Review Article

# โรคพิธิโอซิสในคน

อรวรรณ มั่นคงธนากิจ
พัชรี กัมมารเจษฎากุล*

## Human Pythiosis.

**Orawan Monkongtanakit, Patcharee Kammarnjassadakul**
**Department of Medical Microbiology, Faculty of Medical Technology,**
**Hauchiew Chalermprakiet University, Bang Plee, Samutprakarn, 10540, Thailand.**
*E-mail: kpatcharee@gmail.com
Songkla Med J 2014;32(1):43-54

**บทคัดย่อ:**

โรคพิธิโอซิสในคนเกิดจากเชื้อ *Pythium insidiosum* พบผู้ป่วยในบริเวณเขตร้อน จนถึงเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะประเทศที่กำลังพัฒนา การติดเชื้อเกิดจากการสัมผัสซูโอสปอร์ของเชื้อที่อาศัยอยู่ในน้ำ ลักษณะพยาธิสภาพแบ่งเป็น 4 ลักษณะ คือ การติดเชื้อที่ผิวหนัง การติดเชื้อที่ตา การติดเชื้อที่หลอดเลือดแดง และการติดเชื้อที่แพร่กระจายในบริเวณอื่นๆของร่างกาย การวินิจฉัยโรคใช้เวลานาน และต้องอาศัยผู้ที่มีความรู้ความชำนาญ ได้แก่ การตรวจหาเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ การเพาะเลี้ยงเชื้อ และกระตุ้นให้สร้างซูโอสปอร์ การตรวจด้วยวิธีทางน้ำเหลืองวิทยา และวิธีทางอณูชีววิทยา ปัจจุบันการรักษายังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ดังนั้นบุคคลากรทางการแพทย์ที่มีความรู้และเข้าใจเกี่ยวกับโรค และวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องและรวดเร็วจะส่งผลให้การรักษามีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

**คำสำคัญ:** เชื้อพิเธียม อินซิดิโอซั่ม, ซูโอสปอร์, โรคพิธิโอซิสในคน

กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ 10540
รับต้นฉบับวันที่ 8 พฤษภาคม 2556 รับลงตีพิมพ์วันที่ 18 กันยายน 2556

**Abstract**:

Human pythiosis is caused by *Pythium insidiosum*, often found in patients in tropical and subtropical area especially in developing countries. The infections arise though coming in contact with zoospore of *P. insidiosum*. The disease may be manifested as a cutaneous/subcutaneous, ophthalmic, vascular or disseminated type. The identification of *P. insidiosum* isolated in human is time consuming, and requires skilled personel. It can be carried out by culturing and inducing the formation of zoospores, immunological technique, and molecular technique. At present, treatment has not been successful. However, improved sensitivity and specificity of diagnosis by healthcare professionals will surely result in a more effective treatment.

**Keywords**: human pythiosis, *Pythium insidiosum*, zoospore

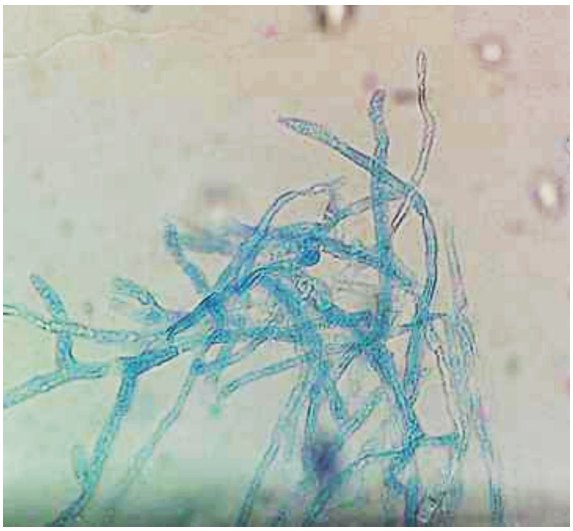
## บทนำ

พิธิโอซิส (Pythiosis)[1,2] เป็นโรคติดเชื้อรุนแรง พบในสัตว์หลายชนิด เช่น ม้า[3,4] แมว[5] สุนัข[6,7] และนกสายพันธุ์ Ibis[8] เป็นต้น และก่อโรคในคนได้ (human pythiosis)[9-12] ปัจจุบันยังไม่พบว่ามีรายงานการติดต่อโรคจากสัตว์สู่คน[13] อาการของโรคพิธิโอซิสในคนเกิดได้หลายลักษณะขึ้นอยู่กับตำแหน่งการติดเชื้อ เช่น เกิดรอยโรคที่ดวงตา (keratitis pythiosis) ผิวหนัง (cutaneous and subcutaneous pythiosis) หลอดเลือดแดง (vascular pythiosis) อวัยวะต่างๆภายในร่างกาย (disseminated pythiosis) เป็นต้น[11] ซึ่งอาจรุนแรงถึงขั้นพิการหรือเสียชีวิตได้[14,15] ในปี พ.ศ. 2528[16] มีรายงานการพบผู้ป่วยโรคพิธิโอซิสรายแรกจากประเทศไทย จากนั้นมีรายงานจำนวนผู้ป่วยเพิ่มสูงขึ้น[9,11,16-19] จากหลายประเทศโดยเฉพาะประเทศในเขตร้อนชื้น[3,10-11,20-23] ในปัจจุบันนี้ประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคพิธิโอซิสมากที่สุดในโลก อาจเนื่องจากประเทศไทยมีปัจจัยและสภาวะแวดล้อมที่สนับสนุนการเกิดโรคติดเชื้อนี้[11,12] เช่น การประกอบอาชีพเกษตรกรรม เป็นต้น สำหรับกลไกการก่อโรคของเชื้อพิเธียม อินซิดิโอซั่มยังไม่ทราบชัดเจน การตรวจวินิจฉัยและการรักษาโรคยังมีปัญหาเนื่องจากมีข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อตัวนี้น้อยมาก ดังนั้นโรคพิธิโอซิสจึงมีความสำคัญและจำเป็นต้องเร่งศึกษาเพื่อพัฒนาการตรวจการรักษา รวมทั้งหาวิธีป้องกันโรคให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

