyester) สารเพิ่มความชื้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (เช่น น้ำกลั่น น้ำเกลือ หรือ PBS) หลอดเก็บตัวอย่างปลอดเชื้อสำหรับเก็บ swab ของพลาสติกแบบซิปลงสำหรับใส่หลอดเก็บตัวอย่าง และปากกาเคมีชนิดหมึกถาวร โดยดำเนินการเก็บตัวอย่างดังนี้ (CDC, 2012)

1. สวมถุงมือ นำ swab ออกจากบรรจุภัณฑ์ โดยระวังอย่าให้ปลาย swab เกิดการสัมผัส
2. จุ่ม swab ลงในภาชนะบรรจุสารเพิ่มความชื้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปิบบของเหลวส่วนเกินออกเบา ๆ โดยดัน swab เข้าไปด้านในของภาชนะ
3. ใช้ swab เช็ดพื้นผิวที่จะเก็บตัวอย่าง พื้นที่ที่แนะนำในการเช็ดคือ <100 ตารางเซนติเมตร โดยเช็ดเป็นเส้นรูปตัว 'S' ในแนวตั้ง (รูปที่ 18 ซ้าย) ให้ครอบคลุมพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้งหมด หลีกเลียงการปล่อยให้ swab แห้งสนิท
4. หมุน swab อีกครั้งแล้วเช็ดบริเวณเดิมเป็นรูปตัว 'S' แนวเฉียง (รูปที่ 18 ขวา)
5. ใส่ swab ลงในหลอดเก็บตัวอย่างแล้วหักก้าน swab ออก ระวังไม่ให้มือสัมผัสกับด้านในของหลอดเก็บตัวอย่าง ปิดฝาให้แน่นและใช้ปากกาเคมีชนิดหมึกถาวรบันทึกหมายเลขตัวอย่าง วันที่ และเวลาที่เก็บตัวอย่าง
6. ใส่หลอดเก็บตัวอย่างลงในถุงพลาสติกที่ซิปลง และติดฉลากระบุข้อมูลตัวอย่างและผู้ส่ง



รูปที่ 18 แสดงการ swab รูปตัว 'S' ในแนวตั้ง (ซ้าย) และ 'S' ในแนวเฉียง (ขวา)

บรรจุภัณฑ์และการขนส่งตัวอย่าง (Sample Packaging and transportation)

ก่อนการขนส่งตัวอย่างควรตรวจสอบการติดฉลากและการจัดการตัวอย่างให้เหมาะสม มีการติดฉลากหรือระบุข้อมูลตัวอย่างให้ชัดเจนโดยอย่างน้อยต้องมีการระบุข้อมูลชื่อที่อยู่เจ้าของ หมายเลขหรือรหัสสัตว์ ชนิดตัวอย่างหรือเนื้อเยื่ออวัยวะที่เก็บตัวอย่าง ควรใช้ปากกาเคมีชนิดหมึกถาวร

ในการขนส่งตัวอย่างโดยหลักแล้วจะดำเนินการอย่างระมัดระวัง บรรจุภัณฑ์ที่ใช้สามารถทนต่อการจัดการอย่างไม่ระมัดระวัง มีความทนทานเพียงพอที่จะป้องกันการรั่วไหลของสิ่งบรรจุ รวมถึงการติดฉลากและมีเอกสารประกอบที่บันทึกข้อมูลของตัวอย่างอย่างเหมาะสม การขนส่งตัวอย่างทุกชนิดควรใช้บรรจุภัณฑ์สามชั้น (รูปที่ 19) ได้แก่

1. บรรจุภัณฑ์ชั้นใน (Primary container) เป็นภาชนะกันรั่ว เช่น หลอดพลาสติกหรือขวดบรรจุตัวอย่างที่มีฝาปิดสนิท ควรซีลด้วยเทปหรือพาราฟิล์ม และติดฉลากให้ถูกต้อง ปริมาณตัวอย่างในแต่ละภาชนะไม่ควรเกิน 500 มิลลิลิตร หรือ 500 กรัม

2. บรรจุภัณฑ์ชั้นกลาง (Secondary container) เป็นภาชนะรองรับภาชนะชั้นใน อาจเป็นถุงพลาสติกหรือกล่องที่กันน้ำและปิดผนึกแน่นหนา ต้องบรรจุวัสดุดูดซับที่เพียงพอ เช่น ผ้า กระดาษเช็ดมือหรือใยสังเคราะห์ กรณีขนส่งของเหลวเพื่อรองรับการรั่วไหล

3. บรรจุภัณฑ์ชั้นนอก (Outer packaging) เป็นภาชนะที่แข็งแรง ทนทาน และทำความสะอาดหรือกำจัดได้ง่าย เช่น กล่องพลาสติกเรียบ หรือกล่องกระดาษแข็ง ต้องปิดผนึกแน่นหนา และบรรจุแบบฟอร์มหรือข้อมูลที่เกี่ยวข้องในถุงพลาสติกกันน้ำภายใน รวมถึงต้องติดเทปรายการสิ่งของไว้ด้านนอกของบรรจุภัณฑ์

การใช้วัสดุทำความเย็น เช่น น้ำแข็งหรือน้ำแข็งแห้ง ต้องบรรจุในบรรจุภัณฑ์เสริมที่ป้องกันการรั่วซึมภายในบรรจุภัณฑ์ชั้นนอก (BMBL, 2020; IATA, 2019; WHO, 2021)

กรณีการขนส่งตัวอย่างไปต่างประเทศต้องส่งโดยหน่วยงานที่มีใบอนุญาตขนส่งที่ถูกต้องตามมาตรฐานสากล โดยทั่วไปแล้วสิ่งส่งตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยด์จะถูกจัดอยู่ในประเภท B เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่ได้อยู่ในรูปแบบที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ง่าย (DOT, 2011; IATA, 2019; WHO, 2021)

การขนส่งตัวอย่างแต่ละชนิดระหว่างการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างเลือด เนื้อเยื่อ ซีรัม swab ต้องขนส่งแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 °C กรณีตัวอย่าง swab ที่เก็บใน transport medium และตัวอย่างมูลสัตว์สามารถขนส่งที่อุณหภูมิห้องได้ ยกเว้นตัวอย่างมูลสัตว์ที่ต้องการตรวจทางปรสิตวิทยาพร้อมด้วยต้องขนส่งแบบแช่เย็น



รูปที่ 19 แสดงตัวอย่างบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการขนส่งตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

บทที่ 7

การตรวจวินิจฉัยโรคmelioidosis ในสัตว์ทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory Diagnosis)

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการยืนยันการติดเชื้อ เนื่องจากลักษณะอาการทางคลินิกของสัตว์แต่ละชนิดมีความหลากหลายและมักไม่จำเพาะ รวมถึงอาการทางคลินิกของสัตว์ที่แสดงออกนั้นคล้ายคลึงกับโรคติดเชื้ออื่น ๆ อีก เช่น วัณโรค (Tuberculosis) ปอดอักเสบ (Pneumonia) และมลงคล่อ (Glanders) จึงยากที่จะวินิจฉัยโรคนี้จากอาการทางคลินิก จำเป็นที่จะต้องมีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการในการยืนยันโรค

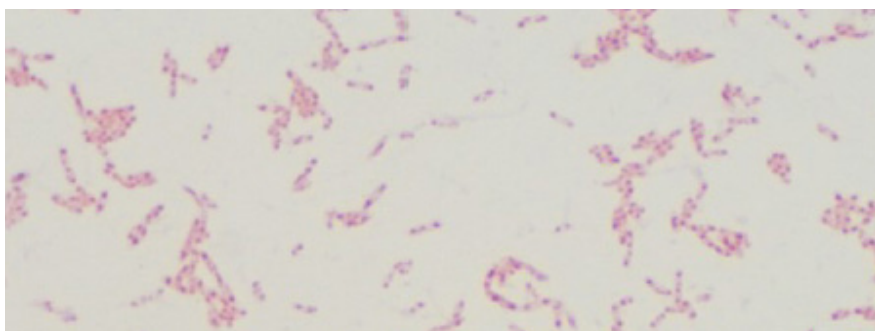
วิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคmelioidosisทางห้องปฏิบัติการ (Gold standard) คือ การเพาะแยกเชื้อ *B. pseudomallei* จากตัวอย่างส่งตรวจ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 2-3 วัน เนื่องจากเชื้อเติบโตช้า และตัวอย่างส่งตรวจมักมีการปนเปื้อน เนื่องจากมักเป็นตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมในการเลี้ยงสัตว์ เช่น ดิน หรือน้ำ เป็นต้น จำเป็นที่จะต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (Selective media) ช่วยในการแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ออกจากเชื้ออื่นที่สามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่า ที่จะเจริญขึ้นกลบในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป ซึ่งปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีในการตรวจวินิจฉัยที่สามารถดำเนินการทดสอบได้สะดวก รวดเร็ว และมีความจำเพาะสูง โดยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) และเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular technique) เข้ามาเป็นทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยเพื่อตรวจยืนยันโรคทางห้องปฏิบัติการ

ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ถูกต้อง รวดเร็ว และปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน การปฏิบัติการทดสอบจึงต้องอาศัยความรู้ ความเข้าใจด้านจุลชีววิทยา เทคนิคทางชีวเคมี การตรวจทางอณูชีววิทยา และการปฏิบัติตามมาตรการความปลอดภัยทางชีวภาพที่เข้มงวด เนื่องจากโดยทั่วไปเชื้อ *B. pseudomallei* จะไม่แพร่กระจายโดยการสัมผัส แต่สามารถก่อโรครุนแรงผ่านละอองลอย (aerosol) ได้ การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการโดยใช้อุปกรณ์สากลต้องปฏิบัติงานภายใต้ระบบความปลอดภัยชีวภาพระดับที่ 3 (Biosafety Level 3; BSL-3) อย่างไรก็ตาม ข้อกำหนดของพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 ได้ระบุให้เชื้อ *B. pseudomallei* อยู่ในกลุ่ม 3* ซึ่งสามารถดำเนินการตรวจวินิจฉัยภายใต้ห้องปฏิบัติการที่มีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 2 ที่มีการดำเนินการอย่างเข้มงวด (BSL-2 enhance) เพื่อป้องกันการติดเชื้อในบุคลากรห้องปฏิบัติการ การปฏิบัติงานกับเชื้อหรือตัวอย่างสงสัยต้องดำเนินการตามข้อแนะนำสำคัญ ดังต่อไปนี้

1. ดำเนินการปฏิบัติกับตัวอย่างภายในตู้ชีวนิรภัย Class II (Biosafety cabinet; BSC class II)
 2. ปั่นเหยียงตัวอย่างในเครื่องปั่นเหยียงที่มีฝาปิดที่รับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ
 3. ทำการขนส่งตัวอย่าง เฟลทเพาะเชื้อ สไลด์ย้อม ชุดทดสอบ Analytical Profile Index (API) ของตัวอย่าง ฯลฯ ในภาชนะปิดก่อนนำออกจาก BSC ไปยังตู้บ่มเชื้อหรือห้องจุลทรรศน์
 4. ผู้ปฏิบัติการทดสอบสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (Personal Protective Equipment; PPE) ดังนี้ เสื้อกาวน์ หน้ากากชนิด N95, goggle/แว่นตา/face shield, ถุงมือ 2 ชั้น หมวกคลุมผม และรองเท้า
- ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัย *B. pseudomallei* ทางห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการได้หลายวิธี ดังนี้

การย้อมสีแกรม (Gram staining)

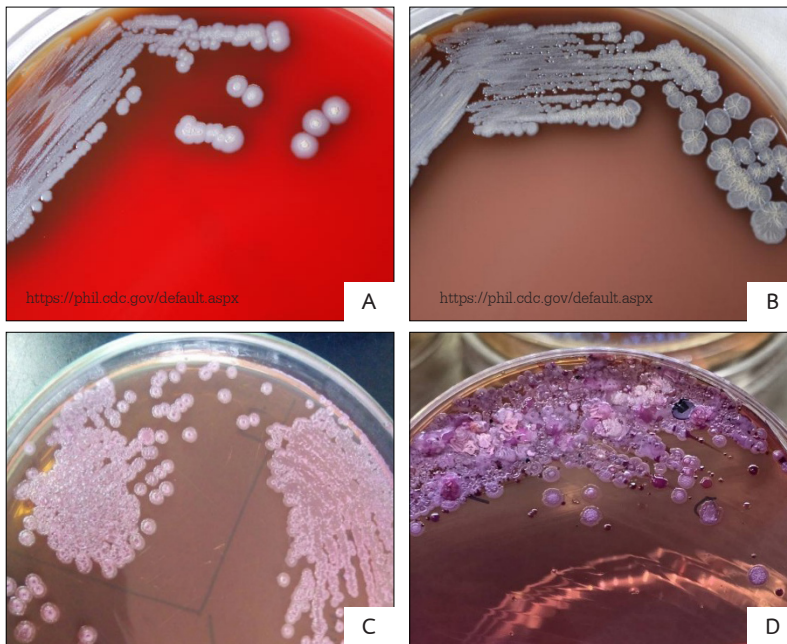
การย้อมสีแกรม เป็นวิธีการที่ทดสอบได้ง่ายเพื่อระบุลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเพื่อแยกกลุ่มแบคทีเรียระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ทำการ fix โคโลนีเชื้อสงสัยด้วยแอลกอฮอล์ 70% ก่อนการย้อมสี การย้อมสีแกรมประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ การย้อมด้วยสีย้อมที่ละลายน้ำได้ (crystal violet) การฟอกสี (decolorization) และการย้อมกลับสี (counter staining) เซลล์จะถูกย้อมด้วยสี crystal violet ในขั้นต้น แล้วเติมสารละลาย Gram's iodine ลงไป จะเกิดการสร้างสารเชิงซ้อนระหว่าง crystal violet และ iodine จากนั้นจึงเติมสารฟอกสี (เช่น ethyl alcohol หรือ acetone) ลงในตัวอย่าง สุดท้ายเติมสารย้อมกลับสี เช่น safranin ลงในตัวอย่าง ส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างรูปร่างของแบคทีเรีย ลักษณะของเชื้อ *B. pseudomallei* มีลักษณะเชื้อติดสีแกรมลบ (สีแดงหรือสีชมพู) เป็นแท่งเรียวยาว (bacilli) มักพบเป็นแท่งเดี่ยว ๆ แต่ก็อาจก่อตัวเป็นสายโซ่ได้เช่นกัน ติดสีชัดที่ปลายทั้ง 2 ด้าน (bipolar staining) ลักษณะคล้ายเข็มกลัดซ่อนปลาย (safety pin) (รูปที่ 20) อย่างไรก็ตามลักษณะดังกล่าวนี้ไม่จำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* เท่านั้น เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ เช่น *Pasteurella pestis* หรือกลุ่ม *Enterobacteriaceae* เช่น *Klebsiella* spp. และ *Escherichia coli* และกลุ่ม *Pseudomonas* ก็ติดสีในลักษณะคล้าย ๆ กันได้ (เพลินจันท์, 2547) ในส่วนของขั้นตอนการย้อมสีอาจมีความแตกต่างเล็กน้อยในองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้สำหรับการย้อมแกรม หากใช้ชุดอุปกรณ์ย้อมแกรมเชิงพาณิชย์ให้ปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตเสมอ



รูปที่ 20 เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จากการย้อมสีแกรม (Gram stain, 100x) แสดงลักษณะ “safety pin”
(ที่มา: Rout et al., 2024)

การเพาะแยกเชื้อ (Bacterial isolation)

วิธีการเพาะแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ถือเป็นวิธีมาตรฐานการในตรวจวินิจฉัยสำหรับโรคเมลิอยด์ทั้งในสัตว์และมนุษย์ *B. pseudomallei* สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อหลากหลายชนิด เช่น blood agar, MacConkey agar, eosin methylene blue (EMB), trypticase soy agar และ nutrient agar เป็นต้น โดยลักษณะโคโลนีของ *B. pseudomallei* ที่เจริญบนอาหารชนิดต่าง ๆ จะมีลักษณะ รูปร่าง และสี แตกต่างกัน(รูปที่ 21) แต่จะเติบโตได้ช้า อย่างไรก็ตามลักษณะโคโลนีที่เพาะโดยใช้อาหารทั่วไปในห้องปฏิบัติการอาจคล้ายแบคทีเรียชนิดอื่น จึงมีการพัฒนาการเพาะแยกเชื้อโดยใช้อาหารเฉพาะในการเพาะแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มักนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและได้รับการยอมรับ คือ อาหารชนิด Ashdown's agar เนื่องจากสามารถเพิ่มความไว และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่น อาหารเลี้ยงเชื่อนี้ยังเหมาะสำหรับการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่มีลักษณะการปนเปื้อนค่อนข้างมากจากเชื้อชนิดอื่น ๆ เช่น ดิน น้ำจากแหล่งที่สงสัย (Francis et al., 2006; Glass et al., 2009) นอกจากนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อ Ashdown's agar จะคัดเลือกเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา gentamicin อันเป็นลักษณะของเชื้อ *B. pseudomallei* ส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา gentamicin ได้เป็นปกติในบางพื้นที่ (Glass et al., 2009; Peacock et al., 2005)



รูปที่ 21 ลักษณะโคโลนีเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ A: โคโลนีเชื้อสีขาวบน blood agar บ่มที่ 37 °C 72 ชั่วโมง B: โคโลนีเชื้อสีขาวครีมบน chocolate agar บ่มที่ 37 °C 72 ชั่วโมง C: โคโลนีสีชมพูอ่อนบน MacConkey agar บ่มที่ 37 °C 48 ชั่วโมง D: โคโลนีเชื้อสีม่วงบน Ashdown's agar บ่มที่ 37 °C 96 ชั่วโมง

ขั้นตอนการเพาะแยกเชื้อต้องปฏิบัติงานในตู้ปลอดเชื้อ Biological Safety Cabinets Class II แยกตามชนิดตัวอย่างดังนี้

ตัวอย่างที่เป็นอวัยวะ (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 2557)

1. นำตัวอย่างอวัยวะที่ส่งตรวจเช็คทำความสะอาดผิวภายนอกด้วยสำลีแอลกอฮอล์
2. ใช้กรรไกรตัดผ่ากลางชิ้นเนื้อ แล้วนำไปเพาะเชื้อใน blood agar/ MacConkey agar/ Ashdown's agar และตัดชิ้นเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงใน selective broth
3. นำเพลท blood agar/ MacConkey agar/ Ashdown's agar และ selective broth บ่ม 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

4. ถ้าเชื้อเจริญบน blood agar โคโลนีจะมีสีขาวหรือสีครีม บน MacConkey โคโลนีจะมีสีชมพู และบน Ashdown's agar โคโลนีเชื้อจะมีลักษณะแบน สีชมพูอมม่วงออกม่นาว (รูปที่ 23) และเริ่มเหี่ยวยุบหลังบ่มนาน 72 ชั่วโมง (รูปที่ 21)

5. Subculture เชื้อที่ส่งสัยลงบน blood agar/ MacConkey agar/ Ashdown's agar บ่ม 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

ตัวอย่างจาก Swab (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 2557)

1. นำตัวอย่าง swab ที่ส่งตรวจไปเพาะเชื้อใน blood agar, MacConkey agar และ Ashdown's agar ส่วน swab ที่เพาะเชื้อแล้วให้ใส่ลงใน selective broth

