Case Summary Case 3

ผู้นำเสนอ พญ.ปฐวี บุญตานนท์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
ที่ปรึกษา รศ.พญ.ศศิโสภิณ เกียรติบูรณกุล คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

"A 22-year-old man presented with fever and neck mass"

Patient profile: ชายไทยโสด 22 ปี ไม่ได้ประกอบอาชีพ ภูมิลำเนา และที่อยู่ปัจจุบันอยู่จังหวัดนครสวรรค์

Chief complaint: ไข้ เหนื่อยมากขึ้น 3 วันก่อนมารพ.

Present illness:

พฤศจิกายน 2556	เริ่มปวดท้อง ไม่มีถ่ายเหลว ไม่มีคลื่นไส้ กลางคืนมีไข้หนาว น้ำหนักลด
มกราคม-กุมภาพันธ์ 2557	ยังมีไข้ ปวดท้อง และมีก้อนโตขึ้นที่คอด้านซ้าย ต่อมาเริ่มมีก้อนโตที่คอด้านขวา ได้ยาฆ่าเชื้ออาการไม่ดีขึ้น
มีนาคม 2557	มีอาการปวดศีรษะทั่วๆ ได้ไปรักษาที่รพ. จังหวัด ด้วยอาการไม่รู้สึกตัว ให้การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มสมอง เริ่ม HRZE ตั้งแต่ 9 มีนาคม 2557 อาการไข้และปวดท้องดีขึ้น รู้ตัวมากขึ้น แต่ก้อนที่คอทั้ง 2 ข้างยังโต
เมษายน 2557	ก้อนที่คอไม่ยุบลง เพิ่ม prednisolone (5) 1×1, ciprofloxacin (250) 2×2 ก้อนที่คอขนาดลดลงแต่ยังไม่ยุบจนหมด ส่งตัวไปรับยาต่อที่รพ. ชุมชน ต่อมาก้อนโตกลับขึ้นใหม่ ยังมีไข้และปวดท้อง
ธันวาคม 2557	ทำ biopsy ก้อนที่คอพบ chronic granulomatous inflammation ย้อม AFB, GMS และ PAS: negative, CT whole abdomen: hepatomegaly with normal surface, splenomegaly 12 cm, matted and long chain of paraaortic, aortocaval, mesenteric lymph node size up to 4.4 cm
3 วัน	ก่อนมารพ. มีไข้สูง หนาวสั่นมากกว่าเดิม ไอแห้งๆ เหนื่อยมากขึ้นจึงมารพ.

Physical examination

GA: A young man with fever, awake, alert, tachypnea and use of accessory respiratory muscles

Vital signs: T 38°C, BP 120/70 mmHg, PR 140/min, RR 30/min SpO_2 92% (oxygen mask with bag 10 LPM)

HEENT: mildly pale conjunctivae, anicteric sclerae, no oral thrush, no oral hairy leukoplakia

LN: submandibular LN size 1-3 cm, matted bilateral cervical LN size 1-2 cm, not tender, no fluctuation, no redness, hard consistency and fixed, Lt. axilla LN size 1.5-2.5 cm, Rt. axilla LN impalpable, groin LN size 1.5-2.5 cm, rubbery consistency, not tender, no fluctuation, no redness

Heart: normal S_1 S_2, no murmur

Lungs: trachea in midline, decrease breath sound at RUL, coarse crepitation Rt. lung, dullness on percussion above Rt. 2nd ICS, vocal resonance and tactile fremitus can't be evaluated

Abdomen: soft, not tender, liver 3 cm below RCM, span 15 cm with smooth surface, splenic dullness positive