## สาเหตุของโรค

โรคพิธิโอซิสเกิดจากเชื้อพิเธียม อินซิดิโอซั่ม (*Pythium insidiosum*)[24] พบเชื้ออาศัยอยู่ในเขตร้อนชื้นที่มีดินและแหล่งน้ำขังตามธรรมชาติ[25] ลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบสายราขนาดใหญ่ ไม่มีสี และอาจพบผนังกั้นได้ (sparsely septate hyphae)[12] (รูปที่ 1) แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมเชื้อจะสร้างซูโอสปอร์ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ในน้ำได้โดยอาศัยแฟลกเจลล่า 2 เส้น[26] สำหรับการจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ของเชื้อ *P. insidiosum* มีดังนี้[27]

Kingdom: Stramenopila (Chromista)
Division: Oomycota
Class: Oomycetes
Order: Pythiales
Family: Pythiaceae
Genus : *Pythium*
Species: *Pythium insidiosum*



**รูปที่ 1** ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X แสดงสายราแบบ sparsely septate hyphae ย้อมด้วย lactophenol cotton blue ของเชื้อ *Pythium insidiosum* ที่เพาะเลี้ยงบน Sabouraud dextrose agar (SDA)

ถึงแม้ลักษณะทางโคโลนีและรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *P. insidiosum* จะคล้ายเชื้อรา แต่จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี การจำแนกเชื้อโดย Phylogenetic relationships พบว่ามีความแตกต่างจากราแท้ (true fungi)[28-31] และมีลักษณะใกล้เคียงกับสาหร่ายและไดอะตอมในกลุ่ม Oomycota เชื้อ *P. insidiosum* จึงไม่ใช่เชื้อรา จึงสามารถเรียกเชื้อตัวนี้ได้ว่าเป็น fungal like organism

## วงจรชีวิตและการก่อโรค

เชื้อ *P. insidiosum* มีการสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) ซึ่งพบได้น้อยในธรรมชาติและการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดจากหน่วยสืบพันธุ์เพศผู้ เรียกว่า แอนเทอริเดียม [antheridium (An)] สร้างท่องอก [fertilization tube (Ft)] มาปฏิสนธิกับหน่วยสืบพันธุ์เพศเมีย เรียกว่า โอโอโกเนียม [oogonium (Oom)] เกิดเป็นโอโอสปอร์ [oospore (Oos)] และงอกเป็นสายราต่อไป[24]

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นเมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะแวดล้อม และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่านั้น เริ่มจากเกิดการเคลื่อนที่ของ protoplasm ไปยังปลายสายรา ทำให้ปลายสายรามีลักษณะพองออกเป็น vesicle คล้ายถุงหุ้มขนาดใหญ่เรียกว่า zoosporangium ภายในเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ เพื่อสร้าง biflagellated zoospores จำนวนมากมาย ทำให้ zoosporangium แตกออก biflagellated zoospores (รูปที่ 2) จะเคลื่อนที่ในน้ำได้โดยใช้แฟลกเจลล่า (flagella) 2 เส้น ประมาณ 10-15 นาที จากนั้นเชื้อจะสลัดแฟลกเจลล่า ทิ้ง เกิดการเปลี่ยนรูปร่างเป็น encysted zoospore และเจริญเป็นสายราต่อไป Mendoza และคณะ[26] สันนิษฐานว่าการติดเชื้อในคนหรือสัตว์ เกิดจากคนหรือสัตว์มีบาดแผลไปสัมผัสกับแหล่งน้ำที่มี biflagellated zoospores อยู่ biflagellated zoospores เคลื่อนที่ไปเกาะติดกับบาดแผล จากนั้นเชื้อจะสลัด flagella ทิ้ง เปลี่ยนรูปร่างเป็น encysted zoospores เจริญเป็นสายราและก่อโรคได้[6-27, 32] ในปัจจุบันยังไม่ทราบข้อสรุปถึงกลไกการก่อโรคพิธิโอซิสในคนอย่างชัดเจน แต่ข้อมูลจากการศึกษาพบว่ามีปัจจัยที่สนับสนุนให้เกิดโรคพิธิโอซิสในคนได้ เช่น

1. ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *P. insidiosum*

1.1 Biflagellated zoospores ทำหน้าที่เสมือนหน่วยแพร่พันธุ์โรค เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ และหลั่งสารบางอย่างเพื่อช่วยเกาะติดกับบาดแผลของคนได้[26,33]

1.2 เชื้อสร้างเอนไซม์ proteases ทำลายผนังเซลล์ช่วยให้เชื้อเจริญเป็นสายราเพื่อบุกรุกและก่อโรคได้[34]

2. ความสามารถในการเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส[12]

**รูปที่ 2** ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X แสดง zoospores ของเชื้อ *Pythium insidiosum*

## โรคพิธิโอซิสในคน (human pythiosis)

โรคพิธิโอซิสในคน แสดงอาการทางคลินิก 4 แบบ ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของการติดเชื้อ คือ

1. การติดเชื้อบริเวณผิวหนังและชั้นใต้ผิวหนัง (cutaneous/subcutaneous pythiosis)[10] ในคนพบผู้ป่วยกลุ่มนี้น้อยสุด พบแผลอักเสบเรื้อรังบริเวณผิวหนังและใต้ผิวหนัง ตำแหน่งที่เกิด เช่น ใบหน้า แขน ขา เป็นต้น

2. การติดเชื้อบริเวณหลอดเลือดแดง (vascular pythiosis)[9,14] โดยเริ่มต้นมักจะพบเชื้อที่บริเวณหลอดเลือดแดงใหญ่บริเวณขา เมื่อเชื้อมีจำนวนมากขึ้นจะทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดง ส่งผลให้อวัยวะที่อยู่ด้านล่างอุดตันไม่มีเลือดไปหล่อเลี้ยงส่งผลให้เกิดเนื้อตาย (necrosis) หลังจากนั้นเชื้อจะแพร่ไปตามหลอดเลือดแดงได้รวดเร็ว จนท้ายสุดเชื้อจะไปเจริญที่หลอดเลือดแดงใหญ่บริเวณหัวใจ (aorta) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ พยาธิสภาพนี้พบมากที่สุดในคนที่เป็นโรค Thalassemia-hemoglobinopathy ร่วมด้วย[35,36]