2. นำเพลท blood agar/ MacConkey agar/ Ashdown's agar และ selective broth บ่ม 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

3. ถ้าเชื้อเจริญบน blood agar โคโลนีจะมีสีขาวหรือสีครีม ถ้าบน MacConkey โคโลนีจะมีสีชมพู ส่วนเชื้อบน Ashdown's agar จะมีลักษณะแบน สีม่วงอมชมพูออกม่นาว และเหี่ยวยุบ และใน selective broth จะเกิด pellicle หรือฝ้าที่ลอยอยู่ด้านบน (รูปที่ 22)

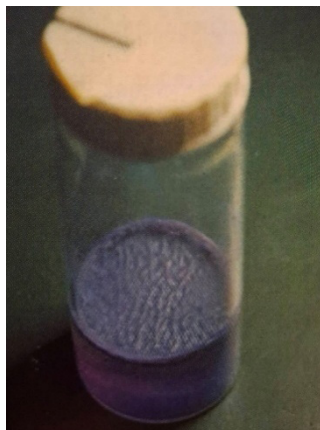
4. นำ selective broth ไปเพาะเชื้อใน blood agar/ MacConkey agar/ Ashdown's agar บ่ม ในที่ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง ถ้ามีเชื้อบนเพลทลักษณะโคโลนี ตามข้อ 2.2.3 ทำการ subculture โคโลนีที่ส่งสัยลงบน blood agar/ MacConkey agar/ Ashdown's agar บ่มในตู้บ่ม 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

ตัวอย่างจากดิน (ปรับปรุงจาก Limmathurotsakul et al., 2013a)

1. นำตัวอย่างดินไปชั่งประมาณ 10 กรัม ใส่ลงไปใน TBSS-C50 broth หรือ selective broth 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบหลอดเชื้อขนาด 25 มิลลิลิตร หรือ นำตัวอย่างดินไปชั่งประมาณ 20 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้ว ผสมดินและน้ำให้เข้ากันโดยใช้ vortex นาน 30 วินาที

2. บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C (37-42 °C) นาน 48 ชั่วโมง หากบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิแบบเขย่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเชื้อ โดยแนะนำให้ตั้งค่าความเร็ว 220 rpm ที่ 40 °C นาน 48 ชั่วโมง

3. ใน TBSS-C50 broth หรือ selective broth จะเกิด pellicle หรือฝ้าที่ลอยอยู่ด้านบน ให้ดูด น้ำส่วนใส 10 ไมโครลิตร ลงบน blood agar/MacConkey agar/Ashdown's agar, streak เพลท เพื่อให้ได้โคโลนี เดี่ยวของเชื้อบ่มในตู้บ่ม 37 °C นาน 48 ชั่วโมง หรือสังเกตทุกวันนาน 7 วัน



รูปที่ 22 ลักษณะ pellicle หรือฝ้าของ *Burkholderia pseudomallei* ที่ลอยอยู่ด้านบน selective broth (ที่มา: เพลินจันทร์, 2547)

ตัวอย่างน้ำ (Menzies School of Health Research, 2022)

วิธีการที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* ในตัวอย่างน้ำมี 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ เตรียมตัวอย่างน้ำโดยการกรองและ enrichment ตามด้วยการตรวจหาเชื้อโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และ/หรือ PCR การตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วย PCR (ภาคผนวก ค) โดยทั่วไปการกรองตัวอย่างน้ำจะใช้แผ่นกรองเมมเบรนละเอียด เช่น แผ่นกรองเซลลูโลส ขนาด 0.22 µm บั้มมือหรือบั้มสุญญากาศไฟฟ้าสามารถใช้กรองตัวอย่างน้ำได้

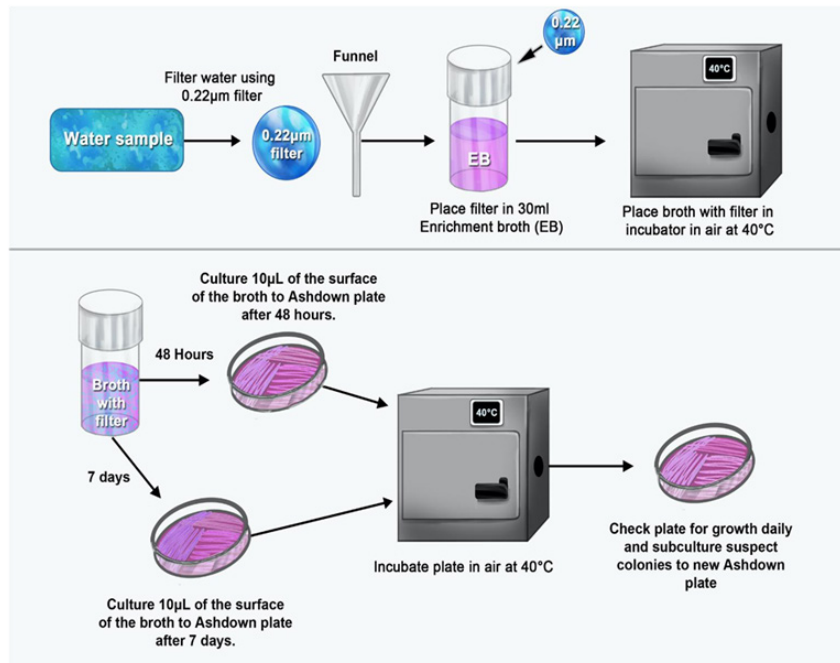
อย่างไรก็ตาม แนะนำให้ใช้บั้มสุญญากาศไฟฟ้าเมื่อทำการทดสอบตัวอย่างจำนวนมาก ควรทำความสะอาดและฆ่าเชื้อกรวยกรองและระบบกรองให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นตามด้วยแอลกอฮอล์ 70% และทำให้แห้งหลังจากกรองตัวอย่างทุกตัวอย่างแล้ว เพื่อให้แน่ใจว่าจะไม่เกิดการปนเปื้อนข้ามในตัวอย่าง

ขั้นตอนการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำ (รูปที่ 23) ดังนี้

1. ตรวจสอบให้แน่ใจว่ากรวยกรอง forceps และอุปกรณ์กรองได้รับการฆ่าเชื้ออย่างทั่วถึงด้วยน้ำกลั่น ตามด้วยเอทานอล 70% ก่อนใช้งาน
2. นำตัวกรองออกจากบรรจุภัณฑ์ ตรวจสอบให้แน่ใจว่ามีเพียง forceps เท่านั้นที่สัมผัสกับตัวกรอง แล้ววางลงบนฐานกรวยกรอง
3. ตรวจสอบให้แน่ใจว่ากรวยกรองอยู่ในตำแหน่งที่แน่นหนา ก่อนเทตัวอย่างน้ำลงในกรวยกรอง
4. เปิดบั้ม ตรวจสอบให้แน่ใจว่าวาล์วตัวกรองเปิดอยู่ หรือใช้บั้มมือเพื่อเริ่มกรองตัวอย่าง (ขั้นตอนปฏิบัติที่อาจจะแตกต่างกันไปตามระบบบั้มกรองที่ใช้งาน ควรปฏิบัติตามคำแนะนำเฉพาะของผู้ผลิต)
5. เมื่อกรองน้ำจนหมดแล้ว ให้นำตัวกรองไปใส่ในอาหารเหลวปริมาตร 30 มิลลิลิตร (TBSS-C50 หรือ Ashdown's broth ผสม colistin)
6. ทำความสะอาดกรวยกรองให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ตามด้วยเอทานอล 70% แล้วเช็ดให้สะอาดก่อนกรองตัวอย่างต่อไป
7. บ่มอาหารเหลวที่มีแผ่นกรองที่อุณหภูมิ 40°C
8. หลังจากบ่มครบ 48 ชั่วโมง ให้นำอาหารเหลวด้านบน 10 ไมโครลิตร ใส่ลงบนเพลทเพาะเชื้อ Ashdown's agar, streak เพลทเพื่อให้เชื้อแยกโคโลนีเดี่ยว
9. ตรวจสอบเพลทเพาะเชื้อหลังจากเพาะเชื้อ 2 วัน และตรวจทุกวันเพื่อหาโคโลนีที่น่าสงสัย
10. โดยนำโคโลนีที่น่าสงสัยไปเพาะเชื้อลง Ashdown's plate เพิ่มเติมตามรูปที่ 21 ด้านบน
11. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 8 และ 9 หลังจากบ่มอาหารเหลวเป็นเวลา 7 วัน โดยทำการเพาะแยกเชื้อบนเพลท Ashdown's agar ใหม่ บ่มและตรวจสอบการเจริญเติบโตหลังจากเพาะลงเพลท 2 วัน จากนั้นจึงตรวจทุกวันเพื่อหาการเจริญเติบโตหรือกลุ่มแบคทีเรียที่สงสัย

นอกจากนี้ยังมี **Modified Moore's swab method*** ที่นำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างน้ำก่อนการเพาะแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีข้อจำกัดของเครื่องบั้มสุญญากาศในการกรองตัวอย่างน้ำ วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ดำเนินการ มีดังนี้

- | | |
|-------------------------|---|
| 1. ผ้าก๊อซ | 6. Magnetic stirrer และ Magnetic bar |
| 2. เชือก | 7. Ashdown's broth 150 มิลลิลิตร ใน flask 500 มิลลิลิตร |
| 3. ปีกเกอร์ ขนาด 2 ลิตร | 8. Ashdown's agar |
| 4. ขาตั้ง | 9. ตั้บแบบเขย่า |
| 5. ที่คีบ/ forceps | 10. ตั้บ |



รูปที่ 23 แผนภาพแสดงขั้นตอนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในการเพาะแยกเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จากตัวอย่างน้ำ (ที่มา: Menzies School of Health Research, 2022)

วิธีเตรียม Moore's swab โดย

1. นำผ้าก๊อชขนาด กว้าง 6 นิ้ว X ยาว 48 นิ้ว มาพับซ้อนกันให้ได้ 8 ชั้น จากนั้นมัดตรงกลางให้แน่น เหลือปลายเชือกไว้ความยาวประมาณ 50 เซนติเมตร ดังรูปที่ 24

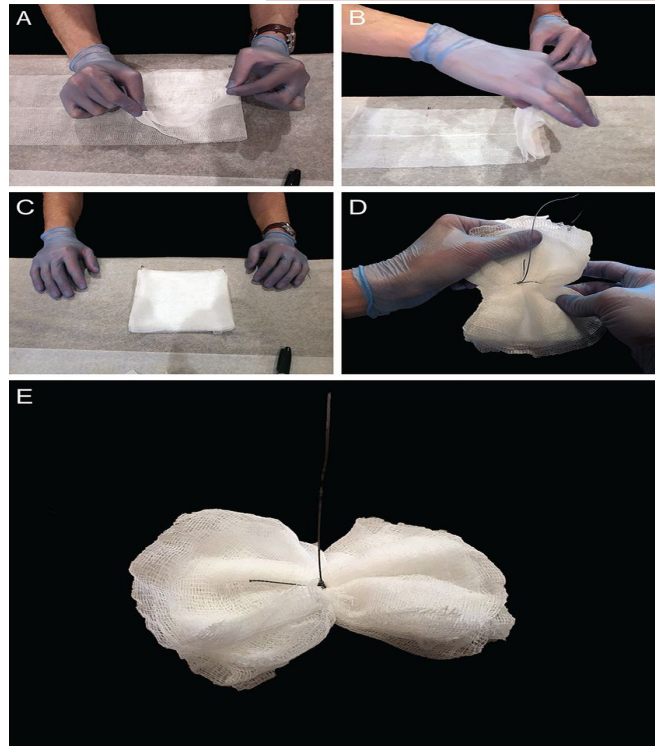
2. นำ Moore's swab ใส่ลงในถุงที่สามารถอบฆ่าเชื้อได้ แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นตอนการเพาะเชื้อจากตัวอย่างน้ำโดย Modified Moore's swab method

1. เติมตัวอย่างน้ำ 1-2 ลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 3 ลิตร
2. ใส่ Magnetic bar ลงในบีกเกอร์ นำไปตั้งบนเครื่อง Magnetic stirrer
3. นำ Moore's swab ใส่ลงไปตรงกลางบีกเกอร์ ให้ตัวอย่างน้ำท่วม swab ผูกเชือกไว้กับขาตั้ง
4. เปิดเครื่อง Magnetic stirrer ให้น้ำหมุนวน ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง
5. เมื่อครบ 1 คืน ใช้ที่คีบย้าย swab ลงใน Ashdown broth บ่มที่ 37 °C ความเร็ว 200 rpm 24 ชั่วโมง

6. จากนั้นดูด Ashdown broth มาทำการ spread ลงบน Ashdown agar บ่มที่ 37 °C สังเกตการเจริญของเชื้อทุกวัน นาน 7 วัน

หมายเหตุ *ข้อมูลจากการฝึกอบรมโดย ศ.รศนา วงศ์รันชีวิน และ ดร.โชติมา โพธิทรัพย์ (มหาวิทยาลัยขอนแก่น)



รูปที่ 24 การเตรียม Moore's swab (A และ B) พับผ้าก๊อชขนาด 6 x 48 นิ้ว พับซ้อนกันไปมา (C และ D) ผูกแผ่นผ้าก๊อชด้วยเชือกตรงกลาง (E)
ได้ Moore's swab สำหรับใช้งาน (ที่มา: Sikorski & Levine, 2020)

ตัวอย่างอากาศ (Menzies School of Health Research, 2022) ทำการเพาะแยกเชื้อ ดังนี้

1. หากใช้แผ่นวุ้นแบบเฉพาะเก็บตัวอย่างอากาศ ให้วางแผ่นวุ้นในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C โดยตรง
2. ตรวจสอบแผ่นวุ้นหลังจากนั้น 2 วัน เพื่อดูการเจริญเติบโต และสังเกตต่อทุกวัน
3. หากใช้แผ่นกรองอากาศแบบพกพา ให้นำแผ่นกรองใส่ลงในขวดเก็บตัวอย่างที่สะอาดและมีฉลากติดหรือภาชนะที่ปิดผนึกได้ โดยใช้ forceps ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4. เติมหาอาหารเหลวเฉพาะ (TBSS-C50 หรือ Ashdown's broth) 30 มิลลิลิตร ลงในภาชนะที่มีแผ่นกรอง ตรวจสอบให้แน่ใจว่าผ่านกรองละลายจนหมด (หากใช้แผ่นกรองแบบเจลาคติน) หรือจมอยู่ในอาหารเหลวจนหมด
5. บ่มอาหารเหลวที่มีตัวกรองที่อุณหภูมิ 40 °C
6. หลังจากบ่มเพาะเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้นำอาหารเหลว 10 มิลลิลิตร ของพื้นผิวทั้งหมดมาเพาะบน Ashdown's agar ทำการ streak เพลาเพื่อให้ออกโคโลนีเดียว
7. ตรวจสอบเพลทหลังจากนั้น 2 วัน เพื่อดูว่ามีการเจริญเติบโตหรือไม่ จากนั้นตรวจสอบทุกวัน เพื่อดูว่ามีการเจริญเติบโตของโคโลนีที่สงสัยหรือไม่
8. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5 และ 6 หลังจากบ่มอาหารเหลวเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำอาหารเหลว 10 มิลลิลิตร มาเพาะต่อลงบนเพลท Ashdown ที่สะอาด บ่มและตรวจสอบหลังจาก 2 วัน และตรวจสอบทุกวันว่าพบการเจริญเติบโตของโคโลนีที่สงสัยหรือไม่

โดยทั่วไปหลังจากขั้นตอนการเพาะแยกเชื้อได้เชื้อโคโลนีเดียว จะทำการทดสอบทางจุลชีววิทยาขั้นพื้นฐาน (รวมถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีทั่วไป การย้อมสีแกรม การทดสอบออกซิเดสให้ผลบวก การไม่สามารถดูดซึมน้ำตาล arabinose ได้ การดื้อต่อ gentamicin และ colistin ร่วมกับไวต่อยา amoxicillin-clavulanate) การทดสอบยืนยัน *B. pseudomallei* สามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น API20NE, Vitek II Compact, specific latex agglutination test, lateral flow immunoassay หรือการทดสอบ PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei*

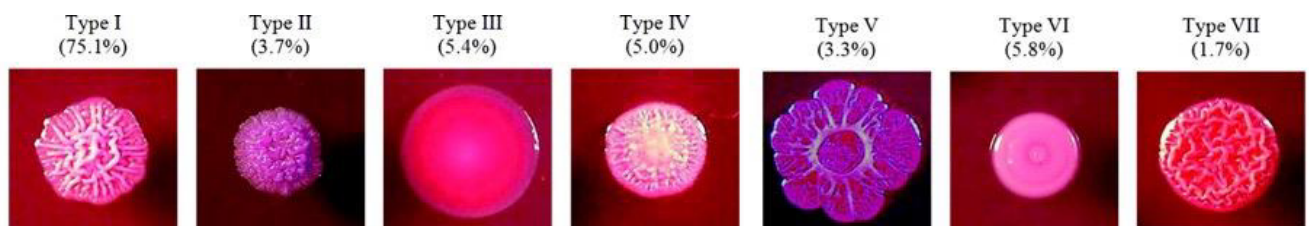
ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถตรวจยืนยันได้จากการตรวจเทคนิคทางชีวเคมี (Biochemical test) ร่วมกับการย้อมสีแกรมเพื่อตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล เช่น PCR หรือ Real-time PCR ซึ่งมีความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัย ทำให้สามารถทราบผลการตรวจวินิจฉัยได้เร็วขึ้นกว่าวิธีการตรวจดั้งเดิม และช่วยลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อของผู้ปฏิบัติงาน

ลักษณะโคโลนีของเชื้อเมลิออยด์บน blood agar (รูปที่ 21, 25) โดยทั่วไปจะมีลักษณะเป็นจุดกลมเล็ก ๆ โคโลนีเป็นชนิด non-hemolytic มีสีครีม มีนวลแบบโลหะ (metallic sheen) อาจจะแห้งและย่นเมื่อบ่มนานมากกว่า 24 ชั่วโมง ลักษณะบนอาหาร Ashdown's agar (รูปที่ 21, 25) โคโลนีมักจะพัฒนาเป็นโคโลนีสีม่วงหรือม่วงอบชมพู แบน และมีรอยย่นภายใน 48 ชั่วโมง และลักษณะของเชื้อบน MacConkey agar (รูปที่ 21) จะมีลักษณะไม่มีสี มีนวล (non-lactose fermenter) และโคโลนีมักจะมึลลักษณะสีชมพูหลังจาก 48 ชั่วโมง และอาจเกิดลักษณะมีนวลแบบโลหะได้เช่นกัน (Hoffmaster et al., 2015) โคโลนีมีกลิ่นเฉพาะคล้ายกลิ่นไธเรหยาจากดินหลังฝนตกใหม่ นอกจากนี้ สันฐานวิทยาของโคโลนีก็มีความหลากหลายมาก และสายพันธุ์หนึ่งอาจมีโคโลนีได้หลายรูปแบบ (Chantratita et al., 2007) ดังแสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 25 ลักษณะโคโลนี *Burkholderia pseudomallei* บนอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ และลักษณะรูปร่างเชื้อจากการย้อมสีแกรม

