บทที่ 2

การสำรวจเอกสาร

ก. ลักษณะและคุณสมบัติทั่วไปของเชื้อ

เชื้อมัยโคแบคทีเรีย แม้จะย้อมไม่ติดสีแกรมก็จัดเป็นบัคเตรีแกรมบวก อยู่ใน Class Schizomycetes Order Actinomycetale Family Mycobacteriaceae รูปร่าง cocco-bacilli, bacilli หรือ filament มีขนาด 0.2-0.6 x 1.0-10 um. ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างแคปซูล ผนังเซลล์ประกอบด้วย lipids ถึง 60%[9] (รูป 1) มีคุณสมบัติในการติดสียาก และทนต่อการล้างด้วยกรด[10] ดังนั้นเมื่อย้อม acid-fast stain จึงให้ผลบวก แต่บัคเตรีอื่น ๆ ก็ให้ผลบวกได้ เช่น *Norcadia*[9] เป็นต้น รูปร่างลักษณะของโคโลนีมีลักษณะต่าง ๆ กันในแต่ละสปีชีส์ เช่น *M.tuberculosis* มีลักษณะคล้ายดอกกะหล่ำ หยาบและแห้ง มีสีคล้ายฟางข้าว ตรงข้ามกับกลุ่มของ *Mycobacterium avium* complex (MAC) ซึ่งโคโลนีเป็นมูกเรียบ

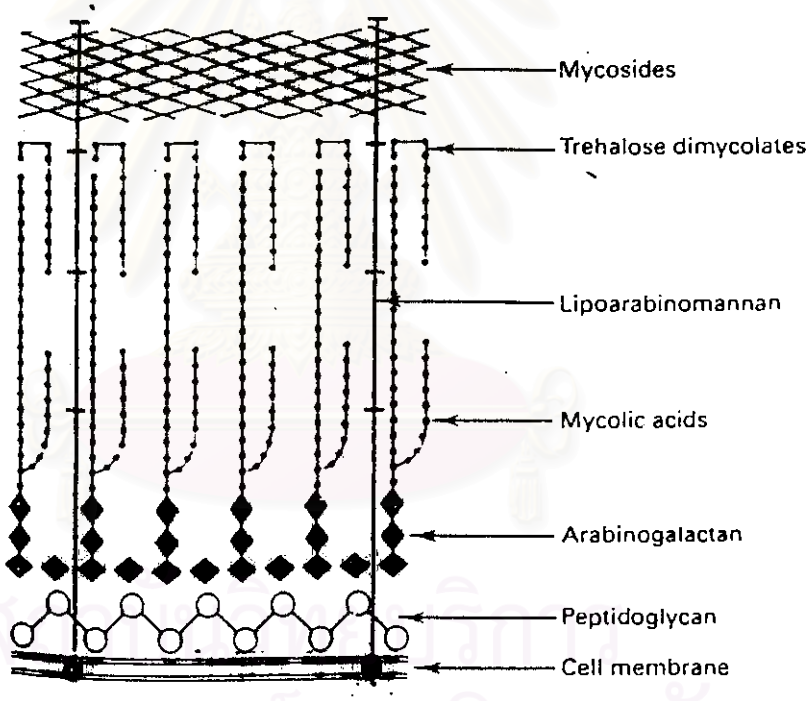
มัยโคแบคทีเรียมีอัตราการเจริญแตกต่างกันจึงแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เจริญรวดเร็ว (rapid grower) และกลุ่มที่เจริญช้า (slow grower) ซึ่งโคโลนีจะปรากฏให้เห็นเมื่อเพาะเลี้ยงนานกว่า 7 วัน อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับแต่ละสปีชีส์ เช่นกันคือ ตั้งแต่ 25° ซ ถึง 45° ซ อาหารที่ใช้เลี้ยงมีทั้งอาหารแข็งและเหลว อาหารแข็งมี 2 ประเภท คือ 1) agar based media ได้แก่ Middlebrook 7 H 10 และ 7 H 11 และ 2) egg- based media ได้แก่ Ogawa และ Lowenstein - Jensen ที่มีไข่เป็นส่วนประกอบ

สารพันธุกรรม (genome) เป็น single circular chromosome ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3×10^{10} - $5..5 \times 10^{10}$ และมี % G + C ค่อนข้างสูง คือประมาณ 66-71%[11] มีไรโบโซม (ribosome) ขนาด 70 S ประกอบด้วย 2 subunits[12] คือ