3. การติดเชื้อที่ดวงตา (ocular pythiosis)[17,24] อาการ คือ ปวด บวม ระคายเคืองที่บริเวณดวงตา และเกิดแผลที่กระจกตาได้ เชื้อมักลุกลามอย่างรวดเร็วจนถึงขั้นอาจทำให้ตาบอดได้ การติดเชื้อลักษณะนี้มักเกิดจากอุบัติเหตุ เช่น น้ำที่มีเชื้อกระเด็นเข้าตา ขยี้ตา เศษหญ้าบาดตา เป็นต้น

4. การติดเชื้อที่บริเวณอื่นๆ ของร่างกาย (disseminated pythiosis)[15,35] มีรายงานการติดเชื้อที่สมอง ปอด โพรงจมูก ตับ ไต กระเพาะอาหาร เป็นต้น

การที่ประเทศไทยพบผู้ป่วยมากที่สุดในโลก[9,11,16-19] อาจเนื่องมาจากหลายสาเหตุ คือ ประเทศไทยมีอากาศร้อนชื้นตลอดปี มีดินอุดมสมบูรณ์และแหล่งน้ำขังตามธรรมชาติมากมาย ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* และคนไทยมีอาชีพเกษตรกรรมเป็นหลัก ซึ่งเป็นปัจจัยให้สัมผัสกับแหล่งน้ำที่มีเชื้ออาศัยอยู่และเกิดโรคพิธิโอซิสได้[11,12,35] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ธีระพงษ์ กระแจะจันทร์ และคณะ[11] ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2528-2546 ในผู้ป่วยโรคพิธิโอซิสจำนวน 102 ราย พบได้จากทุกภาคของประเทศไทย และเมื่อศึกษาประวัติผู้ป่วยโรคพิธิโอซิสพบว่า ร้อยละ 75 ของผู้ป่วย มีอาชีพเกษตรกรรม และพบว่าผู้ป่วย vascular pythiosis ทุกรายมีประวัติเป็นโรคเลือด โดยพบโรคนี้ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียถึงร้อยละ 85 ซึ่งธาลัสซีเมียเป็นโรคที่พบมากในคนไทย[11,37,38] ในปัจจุบันยังไม่ทราบความสัมพันธ์ระหว่างโรคเลือดกับโรคพิธิโอซิสในคน จากข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าคนไทยมีภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรค ดังนั้นการศึกษาโรคพิธิโอซิสจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง

### การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

สิ่งส่งตรวจสำหรับโรคพิธิโอซิสส่วนมากเป็นชิ้นเนื้อ ก้อนเลือดอุดตัน และหนองในเนื้อเยื่อ ควรนำส่งห้องปฏิบัติการทันทีเพื่อทำการเพาะเชื้อโดยใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หรือ

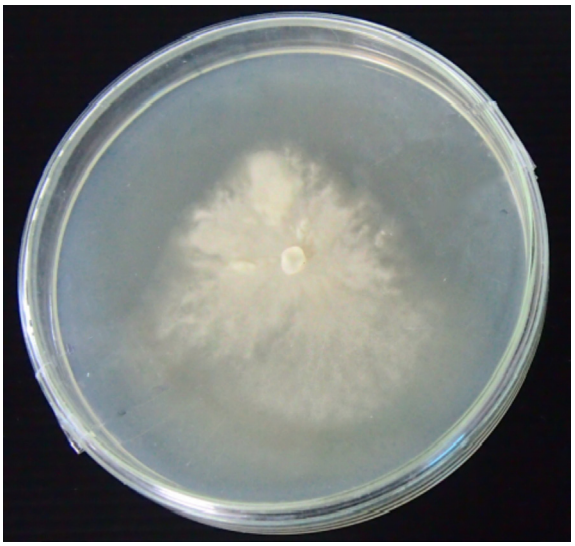
น้ำเกลือปราศจากเชื้อ (ความเข้มข้นต่ำ) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ (ยา streptomycin และยา ampicillin) สำหรับชิ้นเนื้อควรล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อก่อนนำส่งห้องปฏิบัติการ ไม่ควรแช่เย็นหรือเก็บไว้ในที่เย็น หรือแช่ในน้ำเกลือความเข้มข้นสูง เนื่องจากมีผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ประมาณร้อยละ 20 ของสิ่งส่งตรวจไม่สามารถเพาะเชื้อขึ้นได้[12] นอกจากนี้หากไม่สามารถส่งห้องปฏิบัติการได้ภายใน 2 วัน ควรเก็บไว้ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์แบบกว้าง (board spectrum antibiotic) เช่น chloramphenicol หรือ tetracycline สำหรับวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคพิธิโอซิสนั้น สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

**1. การตรวจโดยตรง (direct examination and histopathology)**

สำหรับการย้อมทาง histopathology สามารถย้อมได้ทั้ง Gomori'smethenamine - silver nitrate stain (GMS) และ Periodic Acid-Schiff (PAS) การตรวจ direct examination สามารถตรวจได้จากชิ้นเนื้อบริเวณหลอดเลือดแดงที่มีการอุดตัน หรือหนองในเนื้อเยื่อ โดยใช้น้ำยา 10% KOH ลักษณะที่พบ คือ สายราขนาดใหญ่เส้นสั้นๆ ไม่มีผนังกั้น (อาจพบผนังกั้นได้บ้างแต่น้อยมาก) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-10 ไมครอน ซึ่งคล้ายคลึงกับลักษณะที่พบได้ในโรค zygomycosis ที่เกิดจากเชื้อ *Basidiobolous ranarum* และ *Conidiobolus coronatus* โดยเฉพาะรอยโรคจาก cutaneous/subcutaneous pythiosis ที่จะพบลักษณะ splendorehoppli phenomenon[39] ดังนั้น แพทย์จึงต้องสอบถามประวัติของผู้ป่วย หรือวิธีอื่นเพื่อยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยให้ถูกต้องแม่นยำเพิ่มขึ้น