ซ้ายบน: โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Ashdown's agar ที่ 24 ชั่วโมง ขวาบน: โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Ashdown's agar ที่ 48 ชั่วโมง
ซ้ายล่าง: โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar ที่ 48 ชั่วโมง ขวาล่าง: ลักษณะรูปร่างเชื้อจากการย้อมสีแกรม (ที่มา: Meumann and Currie, 2024)



รูปที่ 26 การเปลี่ยนแปลงทางสันฐานวิทยาของ *Burkholderia pseudomallei* บน Ashdown's agar บ่มที่ 37 °C นาน 4 วัน (ที่มา: Chantratita et al., 2007)

ตารางที่ 4 ลักษณะของโคโลนีเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ภายหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง)	ขนาดโคโลนี (มิลลิเมตร)	ลักษณะโคโลนี
Trypticase soy agar (TSA)	18-24	0.5-1	รูปร่างกลม เป็นมันเงา ผิวเรียบ มีสีขาว ทึบแสง และด้าน ผิวเป็นลักษณะปุ่มคล้ายสะดือ โคโลนีอาจเป็นสีเหลืองได้
Blood agar (BA)	18-24	0.5-1	รูปร่างกลม ออกสีครีม ขอบเรียบ ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแตก (hemolysis) ลักษณะคล้ายเชื้อโคลิฟอร์ม บางสายพันธุ์เป็นเมือก (mucoid) บางสายพันธุ์มีลักษณะมันวาว (metallic sheen)
	48	1-2	ลักษณะมันวาวคล้ายโลหะเพิ่มขึ้น เริ่มเหี่ยวย่น อาจพบ alpha-hemolytic
	72	2-3	โคโลนีจะเปลี่ยนลักษณะเป็นแห้ง และยุบชัดเจน
MacConkey agar	18-24	0.5-1	รูปร่างกลม เป็นจุดใส ๆ ไม่มีสี (non-lactose fermenter)
	48	1-2	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ไม่มันวาว มันวาว (metallic sheen) เริ่มมีสีชมพู (mimicking lactose fermenters) เริ่มแห้งและยุบ
Chromogenic agar			โคโลนีจะมีสีขาวหรือไม่มีสี ไม่พบโคโลนีแห้งและยุบ
<i>Burkholderia pseudomallei</i> selective agar			โคโลนีรูปร่างกลม มีรอยยุบ เป็นเมือกหรือแห้ง แบน สีม่วง และหลังจากบ่มเกิน 2 วัน โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม
Ashdown's agar (ASH)	18-24	Pinpoint	โคโลนีจะมีขนาดเล็กเป็นจุดใส ๆ กลมขอบเรียบ
	48	1-2	โคโลนีกลม แบน สีม่วงอ่อน หรือม่วงอมชมพู ขอบเรียบ มันวาวคล้ายโลหะ
	72	2-3	โคโลนีกลม แบนสีม่วง ขนาดใหญ่ขึ้น ลักษณะเปลี่ยนเป็นโคโลนีแห้ง และยุบชัดเจน

ปรับปรุงข้อมูลจาก เทลินจันทร์ (2547) และ Melioidosis Reference Manual (Menzies School of Health Research, 2022)

การทดสอบลักษณะทางชีวเคมี (Biochemical test)

การทดสอบลักษณะทางชีวเคมีที่ใช้ทดสอบเชื้อ *B. pseudomallei* มักใช้การทดสอบ oxidase เป็นหลักเพื่อแยกจากเชื้อ *B. mallei* ซึ่ง *B. pseudomallei* จะให้ผลบวก (+) ต่อ oxidase test และ *B. mallei* จะให้ผลลบ (-) ตัวอย่างวิธีการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อใช้ระบุชนิดของเชื้อที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 5 นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีชุดทดสอบสำเร็จรูป หรือการใช้เครื่องอัตโนมัติในการยืนยันเชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น ชุดทดสอบ API20NE และ Vitek system เป็นต้น โดย API20NE มีข้อได้เปรียบในการระบุเชื้อได้ถูกต้องมากกว่า ส่วน Vitek system มีข้อได้เปรียบในเรื่องเวลาการทดสอบที่สั้นกว่า (Lowe et al., 2002; Deepak et al., 2008)



รูปที่ 27 ตัวอย่างชุดทดสอบสำเร็จรูป API20NE (ที่มา: <https://scientific.dksh.co.th/product/>)

ตารางที่ 5 การระบุลักษณะเบื้องต้นและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Burkholderia* และ *Pseudomonas* species ที่มีความสำคัญทางสัตวแพทย์*

Test	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Glucose fermented	-	-	-
Oxidase	+	V	+
Catalase	+	+	+
Growth at 42°C	+	-	+
Motility	+	-	+
Urease	V	V	V
Growth on MacConkey	+	V-	+
Nitrate reduction	+	+	+
Gas from nitrate	+	-	+
Odour	Putrid becoming earthy	-	Fruity, grape-like
Haemolysis	+	-	+
Maltose	+	-	-
Manitol	+	-	V

Note: + = greater than or equal to 90% positive; - = less than or equal to 10% positive; v = variable, 11 to 89% positive

*ปรับปรุงข้อมูลจาก Clinical Veterinary Microbiology (Markey et al., 2013)

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Susceptibility Testing)

รูปแบบความไวต่อยาต้านจุลชีพ (antimicrobial susceptibility pattern) สามารถใช้เป็นข้อมูลเสริมในการระบุเชื้อ *B. pseudomallei* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปเชื้อชนิดนี้มีความดื้อต่อ gentamicin และ colistin แต่มีความไวต่อ amoxicillin-clavulanate (Hoffmaster et al., 2015; Trinh et al., 2018) สถาบันมาตรฐานทางคลินิกและห้องปฏิบัติการ (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI) ได้กำหนดแนวทางการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเฉพาะในเอกสาร CLSI M45-ED3:2016 ซึ่งแนะนำให้ใช้การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) เป็นหลัก อย่างไรก็ตาม ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมะเร็ง มักใช้วิธี disk-diffusion susceptibility testing ในการประเมินเบื้องต้น โดยค่าสำหรับการแปลผลการทดสอบดังกล่าวได้ถูกกำหนดไว้โดย The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (ภาคผนวก ข) ทั้งนี้ CLSI (2016) ได้แนะนำยาต้านจุลชีพหลักที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ได้แก่ amoxicillin-clavulanate, ceftazidime, imipenem, doxycycline, tetracycline และ trimethoprim-sulfamethoxazole (รูปที่ 28)

Potential Bacterial Agents of Bioterrorism: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis*, and *Brucella* spp.

Testing Conditions

Medium: Broth microdilution: unsupplemented Brucella broth pH adjusted to 7.1 ± 0.1 for *Brucella* spp.; CAMHB + 2% defined growth supplement for *F. tularensis*; CAMHB for all other organisms
Inoculum: Growth method or direct colony suspension in CAMHB, equivalent to a 0.5 McFarland standard; for *F. tularensis*, prepare inoculum as a direct colony suspension from a chocolate agar plate.
Incubation: $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$; ambient air; 16 to 20 hours; for *Y. pestis*, incubate 24 hours and if unacceptable growth in the control well, reincubate an additional 24 hours; for *F. tularensis* and *Brucella* spp., incubate 48 hours (see comment 8).

Routine QC Recommendations (See Table 23A [CAMHB], Table 23E [CAMHB + 2% defined growth supplement], and Table 23F [Brucella broth] for acceptable QC ranges).

E. coli ATCC® 25922 (all organisms)
E. coli ATCC® 35218 (for β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations and *B. pseudomallei*)
S. aureus ATCC® 29213 (for *B. anthracis* and *F. tularensis*)
P. aeruginosa ATCC® 27853 (for *B. mallei/pseudomallei* and *F. tularensis*)
S. pneumoniae ATCC® 49619 (for *Brucella* spp. only)

See QC Tables 23A, 23E, and 23F.

* ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

Agents to Consider for Primary Testing

<i>B. anthracis</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>B. mallei</i>	<i>B. pseudomallei</i>	<i>F. tularensis</i>	<i>Brucella</i> spp.
Penicillin ^a	Gentamicin	Ceftazidime	Amoxicillin-clavulanate	Gentamicin Streptomycin	Gentamicin Streptomycin
Doxycycline Tetracycline	Streptomycin	Imipenem	Ceftazidime	Doxycycline Tetracycline	Doxycycline Tetracycline
Ciprofloxacin	Doxycycline Tetracycline	Doxycycline Tetracycline	Imipenem	Ciprofloxacin or levofloxacin	Trimethoprim- sulfamethoxazole
	Ciprofloxacin		Doxycycline Tetracycline	Chloramphenicol	
	Trimethoprim- sulfamethoxazole		Trimethoprim- sulfamethoxazole		
	Chloramphenicol				

Abbreviations: ATCC®, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; QC, quality control.

รูปที่ 28 แสดงข้อมูลในการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อกลุ่ม Bioterrorism: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis* และ *Brucella* spp. (ที่มา: CLSI, 2016)

การตรวจวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยา (Serology diagnosis)

การทดสอบทางซีรั่มวิทยาหลายรูปแบบได้รับการพัฒนาแต่ยังขาดมาตรฐานและมีความไวและความจำเพาะต่ำ (Lau et al., 2015) วิธีการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการกรมปศุสัตว์ใช้ตรวจ คือ การทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงทางอ้อม (Indirect Haemagglutination Assay: IHA) เป็นการทดสอบทางซีรั่มวิทยาแบบง่ายที่สามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่สัตว์สร้างขึ้นต่อเชื้อ *B. pseudomallei* โดยวิธีการนี้เป็นวิธีที่ประยุกต์ใช้จากวิธีทดสอบในการตรวจหาแอนติบอดีในมนุษย์ ปัจจุบัน IHA จึงเป็นการทดสอบที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการสำรวจทางซีรั่มวิทยาในการวัดปริมาณการตอบสนองของแอนติบอดีในทั้งในมนุษย์และสัตว์ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* แต่ด้วยวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการทางซีรั่มวิทยาไม่สามารถสรุปได้ว่าสัตว์มีการติดเชื้อหรือไม่ จึงทำให้การนำ IHA มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยด์ในประเทศไทยนั้นมีความจำกัดอย่างมาก โดยเฉพาะข้อจำกัดในการแปลผลการทดสอบในพื้นที่ที่เป็นโรคประจำถิ่น (สุรพงษ์และคณะ, 2015) มีข้อสังเกตว่าความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยของ IHA ในภูมิภาคที่มีโรคเมลิออยด์เป็นโรคประจำถิ่นนั้นจะต่ำ เนื่องจากอัตราการตรวจพบผลบวกในซีรั่มของประชากรที่มีสุขภาพดีจะพบได้สูง (MORU, 2011) อย่างไรก็ตาม IHA สามารถใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาเพื่อทดสอบว่าสัตว์เคยมีการสัมผัสกับเชื้อ *B. pseudomallei* มาก่อนหรือไม่ เนื่องจากสัตว์ที่เคยสัมผัสเชื้อจะมีระดับภูมิคุ้มกันในระดับสูงแม้ว่าจะไม่เป็นโรคก็ตาม

ข้อมูลของ Veterinary laboratory users guide (Queensland Gov., 2019) ได้สรุปไว้ว่าผลการตรวจ Complement Fixation Test (CFT) ของ *B. pseudomallei* ค่อนข้างจำเพาะและบ่งชี้การติดเชื้อที่กำลังดำเนินอยู่ ขณะที่การทดสอบ IHA บ่งชี้การติดเชื้อในอดีตและปัจจุบัน สัตว์ในพื้นที่ที่มีโรคเมลิออยด์ประจำถิ่นมักมีค่า IHA พื้นฐานสูงกว่า ดังนั้นควรใช้ความระมัดระวังในการตีความและวินิจฉัยผลการตรวจทางซีรั่มวิทยา การวินิจฉัยโรคเมลิออยด์จะแม่นยำยิ่งขึ้นหากทำการทดสอบทั้ง CFT และ IHA และเปรียบเทียบผลดังตารางที่ 6 แม้ว่าตารางนี้จะใช้สำหรับการวินิจฉัยโรคเมลิออยด์ในแพะโดยเฉพาะ แต่สามารถใช้เป็นแนวทางในการวินิจฉัยโรคเมลิออยด์ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ ได้

ตารางที่ 6 การแปลผลการทดสอบ Complement Fixation Test (CFT) และ Indirect Haemagglutination Assay (IHA) สำหรับการวินิจฉัยโรคเมลิออยด์ในแพะ

Titer of test		การแปลผลสำหรับการตรวจวินิจฉัย
CFT	IHA	
Negative	Negative	ไม่ติดเชื้อ (ไม่รวมการติดเชื้อในช่วง 6 วันก่อนการเก็บตัวอย่าง)
Negative	40-160	อาจเป็น agglutinins ตามธรรมชาติหรือปฏิกิริยาร่วมกับเชื้อก่อโรคอื่น ๆ รวมทั้งอาจบ่งชี้ถึงการติดเชื้อหรือการสัมผัสในอดีต
Negative	≥320	อาจเป็นโรคเมลิออยด์ อาการอาจปรากฏหรือไม่ปรากฏก็ได้ ตรวจเลือดซ้ำภายใน 14-21 วัน เพื่อตรวจหาระดับไตเตอร์ที่เพิ่มขึ้น อาจบ่งชี้ถึงการติดเชื้อเรื้อรัง
8-16	40-160	อาจเป็นโรคเมลิออยด์ อาการอาจปรากฏหรือไม่ปรากฏก็ได้ ตรวจเลือดซ้ำภายใน 14-21 วัน เพื่อตรวจหาระดับไตเตอร์ที่เพิ่มขึ้น
≥ 32	≥ 320	ติดเชื้อ มีแนวโน้มว่ามีอาการทางคลินิกของโรคเมลิออยด์เฉียบพลัน

ที่มา: Queensland Gov., 2019

อย่างไรก็ตาม ในสัตว์จำพวกอูฐ ผลการตรวจทางซีรั่มวิทยาที่เป็นบวกสามารถตีความได้ว่าเป็นหลักฐานการสัมผัสเชื้อเท่านั้น เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาทางซีรั่มวิทยาในสัตว์เหล่านี้ ดังนั้นผลการทดสอบทางซีรั่มวิทยาอาจไม่สัมพันธ์กับอาการทางคลินิกที่สังเกตพบ ไม่ควรสรุปว่าสัตว์ป่วยด้วยโรคเมลิออยด์ หากสงสัยการติดเชื้อควรส่งตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับตรวจยืนยันด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อ และ PCR ตามที่ World Organisation for Animal Health (2024) แนะนำ

การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา (Molecular techniques)

ปัจจุบันเทคนิคทางอนุชีววิทยาได้รับการพัฒนาอย่างกว้างขวาง และมีบทบาทสำคัญในการตรวจวินิจฉัยโรคในสัตว์ทางห้องปฏิบัติการเป็นอย่างมาก สำหรับการวินิจฉัยโรคเมลิออยด์ก็เช่นเดียวกัน เนื่องจากเทคนิคทางอนุชีววิทยาเป็นเทคนิคที่ตรวจวินิจฉัยได้ผลการทดสอบที่รวดเร็วและแม่นยำ แม้ว่าการเพาะเชื้อจะยังคงเป็นมาตรฐาน สำหรับการวินิจฉัยโรค แต่ใช้เวลาและอาจเป็นความท้าทายเนื่องจากลักษณะเฉพาะของเชื้อที่ต้องใช้ความพิถีพิถันในการเพาะแยกและยืนยันเชื้อ วิธีการทางอนุชีววิทยาจึงเป็นทางเลือกที่รวดเร็วกว่า และมีความจำเพาะสูงกว่า ซึ่งมีความจำเป็นในการควบคุมการระบาดและการป้องกันการแพร่กระจายของโรค

เทคนิคทางอนุชีววิทยาที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *B. pseudomallei* ในปัจจุบัน

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) และ Real-time PCR (qPCR)

วิธี PCR เป็นเทคนิคอนุชีววิทยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุดสำหรับการตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน (amplify) ชิ้นส่วนของ DNA เป้าหมายที่จำเพาะเจาะจงให้ได้ในปริมาณมากแบบทวีคูณ (exponentially) จากสารตั้งต้นเพียงเล็กน้อย ทำให้สามารถระบุเชื้อแบคทีเรียได้แม้ว่าจะมีจำนวนเชื้อมีน้อยมากก็ตาม ในปัจจุบันเทคนิค PCR ถูกนำมาใช้ในการตรวจยืนยันเชื้ออย่างกว้างขวาง มีศักยภาพในการตรวจหาเชื้อได้อย่างรวดเร็ว และแม่นยำยิ่งขึ้น

หลักการ: PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการในหลอดทดลองจาก DNA ต้นแบบโดยปฏิกิริยาประกอบด้วยสามขั้นตอนหลัก ได้แก่ การแยกสาย DNA (denaturation), การเข้าจับกันระหว่าง primer และ DNA สายเดี่ยว (annealing) และการขยายสำเนา DNA (extension) ซึ่งทำให้ได้สำเนา DNA จำนวนมากที่สามารถนำ

ไปวิเคราะห์ได้ ในส่วนของ Real-time PCR หรือ qPCR เป็นการพัฒนา PCR ที่วัดปริมาณ DNA เป้าหมายได้ในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ (in real-time) โดยอาศัยการตรวจวัดสารเรืองแสง (fluorescence) ที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบการวัดความเข้มของสัญญาณสารเรืองแสงในแต่ละรอบทำให้สามารถคำนวณปริมาณเริ่มต้นของ DNA ในตัวอย่างได้

ยีนเป้าหมาย: มีการใช้ยีนหลากหลายชนิดเป็นเป้าหมายสำหรับการทดสอบ PCR เป้าหมายที่พบได้บ่อยและมีความน่าเชื่อถือสูงคือ กลุ่มยีนระบบการหลั่งแบบที่ 3 (Type III secretion system 1; T3SS-1) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *orf2* บริเวณนี้ได้รับการอนุรักษ์ไว้อย่างสูงใน *B. pseudomallei* และไม่ปรากฏในสายพันธุ์ใกล้เคียงอื่น ๆ เช่น *B. thailandensis* และ *B. mallei* ทำให้เป็นเป้าหมายที่มีความจำเพาะสูง (Rainbow et al., 2002; กัญญ์ธนิต และคณะ, 2558) เป้าหมายอื่น ๆ ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบเมตาบอลิซึม (*lpxO*) และลำดับจีโนมเฉพาะอื่น ๆ

ตารางที่ 7 ข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิค PCR และ Real-time PCR ในการตรวจวินิจฉัย *B. pseudomallei*

ข้อดี	ข้อจำกัด
-รวดเร็ว สามารถทราบผลได้ภายในไม่กี่ชั่วโมง ช่วยลดเวลาในการวินิจฉัยได้อย่างมากเมื่อเทียบกับวิธีการเพาะแยกเชื้อ	-แม้ความไวจะสูง แต่ความไวอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับประเภทของตัวอย่าง เช่น การศึกษาบางกรณีแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเลือดมีความไวต่อการตรวจต่ำกว่าตัวอย่างอื่น ๆ
-PCR มีความไวสูงและจำเพาะเจาะจง ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียแม้มีปริมาณน้อยมาก และระบุชนิดของ <i>B. pseudomallei</i> ได้อย่างแม่นยำ โดยไม่สับสนกับสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม <i>Burkholderia</i>	-คุณภาพของ DNA ที่สกัดจากตัวอย่างมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จของปฏิกิริยาในการทดสอบ
-สามารถใช้ตรวจหา <i>B. pseudomallei</i> ได้โดยตรงจากตัวอย่างทางคลินิก (เช่น เลือด หนอง เสมหะ) หรือตัวอย่างสิ่งแวดล้อม (เช่น ดิน น้ำ) โดยไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการเพาะเชื้อก่อน	