Extremities: no pitting edema, no abnormal skin lesions

Investigations

1. CBC: WBC 43,450 cells/mm^3 (N 88%, L 6%, M 3%, band 3%), platelet 421,000 cells/mm^3, Hct 23.7%, Hb 7.6 g/dL, MCV 64.9 fL, RDW 22.3%
2. BUN 34 mg/dL, Cr 2.96 mg/dL, Na 131 mmol/L, K 4.53 mmol/L, Cl 101 mmol/L, HCO_3 17.4 mmol/L
3. LFT: AST 21 U/L, ALT 26 U/L, TB 0.7 mg/dL, DB 0.6 mg/dL, GGT 226 U/L, ALP 217 U/L, alb 16.6 g/L, globulin 57.2 g/L
4. Anti-HIV: negative
5. Blood culture for mycobacterium: *Mycobacterium abscessus*

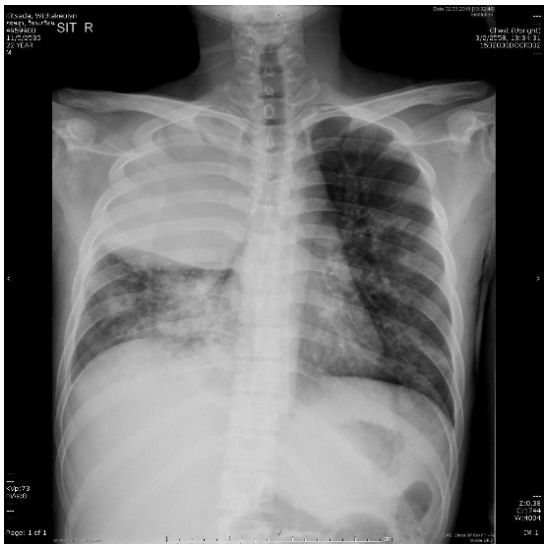
   Cervical lymph node culture: *Mycobacterium abscessus*

   Microbial identification 18sRNA from cervical lymph node: *Pneumocystis jirovecii*

   Sputum culture for mycobacteria: negative

   Right lung tissue pathology: organizing pneumonia, negative for AFB, GMS

   Interferon gamma autoantibody: positive
6. Chest X-ray: as figure



Discussion

ผู้ป่วยมาด้วยอาการไข้เรื้อรังและต่อมน้ำเหลืองโตทั่วตัว มีประวัติได้รับยาต้านวัณโรคมาระยะหนึ่ง การตอบสนองดีขึ้นในช่วงแรกต่อมาอาการแย่ลง ตรวจร่างกายพบว่าตับโตร่วมด้วย มีการวินิจฉัยแยกโรคดังนี้ สาเหตุจากการติดเชื้อ ได้แก่ multidrug-resistant tuberculosis, non-tuberculous mycobacterium infection (NTM), disseminated fungal infection เช่น cryptococcosis, histoplasmosis, penicillosis และสาเหตุที่ไม่ได้มาจากการติดเชื้อ ได้แก่ lymphoma

อาการที่มารพ. ด้วยไข้สูงเหนื่อยมากขึ้นมา 3 วันก่อนมารพ. ร่วมกับตรวจร่างกายและภาพฟิล์มเอกซเรย์ปอดเข้าได้กับภาวะปอดอักเสบ โดยเป็นจากการติดเชื้อที่เกิดขึ้นใหม่หรือจากเชื้อที่เป็นสาเหตุเดียวกันที่ทำให้เกิดภาวะไข้เรื้อรังและต่อมน้ำเหลืองที่ได้กล่าวไปข้างต้น โดยเชื้อก่อโรคที่เป็นไปได้เพิ่มเติมมีดังนี้ *S. pneumoniae, H. influenzae* หรือเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบในกลุ่ม Enterobacteriacea และ *Burkholderia pseudomallei*