**2. การเพาะเชื้อ**

สิ่งส่งตรวจจากบริเวณที่ติดเชื้อ จะต้องนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อทำการเพาะเชื้อโดยทันที หากไม่สามารถนำส่งได้ทันทีควรเก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือแช่ไว้ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ห้ามเก็บในที่เย็นหรือน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสูงเพราะจะทำให้เชื้อตายได้ อาหารที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราทั่วไปที่ไม่ผสมยา cyclohexamide บ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบลักษณะโคโลนีผิวหน้าเรียบแผ่ติดกับหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ มีสีขาวจนถึงสีครีม (รูปที่ 3) เมื่อนำมาย้อมดูด้วยสี lactophenol cotton blue (LPC) พบสายราขนาดใหญ่อาจมีและไม่มีผนังกั้น อาจพบกิ่งก้าน (branching hyphae) ที่ทำมุมประมาณ 90 องศาได้ (รูปที่ 1) ซึ่งคล้ายกับเชื้อราในกลุ่ม *Entomophthorales* ต่างกันตรงเชื้อ *P. insidiosum* ไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใดๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีตรวจยืนยันว่าผู้ป่วยเป็นโรคพิธิโอซิสคือ กระตุ้นให้เชื้อสร้างซูโอสปอร์ (zoospore) โดยปกติเชื้อในกลุ่มพิเธียมทุกตัวสามารถสร้างซูโอสปอร์ได้ในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของ calcium และ magnesium ion แต่มีเพียงสปีชีส์เดียวคือ *P. insidiosum* ที่สามารถก่อให้เกิดโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม วิธีการกระตุ้นให้เชื้อสร้างซูโอสปอร์จึงเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจยืนยันโรคพิธิโอซิส โดยการเลี้ยงเชื้อในน้ำต้มดอกหญ้ามาเลเซีย แล้วจึงกระตุ้นด้วย induction medium[26] เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบถุงหุ้มซูโอสปอร์ (zoosporangia) ที่มีซูโอสปอร์ และซูโอสปอร์



**รูปที่ 3** ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pythium insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA

ที่เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า 2 เส้น (รูปที่ 2) ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงเชื้อคือ ต้องใช้เวลานาน ความไวต่ำ และต้องการผู้ที่มีประสบการณ์ในการทำงาน และในบางครั้งไม่สามารถเพาะเชื้อได้จากสิ่งส่งตรวจ[40] จึงต้องมีการพัฒนาวิธีอื่นที่มีความจำเพาะ แม่นยำ และรวดเร็วยิ่งขึ้น ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

**3. วิธีทางน้ำเหลืองวิทยา**

การทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยาเดิมใช้ในการวินิจฉัยโรคพิธิโอซิสในสัตว์ สำหรับในผู้ป่วย human pythiosis ได้มีการนำทั้งวิธีเดิมและพัฒนาวิธีใหม่เพิ่มขึ้นในปัจจุบันได้แก่

3.1 Immunodiffusion test (ID)

วิธีนี้เดิมเป็นวิธีที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคพิธิโอซิสในสัตว์ โดยใช้แอนติเจน 2 ชนิด คือ แอนติเจนที่มาจากการย่อยสายราของเชื้อ *P. insidiosum* ด้วยเอนไซม์ทริปซิน กับแอนติเจนที่เตรียมจาก culture filtration antigen (CFA) ที่เข้มข้น[41] ผลการทดสอบให้ผลบวกในสัตว์และคนที่เป็นโรคนี้ ยกเว้นกรณีที่เป็นโรคแบบเรื้อรังและการทดสอบที่ผิวหนังพบว่าวิธีนี้ให้ผลเป็นลบ[42] ในการทดสอบที่ใช้ CFAs เป็นแอนติเจน พบว่าให้ผลบวกกับผู้ป่วยพิธิโอซิส แต่ให้ผลลบกับผู้ป่วยโรคติดเชื้อราชนิดอื่นและในคนปกติ แต่การทดสอบในผู้ป่วยที่มีรอยโรคที่ตา การทดสอบ ID ให้ผลลบ[43] ในการติดตามผลการรักษาในม้าด้วยวิธีนี้พบว่า ให้ผลลบเมื่อการรักษาได้ผล[41] ในขณะที่ของผู้ป่วยจะมีไตเตอร์ต่ำลง[43]

3.2 Western blot

วิธี western blot ให้ผลบวกในคนที่เป็นโรคนี้ ยกเว้นผู้ป่วยที่มีรอยโรคที่ตา นอกจากนี้วิธี western blot ยังถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาแอนติเจนที่น่าสนใจของตัวเชื้อ[44,45] พบว่ามีหลายแอนติเจนที่น่าจะมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคและการรักษาโรคพิธิโอซิส ซึ่งในปัจจุบันยังอยู่ในขั้นตอนการศึกษาวิจัย

3.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

วิธี ELISA สามารถตรวจระยะการเกิดโรคได้ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจนถึงระยะเรื้อรังโดยเฉพาะเมื่อตรวจด้วยวิธี ID ให้ผลลบ นอกจากนี้ยังพัฒนามาจนมีความไวและความจำเพาะสูงมากได้ถึงร้อยละ 100 ในบางการศึกษา[46-48] จึงถูกนำมาใช้ในการดูการตอบสนองต่อการรักษาผู้ป่วยที่กำลังได้รับการรักษา

3.4 Immunochromatographic test (ICT) และ Haemagglutination test (HA)

เนื่องจากว่าวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้นเป็นวิธีที่ยากจะทำได้นอกห้องปฏิบัติการ ในปี พ.ศ. 2552 ธีรพงษ์ กระแจะจันทร์ และคณะ[49] ได้พัฒนาวิธี ICT โดยใช้ Culture filtrate antigen of *P. insidiosum* เพื่อตรวจหา human anti-*P. insidiosum* antibody ในปีเดียวกัน Jindayok และคณะ[50] ก็ได้รายงานวิธี HA สำหรับตรวจหา anti-*P. insidiosum* antibody เช่นเดียวกัน ซึ่งทั้งสองวิธีมีความไวและความจำเพาะสูง แต่วิธี HA สามารถตรวจโรคพิธิโอซิสจากสัตว์ได้ ในขณะที่วิธีอื่นที่มีความไวและความจำเพาะสูงไม่สามารถตรวจได้