วิธีการขยาย DNA แบบไอโซเทอร์มอล (Isothermal Amplification Methods)

หลักการทำงานของ Isothermal Amplification คือ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA หรือ RNA) โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ที่ทำงานที่อุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียว โดยจะใช้เอนไซม์ที่ทนความร้อนและมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น strand displacement เพื่อแยกสาย DNA สองสายออกจากกัน และสร้างสาย DNA ใหม่ขึ้นมาอย่างรวดเร็วและจำเพาะเจาะจง วิธีนี้จึงไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือให้ความร้อน (thermal cycler) ในการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิเหมือนเทคนิค PCR จึงเหมาะสำหรับการใช้งานในสภาพแวดล้อมที่มีทรัพยากรจำกัด ณ จุดตรวจ เทคนิคนี้จะขยาย DNA ที่อุณหภูมิคงที่เพียงจุดเดียว วิธีการทดสอบที่ใช้หลักการนี้ ได้แก่

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

หลักการ: LAMP ใช้ไพรเมอร์ชุดเฉพาะเพื่อขยายลำดับ DNA เป้าหมายในปฏิกิริยาต่อเนื่องที่อุณหภูมิคงที่ (โดยทั่วไปคือ 60-65°C) การขยายยีนสามารถตรวจจับได้ด้วยสายตาโดยใช้ความขุ่นหรือสีของสารเรืองแสง

ยีนเป้าหมาย: กลุ่มยีน TTS1 ยังเป็นเป้าหมายที่จำเพาะสำหรับการทดสอบ (Rainbow et al., 2002; Chantratita et al., 2008)

ข้อดี: รวดเร็ว ทราบผลการทดสอบภายใน 1 ชั่วโมง ใช้งานง่าย ใช้เครื่องมืออุปกรณ์น้อย และมีความไวและความจำเพาะสูงเทียบเท่า PCR

Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

หลักการ: RPA เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ทำงานภายใต้อุณหภูมิต่ำคงที่ (37-42 °C) ใช้เอนไซม์ Recombinase ในการช่วยให้ Primer จับคู่กับ DNA เป้าหมายได้อย่างรวดเร็ว จากนั้นเอนไซม์ DNA Polymerase จะทำการสังเคราะห์ DNA ต่อไป ทำให้ได้ปริมาณ DNA ที่มากพอสำหรับการตรวจจับภายในเวลาไม่กี่นาที

การผสมรวมกับระบบ CRISPR-Cas (Integration with CRISPR-Cas Systems): RPA สามารถใช้ร่วมกับระบบ CRISPR-Cas12a เพื่อสร้างชุดทดสอบที่มีความไวและจำเพาะสูงสำหรับการตรวจหาเชื้อก่อโรค ขั้นตอน RPA จะขยายสัญญาณ DNA เป้าหมาย จากนั้นจะกระตุ้นเอนไซม์ Cas12a ให้ตัดโมเลกุลรีพอร์เตอร์ และสร้างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์

ข้อดี: วิธีนี้มีความรวดเร็วมากทราบผลภายใน 10-20 นาที ใช้อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิร่างกาย เหมาะต่อการใช้งานภาคสนาม และมีความไวสูง สามารถตรวจจับ DNA ที่มีความเข้มข้นต่ำได้

การจำแนกสายพันธุ์และการตรวจลำดับสารพันธุกรรม (Molecular Typing and Sequencing)

วิธีการนี้เหมาะสำหรับใช้ในการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา การสืบสวนการระบาด และการแยกแยะระหว่างสายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อ *B. pseudomallei* รวมถึงการศึกษาวិจัยเชิงลึก

Multilocus Sequence Typing (MLST)

หลักการ: MLST เป็นวิธีที่ใช้จำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีนพื้นฐาน (Housekeeping Genes) โดยยีนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดำรงชีวิตของจุลชีพ และยีนที่ใช้ในกระบวนการซ่อมแซมสารพันธุกรรม (ชนม์ชนก, 2560; Ibarz & Maiden, 2009) ลำดับเฉพาะของแต่ละยีนจะได้รับการกำหนดหมายเลขอัลลีล (allele number) และการรวมกันของหมายเลขเหล่านี้ถูกนำไปสร้างโปรไฟล์ “sequence type (ST)” ที่เป็นลักษณะเฉพาะสำหรับสายพันธุ์ สำหรับยีนพื้นฐานที่ใช้ในการทดสอบด้วย MLST สำหรับเชื้อ *B. Pseudomallei* ที่มีเผยแพร่อยู่บนเว็บไซต์ <https://pubmlst.org/> ได้แก่ ยีน *ace*, *gltB*, *gmhD*, *lepA*, *lipA*, *nark* และ *ndh* (Godoy et al., 2003)

การประยุกต์ใช้: MLST เป็นวิธีการมาตรฐานสากลสำหรับการจำแนกสายพันธุ์ ซึ่งช่วยให้สามารถเปรียบเทียบสายพันธุ์ที่แยกได้จากสถานที่ต่าง ๆ

Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA)

หลักการ: MLVA เป็นวิธีการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ระดับโมเลกุลโดยใช้ PCR เพิ่มจำนวนและจัดลำดับลำดับดีเอ็นเอซ้ำ ๆ ที่เรียกว่า “variable number tandem repeats” (VNTRs) วิธีนี้จะสร้างรูปแบบ MLVA เฉพาะเจาะจงสำหรับสายพันธุ์แบคทีเรียที่ศึกษา โดย MLVA ให้ผลได้เร็วกว่าวิธีการดั้งเดิมอย่าง Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) และการตรวจวินิจฉัยลำดับเบสแบบ MLST ซึ่งอาจใช้เวลาหลายวัน (Currie et al., 2009)

การประยุกต์ใช้: MLVA ให้รูปแบบ DNA ความละเอียดสูง มีประโยชน์หลักในการจำแนกสายพันธุ์จุลชีพ เพื่อวัตถุประสงค์ด้านระบาดวิทยา โดยช่วยในการระบุแหล่งที่มาของการระบาด ติดตามการแพร่กระจายของเชื้อโรค และช่วยในการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ (Currie et al., 2009; Yen et al., 2009; Lindstedt et al., 2013)

Sequencing/ Whole-Genome Sequencing (WGS):

หลักการ: เป็นเทคนิคหาลำดับเบสของ DNA โดยอาจทำเฉพาะบางยีน (gene panel), ส่วนที่เข้ารหัสโปรตีนทั้งหมด หรือทั้งจีโนม (Whole Genome Sequencing; WGS) เป็นการทดสอบที่ละเอียดที่สุด โดยจะถอดรหัสลำดับเบสของ DNA ทั้งหมดในจีโนมของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ข้อมูลพันธุกรรมทั้งหมด นำไปวิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมเฉพาะของเชื้อนั้น ๆ ประเมินความรุนแรงของเชื้อ และการตอบสนองต่อยาได้อย่างครอบคลุม ปัจจุบันการถอดรหัสลำดับเบสของ DNA ทั้งหมดในจีโนม ใช้เทคโนโลยี Next-Generation Sequencing (NGS) เพื่ออ่านลำดับเบสของ DNA ได้อย่างละเอียดและได้ข้อมูลพันธุกรรมทั้งหมด กำหนดลำดับ DNA ทั้งหมดของจีโนมของสิ่งมีชีวิต การยืนยันชนิดเชื้อด้วยเทคนิค Sanger Sequencing โดยการระบุยีนที่จำเพาะ เช่น การหาลำดับยีน *groEL* มีความสามารถในการจำแนกเชื้อได้ดีกว่าการใช้ 16S rRNA เนื่องจากสามารถแยกแยะ *B. pseudomallei* จากสปีชีส์อื่นในสกุล *Burkholderia* ได้แม่นยำกว่า (Lau et al., 2015)

การประยุกต์ใช้: WGS เป็นวิธีที่ครอบคลุมและมีความละเอียดสูงที่สุดสำหรับการระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย สามารถนำข้อมูล WGS ไปจัดโปรไฟล์ MLST ของเชื้อได้ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังมีประโยชน์ในการนำไปวิเคราะห์เพื่อทำความเข้าใจวิวัฒนาการและการแพร่กระจายของสายพันธุ์ *B. pseudomallei* แม้ว่าจะยังไม่เป็นเครื่องมือวินิจฉัยที่ใช้กันทั่วไป แต่การพัฒนาเทคนิค WGS เพื่อการใช้งานมีเพิ่มมากขึ้น และมีต้นทุนการปฏิบัติการทดสอบที่ลดลง

การตรวจวินิจฉัยโรคmelioidosisในสัตว์สามารถทำได้จากตัวอย่างทางคลินิก เช่น ฝีมหนอง เลือด สิ่งคัดหลั่ง หรือเนื้อเยื่อ โดยวิธีการเพาะแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ยังคงเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการยืนยันการติดเชื้อ การใช้ Ashdown's agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ จะให้ลักษณะโคโลนีจำเพาะที่สามารถแยกแยะได้ชัดเจน การตรวจทางอณูชีววิทยา เช่น PCR ช่วยยืนยันการติดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่การทดสอบทางซีรั่มวิทยา เช่น ELISA และ IHA เหมาะสำหรับการเฝ้าระวังโรคเบื้องต้นมากกว่าการใช้ในการวินิจฉัยโรค การดำเนินการทั้งหมดในห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสูง เนื่องจากเชื้อ *B. pseudomallei* มีความเสี่ยงต่อบุคลากร ผู้ปฏิบัติงาน และผลการตรวจที่ถูกต้องมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการรักษา ควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายของโรคในสัตว์

บทที่ 8

การรักษา การป้องกัน และควบคุม โรคเมลิออยด์ในสัตว์

ข้อควรพิจารณาเฉพาะสำหรับการรักษาในสัตว์

การรักษาโรคเมลิออยด์ในปศุสัตว์มักไม่ค่อยมีการดำเนินการ เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง ต้องทำการรักษาเป็นระยะเวลานาน และมีความเสี่ยงสูงที่จะล้มเหลว โดยสัตว์ที่ได้รับผลกระทบมักถูกทำการุณยฆาต เนื่องจากมีความเสี่ยงที่จะแพร่โรคในฝูง และเสี่ยงต่อการติดเชื้อสู่มนุษย์ หากพิจารณาจะดำเนินการรักษา ต้องใช้ยาต้านจุลชีพเป็นระยะเวลานาน ซึ่งจะพิจารณาจากการเพาะเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ตามแนวทางการรักษาในมนุษย์ โดยให้ยาในกลุ่ม β -lactam ทางหลอดเลือดดำ เช่น ceftazidime หรือกลุ่ม carbapenems เช่น meropenem เป็นยาหลัก ตามด้วยการให้กินยา trimethoprim-sulfamethoxazole และ doxycycline เป็นเวลาหลายเดือน ซึ่งมีรายงานการรักษาสุนัขป่วยในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยที่ตรวจพบการติดเชื้อ *B. pseudomallei* โดยทำการรักษาตามแนวทางดังกล่าวเป็นระยะเวลานานกว่า 20 สัปดาห์ และด้วยวิธีการและขั้นตอนการรักษาที่ดัดแปลงมาจากแนวทางปฏิบัติจากการรักษาในมนุษย์ แต่สัตว์บางชนิดอาจต้องปรับเปลี่ยนตามสรีรวิทยาและความไวต่อยาต้านจุลชีพบางชนิด เนื่องจากต้องให้ยาเป็นระยะเวลานานในการกำจัดเชื้อ สิ่งสำคัญจึงต้องมีการติดตามเฝ้าระวังผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยา (Khongsee et al., 2019)

การป้องกัน ควบคุมโรคเมลิออยด์ในสัตว์

การป้องกันโรค เนื่องจากโรคเมลิออยด์ยังไม่มีวัคซีนที่ใช้ได้จริงในสัตว์ แนวทางการป้องกันโรคเมลิออยด์ในประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของโรคสูงหรือพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคหรือผู้ที่มีความเสี่ยงสูง จึงมุ่งเน้นการป้องกันการแพร่เชื้อ ได้แก่

1. การจำกัดการสัมผัสกับแหล่งกำเนิดเชื้อในสิ่งแวดล้อมและสัตว์ที่ติดเชื้อของกลุ่มอาชีพที่มีความเสี่ยง เช่น ชาวนา และนักเดินทางที่เดินทางเข้าไปในพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของโรคสูง ควรสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันหากต้องสัมผัสดินหรือน้ำโดยตรง เช่น รองเท้าบูท และถุงมือ โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝน หรือฤดูมรสุม (Suntornsut et al., 2016)

2. จัดการสัตว์ที่ติดเชื้ออย่างระมัดระวัง โดยเฉพาะกรณีการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ที่สงสัยการติดเชื้อ *B. pseudomallei* สัตวแพทย์ เจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ เจ้าหน้าที่ผู้ดูแลสัตว์ในสวนสัตว์ และเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ ควรสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล เช่น ถุงมือ และรองเท้าน้ำบูท และมีการล้างทำความสะอาดร่างกายอย่างเหมาะสม และพิจารณาการฉายแสงสัตว์ที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นโรค เพื่อลดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์
3. ซ้ำเชื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และบริเวณที่ปนเปื้อน เนื่องจากสัตว์ที่ติดเชื้อสามารถขับเชื้อปนเปื้อนพื้นที่อยู่อาศัยได้ ดังนั้นควรทำความสะอาดบริเวณเหล่านี้ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ หรือสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ เช่น น้ำยาฟอกขาวเจือจาง (diluted bleach) ซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงของการแพร่เชื้อ และการติดเชื้อในมนุษย์ได้
4. ปฏิบัติตามหลักสุขอนามัยที่ดี หลังจากสัมผัสดินหรือสัตว์ใด ๆ ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค ให้ล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่และน้ำเพื่อป้องกันการติดเชื้อ โดยเฉพาะในกรณีที่มีผิวหนังมีบาดแผลหรือแผลพุพอง (Limmathurotsakul et al., 2013b)
5. หลีกเลี่ยงผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อน หลีกเลี่ยงการบริโภคนมจากสัตว์ที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์โดยเฉพาะในภูมิภาคที่มีโรคเมลิออยด์เกิดขึ้นบ่อย

สารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *B. pseudomallei* ได้แก่ แอลกอฮอล์ (70%) สารฆ่าเชื้อกลุ่มฟีนอลิก (ไลซอล 2%) คลอรีน (0.1–0.5%) และสารออกซิไดซ์ (Virkon® 1%) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3%) หรือฟอร์มาลดีไฮด์ (4%) เหมาะสำหรับการใช้กำจัด *B. pseudomallei* ในสภาพแวดล้อมทั่วไป ส่วนสารชีวภาพและนาโนเทคโนโลยีเหมาะสำหรับกรณีที่มี biofilm หรือเชื้อดื้อยา ทั้งนี้ควรเลือกใช้ตามบริบทและความเหมาะสมของพื้นที่และวัตถุประสงค์ นอกจากนี้ผู้ที่ใช้อาชีพในกลุ่มเสี่ยงที่จะสัมผัสเชื้ออยู่บ่อยครั้ง ได้แก่ สัตวแพทย์ เจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ และเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ ควรมีการตรวจสุขภาพโดยการตรวจเฝ้าระวังทางภูมิคุ้มกันเพื่อเฝ้าระวังการติดเชื้อ

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

สารฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้น/ เงื่อนไข	ประสิทธิภาพ	แหล่งอ้างอิง
คลอรีน (Chlorine)	0.1-0.5%	กำจัดได้ 99.99% ภายใน 10 นาที	(Howard & Inglis, 2005; Chaita et al., 2006; O’Connell et al., 2009)
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H ₂ O ₂)	3%	มีประสิทธิภาพสูง	(Chaita et al., 2006; Luchinin et al., 2020)
ฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde)	4%	มีประสิทธิภาพสูง	(Chaita et al., 2006; Luchinin et al., 2020)
แอลกอฮอล์ (Alcohol)	70%	มีประสิทธิภาพสูง	(Chaita et al., 2006)
ควอเตอร์นารีแอมโมเนียม (Quaternary ammonium)	0.5-1%	มีประสิทธิภาพ	(Ruanchaiman et al., 2024; Chaita et al., 2006; Luchinin et al., 2020)
Umonium38, Virkon®	≥0.5% (15 นาที)	กำจัดเชื้อได้หมด	(Ruanchaiman et al., 2024)
ซิลเวอร์นาโน (AgNPs)	32-48 µg/mL (MIC)	ฆ่าเชื้อได้รวดเร็ว	(Siritongsuk et al., 2016; Thammawithan et al., 2022)
ไบโอฟิล์ม/ชีวภาพ (<i>T. asperellum</i> filtrate, chitosan, DNase I)	เฉพาะทาง	ลด biofilm และเสริมฤทธิ์ ยาฆ่าเชื้อ	(Roopkhan et al., 2025; Thonglao et al., 2022; Pakkulnan et al., 2023)

การควบคุมโรคเมลิออยด์ จำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่องโดยอาศัยแนวทางแบบผสมผสาน เนื่องจากเชื้อก่อโรคสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดินและน้ำ โดยเฉพาะในพื้นที่เสี่ยงที่มีการรายงานการเกิดโรคบ่อยครั้ง การเฝ้าระวังสุขภาพสัตว์อย่างต่อเนื่องจึงเป็นมาตรการสำคัญ ควบคู่ไปกับการรายงานโรคต่อเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องอย่างทันที่ การแยกสัตว์ป่วยตามหลักการจัดการฟาร์มที่ดี (Good Farming Practices) และการดำเนินมาตรการสุขาภิบาลฟาร์มอย่างเคร่งครัดถือเป็นปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงของการแพร่กระจายเชื้อ (Sim et al., 2018; Mariappan et al., 2022; Choy et al., 2000)

นอกจากนี้ การควบคุมโรคในมิติด้านสิ่งแวดล้อม ควรรวมถึงการลดการสัมผัสกับดินหรือน้ำที่อาจปนเปื้อนในพื้นที่เสี่ยง และการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมอย่างสม่ำเสมอ (Li et al., 2025; Sim et al., 2018) ทั้งนี้ การดำเนินมาตรการควบคุมโรคควรยึดตามแนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียว (One Health) ซึ่งเน้นการบูรณาการข้อมูลตลอดจนความร่วมมือระหว่างสัตวแพทย์ แพทย์ และนักสิ่งแวดล้อม เพื่อให้เกิดการควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน (Mariappan et al., 2022; Kelser, 2016)