Diagnosis

Adult onset autoimmune deficiency

Disseminated *Mycobacterium abscessus* infection

Extrapulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection

Management

เบื้องต้นให้การรักษาด้วย imipenem 500 มก. ทางเส้นเลือดดำทุก 6 ชม. เพื่อรักษาโรคปอดอักเสบและครอบคลุม *B. pseudomallei* ได้ทำการตัดชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอไปตรวจวินิจฉัย ในระหว่างนี้ผลเพาะเชื้อวัณโรคในเลือดจาก *Lowenstein-Jensen* medium รายงานว่ามีเชื้อขึ้นภายใน 7 วัน จึงคิดถึงสาเหตุการติดเชื้อกลุ่ม rapid-growing mycobacteria จึงได้ปรับเพิ่มยาได้แก่ ciprofloxacin และ clarithromycin ต่อมาผลเพาะเชื้อในเลือดรายงานเป็น *M. abscessus* จึงได้ปรับยาอีกครั้งตามผลความไวต่อยาดังนี้ คือ imipenem, levofloxacin และ amikacin ให้ทางเส้นเลือดดำ ในเวลาต่อมาผลตรวจเพิ่มเติมของชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลืองที่คอโดยวิธี Microbial identification 18sRNA รายงานเป็น *Pneumocystis jirovecii* จึงให้การรักษาด้วย TMP-SMX แต่หลังจากได้ยาผู้ป่วยมีผื่นแดงขึ้นทั่วตัว สงสัยภาวะแพ้ยาจึงหยุดยา TMP-SMX เมื่อผื่นยุบลงจึงให้ปรับการรักษาเป็น primaquine ร่วมกับ clindamycin เป็นระยะเวลา 21 วัน หลังจากนั้นผู้ป่วยไม่มีไข้ ต่อมน้ำเหลืองขนาดเล็กลงและอาการเหนื่อยดีขึ้นตามลำดับ

Microbiology: *Mycobacterium abscessus*

Phylum: *Actinobacteria*

Family: *Mycobacteriaceae*

Genus: *Mycobacterium*

M. abscessus เป็นเชื้อในกลุ่ม rapid growing mycobacteria ซึ่งจะโตเร็วทำให้เมื่อเพาะเชื้อจะสามารถเห็นโคโลนีเชื้อได้ภายใน 1 สัปดาห์

M. abscessus พบได้ตามแหล่งน้ำต่างๆ เช่น น้ำฝน สระว่ายน้ำ น้ำประปา แม้กระทั่งน้ำดื่ม (Thomson R, BMC Infectious Diseases 2013; 13: 241-7.)

การดื้อยาของ *M. abscessus* เกิดจาก natural (intrinsic) และ acquired resistance (Nessar R, J Antimicrob Chemother 2012: 2-9)

Natural resistance เกิดจาก

: cell wall ที่หนากว่าแบคทีเรียอื่นๆ ซึ่งประกอบด้วยชั้น mycolates (waxy) ทำให้ยาผ่านไม่ได้หรือผ่านได้น้อย (chemical, hydrophobic barrier)

: การสร้าง enzyme เช่น

- aminoglycoside acetyltransferase และ aminoglycoside phosphotransferase ทำให้ดื้อต่อยา aminoglycosides
- rifampicin ADP-ribosyltransferase ทำให้ดื้อต่อยา rifampicin
- 23S RNA methyltransferase ทำให้ดื้อต่อยา macrolides

: efflux pump โดยอาศัยโปรตีน ABC transporters และ MmpL family ทำให้ดื้อต่อยาหลายกลุ่ม

: genetic polymorphism of target genes เช่น

- การดื้อยาต่อ ethambutol (MIC > 64 µg/mL),
- การดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolones (MIC > 8 µg/mL)

Acquired resistance เช่น

: การดื้อยา aminoglycosides เกิดจาก mutation ที่ gene *rrs* ซึ่งมีผลต่อ 16S RNA ทำให้ดื้อยา kanamycin, amikacin, gentamicin และ tobramycin (MIC > 1000 µg/mL)