**4. วิธีทางอณูชีววิทยา**

ในปัจจุบันมีการนำวิธีทางอณูชีววิทยามาใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อราเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีข้อมูลเกี่ยวกับลำดับดีเอ็นเอที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาวิธีการตรวจและวินิจฉัยโรคโดยเฉพาะในโรคติดเชื้อราที่มีลักษณะทางโคโลนีและ/หรือภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่คล้ายคลึงกัน และในกรณีที่ไม่สามารถเพาะเชื้อได้เช่นเดียวกับในโรคพิธิโอซิส ในปี พ.ศ. 2545 Grooters และ Gee[51] พัฒนา specific primer สำหรับบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ในการทำ nested polymerase chain reaction (PCR) และมีอีกหลายการศึกษาที่นำส่วน ITS และ cytochrome oxidase I (COX I) มาใช้ในการตรวจหาโรคพิธิโอซิสด้วยวิธี PCR[10,52,53] แต่เนื่องจากต้องอาศัยข้อมูลทางด้านลำดับเบส DNA ซึ่งยังมีไม่มากพอ จึงต้องระมัดระวังในการแปลผล นอกจากนี้ Schurko และคณะ[54] นำเทคนิค hybridization มาพัฒนาโดยใช้ species-specific DNA probe สำหรับบริเวณ ribosomal intergenic spacer (IGS) ที่มีขนาด 530 bp แต่เนื่องจากวิธีเหล่านี้เป็นวิธีที่ยุ่งยาก ต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพง และบุคลากรต้องมี

ความชำนาญ จึงนำมาใช้ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจได้ด้วยวิธีทางน้ำเหลืองวิทยา เช่น การติดเชื้อบริเวณกระจกตาและจากชิ้นเนื้อที่ทำการย้อมทางพยาธิวิทยาแล้ว

## การรักษา

ในปัจจุบันการรักษาโรคพิธิโอซิสให้ผลที่ไม่ดีนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในคน เนื่องจากการใช้ยาต้านเชื้อราเพียงอย่างเดียวให้ผลการรักษาที่ดีเฉพาะในผู้ป่วยที่ติดเชื้อบริเวณผิวหนัง โดยใช้ saturated solution of potassium iodide (SSKI) และยาต้านเชื้อรา เช่น amphotericin B, ketoconazole, itraconazole และ terbinafine ในขณะที่การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อบริเวณหลอดเลือดแดงนั้นไม่ได้ผล[2] เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อนี้ไม่ใช่เชื้อรา การรักษาที่ผ่านมาจึงเป็นการรักษาแบบผสมผสานคือ รักษาด้วยการผ่าตัด การให้ยารักษา และการให้แอนติเจน (immunotherapy) เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน[11]

### การผ่าตัด

การผ่าตัดเอารอยโรคออกเป็นการรักษาที่ได้ผลดีทั้งในคนและสัตว์ แต่ในบางกรณีการผ่าตัดเอาเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อออกมาไม่ได้หมดส่งผลให้เกิดการลุกลามขึ้นใหม่ โดยเฉพาะในคนประมาณร้อยละ 40 ที่มักจะพบการลุกลามเข้าหลอดเลือดในช่องท้องและหลอดเลือดหัวใจจนทำให้เสียชีวิตในท้ายที่สุด[11]

### การรักษาด้วยยาต้านเชื้อรา

การที่เชื้อ *P. insidiosum* ไม่ใช่เชื้อรา และไม่มี ergosterol เป็นส่วนประกอบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เช่นเชื้อราตัวอื่น จึงทำให้การรักษาด้วยยาต้านเชื้อราไม่ค่อยได้ผลสำเร็จ[39,55,56] อย่างไรก็ตามยังมีรายงานที่พบว่าสามารถใช้ยากลุ่มที่ยับยั้งการสร้าง ergosterol (ยากลุ่ม azoles) terbinafine และ amphotericin B ในการรักษาได้ในบางกรณี[23,57-59] เนื่องจากเชื้อในกลุ่ม oomycete บริเวณผนังเซลล์ส่วนใหญ่ประกอบด้วย cellulose และ β-glucan[60] จึงได้มีการศึกษาความไวของเชื้อต่อยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง ergosterol ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง β-glucan และแบบนำยาทั้งสองกลุ่มมาผสมผสานกัน เช่น การศึกษาของ Argenta และคณะ[61] ทดสอบความไวต่อยาของเชื้อในหลอดทดลองพบว่ายา terbinafine ที่ใช้ร่วมกับ itraconazole หรือ voriconazole สามารถยับยั้งเชื้อได้ร้อยละ 17 จากตัวอย่างเชื้อทั้งหมด 30 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีผู้ทดลองความไวของเชื้อต่อยา terbinafine, amphotericin B, metronidazole, rifampicin, ibuprofen และ fluvastatin แต่ละตัว และแบบผสมผสาน เพื่อหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal fungicidal concentration (MFC) ซึ่งผลการทดลองพบว่า *P. insidiosum* แต่ละสายพันธุ์ให้ผลการทดสอบความไวรับต่อยาไม่เหมือนกัน[62] เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกโดยทดสอบกับกระต่ายที่ถูกทำให้เป็นโรคพิธิโอซิสพบว่าผลจากการทดสอบในหลอดทดลองไม่สอดคล้องกับผลทดสอบทางคลินิก[63] ดังนั้นการเลือกใช้ยากับผู้ป่วยจึงต้องอาศัยข้อมูลจากการรักษาที่ผ่านมาเป็นปัจจัยสำคัญมากกว่าข้อมูลที่ได้จากการทำ MIC/MFC ในหลอดทดลอง