ในปัจจุบัน การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่มีความรวดเร็วและแม่นยำ ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของการตระหนักรู้ถึงความสำคัญต่อโรคเมลิออยด์ในสัตว์ ส่งผลให้สามารถตรวจพบโรคได้ในระยะเริ่มต้น และดำเนินมาตรการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีประวัติการเกิดโรคหรือเป็นเขตโรคประจำถิ่น อย่างไรก็ตาม โรคเมลิออยด์ยังคงเป็นภัยคุกคามที่สำคัญต่อสัตว์หลากหลายกลุ่ม ทั้งในระบบการเลี้ยงปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่าในสวนสัตว์ ตลอดจนสัตว์ exotic ที่ได้รับความนิยมในการนำเข้า รวมทั้งการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ เช่น จระเข้ นกกระजอกเทศ และอัลปาก้า ซึ่งแนวโน้มการเพาะเลี้ยงสัตว์เหล่านี้มีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

สถานการณ์ดังกล่าวก่อให้เกิดความท้าทายต่อระบบการเฝ้าระวัง การควบคุม และการป้องกันโรคเมลิออยด์ โดยเฉพาะในด้านการเฝ้าระวังเชื้อในสิ่งแวดล้อมที่จำเป็นต้องมีการติดตามตรวจสอบอย่างสม่ำเสมอ เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อสู่สัตว์ รวมทั้งมนุษย์ ในด้านการวิจัยร่วมกับการพัฒนาวัคซีนยังคงเป็นประเด็นสำคัญ โดยมีความพยายามในการศึกษาวัคซีนชนิดโปรตีนและเชื้อเป็นชนิดอ่อนแรงในสัตว์ทดลอง เช่น หนู ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการป้องกันโรคได้บางส่วน นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ (Klimko et al., 2022; Ruiz et al., 2018) ทั้งนี้มีการศึกษาการให้ภูมิคุ้มกันเสริมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) โดยมุ่งหวังให้มีศักยภาพในการเสริมภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง (Wu et al., 2023)

ดังนั้นความสำเร็จในการควบคุมโรคเมลิออยด์ในสัตว์จำเป็นต้องอาศัยแนวทางแบบองค์รวมที่ครอบคลุมทั้งด้านการเฝ้าระวัง การวินิจฉัย การควบคุมเชิงสิ่งแวดล้อม และการวิจัยพัฒนาเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ เพื่อรองรับการป้องกันโรคอย่างยั่งยืนในอนาคต

บทที่ 9

แหล่งสืบค้นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับโรคเมลิออยด์

<https://www.melioidosis.info/>

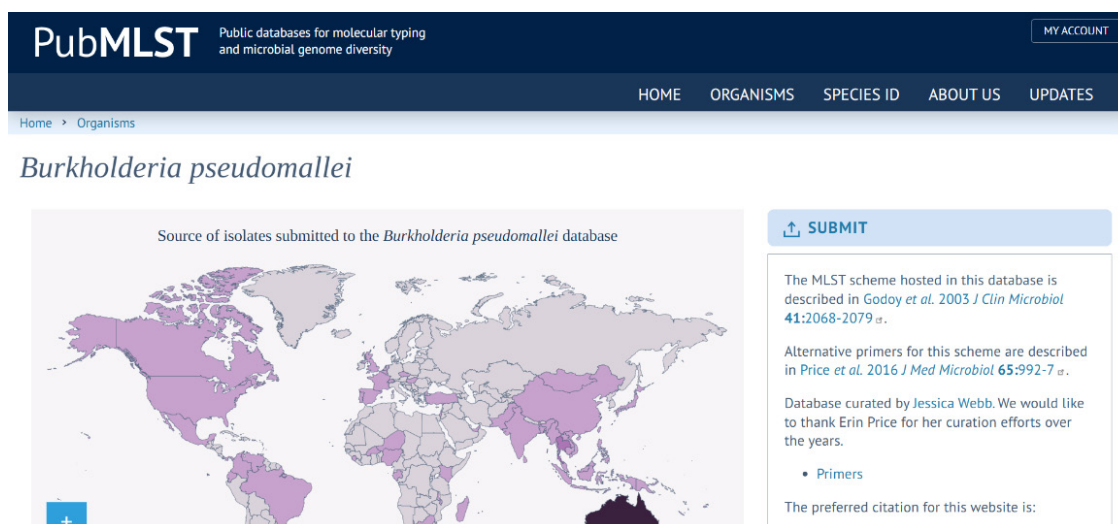
แพลตฟอร์มออนไลน์สำหรับการรายงานกรณีโรคเมลิออยด์ และใช้สำหรับการเผยแพร่ข้อมูล และสื่อการสอนเกี่ยวกับโรคเมลิออยด์สำหรับประชาชนทั่วไป นักวิจัย และผู้กำหนดนโยบายด้านสุขภาพ สนับสนุนงานวิจัยและนโยบายสาธารณสุขในการควบคุมโรค โดยสร้างเครือข่ายนักวิจัยระดับชาติและนานาชาติ รวบรวมกรณีศึกษาและข้อมูลระบาดวิทยา ทั้งที่ตีพิมพ์และยังไม่ได้ตีพิมพ์จากสถาบันต่าง ๆ ทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศ โดยมี Mahidol Oxford Tropical Medicine Research Unit (MORU) คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นผู้ดูแลแพลตฟอร์มเผยแพร่ข้อมูลความรู้และสื่อการสอน สำหรับบุคลากรทางการแพทย์ นักวิจัย และประชาชนทั่วไป ข้อมูลจากเว็บไซต์นี้สามารถนำไปใช้เพื่อ การเฝ้าระวังโรค การวิจัย การพัฒนาแนวทางการวินิจฉัย รักษา และควบคุมโรคเมลิออยด์ ได้ทั้งในสัตว์และมนุษย์ รวมถึงสนับสนุนแนวทาง “One Health” ในระดับโลก



รูปที่ 29 หน้าเพจของ <https://www.melioidosis.info/>

<https://pubmlst.org/> (Jolley et al. 2018)

ฐานข้อมูลสาธารณะของเชื้อ *B. pseudomallei* สำหรับการจำแนกเชิงโมเลกุล (molecular typing) และศึกษาความหลากหลายของจีโนมของจุลินทรีย์ที่มีการรวบรวมไว้จากทั่วโลก (Source of isolates submitted to the *Burkholderia pseudomallei* database)



รูปที่ 30 หน้าเพจ PubMLST ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

โดย PubMLST.org เป็นฐานข้อมูลแบบเปิดที่ได้รับการดูแลจัดการอย่างเป็นระบบ โดยรวบรวมข้อมูลลำดับพันธุกรรมของจุลินทรีย์กว่า 130 สายพันธุ์ รวมถึงเชื้อ *B. pseudomallei* พร้อมข้อมูลแหล่งที่มา และลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เกี่ยวข้อง (<https://pubmlst.org/organisms/burkholderia-pseudomallei>) แพลตฟอร์มนี้พัฒนาขึ้นจากแนวคิดของระบบการจัดลำดับแบบหลายตำแหน่ง (Multilocus Sequence Typing: MLST) ซึ่งเริ่มใช้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2541 โดยอาศัยซอฟต์แวร์ BIGSdb (Bacterial Isolate Genome Sequence Database) ที่สามารถจัดเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลลำดับพันธุกรรมในทุกระดับ ตั้งแต่ยีนเดี่ยวไปจนถึงจีโนมสมบูรณ์ (Jolley and Maiden, 2010)

ระบบดังกล่าวใช้การวิเคราะห์แบบทีละยีน พร้อมคำอธิบายประกอบที่ช่วยระบุยีนและบันทึกความแปรผันของอัลลีลอย่างเป็นระบบ รองรับการวิเคราะห์เชิงแยกในระดับประชากร พร้อมเชื่อมโยงกับข้อมูลฟีโนไทป์และแหล่งที่มา เพื่อสนับสนุนการศึกษาทางระบาดวิทยา การทำนายการดื้อยาต้านจุลชีพ การตอบสนองต่อวัคซีน และการวิเคราะห์หน้าที่ของยีนแปรผัน ระบบนี้ไม่มีข้อจำกัดด้านจำนวนลำดับ ตำแหน่งทางพันธุกรรม หรือรูปแบบอัลลีล ทำให้สามารถจัดทำแคตตาล็อกความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในระดับประชากรได้อย่างครอบคลุม

บทที่ 10

บรรณานุกรม

- กัญญ์ณิศา ลิ้มวิบูลพงศ์, ชัยยงค์ สาก้า, ฤชดา กาญจนเพ็ญ, และ ชัยวลัญช์ ตุนาค. (2558). การตรวจเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จากตัวอย่างอวัยวะส่งตรวจด้วยวิธี real-time PCR. *วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (Thai-NIAH e-Journal)*, 10(1), 26–41.
- ชนม์ชนก ถิระแก้ว. (2560). *Multilocus Sequence Typing (MLST): เทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อติดตามความปลอดภัยในอาหาร*. *วารสารสาธารณสุขศาสตร์*, 47(1), 91–104.
- นราพร สมบูรณ์นะ, และ สลิษา เบญจสกุลลี้อา. (2560). วงจรชีวิตของ *Burkholderia pseudomallei*. *พุทธชินราชเวชสาร*, 34(1), 115–120.
- เพลินจันทร์ เชษฐโชติศักดิ์. (2547). *โรคเมลิออยโดสิส*. กรุงเทพมหานคร: โฮลิสติก แพ็บลิชชิง. 188 หน้า.
- สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. (2557). *วิธีการทดสอบ: วิธีการตรวจหาเชื้อ Burkholderia pseudomallei*. เอกสารมาตรฐานปฏิบัติการ (SOP) กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา, 7 หน้า.
- สุกัญญา นาคสุนทร, และ ปริญญ์ พันนุฤทธิ์. (2559). การศึกษาทางซีรัมวิทยาต่อโรคเมลิออยด์โดยวิธี Indirect haemagglutination และการเพาะเชื้อแบคทีเรียในสัตว์พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย. *วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (Thai-NIAH e-Journal)*, 10(3), 91–111.
- สุรพงษ์ วงศ์เกษมจิตต์, रेखा คณิตพันธ์, และ นิตยา ศรีแก้วเขียว. (2558). การประเมินเบื้องต้นของชุดทดสอบโรคเมลิออยโดสิสในปศุสัตว์โดยวิธี Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (Thai-NIAH e-Journal)*, 9(3), 87–99.
- อรรถพร จินพันธุ์, บุษรา สิทธิวิเชียรวงศ์, และ ศุภลักษณ์ ลิ้มเลิศวาที. (2557). การศึกษาเพาะปาดิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่เพาะแยกได้จากแพะและดินในฟาร์มแพะด้วยวิธี Pulse fieldgel electrophoresis. *วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (Thai-NIAH e-Journal)*, 8(3), 130–138.
- Aiello, S. E., & Moses, M. A. (Eds.). (2016). *The Merck veterinary manual* (11th ed.). Merck & Co., Inc.
- Allwood, E. M., Devenish, R. J., Prescott, M., Adler, B., & Boyce, J. D. (2011). Strategies for intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Frontiers in Microbiology*, 2, 170. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00170>
- Anesomboon, S., Muangsombut, V., Srinon, V., Meethai, C., Tharinjaroen, C. S., Amornchai, P., Withatanung, P., Chantratita, N., Mayo, M., Wuthiekanun, V., Currie, B. J., Stevens, J. M., & Korbsrisate, S. (2021). Detection and differentiation of *Burkholderia* species with pathogenicpotential in environmental soil samples. *PLOS ONE*, 16(1), e0245175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245175>
- Arindam, C., & Christopher, H. H. (2019). Melioidosis: An updated review. *Australian Journal for General Practitioners*, 48(4), 327–332.
- Ariyanti, T., & Noor, S. (2022). Melioidosis: Important neglected zoonosis and their presence in animal in Indonesia, handling constraints and solutions. *Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences (WARTAZOA)*, 32(1), 49–57.
- Auty, J., Jenkins, C., Hincks, J., Straatman-Iwanowska, A., Allcock, N., Turapov, O., Galyov, E., Harding, S., & Mukamolova, G. (2022). Generation of distinct differentially culturableforms of *Burkholderia* following starvation at low temperature. *Microbiology Spectrum*, 10, e02110-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02110-21>

- Baker, A., Tahani, D., Gardiner, C., Bristow, K. L., Greenhill, A. R., & Warner, J. (2011). Groundwater seeps facilitate exposure to *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and environmental microbiology*, 77(20), 7243–7246. <https://doi.org/10.1128/AEM.05048-11>
- Balaji, V., Perumalla, S., Perumal, R., Inbanathan, F., Sekar, S., Paul, M., Sahni, R., Prakash, J., & Iyadurai, R. (2018). Multi locus sequence typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates from India unveils molecular diversity and confers regional association in Southeast Asia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(6), e0006558. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006558>
- Bearss, J., Hunter, M., Dankmeyer, J., Fritts, K., Klimko, C., Weaver, C., Shoe, J., Quirk, A., Toothman, R., Webster, W., Fetterer, D., Bozue, J., Worsham, P., Welkos, S., Amemiya, K., & Cote, C. (2017). Characterization of pathogenesis of and immune response to *Burkholderia pseudomallei* K96243 using both inhalational and intraperitoneal infection models in BALB/c and C57BL/6 mice. *PLoS ONE*, 12(2), e0172627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172627>
- Bhengsi, S., Baggett, H., Jorakate, P., Kaewpan, A., Prapasiri, P., Naorat, S., Thamthitawat, S., Tanwisaid, K., Chantira, S., Salika, P., Dejsirilert, S., Peruski, L., & Maloney, S. (2011). Incidence of bacteremic melioidosis in eastern and northeastern Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(1), 117–120.
- Birnie, E., Biemond, J. J., & Wiersinga, W. J. (2022). Drivers of melioidosis endemicity: Epidemiological transition, zoonosis, and climate change. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 35(3), 196–204.
- Broek, C., & Stevens, J. (2017). Type III secretion in the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 225. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00255>
- Brook, M., Currie, B., & Desmarchelier, P. (1997). Isolation and identification of *Burkholderia pseudomallei* from soil using selective culture techniques and the polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 82(5), 589–596.
- Busch, J. D., Kaestli, M., Mayo, M., Roe, C. C., Vazquez, A. J., Choy, J. L., Harrington, G., Benedict, S., Stone, N. E., Allender, C. J., Bowen, R. A., Keim, P., Currie, B. J., Sahl, J. W., Tuanyok, A., & Wagner, D. M. (2024). Melioidosis in goats at a single Australian farm was caused by multiple diverse lineages of *Burkholderia pseudomallei* present in soil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 18(12), e0012683. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012683>
- Bzdyl, N. M., Moran, C. L., Bendo, J., & Sarkar-Tyson, M. (2022). Pathogenicity and virulence of *Burkholderia pseudomallei*. *Virulence*, 13(1), 1945–1965.
- Canales, R., Sánchez-Okruky, R., Bustamante, L., Vences, M., & Dennis, M. (2020). Melioidosis in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) after a hurricane in the Caribbean Islands. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 51, 443–447.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012). *The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH): Surface sampling procedures for Bacillus anthracis spores from smooth, non-porous surfaces*. <https://www.cdc.gov/niosh/topics/emres/surface-sampling-bacillus-anthraxis.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020). *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories* (6th ed.). U.S. Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. https://www.cdc.gov/abs/pdf/SF_19_308133-A_BMBL6_00-800K-WEB-final-3.pdf
- Chaita, T., Wanitjiewaphan, K., Hannond, P., Kongthaworn, A., Namwat, W., Angkititrakul, S., & Kuyyakanond, T. (2006). In-vitro evaluation of antiseptics and disinfectants against *Burkholderia pseudomallei* from clinical isolates. *Srinagarind Medical Journal*, 21(4), 289–292.
- Chantratita, N., Meumann, E., Thanwisai, A., Limmathurotsakul, D., Wuthiekanun, V., Wannapasni, S., Tumapa, S., Day, N. P., & Peacock, S. J. (2008). Loop-mediated isothermal amplification method targeting the TTS1 gene cluster for detection of *Burkholderia pseudomallei* and diagnosis of melioidosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 568–573.
- Chantratita, N., Wuthiekanun, V., Boonbumrung, K., Tiya-wisut-sri, R., Vesaratchavest, M., Limmathurotsakul, D., Chierakul, W., Wongratanacheewin, S., Pukritiyakamee, S., White, N. J., Day, N. P. J., & Peacock, S. J. (2007). Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 807–817.
- Chapartegui-González, I., Stockton, J., Bowser, S., Badten, A., & Torres, A. (2024). Unraveling the role of toxin-antitoxin systems in *Burkholderia pseudomallei*: Exploring bacterial pathogenesis and interactions within the HigBA families. *Microbiology Spectrum*, 12(8), e00748-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00748-24>

- Chen, P. S., Chen, Y. S., Lin, H. H., Liu, P. J., Ni, W. F., Hsueh, P. T., Liang, S. H., Chen, C., & Chen, Y. L. (2015). Airborne transmission of melioidosis to humans from environmental aerosols contaminated with *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), e0003834. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003834>
- Cheng, A. C., & Currie, B. J. (2005). Melioidosis: Epidemiology, pathophysiology, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 383–416.
- Chewapreecha, C., Holden, M. T., Vehkala, M., Välimäki, N., Yang, Z., Harris, S. R., Mather, A. E., Tuanyok, A., De Smet, B., Le Hello, S., Bizet, C., Mayo, M., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Phetsouvanh, R., Spratt, B. G., Corander, J., Keim, P., Dougan, G., Dance, D. A., & Peacock, S. J. (2017). Global and regional dissemination and evolution of *Burkholderia pseudomallei*. *Nature Microbiology*, 2, 16263. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.263>
- Chittivej, C., Buspavanij, S., & Chaovanasai, A. (1955). Melioidosis with case report in Thai. *Royal Thai Army Medical Journal*, 68, 11–17.
- Choy, J., Mayo, M., Janmaat, A., & Currie, B. (2000). Animal melioidosis in Australia. *Acta Tropica*, 74(2–3), 153–158.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2016). *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria* (3rd ed.; CLSI guideline M45). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cote, C., Mlynek, K., Klimko, C., Biryukov, S., Mou, S., Hunter, M., Rill, N., Dankmeyer, J., Miller, J., Talyansky, Y., Davies, M., Meinig, J., Halasohoris, S., Gray, A., Spencer, J., Babyak, A., Hourihan, M., Curry, B., Toothman, R., Ruiz, S., Zeng, X., Ricks, K., Clements, T., Douglas, C., Ravulapalli, S., Stefan, C., Shoemaker, C., Elrod, M., Gee, J., Weiner, Z., Qiu, J., Bozue, J., Twenhafel, N., & Deshazer, D. (2024). Virulence of *Burkholderia pseudomallei* ATS2021 unintentionally imported to the United States in aromatherapy spray. *Emerging Infectious Diseases*, 30, 2056–2069. <https://doi.org/10.3201/eid3010.240123>
- Currie, B., Fisher, D., Howard, D., Burrow, J., Selvanayagam, S., Snelling, P., Anstey, N., & Mayo, M. (2000). The epidemiology of melioidosis in Australia and Papua New Guinea. *Acta Tropica*, 74(2–3), 121–127.
- Currie, B. J., Haslem, A., Pearson, T., Hornstra, H., Leadem, B., Mayo, M., Gal, D., Ward, L., Godoy, D., Spratt, B. G., & Keim, P. (2009). Identification of melioidosis outbreak by multilocus variable-number tandem repeat analysis. *Emerging Infectious Diseases*, 15(2), 169–174.
- Currie, B. J., Price, E. P., Mayo, M., Kaestli, M., Theobald, V., Harrington, I., Harrington, G., & Sarovich, D. S. (2015). Use of whole-genome sequencing to link *Burkholderia pseudomallei* from air sampling to mediastinal melioidosis, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 21(11), 2052–2054.
- Damrongsukij, P., Doemlim, P., Kusolsongkhrookul, R., Tanee, T., Petcharat, P., Siriporn, B., Piratae, S., & Pumipuntu, N. (2021). One Health approach of melioidosis and gastrointestinal parasitic infections from *Macaca fascicularis* to human at Kosumpee Forest Park, Maha Sarakham, Thailand. *Infection and Drug Resistance*, 14, 2213–2223.
- Dance, D. A. (2000). Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia* spp. and human–animal hosts. *Acta Tropica*, 74(2–3), 159–168.
- Dance, D. A. B. (1991). Melioidosis: The tip of the iceberg? *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 52–60.
- Dance, D. A. B., Wuthiekanun, V., Baird, R. W., Norton, R., Limmathurotsakul, D., & Currie, B. J. (2021). Interpreting *Burkholderia pseudomallei* disc diffusion susceptibility test results by the EUCAST method. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(6), 827–829.
- Department of Industry, Tourism and Trade, Northern Territory Government. (2022). *Melioidosis information for animal owners* (4 pp.). https://dpiir.nt.gov.au/_data/assets/pdf_file/0011/232976/840.pdf
- Desoutter, A., Deshayes, T., Vorimore, F., Klotoe, B., Durand, B., Colot, J., Wagner-Lichtenegger, G., Steinmetz, I., Tuanyok, A., & Laroucau, K. (2024). Isolation of *Burkholderia pseudomallei* from a goat in New Caledonia: Implications for animal and human health monitoring and serological tool comparison. *BMC Veterinary Research*, 20(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-03957-5>
- Draper, A. D., Mayo, M., Harrington, G., Karp, D., Yinfoo, D., Ward, L., Haslem, A., Currie, B. J., & Kaestli, M. (2010). Association of the melioidosis agent *Burkholderia pseudomallei* with water parameters in rural water supplies in Northern Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5305–5307.
- Elschner, M. C., Hnizdo, J., Stamm, I., El-Adawy, H., Mertens, K., & Melzer, F. (2014). Isolation of the highly pathogenic and zoonotic agent *Burkholderia pseudomallei* from a pet greeniguana in Prague, Czech Republic. *BMC Veterinary Research*, 10, 283. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0283-7>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2023). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters* (Version 13.1). <http://www.eucast.org>