: การดื้อยา macrolides เกิดจาก mutation ที่ gene *rrl* ทำให้มีผลต่อ 23S RNA ซึ่งเป็น target ร่วมของยากลุ่ม macrolides, lincosamides และ streptogramins ทำให้ดื้อยากลุ่ม macrolides, lincosamides และ streptogramins แบบ cross resistance ได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการดื้อยาแบบเหนี่ยวนำ (inducible macrolide resistance) คือสายพันธุ์ที่ไวเมื่อใช้ยาไปแล้วระยะหนึ่ง (3-7 วัน) อาจเหนี่ยวนำให้ดื้อยาได้ โดยพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *M. abscessus* (sensu stricto) หลังจากได้รับการรักษาด้วยยา clarithromycin มีการดื้อยาระหว่างการรักษาได้มากกว่า ผู้ป่วยที่ใช้ยา azithromycin แต่ไม่พบการเหนี่ยวนำให้ดื้อยาในเชื้อ *M. massiliense* (Chol G, Am J Respir Crit Care Med 2012; 186: 917-25.)

: การดื้อยา fluoroquinolones เกิดจาก mutation ที่ gene *gyrA*

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพต่อ *M. abscessus* complex จากการศึกษาใน 3 ช่วงเวลา คือ

: การศึกษาที่ 1 เป็นการศึกษาเชื้อ *M. abscessus* 167 isolates จาก multicenter ในไต้หวัน (SMART program) ปี ค.ศ. 2002-2003 (Huang TS, J Formos Med Assoc 2008;107:281–7.) พบว่า ไวต่อ clarithromycin, ciprofloxacin และ imipenem เป็นร้อยละ 52.7, 35.7 และ 28.9 ตามลำดับ

: การศึกษาที่ 2 เป็นการศึกษาเชื้อ *M. abscessus* 74 isolates จากเกาหลีใต้ ปี ค.ศ. 2005-2006 (Park S, J Korean Med Sci. 2008;23:49–52.) พบว่า ไวมากต่อ amikacin, cefoxitin และ clarithromycin เป็นร้อยละ 99, 99 และ 91 ตามลำดับ และไวปานกลางต่อ imipenem, ciprofloxacin และ moxifloxacin เป็นร้อยละ 55, 57 และ 73 ตามลำดับ

: การศึกษาที่ 3 เป็นการศึกษา clinical outcome จากการติดเชื้อ *M. abscessus* 40 isolates ในไต้หวัน ปี ค.ศ. 2006-2008 (Huang Y, J Microbiol Immunol Infect 2010; 43: 401-6.) พบผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ดังนี้

Antimicrobial agents	**MIC (µg/mL)**			**% Susceptibility**
	Range	MIC_{50}	MIC_{90}	
Amikacin	0.125-64	4	16	95.0
Cefoxitin	16-256	32	32	32.5
Ciprofloxacin	0.064-64	4	16	10.0
Clarithromycin	0.032-8	0.25	2	92.5
Doxycycline	0.125-256	32	128	7.5
Imipenem	1-256	16	128	12.5
Moxifloxacin	0.064-32	8	32	22.5
Sulfamethoxazole	16-256	256	256	7.5
Tigecycline	0.064-2	0.5	2	100

ปัจจุบัน *M. abscessus* complex ประกอบด้วย 3 species คือ *M. abscessus* (sensu stricto), *M. massiliense* และ *M.bolletii* ซึ่งไม่สามารถใช้การวินิจฉัยแยกเชื้อด้วย phenotypic analysis ต้องใช้ genotypic analysis โดยการใช้ multiple sequencing analysis ที่มี *target gene rpoB, hsh65, gnd, glpK, secA* และ *soda* (Choi G, J Clin Microbiol 2011; 49: 1107-9.)