นอกจากนี้หลายรายงานการศึกษาพบว่ายาต้านแบคทีเรียมีผลกับเชื้อในกลุ่มพิเธียม โดยเฉพาะมีรายงานว่า minocycline สามารถยับยั้ง *P. insidiosum* ได้[64] และ streptomycin สามารถยับยั้งและสนับสนุนการเจริญเติบโตของ *P. insidiosum* ได้[65] Mahl และคณะ[66] จึงได้ทำการทดสอบความไวของเชื้อ *P. insidiosum* กับยาในกลุ่ม aminoglycoside และ minocycline พบว่ายาในกลุ่ม aminoglycoside ไม่เหมาะในการนำมาใช้ ในขณะที่ tigecycline ให้ผลการทดสอบที่ดีในหลอดทดลอง แต่ยังไม่มีผลการทดสอบทางคลินิก เพื่อความปลอดภัยของการใช้ยาจึงต้องมีข้อมูลผลการทดสอบทางคลินิกที่ชัดเจนต่อไป

### การใช้วัคซีนที่ทำจากแอนติเจนของเชื้อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunotherapy)

วัคซีนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการก่อโรคมาจาก cytoplasmic และ secretory antigens ของเชื้อ

*P. insidiosum*[36,42,67] โดยมีรายงานการรักษาม้าที่เป็นโรคพิธิโอซิสจากประเทศออสเตรเลีย[68] และคอสตาริก้า[69] แอนติเจนที่ใช้ในประเทศออสเตรเลียเป็นของ Miller[68] ซึ่งเป็นส่วนของ sonicated hyphal antigens ให้ผลสำเร็จในการรักษาร้อยละ 53 และผลการรักษาจะดีขึ้นเมื่อมีการรักษาร่วมกับการตัดเอาบริเวณรอยโรคออก แต่มีข้อเสียคือ บริเวณที่ฉีดจะเกิดการบวมแดง ตัวแอนติเจนเสื่อมสภาพได้ง่ายแม้เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่แอนติเจนที่ใช้ที่คอสตาริก้า[69] เตรียมโดย culture filtrate antigens (CFAs) ไม่ค่อยพบอาการบวมแดง และสามารถเก็บได้ถึง 18 เดือนเมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

ปัจจุบันวัคซีนที่ใช้เป็นของ Mendoza[70] ที่ได้เพิ่มส่วนที่เป็นทั้ง exo - และ endoprotein ที่ได้จากการสกัดจากเชื้อ *P. insidiosum* มาผสมในวัคซีนที่ผลิตขึ้น (*Pythium insidiosum* antigen; PIA) ผลการรักษาที่ได้พบว่า ช่วยกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้น[71] โดยในม้าสำเร็จร้อยละ 60 ในแมวร้อยละ 97 และในสุนัขร้อยละ 33[39] สำหรับกลไกการทำงานของแอนติเจนที่ฉีดเข้าไปแล้วสามารถยับยั้งหรือรักษาโรคให้หายได้นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาในเชิงพยาธิวิทยาพบว่า กลไกการตอบสนองต่อการติดเชื้อจะมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอีโอสิโนฟิลเป็นหลัก แต่จะเปลี่ยนการตอบสนองเป็นแมคโครฟาจและลิมโฟซัยต์ชนิด cytotoxic lymphocyte เมื่อมีการฉีดวัคซีนเข้าไป เซลล์เหล่านี้จะไปทำลายเชื้อได้ แต่ยังไม่ทราบผลการป้องกันในระยะยาวเนื่องจากมีรายงานว่าโรคสามารถเกิดกลับเป็นซ้ำอีกได้[39]

สำหรับการรักษาในคนนั้น ได้มีการนำไปใช้กับผู้ป่วยจำนวน 12 รายที่เป็น vascular pythiosis โดยผู้ป่วยได้รับแอนติเจนความเข้มข้น 2 มก./มล. 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน หลังการเข็มที่ 2 ผลที่ได้พบว่ามีผู้ป่วยเสียชีวิตจำนวน 2 ราย ยังคงมีการติดเชื้ออยู่จำนวน 2 ราย อาการดีขึ้นจำนวน 5 ราย และอีก 3 รายไม่สามารถติดตามการรักษาต่อได้[11]

อย่างไรก็ตามทุกวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้น รวมทั้งการรักษาแบบผสมผสาน มีผลการรักษายังไม่เป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากผู้ป่วยเกือบทั้งหมดมักจะเสียชีวิตจากการลุกลามของเชื้อเข้าหลอดเลือดในช่องท้อง ดังนั้นที่สำคัญส่วนคือ การหาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วและถูกต้องที่สุดเพื่อยับยั้งการลุกลามของโรค

## สรุป

**โรคพิธิโอซิสเกิดจากเชื้อ *Pythium insidiosum* ซึ่งพบได้ทั้งในคนและในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม บริเวณเขตร้อนจนถึงเขตร้อนชื้นโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา การติดเชื้อเกิดจากการสัมผัสกับซูโอสปอร์ของเชื้อที่อาศัยอยู่ในน้ำ สำหรับในคนมักจะพบในกลุ่มคนที่เป็นโรค Thalassemia-hemoglobinopathy ร่วมด้วย ลักษณะพยาธิสภาพที่พบแบ่งเป็น 4 ลักษณะ คือ การติดเชื้อที่ผิวหนัง การติดเชื้อที่ตา การติดเชื้อที่หลอดเลือดแดง และการติดเชื้อที่แพร่กระจายในบริเวณอื่น ๆ ของร่างกาย การวินิจฉัยโรคที่แน่นอนคือการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบสายราขนาดใหญ่ ไม่ค่อยพบว่ามีผนังกั้น ลักษณะคล้ายเชื้อในกลุ่ม Zygomycetes และเมื่อกระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์พบซูโอสปอร์ที่มีแฟลกเจลล่า 2 เส้น**