- Francis, A., Aiyar, S., Yean, C. Y., Naing, L., & Ravichandran, M. (2006). An improved selective and differential medium for the isolation of *Burkholderia pseudomallei* from clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 55(2), 95–99.
- French, C., Bulterys, P., Woodward, C., Tatters, A., Ng, K., & Miller, J. (2020). Virulence from the rhizosphere: Ecology and evolution of *Burkholderia pseudomallei*-complex species. *Current Opinion in Microbiology*, 54, 18–32.
- Fungwithaya, P., Boonhoh, W., Sontigun, N., Hayakijkosol, O., Klangbud, W., & Wongtawan, T. (2024). Seroprevalence of melioidosis and its association with blood profiles and pathogens in sheltered dogs in southern Thailand. *Veterinary World*, 17, 705–711.
- Galyov, E., Brett, P., & DeShazer, D. (2010). Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 64, 495–517.
- Gassiep, I., Bauer, M. J., Harris, P. N. A., Chatfield, M. D., & Norton, R. (2021). Laboratory safety: Handling *Burkholderia pseudomallei* isolates without a biosafety cabinet. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(7), e0042421. <https://doi.org/10.1128/jcm.00424-21>
- Gassiep, I., Grey, V., Thean, L. J., Farquhar, D., Clark, J. E., Ariotti, L., Graham, R., Jennison, A. V., Bergh, H., Anuradha, S., Dyer, W., James, C., Huang, A., Putt, E., Pakeerathan, V., Griffin, P. M., & Harris, P. N. A. (2023). Expanding the geographic boundaries of melioidosis in Queensland, Australia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 108(6), 1215–1219.
- Ghazali, A., Eng, S., Khoo, J., Teoh, S., Hoh, C., & Nathan, S. (2021). Whole-genome comparative analysis of Malaysian *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates. *Microbial Genomics*, 7(2), 000527. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000527>
- Gierok, P., Köhler, C., Steinmetz, I., & Lalk, M. (2016). *Burkholderia pseudomallei* colony morphotypes show a synchronized metabolic pattern after acute infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004483. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004483>
- Glass, M. B., Beesley, C. A., Wilkins, P. P., & Hoffmaster, A. R. (2009). Comparison of four selective media for the isolation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(6), 1023–1028.
- Godoy, D., Randle, G., Simpson, A. J., Aanensen, D. M., Pitt, T. L., Kinoshita, R., & Spratt, B. G. (2003). Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 2068–2079.
- Hall, C. M., Baker, A. L., Sahl, J. W., Mayo, M., Scholz, H. C., Kaestli, M., Schupp, J., Martz, M., Settles, E. W., Busch, J. D., Sidak-Loftis, L., Thomas, A., Kreutzer, L., Georgi, E., Schweizer, H. P., Warner, J. M., Keim, P., Currie, B. J., & Wagner, D. M. (2022). Expanding the *Burkholderia pseudomallei* complex with the addition of two novel species: *Burkholderia mayonis* sp. nov. and *Burkholderia savannae* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(1), e0158321. <https://doi.org/10.1128/AEM.01583-21>
- Hambali, I. U., Abba, Y., Bitrus, A. A., Peter, I. D., Jesse, F. F. A., Balakrishnan, T., Lila, M. A. M., Haron, A. W., Omar, A. R., Ahmad, N., & Shuhaimy, F. (2018). Seroprevalence of melioidosis in sheep and goats from selected small ruminant farms in Selangor, Malaysia. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 6(2), 88–94.
- Hampton, V., Kaestli, M., Mayo, M., Choy, J. L., Harrington, G., Richardson, L., & Currie, B. J. (2011). Melioidosis in birds and *Burkholderia pseudomallei* dispersal, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 17(7), 1310–1312.
- Haraga, A., West, T., Brittnacher, M., Skerrett, S., & Miller, S. (2008). *Burkholderia thailandensis* as a model system for the study of the virulence-associated type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and Immunity*, 76, 5402–5411.
- Hasselbring, B., Patel, M., & Schell, M. (2011). *Dictyostelium discoideum* as a model system for identification of *Burkholderia pseudomallei* virulence factors. *Infection and Immunity*, 79, 2079–2088.
- Heacock-Kang, Y., McMillan, I., Norris, M., Sun, Z., Zarzycki-Siek, J., Bluhm, A., Cabanas, D., Norton, R., Ketheesan, N., Miller, J., Schweizer, H., & Hoang, T. (2021). The *Burkholderia pseudomallei* intracellular ‘TRANSITome’. *Nature Communications*, 12(1), 1907. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22169-1>
- Hemarajata, P., Baghdadi, J. D., Hoffman, R., & Humphries, R. M. (2016). *Burkholderia pseudomallei*: Challenges for the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(12), 2866–2873.
- Hoffmaster, A. R., AuCoin, D., Baccam, P., Baggett, H. C., Baird, R., Bhengsri, S., Blaney, D. D., Brett, P. J., Brooks, T. J., Brown, K. A., Chantratita, N., Cheng, A. C., Dance, D. A., Decuypere, S., Defenbaugh, D., Gee, J. E., Houghton, R., Jorakate, P., Lertmemongkolchai, G., Limmathurotsakul, D., & Walke, H. T. (2015). Melioidosis diagnostic workshop, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2), e141045. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141045>

- Holden, M., Titball, R., Peacock, S., Cerdeño-Tárraga, A., Atkins, T., Crossman, L., Pitt, T., Churcher, C., Mungall, K., Bentley, S., Sebaihia, M., Thomson, N., Bason, N., Beacham, I., Brooks, K., Brown, K., Brown, N., Challis, G., Cherevach, I., ... Parkhill, J. (2004). Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), 14240–14245.
- Howard, K., & Inglis, T. (2005). Disinfection of *Burkholderia pseudomallei* in potable water. *Water Research*, 39(6), 1085–1092.
- Hussein, M. (2021). Melioidosis (Whitmore disease; *Burkholderia pseudomallei* infection). In *Infectious diseases of dromedary camels* (pp. 1–15). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-79389-0_25
- Ibarz, A., & Maiden, M. (2009). Multilocus sequence typing. *Methods in Molecular Biology*, 551, 129–140.
- International Air Transport Association (IATA). (2019). *Dangerous goods regulations: Packaging Instruction 650 – diagnostic specimens* (60th ed., pp. 451–452). International Air Transport Association.
- Janmaat, A., Choy, J., & Currie, B. J. (2004). Melioidosis in an alpaca (*Lama pacos*). *Australian Veterinary Journal*, 82, 622–623.
- Janesomboon, S., Muangsombut, V., Srinon, V., Meethai, C., Tharinjaroen, C. S., Amornchai, P., Withatanung, P., Chantratita, N., Mayo, M., Wuthiekanun, V., Currie, B. J., Stevens, J. M., & Korbsrisate, S. (2021). Detection and differentiation of *Burkholderia* species with pathogenic potential in environmental soil samples. *PLoS one*, 16(1), e0245175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245175>
- Jayanetra, P., Pipatanagul, S., Punyagupta, S., Ratanabanangkoon, K., & Varavithaya, W. (1974). *Pseudomonas pseudomallei* infection in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 5, 487–491.
- Jimenez, V., Moreno, R., Settles, E., Currie, B., Keim, P., & Monroy, F. (2018). A mouse model of binge alcohol consumption and *Burkholderia* infection. *PLoS ONE*, 13(12), e0208061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208061>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Jolley, K. A., & Maiden, M. C. J. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11, 595. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595>
- Kaestli, M., O'Donnell, M., Rose, A., Webb, J. R., Mayo, M., & Gibb, K. (2019). Opportunistic pathogens and large microbial diversity detected in source-to-distribution drinking water of three remote communities in Northern Australia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(9), e0007672. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007672>
- Kaestli, M., Richardson, L. J., Colman, R. E., Tuanyok, A., Price, E. P., Bowers, J. R., Mayo, M., Kelley, E., Seymour, M. L., Sarovich, D. S., Pearson, T., Engelthaler, D. M., Wagner, D. M., Keim, P. S., Schupp, J. M., & Currie, B. J. (2012). Comparison of TaqMan PCR assays for detection of the melioidosis agent *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 2059–2062.
- Kaewpan, A., Duangurai, T., Rungruengkitkun, A., Muangkaew, W., Kanjanapruthipong, T., Jitprasutwit, N., Ampawong, S., Sukphopetch, P., Chantratita, N., & Pumirat, P. (2022). *Burkholderia pseudomallei* pathogenesis in human skin fibroblasts: A Bsa type III secretion system is involved in invasion, multinucleated giant cell formation, and cellular damage. *PLoS ONE*, 17(2), e0261961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261961>
- Kamjumphol, W., Chareonsudjai, P., Taweechaisupapong, S., & Chareonsudjai, S. (2015). Morphological alteration and survival of *Burkholderia pseudomallei* in soil microcosms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(5), 1058–1065.
- Kasantikul, T., Sommanustweechai, A., Polsrila, K., Kongkham, W., Chaisongkram, C., Sanannu, S., Kongmakee, P., Narongwanichgarn, W., Bush, M., Sermiswan, R. W., & Banlunara, W. (2016). Retrospective study on fatal melioidosis in captive zoo animals in Thailand. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(5), e389–e394. <https://doi.org/10.1111/tbed.12315>
- Kelser, E. A. (2016). Melioidosis: A greater threat than previously suspected? *Microbes and Infection*, 18(11), 661–668.
- Ketterer, P., Webster, W., Shield, J., Arthur, R., Blackall, P., & Thomas, A. (1986). Melioidosis in intensive piggeries in south eastern Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 63(5), 146–149.
- Khongraphan, S., Ekchariyawat, P., Sanongkiet, S., Luangjindarat, C., Sirisinha, S., Ponpuak, M., Midoeng, P., Pudla, M., & Utaisinchaoen, P. (2024). Differentiation in pyroptosis induction by *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* in primary human monocytes: A possible cause of sepsis in acute melioidosis patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 18(7), e0012368. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012368>
- Khongsee, P., Lueangthuwapranit, C., Ingkasri, T., Sretrirutchai, S., Kaewrakmuk, J., Saechan, V., & Tuanyok, A. (2019). Successful treatments and management of a case of canine melioidosis. *Veterinary Sciences*, 6(4), 76. <https://doi.org/10.3390/vetsci6040076>

- Klimko, C., Shoe, J., Rill, N., Hunter, M., Dankmeyer, J., Talyansky, Y., Schmidt, L., Orne, C., Fetterer, D., Biryukov, S., Burtnick, M., Brett, P., DeShazer, D., & Cote, C. (2022). Layered and integrated medical countermeasures against *Burkholderia pseudomallei* infections in C57BL/6 mice. *Frontiers in Microbiology*, 13, 965572. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.965572>
- Kong, C., Wong, R., Ghazali, A., Hara, Y., Aziz, T., & Nathan, S. (2023). Transcriptional landscape of *Burkholderia pseudomallei* cultured under environmental and clinical conditions. *Microbial Genomics*, 9, 000982. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000982>
- Kongkaew, W., Thiptara, T., Kaewkalong, S., & Hinjoy, S. (2017). Situation of melioidosis in Thailand, 2006–2015. *Thai-NIAH e-Journal*, 12(1), 80–102.
- Kwanhian, W., Jiranantasak, T., Kessler, A., Tolchinsky, B., Parker, S., Songsri, J., Wisessombat, S., Pukanha, K., Testamenti, V., Khongsee, P., Srethirutchai, S., Kaewrakmuk, J., Tangpong, J., & Tuanyok, A. (2020). Investigation of melioidosis outbreak in pig farms in southern Thailand. *Veterinary Sciences*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.3390/vetsci7010009>
- Ladds, P. W., Thomas, A. D., Speare, R., & Brown, A. S. (1990). Melioidosis in a koala. *Australian Veterinary Journal*, 67(8), 304–305.
- Laklaeng, S., Songsri, J., Wisessombat, S., Mala, W., Phothaworn, P., Senghoi, W., Nuinoon, M., Tangphatsornruang, S., Wongtawan, T., Hayakijkosol, O., Kerdin, A., & Klangbud, W. (2024). Multi-locus sequence typing and genetic diversity of antibiotic-resistant genes and virulence-associated genes in *Burkholderia pseudomallei*: Insights from whole genome sequencing of animal and environmental isolates in Thailand. *Veterinary Microbiology*, 298, 110236. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110236>
- Lau, S. K., Sridhar, S., Ho, C. C., Chow, W. N., Lee, K. C., Lam, C. W., Yuen, K. Y., & Woo, P. C. (2015). Laboratory diagnosis of melioidosis: Past, present and future. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 240(6), 742–751.
- Lee, M. A., Wang, D., & Yap, E. H. (2005). Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43(3), 413–417.
- Lee, S., Chong, C., Lim, B., Chai, S., Sam, K., Mohamed, R., & Nathan, S. (2007). *Burkholderia pseudomallei* animal and human isolates from Malaysia exhibit different phenotypic characteristics. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(3), 263–270.
- Lennings, J., West, T., & Schwarz, S. (2019). The *Burkholderia* type VI secretion system 5: Composition, regulation and role in virulence. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3339. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03339>
- Li, X., Wang, S., Wu, P., Nan, D., Chen, D., Suo, L., Lu, X., Rao, C., Li, Q., Yue, J., Xiang, Y., Mao, X., & Yan, J. (2024). Effect of O antigen glycosyl isomerase gene mutation on biological property and pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei* strain BPC006. *International Journal of Biological Macromolecules*, 258(Pt 2), 128922. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2032.128922>
- Limmathurotsakul, D., Dance, D., Wuthiekanun, V., Kaestli, M., Mayo, M., Warner, J., Wagner, D., Tuanyok, A., Wertheim, H., Cheng, T., Mukhopadhyay, C., Puthucheary, S., Day, N., Steinmetz, I., Currie, B., & Peacock, S. (2013a). Systematic review and consensus guidelines for environmental sampling of *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3), e2105. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002105>
- Limmathurotsakul, D., Golding, N., Dance, D. A., Messina, J. P., Pigott, D. M., Moyes, C. L., Rolim, D. B., Bertherat, E., Day, N. P., Peacock, S. J., & Hay, S. I. (2016). Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nature Microbiology*, 1(1), 15008. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.8>
- Limmathurotsakul, D., Kanoksil, M., Wuthiekanun, V., Kitphati, R., de Stavola, B., Day, N. P. J., & Peacock, S. J. (2013b). Activities of daily living associated with acquisition of melioidosis in northeast Thailand: A matched case-control study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(2), e2072. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002072>
- Limmathurotsakul, D., Thammasart, S., Warrasuth, N., Thapanagulsak, P., Jatapai, A., Pengreungrojanachai, A., Anun, S., Joraka, W., Thongkamkoon, P., Saiyen, P., Wongratanacheewin, S., Day, N. P. J., & Peacock, S. J. (2012). Melioidosis in animals, Thailand, 2006–2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18(2), 325–327.
- Limmathurotsakul, D., Wongratanacheewin, S., Teerawattanasook, N., Wongsuvan, G., Chaisuksant, S., Chetchotisakd, P., Chaowagul, W., Day, N., & Peacock, S. (2010). Increasing incidence of human melioidosis in northeast Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 1113–1117.
- Lindstedt, B. A., Torpdahl, M., Vergnaud, G., Le Hello, S., Weill, F. X., Tietze, E., Malorny, B., Prendergast, D. M., Ni Ghallchóir, E., Lista, R. F., Schouls, L. M., Söderlund, R., Börjesson, S., & Åkerström, S. (2013). Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012. *Eurosurveillance*, 18(4), 20385. <https://doi.org/10.2807/ese.18.04.20385-en>
- Loaiza, C., Duhan, N., Lister, M., & Kaundal, R. (2021). *In silico* prediction of host-pathogen protein interactions in melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei* and human reveals novel virulence factors and their targets. *Briefings in Bioinformatics*, 22(3), bbz162. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz162>