M. abscessus complex เป็นเชื้อที่ดื้อยามากที่สุดใน mycobacteria ในรายที่ให้ผล AFB positive แต่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อ แล้วการรักษาไม่ได้ผล ควรคิดถึงเชื้อนี้ด้วย

M. abscessus complex มีผลการทดสอบความไวแตกต่างกัน ซึ่งอาจใช้ช่วยในการวินิจฉัยแยกเชื้อได้ ดังนี้

: *M. abscessus* (sensu stricto) ดื้อต่อยา doxycycline อาจไว (C28 polymorphism) หรือดื้อ (T28 polymorphism) ต่อยา clarithromycin

: *M. massiliense* ไวต่อยา doxycycline และไวต่อยา clarithromycin

: *M. bolletii* (ยังพบน้อยมากที่ก่อโรคในคน) ดื้อต่อยา doxycycline และดื้อต่อยา clarithromycin

Microbiology: ***Pneumocystis jirovecii***

Phylum: *Ascomycota*

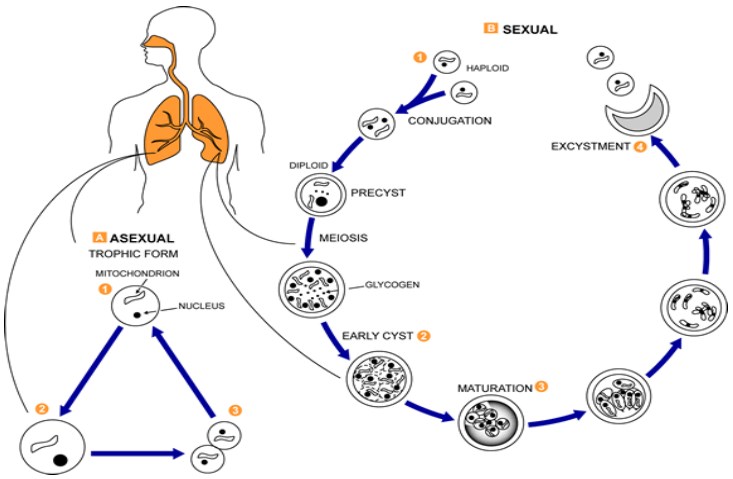
Family: *Pneumocystidaceae*

Genus: *Pneumocystis*

แต่ละ species มีความจำเพาะกับ host ได้แก่ *P.carinii* และ *P. wakefieldiae* พบในหนู rat, *P.murina* พบในหนู mice, *P. oryctolagi* พบในกระต่าย และ *P. jirovecii* พบในคน

P. jirovecii เดิมจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อปรสิต (protozoa) ชื่อว่า *Pneumocystis carinii* ปัจจุบันจัดอยู่ในเชื้อรา ลักษณะเป็น yeast-like fungi ขนาด 4-7 µm คล้ายครึ่งทรงกลม หรือถ้วยกาแฟ (cup-shaped) อาจพบเป็น normal microbiota ในช่องปากของคน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คนปกติพบว่ามีภูมิคุ้มกันตั้งแต่เป็นเด็กอายุ 3-4 ปี แต่สามารถก่อโรคในคนที่มีความพร่องของภูมิคุ้มกันทั้ง humoral และ cellular immune response จึงพบก่อโรคในทารกคลอดก่อนกำหนด เด็กขาดอาหาร หรือทุโภชนา ผู้ป่วย HIV หรือได้รับสารกดภูมิคุ้มกัน หรือหญิงตั้งครรภ์ โดยจะพบเชื้อ colonize ในทางเดินหายใจ โดยไม่มีอาการก่อนจะนำไปสู่การติดเชื้อ หรือเป็นคนที่จะแพร่เชื้อไปสู่คนที่มีความพร่องของภูมิคุ้มกัน โดยแพร่เป็น airborne transmission

Life cycle



-

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

เนื่องจาก *P. jirovecii* ไม่สามารถเพาะเลี้ยง (culture) การวินิจฉัยจึงเป็นการตรวจหาเชื้อโดยตรงด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic direct examination) หรือ วิธีอณูโมเลกุล (Molecular methods)