**สำหรับการตรวจด้วยวิธีทางน้ำเหลืองวิทยาแต่เดิมเป็นการทดสอบ immunodiffusion แต่ปัจจุบันมีการพัฒนาการทดสอบด้วยวิธี ELISA ให้มีความไวและความจำเพาะสูง คือ ร้อยละร้อย จึงถูกนำมาใช้ในการติดตามผลการรักษากับผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ในขณะที่วิธีทางอณูชีววิทยาก็มีข้อจำกัดทางด้านข้อมูลทางด้านข้อมูลลำดับ Deoxy-ribonucleic acid (DNA) การรักษาในปัจจุบันยังไม่มียาต้านเชื้อราตัวใดให้ผลกับเชื้อนี้ การรักษาด้วยการผ่าตัดเหมาะสำหรับการติดเชื้อที่หลอดเลือด ในขณะที่การรักษาด้วยการฉีดแอนติเจนของเชื้อยังคงเป็นวิธีการใหม่ที่ยังคงต้องการการติดตามผลและดูผลในระยะยาวกันต่อไป การรักษาจึงเป็นการรักษาแบบผสมผสานมากกว่าการรักษาด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการศึกษาในเชิงลึกเกี่ยวกับเชื้อ *P. insidiosum* ไม่ว่าจะทางด้านพยาธิ-**

**วิทยาคลินิก กลไกการก่อโรค ปัจจัยที่ทำให้เชื้อก่อความรุนแรงของโรคได้ ยังคงต้องการความสมบูรณ์ของข้อมูลทางด้านลำดับ DNA ของเชื้อเพื่อเป็นความหวังในการรักษาผู้ป่วยโรคนี้ต่อไป**

## กิตติกรรมประกาศ

บทความฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์สุชา จุลสำลี อาจารย์ประจำคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ รองศาสตราจารย์ ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ คณะแพทยศาสตร์ศิริราช และ รองศาสตราจารย์อิสยา จันทร์-วิทยานุชิต คณบดีคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ และ รองศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินดามพร หัวหน้าหน่วยเชื้อรา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำ จึงขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้สนับสนุนการทำงานและให้กำลังใจแก่ผู้เขียน

## เอกสารอ้างอิง

1. Collier L, Balows A, Sussman, M. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 9th ed. London: Edward Arnold Press; 1998.
2. Thianprasit M, Chaiprasert A, Imwidthaya P. Human pythiosis. Curr Top Med Mycol 1996; 7: 43 - 54.
3. Reis JL Jr, de Carvalho EC, Nogueira RH, et al. Disseminated pythiosis in three horses. Vet Microbiol 2003; 96: 289 - 95.
4. White SD, Ghoddusi M, Grooters AM, et al. Cutaneous pythiosis in a nontravelled California horse. Vet Dermatol 2008; 19: 391 - 4.
5. Rakich PM, Grooters AM, Tang KN. Gastrointestinal pythiosis in two cats. J Vet Diagn Invest 2005; 17: 262 - 9.
6. Berryessa NA, Marks SL, Pesavento PA, et al. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. J Vet Intern Med 2008; 22: 1065 - 9.
7. Pereira DI, Schild AL, Motta MA, et al. Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brazil. Vet Res Commun 2010; 34: 301 - 6.
8. Pesavento PA, Barr B, Riggs SM, et al. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. Vet Pathol 2008; 45: 538 - 41.
9. Prasertwitayakij N, Louthrenoo W, Kasitanon N, et al. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: case report and literature review. Semin Arthritis Rheum 2003; 33: 204 - 14.
10. Bosco Sde M, Bagagli E, Araujo JP Jr, et al. Human pythiosis, Brazil. Emerg Infect Dis 2005; 11: 715 - 8.
11. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Pracharktam R, et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. Clin Infect Dis 2006; 43: 569 - 76.
12. Gaastra W, Lipman LJ, De Cock AW, et al. *Pythium insidiosum*: an overview. Vet Microbiol 2010; 146: 1 - 16.
13. Pannanusorn S, Chaiprasert A, Prariyachatigul C, et al. Random amplified polymorphic DNA typing and phylogeny of *Pythium insidiosum* clinical isolates in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2007; 38: 383 - 91.
14. Pupaibool J, Chindamporn A, Patrakul K, et al. Human pythiosis. Emerg Infect Dis 2006; 12: 517 - 8.
15. Franco DM, Aronson JF, Hawkins HK, et al. Systemic *Pythium insidiosum* in a pediatric burn patient. Burns 2010; 36: e68 - 71.
16. Imwidthaya P. Human pythiosis in Thailand. Postgrad Med J 1994; 70: 558 - 60.
17. Krajaejun T, Pracharktam R, Wongwaisayawan S, et al. Ocular pythiosis: is it under-diagnosed? Am J Ophthalmol 2004; 137: 370 - 2.
18. Kunavisarut S, Nimvorapan T, Methasiri S. *Pythium* corneal ulcer in Ramathibodi Hospital. J Med Assoc Thai 2003; 86: 338 - 42.
19. Kaufman L. Penicilliosis marneffei and pythiosis: emerging tropical diseases. Mycopathologia 1998; 143: 3 - 7.
20. Bosco Sde M, Reis G M, Theodoro R C, et al. Morphological and molecular characterization of an equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparison with the first human isolate from the same geographic region. Med Mycol 2008; 46: 557 - 65.