- Lowe, P., Engler, C., & Norton, R. (2002). Comparison of Automated and Nonautomated Systems for Identification of *Burkholderia pseudomallei*, *J Clin Microbiol*, 40(12), 4625-4627.
- Lowe, C. W., Satterfield, B. A., Nelson, D. B., Thiriot, J. D., Heder, M. J., March, J. K., Drake, D. S., Lew, C. S., Bunnell, A. J., Moore, E. S., O'Neill, K. L., & Robison, R. A. (2016). A Quadruplex Real-Time PCR Assay for the Rapid Detection and Differentiation of the Most Relevant Members of the *B. pseudomallei* Complex: *B. mallei*, *B. pseudomallei*, and *B. thailandensis*. *PloS one*, 11(10), e0164006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164006>
- Luchinin, D., Molchanova, E., Rotov, K., Negodenko, A., & Viktorov, D. (2020). Results of tests of disinfecting materials in regard to melioidosis and glanders agents. *Problems of Particularly Dangerous Infections*, 4, 73–78.
- The Mahidol Oxford Tropical Medicine Research Unit (MORU). (2011). *Standard operating procedure (SOP) of indirect haemagglutination assay (IHA) for melioidosis* (Version 1.3; 13 pp.).
- Manivanh, L., Pierret, A., Rattanavong, S., Kounnavongsa, O., Buisson, Y., Elliott, I., Maeght, J., Xayyathip, K., Silisouk, J., Vongsouvath, M., Phetsouvanh, R., Newton, P., Lacombe, G., Ribolzi, O., Rochelle-Newall, E., & Dance, D. (2017). *Burkholderia pseudomallei* in a lowland rice paddy: Seasonal changes and influence of soil depth and physico-chemical properties. *Scientific Reports*, 7(1), 3031. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02946-z>
- Mariappan, V., Vellasamy, K., Anpalagar, R., Lim, Y., Abidin, N., Subramaniam, S., & Nathan, S. (2022). One Health surveillance approaches for melioidosis and glanders: The Malaysian perspective. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1056723. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1056723>
- Mariappan, V., Vellasamy, K., Barathan, M., Girija, A., Shankar, E., & Vadivelu, J. (2021). Hijacking of the host's immune surveillance radars by *Burkholderia pseudomallei*. *Frontiers in Immunology*, 12, 718719. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.718719>
- Markey, B. K., Leonard, F., & Archambault, M. (2013). *Clinical veterinary microbiology* (2nd ed.). Mosby Elsevier.
- McRobb, E., Kaestli, M., Mayo, M., Price, E. P., Sarovich, D. S., Godoy, D., Spratt, B. G., & Currie, B. J. (2013). Melioidosis from contaminated bore water and successful UV sterilization. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(2), 367–368.
- Memišević, V., Kumar, K., Zavaljevski, N., DeShazer, D., Wallqvist, A., & Reifman, J. (2016). DBSecSys 2.0: A database of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* secretion systems. *BMC Bioinformatics*, 17, 387. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1242-z>
- Menzies School of Health Research. (2022). *Melioidosis reference manual* (385 pp.). Darwin, Northern Territory, Australia.
- Merritt, A. J., & Inglis, T. J. J. (2017). The role of climate in the epidemiology of melioidosis. *Current Tropical Medicine Reports*, 4(4), 185–191.
- Meumann, E. M., Limmathurotsakul, D., Dunachie, S. J., Wiersinga, W. J., & Currie, B. J. (2024). *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis. *Nature Reviews Microbiology*, 22, 155–169.
- Meumann, E. M., & Currie, B. J. (2024). Approach to melioidosis. *CMI Communications*, 1(1), 1–6.
- Millan, J., Mayo, M., Gal, D., Janmaat, A., & Currie, B. (2007). Clinical variation in melioidosis in pigs with clonal infection following possible environmental contamination from bore water. *Veterinary Journal*, 174(1), 200–202.
- Ministry of Public Health (MoPH), Division of Communicable Disease. (2021). *Guideline of melioidosis* (231 pp.).
- Moore, R., Reckseidler-Zenteno, S., Kim, H., Niernan, W., Yu, Y., Tuanyok, A., Warawa, J., DeShazer, D., & Woods, D. (2004). Contribution of gene loss to the pathogenic evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Infection and Immunity*, 72, 4172–4187.
- Moule, M. G., Spink, N., Willcocks, S., Lim, J., Guerra-Assunção, J. A., Cia, F., Champion, O. L., Senior, N. J., Atkins, H. S., Clark, T., Bancroft, G. J., Cuccui, J., & Wren, B. W. (2016). Characterization of new virulence factors involved in the intracellular growth and survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and Immunity*, 84(3), 701–710.
- Mukhopadhyay, C., Kaestli, M., Vandana, K., Sushma, K., Mayo, M., Richardson, L., Tuanyok, A., Keim, P., Godoy, D., Spratt, B., & Currie, B. (2011). Molecular characterization of clinical *Burkholderia pseudomallei* isolates from India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(1), 121–123.
- O'Brien, C. R., Krockenberger, M. B., Martin, P., Parkes, H., Kidd, M., & Malik, R. (2003). Disseminated melioidosis in two cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5(2), 83–89.
- O'Connell, H., Rose, L., Shams, A., Bradley, M., Arduino, M., & Rice, E. (2009). Variability of *Burkholderia pseudomallei* strain sensitivities to chlorine disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5405–5409.

- O'Quinn, A., Wiegand, E., & Jeddeloh, J. (2001). *Burkholderia pseudomallei* kills the nematode *Caenorhabditis elegans* using an endotoxin-mediated paralysis. *Cellular Microbiology*, 3(6), 381–393.
- Pakkulnan, R., Thonglao, N., & Chareonsudjai, S. (2023). DNase I and chitosan enhance efficacy of ceftazidime to eradicate *Burkholderia pseudomallei* biofilm cells. *Scientific Reports*, 13, 27790. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27790-2>
- Palasatien, S., Lertsirivorakul, R., Royros, P., Wongratanacheewin, S., & Sermswan, R. (2008). Soil physicochemical properties related to the presence of *Burkholderia pseudomallei*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(Suppl 1), S5–S9.
- Parkes, H. M., Shilton, C. M., Jerrett, I. V., Benedict, S., Spratt, B. G., Godoy, D., O'Brien, C. R., Krockenberger, M. B., Mayo, M., Currie, B. J., & Malik, R. (2009). Primary ocular melioidosis due to a single genotype of *Burkholderia pseudomallei* in two cats from Arnhem Land in the Northern Territory of Australia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(10), 856–863.
- Peacock, S. J., Chieng, G., Cheng, A. C., Dance, D. A. B., Amornchai, P., Wongsuvan, G., Teerawattanasook, N., Chierakul, W., Day, N. P. J., & Wuthiekanun, V. (2005). Comparison of Ashdown's medium, *Burkholderia cepacia* medium and *Burkholderia pseudomallei* selective agar for clinical isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5359–5361.
- Pongmala, K., Pierret, A., Oliva, P., Pando, A., Davong, V., Rattanavong, S., Silvera, N., Luangraj, M., Boithias, L., Xayyathip, K., Menjot, L., Macouin, M., Rochelle-Newall, E., Robain, H., Vongvixay, A., Simpson, A., Dance, D., & Ribolzi, O. (2022). Distribution of *Burkholderia pseudomallei* within a 300-cm deep soil profile: Implications for environmental sampling. *Scientific Reports*, 12(1), 8674. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12795-0>
- Queensland Government. (2019). *Veterinary laboratory users guide* (6th ed.). <https://www.publications.qld.gov.au/dataset/veterinary-laboratory/resource/56026801-3046-4182-b645-46965924f35d>
- Queipo-Ortuño, M. I., De Dios Colmenero, J., Macias, M., Bravo, M. J., & Morata, P. (2008). Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(2), 293–296.
- Rachlin, A., Kleinecke, M., Kaestli, M., Mayo, M., Webb, J. R., Rigas, V., Shilton, C., Benedict, S., Dyrting, K., & Currie, B. J. (2019). A cluster of melioidosis infections in hatchling saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*) resolved using genome-wide comparison of a common north Australian strain of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbial Genomics*, 5(8), e000288. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000288>
- Rainbow, L., Hart, C. A., & Winstanley, C. (2002). Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*. *Journal of Medical Microbiology*, 51(5), 374–384.
- Rattanavong, S., Wuthiekanun, V., Langla, S., Amornchai, P., Sirisouk, J., Phetsouvanh, R., Moore, C., Peacock, S., Buisson, Y., & Newton, P. (2010). Randomized soil survey of the distribution of *Burkholderia pseudomallei* in rice fields in Laos. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 532–536.
- Reckseidler, S., DeShazer, D., Sokol, P., & Woods, D. (2001). Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: Identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant. *Infection and Immunity*, 69, 34–44.
- Rhodes, K., & Schweizer, H. (2016). Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug Resistance Updates*, 28, 82–90.
- Ribolzi, O., Rochelle-Newall, E., Dittrich, S., Auda, Y., Newton, P. N., Rattanavong, S., Knappik, M., Souleleuth, B., Sengtaheuanghoung, O., Dance, D. A., & Pierret, A. (2016). Land use and soil type determine the presence of the pathogen *Burkholderia pseudomallei* in tropical rivers. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(8), 7828–7839.
- Roe, C., Vazquez, A., Phillips, P., Allender, C., Bowen, R., Nottingham, R., Doyle, A., Wongsuwan, G., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Peacock, S., Keim, P., Tuanyok, A., Wagner, D., & Sahl, J. (2022). Multiple phylogenetically diverse, differentially virulent *Burkholderia pseudomallei* isolated from a single soil sample collected in Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 16(2), e0010172. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010172>
- Roopkhan, N., Chaianunporn, T., Chareonsudjai, S., & Chaianunporn, K. (2025). Inhibitory effects of *Trichoderma asperellum* culture filtrates on pathogenic bacteria, *Burkholderia pseudomallei*. *PeerJ*, 13, e19051. <https://doi.org/10.7717/peerj.19051>
- Rout, A. N., Sirka, C. S., Mohanty, S., & Garg, S. (2024). Cutaneous melioidosis presenting as multiple abscesses. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. https://doi.org/10.25259/IJDVL_1404_2024

- Ruanchaiman, S., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Langla, S., Maroongruang, P., Le, K., & Blacksell, S. (2024). Effectiveness of Umonium38 against *Burkholderia pseudomallei*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *BMC Infectious Diseases*, 24(1), 212. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09102-9>
- Ruiz, S., Bowen, L., Bailey, M., & Berkland, C. (2018). Pulmonary delivery of ceftazidime for the treatment of melioidosis in a murine model. *Molecular Pharmaceutics*, 15(3), 1371–1376.
- Rush, C. M., & Thomas, A. D. (2012). Melioidosis in animals. In N. Ketheesan (Ed.), *Melioidosis A century of observations and research* (pp. 312–336). Elsevier BV.
- Saechan, V., Tongthainan, D., Fungfuang, W., Tulayakul, P., Ieamsaard, G., & Ngasaman, R. (2022). Natural infection of leptospirosis and melioidosis in long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) in Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science*, 84, 700–706.
- Sanchez-Villamil, J., Tapia, D., Borlee, G., Borlee, B., Walker, D., & Torres, A. (2020). *Burkholderia pseudomallei* as an enteric pathogen: Identification of virulence factors mediating gastrointestinal infection. *Infection and Immunity*, 89(1), e00654–20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00654-20>
- Sarovich, D., Price, E., Webb, J., Ward, L., Voutsinos, M., Tuanyok, A., Mayo, M., Kaestli, M., & Currie, B. (2014). Variable virulence factors in *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis) associated with human disease. *PLoS ONE*, 9(3), e91682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091682>
- Sawana, A., Adeolu, M., & Gupta, R. (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: Proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in Genetics*, 5, 429. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>
- Scott, A., Twine, S., Fulton, K., Titball, R., Essex-Lopresti, A., Atkins, T., & Prior, J. (2011). Flagellar glycosylation in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Journal of Bacteriology*, 193, 3577–3587.
- Shafiq, M., Ke, B., Li, X., Zeng, M., Yuan, Y., He, D., Deng, X., & Jiao, X. (2022). Genomic diversity of resistant and virulent factors of *Burkholderia pseudomallei* clinical strains recovered from Guangdong using whole genome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 13, 980525. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.980525>
- Sikorski, M. J., & Levine, M. M. (2020). Reviving the “Moore Swab”: A classic environmental surveillance tool involving filtration of flowing surface water and sewage water to recover typhoidal *Salmonella* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(12), e00060–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00060-20>
- Sim, S. H., Ong, C. E. L., Gan, Y. H., Wang, D., Koh, V. W. H., Tan, Y. K., Wong, M. S. Y., Chew, J. S. W., Ling, S. F., Tan, B. Z. Y., Ye, A. Z., Bay, P. C. K., Wong, W. K., Fernandez, C. J., Xie, S., Jayarajah, P., Tahar, T., Oh, P. Y., Luz, S., ... Tan, G. G. Y. (2018). Melioidosis in Singapore: Clinical, veterinary, and environmental perspectives. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 3(1), 31. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3010031>
- Siritongsuk, P., Hongsing, N., Thammawithan, S., Daduang, S., Klaynongsruang, S., Tuanyok, A., & Patramanon, R. (2016). Two-phase bactericidal mechanism of silver nanoparticles against *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS ONE*, 11(12), e0168098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168098>
- Sivalingam, S., Sim, S., Jasper, L., Wang, D., Liu, Y., & Ooi, E. (2008). Pre- and post-exposure prophylaxis of experimental *Burkholderia pseudomallei* infection with doxycycline, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(3), 674–678.
- Sprague, L. D., & Neubauer, H. (2004). Melioidosis in animals: A review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 51(7), 305–320.
- Srikittakarn, L., Sirimalaisuwan, A., Khattiya, R., Krueasukhon, K., & Mekaprateep, M. (2002). Seroprevalence of melioidosis in dairy cattle in Chiang Mai Province, northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 33(4), 739–741.
- Stanton, A. T., & Fletcher, W. (1921). Melioidosis, a new disease of the tropics. *Transactions of the 4th Congress Far East Association of Tropical Medicine*, 2, 196–198.
- Stanton, A. T., & Fletcher, W. (1925). Melioidosis a disease of rodents communicable to man. *Lancet*, 205(5288), 10–13.
- Stanton, A. T., Fletcher, W., & Kanagarayer, K. (1924). Two cases of melioidosis. *Journal of Hygiene*, 23(3), 268–276.
- Stevens, J. M., Ulrich, R. L., Taylor, L. A., Wood, M. W., Deshazer, D., Stevens, M. P., & Galyov, E. E. (2005). Actin-binding proteins from *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* can functionally compensate for the actin-based motility defect of a *Burkholderia pseudomallei* bimA mutant. *Journal of Bacteriology*, 187(22), 7857–7862.

- Stone, J. K., DeShazer, D., Brett, P. J., & Burnnick, M. N. (2014). Melioidosis: Molecular aspects of pathogenesis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12(12), 1487–1499.
- Suntornsut, P., Wongsuwan, N., Malasit, M., Kitphati, R., Michie, S., Peacock, S. J., & Limmathurotsakul, D. (2016). Barriers and recommended interventions to prevent melioidosis in northeast Thailand: A focus group study using the behaviour change wheel. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(7), e0004823. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004823>
- Swe, M., Win, M., Cohen, J., Phyo, A., Lin, H., Soe, K., Amornchai, P., Wah, T., Win, K., Ling, C., Parker, D., Dance, D., Ashley, E., & Smithuis, F. (2021). Geographical distribution of *Burkholderia pseudomallei* in soil in Myanmar. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(5), e0009372. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009372>
- Taetzsch, S., Swaney, E., Gee, J., Hidalgo, P., Broussard, K., Martinez, R., Blaney, D., Galland, G., Gulvik, C., Marston, C., Liu, L., Elrod, M., Deleon-Carnes, M., Tyler, R., Bower, W., Bhatnager, J., Brown, C., Pieracci, E., & Weiner, Z. (2022). Melioidosis in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) imported to the United States from Cambodia. *Comparative Medicine*, 72(6), 394–402.
- Tang, M., Hu, Z., Rao, C., Chen, J., Yuan, S., Zhang, J., Mao, C., Yan, J., Xia, Y., Zhang, M., Yue, J., Xiang, Y., Xie, J., Mao, X., & Li, Q. (2020). *Burkholderia pseudomallei* interferes with host lipid metabolism via NR1D2-mediated PNPLA2/ATGL suppression to block autophagy-dependent inhibition of infection. *Autophagy*, 17, 1918–1933.
- Tanwisaid, K., & Surin, U. (2017). Monthly rainfall and severity of melioidosis in Nakhon Phanom, northeastern Thailand. *Journal of Health Science*, 17, 363–375.
- Thailand–Lao Melioidosis Network Meeting Minute. (2012). Retrieved May 20, 2023, from www.melioidosis.info/th
- Thammawithan, S., Talodthaisong, C., Srichaiyapol, O., Patramanon, R., Hutchison, J., & Kulchat, S. (2022). Andrographolide-stabilized silver nanoparticles overcome ceftazidime-resistant *Burkholderia pseudomallei*: Study of antimicrobial activity and mode of action. *Scientific Reports*, 12, 10701. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14550-x>
- Thonglao, N., Pukkunlun, R., Paluka, J., Chareonsudjai, P., Kanokmethakul, S., Kanokmethakul, K., & Chareonsudjai, S. (2022). Chitosan biological molecule improves bactericidal competence of ceftazidime against *Burkholderia pseudomallei* biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 201, 676–685.
- Titball, R., Russell, P., Cuccui, J., Easton, A., Haque, A., Atkins, T., Sarkar-Tyson, M., Harley, V., Wren, B., & Bancroft, G. (2008). *Burkholderia pseudomallei*: Animal models of infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(Suppl 1), S111–S116.
- Tonpitak, W., Sornklien, C., Chawanit, M., Pavasutthipaisit, S., Wuthiekanun, V., Hantrakun, V., Amornchai, P., Thaipadungpanit, J., Day, N. P. J., Yingst, S., Peacock, S. J., & Limmathurotsakul, D. (2014). Fatal melioidosis in goats in Bangkok, Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(2), 287–290.
- Trevino, S., Dankmeyer, J., Fetterer, D., Klimko, C., Raymond, J., Moreau, A., Soffler, C., Waag, D., Worsham, P., Amemiya, K., Ruiz, S., Cote, C., & Krakauer, T. (2021). Comparative virulence of three different strains of *Burkholderia pseudomallei* in an aerosol non-human primate model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(2), e0009125. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009125>
- Trinh, T. T., Hoang, T. S., Tran, D. A., Trinh, V. T., Göhler, A., Nguyen, T. T., Hoang, S. N., Krumkamp, R., Nguyen, L. T. N., May, J., Doan, P. M., Do, C. D., Que, T. A., & Steinmetz, I. (2018). A simple laboratory algorithm for diagnosis of melioidosis in resource-constrained areas: A study from north-central Vietnam. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(1), 84.e1–84.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.07.029>
- Tuanyok, A., Mayo, M., Scholz, H., Hall, C. M., Allender, C. J., Kaestli, M., Ginther, J., Spring-Pearson, S., Bollig, M. C., Stone, J. K., Settles, E. W., Busch, J. D., Sidak-Loftis, L., Sahl, J. W., Thomas, A., Kreutzer, L., Georgi, E., Gee, J. E., Bowen, R. A., ... Keim, P. (2017). *Burkholderia humptydoensis* sp. nov., a new species related to *Burkholderia thailandensis* and the fifth member of the *Burkholderia pseudomallei* complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(5), e02802–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02802-16>
- Ulrich, R., DeShazer, D., Brueggemann, E., Hines, H., Oyston, P., & Jeddeloh, J. (2004). Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Medical Microbiology*, 53(11), 1053–1064.
- Upatoom, N., Thitisak, W., Leesirikul, N., Likidecharoj, B., & Somsatitku, S. (1984). Bovine Melioidosis: A case report. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 14(1), 65–70. <https://doi.org/10.56808/2985-1130.1372>
- U.S. Department of Transportation (DOT). (2011). 49 CFR Parts 171–180. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/CFR-2011-title49vol2/pdf/CFR-2011-title49-vol2.pdf>