สิ่งส่งตรวจ: เสมหะ oral wash, nasopharyngeal aspirate, bronchoalveolar lavage (BAL), Lung biopsy, tissue, lymph node

Microscopic direct examination: อาจย้อมด้วยสีต่างๆ วินิจฉัยด้วยการดูขนาดที่ใกล้เคียงกับเม็ดเลือด (4-7 µm) และลักษณะที่เป็น cup-shaped, crescent-shaped, kidney bean-shaped หรือ double parenthesis-shaped ดังนี้

Giemsa stain: เป็นการย้อม trophozoites (vegetative state) และ intracystic state (spore state) โดย nucleus จะติดสีน้ำเงินเข้มเป็นจุดๆ (dot-like nuclei) ส่วน cytoplasm ติดฟ้า อาจย้อมด้วย Wright stain, Diff-Quick (modified Wright stain) หรือ Papanicolaou stain

Gomori methenamine silver stain (GMS): เป็นการย้อม trophozoites โดยจะเห็นติดสีดำ

Fluorescence stain: เช่น toluidine blue O หรือ calcofluor white เป็นการย้อม cell wall โดย celluflour ซึ่งเป็น active ingredient ของ calcofluor white จะจับกับ beta-linked polysaccharides เช่น chitin, cellulose ทำให้เห็นเชื้อติดสีเขียวหรือสีฟ้าซึ่งนิยมใช้ในการตรวจหาเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง

Immunofluorescence stain เป็นการใช้ specific monoclonal antibody ทำให้การวินิจฉัยมีความจำเพาะมากขึ้น

มีการศึกษาเปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ ของการย้อมสีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ จากสิ่งส่งตรวจทางเดินหายใจ (Procop GW, J Clin Microbiol 2005; 43: 3333-5.) ได้ผลดังนี้

	Calcofluor white	**Diff-Quick**	**GMS**
ความไว (%)	73.8	48.4	76.9
ความจำเพาะ (%)	99.6	99.6	99.2
Positive predictive values (%)	98.0	96.9	96.2
Negative predictive values (%)	93.4	88.0	94.2

Molecular methods: โดยการตรวจหา DNA ด้วยวิธี PCR, real-time PCR หรือ loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

มีการศึกษาเปรียบเทียบวิธีตรวจหา *P. jirovecii* ด้วย GMS, nested PCR และ LAMP จากผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกซึ่งเข้าได้กับ PCP จำนวน 185 ราย โดยเป็น

- ผู้ป่วย HIV ซึ่งมี CD4+ T cells น้อยกว่า 200 cells/mm3 จำนวน 64 ราย
- ผู้ป่วย non-HIV จำนวน 121 ราย ประกอบด้วย
  : ผู้ป่วยเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ จำนวน 66 ราย
  : ผู้ป่วยมะเร็ง จำนวน 20 ราย
  : ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องอื่นๆ จำนวน 35 ราย

สิ่งส่งตรวจเป็น BAL และ induced sputum จำนวน 135 และ 50 ตัวอย่าง ตามลำดับ (Singh P, Molecular Biology International volume 2015, http://dx.doi.org/10.1155/2015/819091) ได้ผลดังนี้

วิธีทดสอบ	Positive / total samples	% Positive
GMS	12/185	6.5
Nested PCR	41/185	22.2
LAMP	49/185	26.5

มีการศึกษาที่สามารถตรวจพบ PCP DNA จาก BAL ของผู้ป่วย non-HIV ที่ไม่มีอาการแสดงของ pulmonary PCP จึงเป็นไปได้ที่อาจพบ PCP เป็นเพียงเชื้อที่ colonize แต่จะสามารถพัฒนาเป็นเชื้อก่อโรคเมื่อผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือมีการกดภูมิคุ้มกันได้ (khodadadi H, Indian J Publ Health 2013; 42: 298- 305)