21. Mendoza L, Ajello L, McGinnis MR. Infection caused by the Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. J Mycol Med 1996; 6: 151 - 64.
22. Alfaro AA, Mendoza L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*. Equine Vet J 1990; 22: 295 - 7.
23. Triscott JA, Weedon D, Cabana E. Human subcutaneous pythiosis. J Cutan Pathol 1993; 20: 267 - 71.
24. De Cock A, Mendoza L, Padhye AA, et al. *Pythium insidiosum* sp. *nov*., the etiologic agent of pythiosis. J Clin Microbiol 1987; 25: 344 - 9.
25. Supabandhu J, Fisher MC, Mendoza L, et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. Med Mycol 2008; 46: 41 - 52.
26. Mendoza L, Hernandez F, Ajello L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. J Clin Microbiol 1993; 31: 2967 - 73.
27. Phillips AJ, Anderson VL, Robertson EJ, et al. New insights into animal pathogenic oomycetes. Trends Microbiol 2008; 16: 13 - 9.
28. Guarro J, GeneJ, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 454-500.
29. Latijnhouwers M, de Wit PJ, Govers F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. Trends Microbiol 2003; 11: 462 - 9.
30. Tyler BM. Genetics and genomics of the oomycete-host interface. Trends Genet 2001; 17: 611 - 4.
31. Rossman AY, Palm ME. Why are Phytophthora and other Oomycota not true Fungi? Outlooks on Pest Management 2006; 17: 217 - 9.
32. Chaiprasert A, Samerpitak K, Wanachiwanawin W, et al. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. Mycoses 1990; 33: 317 - 23.
33. Monkongtanakit O, Chaiprasert A, Thakerngpol K, et al. Determination of adhesive materials secreted from zoospores of *Pythium insidiosum* on different host tissues. The 2nd CMU graduate research conference, 2010 Nov 26, Chiang Mai University, Chiang Mai. Chiang Mai: Pattaraprinting Press; 2010; p.869 - 7.
34. Davis DJ, Lanter K, Makselan S, et al. Relationship between temperature optima and secreted protease activities of three Pythium species and pathogenicity toward plant and animal hosts. Mycol Res 2006; 110: 96 - 103.
35. Heath JA, Kiehn TE, Brown AE, et al. *Pythium insidiosum* pleuropericarditis complicating pneumonia in a child with leukemia. Clin Infect Dis 2002; 35: E60 - 4.
36. Wanachiwanawin W, Mendoza L, Visuthisakchai S, et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. Vaccine 2004 9; 22: 3613 - 21.
37. Krauss JS. Laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Ann Clin Lab Sci 2003; 33: 401 - 6.
38. Lemmens-Zygulska M, Eigel A, Helbig B, et al. Prevalence of alpha-thalassemias in northern Thailand. Hum Genet 1996; 98: 345 - 7.
39. Mendoza L, Newton JC. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. Med Mycol 2005; 43: 477 - 86.
40. Grooters AM. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003; 33: 695 - 720.
41. Mendoza L, Kaufman L, Standard PG. Immunodiffusion test for diagnosing and monitoring pythiosis in horses. J Clin Microbiol 1986; 23: 813 - 6.
42. Thitithanyanont A, Mendoza L, Chuansumrit A, et al. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. Clin Infect Dis 1998; 27: 1394 - 400.
43. Pracharktam R, Changtrakool P, Sathapatayavongs B, et al. Immunodiffusion test for diagnosis and monitoring of human pythiosis insidiosi. J Clin Microbiol 1991; 29: 2661 - 2.
44. Mendoza L, Nicholson V, Prescott JF. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. J Clin Microbiol 1992; 30: 2980 - 3.
45. Chindamporn A, Vilela R, Hoag KA, et al. Antibodies in the sera of host species with pythiosis recognize

a variety of unique immunogens in geographically divergent *Pythium insidiosum* strains. Clin Vaccine Immunol 2009; 16: 330 - 6.

46. Grooters AM, Leise BS, Lopez MK, et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. J Vet Intern Med 2002; 16: 142 - 6.
47. Krajaejun T, Kunakorn M, Niemhom S, et al. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9: 378 - 82.
48. Mendoza L, Kaufman L, Mandy W, et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immuno 1997; 4: 715 - 8.
49. Krajaejun T, Imkhieo S, Intaramat A, et al. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. Clin Vaccine Immunol 2009; 16: 506 - 9.
50. Jindayok T, Piromsontikorn S, Srimuang S, et al. Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. Clin Vaccine Immunol 2009; 16: 1047 - 51.
51. Grooters AM, Gee MK. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. J Vet Intern Med 2002; 16: 147 - 52.
52. Vanittanakom N, Supabandhu J, Khamwan C, et al. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. J Clin Microbiol 2004; 42: 3970 - 4.
53. Salipante SJ, Hoogestraat DR, SenGupta DJ, et al. Molecular diagnosis of subcutaneous *Pythium insidiosum* infection by use of PCR screening and DNA sequencing. J Clin Microbiol 2012; 50: 1480 - 3.
54. Schurko AM, Mendoza L, de Cock AW, et al. Development of a species-specific probe for *Pythium insidiosum* and the diagnosis of pythiosis. J Clin Microbiol 2004; 42: 2411 - 8.
55. Sekhon AS, Padhye AA, Garg AK. In vitro sensitivity of *Penicillium marneffei* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. Eur J Epidemiol 1992; 8: 427 - 32.
56. Mendoza L, Arias M, Colmenarez V, et al. Intestinal canine pythiosis in Venezuela confirmed by serological and sequencing analysis. Mycopathologia 2005; 159: 219 - 22.
57. Bissonnette KW, Sharp NJ, Dykstra MH, et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. J Med Vet Mycol 1991; 29: 39 - 44.
58. Shenep JL, English BK, Kaufman L, et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. Clin Infect Dis 1998; 27: 1388 - 93.
59. Doria RG, Freitas SH, Linardi RL, et al. Treatment of pythiosis in equine limbs using intravenous regional perfusion of amphotericin B. Vet Surg 2012; 41: 759 - 65.
60. Hendrix JW. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. Science 1964; 144: 1028 - 9.
61. Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, et al. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 767 - 9.
62. Cavalheiro AS, Zanette RA, Spader TB, et al. In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. Vet Microbiol 2009; 137: 408 - 11.
63. Argenta JS, Alves SH, Silveira F, et al. In vitro and in vivo susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. Vet Microbiol 2012; 157: 137 - 42.
64. Loreto ES, Mario DA, Denardi LB, et al. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 201; 55: 3588 - 90.
65. McMeekin D. Inhibition and stimulation of growth of *Pythium* by streptomycin. Mycologia 1978; 70: 880 - 3.

66. Mahl DL, de Jesus FP, Loreto E, et al. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 4021 - 3.
67. Mendoza L, Mandy W, Glass R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. Vaccine 2003; 21: 2797 - 804.
68. Miller R. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. Aust Vet J 1981; 57: 377 - 82.
69. Mendoza L, Alfaro AA. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. Mycopathologia 1986; 94: 123 - 9.
70. Hensel P, Greene CE, Medleau L, et al. Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog. J Am Vet Med Assoc 2003; 223: 215 - 8, 197.
71. Mendoza L, Villalobos J, Calleja CE, et al. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosi in horses. Mycopathologia 1992; 119: 89 - 95.