- Varshith, M., Dastidar, R., Shrilaxmi, M., Bhattacharya, R., Jha, S., Choudhary, S., Varny, E., Carvalho, R., John, L., Sundaramoorthy, V., Smith, C., Damerla, R., Herai, R., Biswas, S., Lal, P., Mukhopadhyay, C., & Dastidar, S. (2024). Virulome and phylogenomic profiling of a novel *Burkholderia pseudomallei* strain from an Indian clinical isolate. *Molecular Genetics and Genomics*, 299(1), 98. <https://doi.org/10.1007/s00438-024-02188-5>
- Virk, H. S., Fhogartaigh, C. N., & Dance, D. A. B. (2023). Glanders and melioidosis: A zoonosis and a sapronosis. In A. Sing (Ed.), *Zoonoses: Infections affecting humans and animals* (pp. 1331–1375). Springer.
- Vongphayloth, K., Rattanavong, S., Moore, C. E., Phetsouvanh, R., Wuthiekanun, V., Sengdouangphachanh, A., Phouminh, P., Newton, P. N., & Buisson, Y. (2012). *Burkholderia pseudomallei* detection in surface water in southern Laos using Moore's swabs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(5), 872–877.
- Warawa, J. M. (2010). Evaluation of surrogate animal models of melioidosis. *Frontiers in Microbiology*, 1, 141. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00141>
- Weber, D. R., Douglass, L. E., Brundage, W. G., & Stallkamp, T. C. (1969). Acute varieties of melioidosis occurring in U.S. soldiers in Vietnam. *American Journal of Medicine*, 46(2), 234–244.
- Welkos, S., Klimko, C., Kern, S., Bearss, J., Bozue, J., Bernhards, R., Trevino, S., Waag, D., Amemiya, K., Worsham, P., & Cote, C. (2015). Characterization of *Burkholderia pseudomallei* strains using a murine intraperitoneal infection model and in vitro macrophage assays. *PLoS ONE*, 10(4), e0124667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124667>
- Whiteley, L., Meffert, T., Haug, M., Weidenmaier, C., Hopf, V., Bitschar, K., Schitteck, B., Kohler, C., Steinmetz, I., West, T., & Schwarz, S. (2017). Entry, intracellular survival, and multinucleated-giant-cell-forming activity of *Burkholderia pseudomallei* in human primary phagocytic and nonphagocytic cells. *Infection and Immunity*, 85(10), e00468–17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00468-17>
- Wiersinga, W., De Vos, A., De Beer, R., Wieland, C., Roelofs, J., Woods, D., & Van Der Poll, T. (2007). Inflammation patterns induced by different *Burkholderia* species in mice. *Cellular Microbiology*, 10(1), 81–87.
- Wiersinga, W. J., Virk, H. S., Torres, A. G., Currie, B. J., Peacock, S. J., Dance, D. A. B., & Limmathurotsakul, D. (2018). Melioidosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 17107. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.107>
- Willcocks, S., Denman, C., Atkins, H., & Wren, B. (2016). Intracellular replication of the well-armed pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *Current Opinion in Microbiology*, 29, 94–103.
- Whitmore, A., & Krishnaswami, C. S. (1912). A hitherto undescribed infective disease in Rangoon. *Indian Medical Gazette*, 47(7), 262–267.
- Whitmore, A. (1913). An account of a glanders-like disease occurring in Rangoon. *Journal of Hygiene*, 13(1), 1–34.
- Wongbutdee, J., Jittimane, J., Daendee, S., Thongsang, P., & Saengnil, W. (2024). Exploring the relationship between melioidosis morbidity rate and local environmental indicators using remotely sensed data. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 21(5), 614. <https://doi.org/10.3390/ijerph21050614>
- Wongwong, N., & Vitoorakool, C. (1999). Report on melioidosis in Chiang Mai. *Northern Veterinary Research and Diagnosis Center Quarterly Report*, 7, 18–22.
- World Health Organization (WHO). (2021). *Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2021–2022*. Geneva, Switzerland.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). (2024). *Chapter 3.6.10. Glanders and melioidosis* (version adopted in May 2018). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2024*. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.10_GLANDERS.pdf
- Wu, P., Rao, C., Liu, W., Zhang, Z., Nan, D., Chen, J., Wang, M., Wen, Y., Yan, J., Yue, J., Mao, X., & Li, Q. (2024). Anti-Hcp1 monoclonal antibody is protective against *Burkholderia pseudomallei* infection via recognizing amino acids at Asp95–Leu114. *Pathogens*, 13(1), 43. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010043>
- Yen, M., Lisanti, O., Thibault, F., San, T., Kee, L., Hilaire, V., Jiali, L., Neubauer, H., Vergnaud, G., & Amisse, V. (2009). Validation of ten new polymorphic tandem repeat loci and application to the MLVA typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates collected in Singapore from 1988 to 2004. *Journal of Microbiological Methods*, 77(3), 297–301.
- Yip, C., Ghazali, A., & Nathan, S. (2020). *Burkholderia pseudomallei* pathogenesis and survival in different niches. *Biochemical Society Transactions*, 48(2), 569–579.
- Zhu, X., Chen, H., Li, S., Wang, L., Wu, D., Wang, X., Chen, R., Li, Z., & Liu, Z. (2020). Molecular characteristics of *Burkholderia pseudomallei* collected from humans in Hainan, China. *Frontiers in Microbiology*, 11, 778. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00778>

- Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K.,... & Stevenson, G. (Eds.). (2012). *Diseases of swine* (10th ed.). Wiley-Blackwell.
- Zimmermann, R., Ribolzi, O., Pierret, A., Rattavong, S., Robinson, M., Newton, P., Davong, V., Auda, Y., Zopfi, J., & Dance, D. (2018). Rivers as carriers and potential sentinels for *Burkholderia pseudomallei* in Laos. *Scientific Reports*, 8(1), 8674. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26684-y>
- Zulkefli, N., Teh, C., Mariappan, V., Ngoi, S., Vadivelu, J., Ponnampalavanar, S., Chai, L., Chong, C., Yap, I., & Vellasamy, K. (2021). Genomic comparison and phenotypic profiling of small colony variants of *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS ONE*, 16(12), e0261382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261382>

บทที่ 11

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* และการเตรียม ส่วนประกอบของอาหาร Ashdown's agar และการเตรียม

Ashdown's agar

Glycerol	40 mL
Tryptic soy broth	10 g
Agar	15 g
Crystal violet 0.1%	5 mL (incubate at least 1 week before use)
Neutral red 1%	5 mL
Distilled water	950 mL

Autoclave ที่อุณหภูมิ 120 °C นาน 15 นาที แล้วเติม gentamicin (คำนวณให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5 mg/L สำหรับตัวอย่างจากสัตว์ป่วย และ 8 mg/L สำหรับตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม) แล้วแบ่งจ่ายลงเพลท

ขั้นตอนการเตรียม Ashdown's agar

1. ผสมส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้น gentamicin ใส่ในขวดแก้วไร้เชื้อ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 L คนให้เข้ากัน
 2. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
 3. ปลอยให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50-55 °C เติม gentamicin จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5 mg/L สำหรับเพาะแยกเชื้อตัวอย่างจากสัตว์ป่วย และ 8 mg/L ใช้สำหรับตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม
 4. เทลงในเพลทเพาะเชื้อและปล่อยให้แข็งตัว
- หมายเหตุ: เพื่อให้ได้สีที่ดีที่สุดควรบ่มสารละลาย Crystal violet 0.1% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้

ส่วนประกอบของอาหาร Ashdown selective broth/ Selective broths

Selective broth (เพลินจันทร์, 2547)

Tryptic soy broth	10 g
Glycerol	40 mL
Crystal violet 0.1%	5 mL (incubate at least 1 week before use)
Distilled water	950 mL
Autoclave ที่อุณหภูมิ 120°C นาน 15 นาที แล้วเติม colistin sulphomethate (colistin injection) 50,000 U/L หรือ 50 mg สำหรับยาผง แล้วจ่ายลงหลอดทดสอบ	

Ashdown selective broth (Menzies School of Health Research, 2022)

Tryptic soy broth	10 g
Crystal violet 0.1%	5 mL
Distilled water	Add to 1,000 mL
Autoclave ที่อุณหภูมิ 120°C นาน 15 นาที แล้วเติม colistin sulphomethate (colistin injection) 50,000 U/L หรือ 50 mg สำหรับยาผง แล้วจ่ายลงหลอดทดสอบ	

ขั้นตอนการเตรียม Ashdown selective broth/ Selective broth

1. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 L คนให้เข้ากัน
2. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที และปล่อยให้เย็นลงถึง 50 °C เก็บขวดไว้ในตู้เย็นที่สะอาดจนกว่าจะนำไปใช้งาน
3. เติมน้ำกลั่น ก่อนที่นำไปใช้งาน โดยผสมให้เข้ากัน

ส่วนประกอบของอาหาร Threonine Basal Salt Solution (TBSS-C50) และการเตรียม

(Menzies School of Health Research, 2022)

1. Solution A (to be added to base solution)

Ingredients	Common Name	Amount
H ₃ PO ₄ 85%	Phosphoric acid	2.306 mL
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Iron (II) sulfate heptahydrate/Ferrous sulphate	0.556 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Zinc sulfate heptahydrate	0.297 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Copper (cupric) sulfate pentahydrate	0.0218 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	Manganese sulfate, monohydrate	0.125 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	Cobalt (II) nitrate hexahydrate	0.030 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	Sodium molybdate dihydrate	0.030 g
H ₃ BO ₃	Boric acid	0.062 g
Distilled Water		1,000 mL

การเตรียม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดข้างต้นลงในขวดขนาด 1 L บนแผ่นให้ความร้อนที่มีแท่งแม่เหล็กกวนจนละลายหมด
Autoclave ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

2. Solution B - Base medium

Ingredients	Common Name	Amount
KH_2PO_4	Monopotassium phosphate/Potassium dihydrogen phosphate	0.451 g
K_2HPO_4	Dipotassium phosphate	1.730 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnesium sulfate	0.123 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Calcium chloride	0.0147 g
NaCl	Sodium chloride	10 g
Nitritotriacetic acid	Nitritotriacetic acid (NTA)	0.200 g
Solution A		20 mL
Distilled Water		1,000 mL

การเตรียม

1. ผสมส่วนผสมทั้งหมดข้างต้นลงในขวดขนาด 1 L ที่สามารถนึ่งฆ่าเชื้อได้
2. ปรับค่า pH ให้เป็น 7.2 ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 1 มิลลิลิตร
3. Autoclave ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

3. Solution C- L-Threonine Solution

Ingredients	Amount
L-Threonine	5.956 g
Distilled Water	100 mL

การเตรียม

1. ผสมส่วนผสมข้างต้นลงในขวดขนาด 100 mL
2. ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.20 μm (เช่น ตัวกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.20 μm)

4. TBSS-C50 Solution Procedure**การเตรียม**

1. เติมสารละลาย L-Threonine (สารละลาย C) 100 mL ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 900 mL (ความเข้มข้นสุดท้ายของ L-Threonine คือ 0.05 M)
2. เติม Colistin จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 mg/L

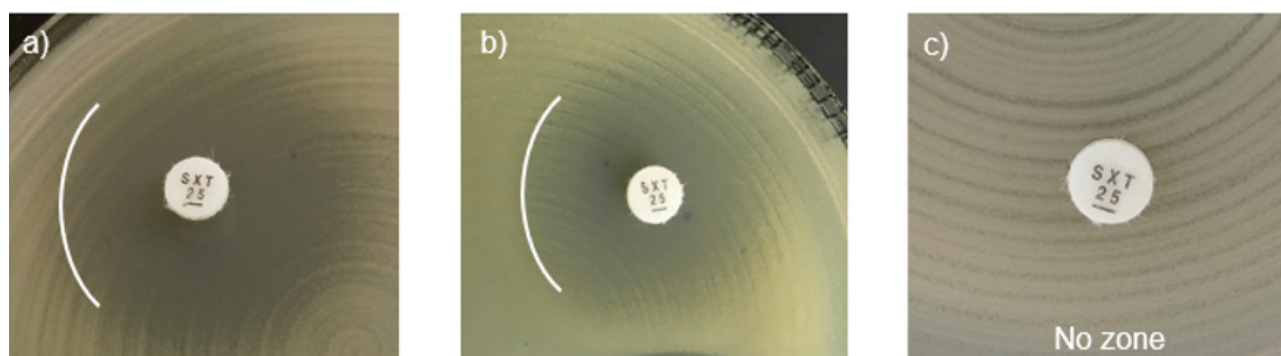
ภาคผนวก ข การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
ค่า Interpretative criteria โดยวิธี Disk diffusion method และ Broth microdilution
สำหรับ *Burkholderia pseudomallei*

Antimicrobial agent	Zone diameter breakpoints ^a (mm)			MIC Interpretive Criteria ^b (µg/mL)		
	S ≥	I	R <	S ≤	I	R ≥
Amoxicillin-clavulanic acid	50	22-49	22	8/4	16/8	32/16
Ceftazidime	50	18-49	18	8	16	32
Chloramphenicol	50	22-49	22	N/A	N/A	N/A
Imipenem	29		29	4	8	16
Meropenem	24		24	N/A	N/A	N/A
Doxycycline	N/A	N/A	N/A	4	8	16
Tetracycline	23		23	4	8	16
Trimethoprim-sulfamethoxazole	50	17-49	17	2/38		4/76

^a The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0. <http://www.eucast.org>; 2022.

^b CLSI M45-ED3:2016 Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria.

S=Susceptible, I=Intermediate, R=Resistant, N/A= not applicable



ตัวอย่าง Inhibition zone สำหรับ *Burkholderia pseudomallei* ต่อยา trimethoprim-sulfamethoxazole (EUCAST, 2024)

a-b) สามารถมองเห็น zone ภายนอกได้ อ่านขอบ zone ด้านนอก และตีความ breakpoints ที่กำหนด

c) การเจริญเติบโตจนถึงแผ่นยาและไม่มีลักษณะของ Inhibition zone ให้รายงานผลเป็น resistant

ภาคผนวก ค การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Multiplex PCR (กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ)
การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางอณูชีววิทยา (DNA preparation for molecular technique)

- สกัด DNA จาก isolate เชื้อที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจ ดัดแปลงจาก Queipo-Ortuño et al. (2008)
 - เพาะเชื้อ *B. pseudomallei* ลงบน blood agar แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ 37 °C นาน 20-24 ชั่วโมง
 - นำเชื้อที่เพาะได้ นำมาสกัด DNA โดยกวาดเชื้อ ลงใน microcentrifuge 1.5 mL ที่มี PBS 1 mL แล้วนำไปปั่นด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที
 - เมื่อปั่นเสร็จให้ทิ้งส่วนใส แล้วเติมน้ำกลั่น 100 µL
 - Mix ตะกอน และน้ำกลั่นให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 10 นาที
 - นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที
 - เก็บส่วนใสด้านบน ลงหลอด microcentrifuge 1.5 mL หลอดใหม่ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C หรือ -20 °C รอการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์

2. ชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) สำหรับการสกัด DNA จากตัวอย่างส่งตรวจทางคลินิกโดยตรง เช่น เลือด อวัยวะ และสิ่งคัดหลั่ง ขั้นตอนการสกัดตามข้อแนะนำของผู้ผลิต

3. ชุดสกัด Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research) สำหรับการสกัดตัวอย่างส่งตรวจที่อาจจะมีสิ่งปนเปื้อน หรือสารยับยั้งการทำปฏิกิริยาสูง เช่น ตัวอย่าง มูลสัตว์ หรือตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ และอากาศ ขั้นตอนการสกัดตามข้อแนะนำของผู้ผลิต



การสกัดตัวอย่าง DNA 1) การต้มที่อุณหภูมิ 100°C 2) ชุดสกัดสำหรับตัวอย่างทางคลินิก 3) ชุดสกัดตัวอย่างมูลสัตว์/ดิน

2. การตรวจยืนยันเชื้อ *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* และ *Burkholderia thailandensis* ด้วยวิธี multiplex PCR (Lee et al., 2005)

Primer name	Oligonucleotide primer 5' → 3'	Species detection	Product size (bp)	Target gene/ nucleotide position
SR1	ACC GCG TAT GAA GGG ATG TC	<i>B. mallei</i> and <i>B. pseudomallei</i>	400-700	The 79-bp upstream of a repetitive DNA element
		<i>B. thailandensis</i>	402	
SRT3	AAA GCT GCG CGC TCG GCA TC	<i>B. thailandensis</i>	308	nucleotide positions 75-94 of the 361-bp fragment <i>B. thailandensis</i>
SR5	ACG CGC ACG CAC CTG CTG AAC	<i>B. thailandensis</i>	308	134-bp downstream of a repetitive DNA element
I4F5	ACC TGC TGC CGG GCT ACG ACT TCA	<i>B. pseudomallei</i> and <i>B. thailandensis</i>	245	MprA
I4R5	CAC CTT GCC GAC CCA CGA GAT GC			

ส่วนประกอบ multiplex PCR mix

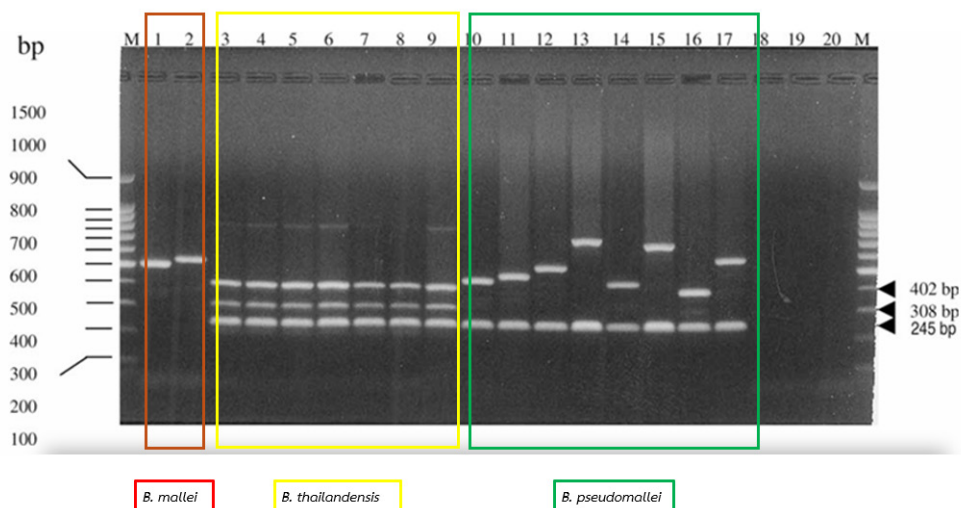
Component	Volume
2x Multiplex	10.0 μ L
Q-solution	7.0 μ L
Primer SR1 (10pmol)	0.6 μ L
Primer SRT3 (10pmol)	0.2 μ L
Primer I4F5 (10pmol)	0.15 μ L
Primer I4R5 (10pmol)	0.15 μ L
Primer SR5 (10pmol)	0.8 μ L
DNA template	2.0 μ L
Total volume	20.0 μL

PCR Cycles	Temperature	Time
Pre-denaturation	95 °C	15 min
Denaturation	94 °C	1 min
Annealing	63 °C	1 min
Extension	72 °C	1 min
Final extension	72 °C	10 min

} 35 cycles

Gel electrophoresis (2% agarose)

Interpretation	PCR product size (bp)
<i>B. thailandensis</i>	3 bands (245, 308, 402)
<i>B. pseudomallei</i>	2 bands (245, 400-700)
<i>B. mallei</i>	1 band (400-700)



(ที่มา: Lee et al., 2005)