1. 50S subunit ประกอบด้วย 23S rRNA หนึ่งโมเลกุล 5S rRNA หนึ่งโมเลกุล และโปรตีน 34 ชนิด

2. 30S subunit ประกอบด้วย 16S rRNA หนึ่งโมเลกุล และโปรตีน 21 ชนิด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 ส่วนประกอบผนังเซลล์ของมัยโคแบคทีเรีย [9]

ข. การจำแนกชนิด

มัยโคแบคทีเรีย ซึ่งทำให้เกิดโรคในคนได้นั้นอาจจำแนกเป็นกลุ่มดังนี้ [13]

1) กลุ่ม T.B. complex เป็นกลุ่มมัยโคแบคทีเรียในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งมีอยู่ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *M.tuberculosis* , *M.bovis* , *M.africanum* และ *M. microti* กลุ่มนี้มีอัตราการเจริญช้า

2) กลุ่ม atypical mycobacteria บางครั้งเรียกว่า mycobacteria other than tubercle bacilli (MOTT) หรือ nontuberculous mycobacteria (NTM)

ในปี ค.ศ. 1954 Timpe และ Runyon [14] ได้แบ่ง atypical mycobacteria ด้วยคุณสมบัติของระยะเวลาการเจริญและการสร้างสี (pigmentation) ของเชื้อเมื่อได้รับหรือไม่ได้รับแสง การแบ่งโดยวิธีดังกล่าวจัดเชื้อออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

2.1 กลุ่ม photochromogen เชื้อกลุ่มนี้เจริญเติบโตช้าและไม่สร้างสีในที่มืดแต่จะสร้างสีเหลืองเมื่อได้รับแสง เชื้อในกลุ่มนี้ ได้แก่ *M.kansasii*, *M.marinum* และ *M.simiae*

2.2 กลุ่ม scotochromogen เชื้อกลุ่มนี้เจริญเติบโตช้าและสร้างสีเหลืองถึงส้ม แม้จะอยู่ในที่มืด เชื้อในกลุ่มนี้ ได้แก่ *M. scrofulaceum*, *M.szulgai*, *M.xenopi* และ *M.gordonae*

2.3 กลุ่ม nonphotochromogen เชื้อกลุ่มนี้เจริญเติบโตช้าและไม่สร้างสีไม่ว่าจะได้รับแสงหรือไม่ เชื้อกลุ่มนี้ ได้แก่ *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.haemophilum* และ *M.malmonse*

2.4 กลุ่ม rapid grower เชื้อกลุ่มนี้ไม่สร้างสีแต่เจริญภายใน 5-7 วัน เชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ *M.chelonae* และ *M.fortuitum*

3) Other ได้แก่ *M.leprae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรื้อนและไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้

ปัจจุบันจำนวนสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ยอมรับแล้วในปี 1980 มีทั้งหมด 41 สปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 1 [15] และที่ตั้งใหม่หลังจากปี 1980 อีกจำนวนหนึ่งดังแสดงในตารางที่ 2 [15]

ตารางที่ 1 **สปีชีส์ของมัยโคแบคทีเรียในรายชื่อที่ยอมรับแล้วในปี 1980**[15]

Slowly growing		
M.tuberculosis	*M.bovis*	*M.africanum*
M.microti	*M.kansasii*	*M.marinum*
M.simiae	*M.asiaticum*	*M.gordonae*
M.scrofulaceum	*M.szulgai*	*M.avium*
M.intracellulare	*M.lepraemurium*	*M.paratuberculosis*
M.malmoense	*M.haemophilum*	*M.farcinogenes*
M.triviale	*M.terrae*	*M.nonchromogenicum*
M.ulcerans	*M.gastri*	*M.xenopi*
Rapidly growing		
M.chelonae	*M.fortuitum*	*M.phlei*
M.smegmatis	*M.aurum*	*M.gadium*
M.neoaurum	*M.vaccae*	*M.chitae*
M.duvalii	*M.flavescens*	*M.gitvum*
M.komossense	*M.senegalense*	*M.parafortuitum*
M.thermoresistibile		
Non-cultivable		
M.leprae		

ตารางที่ 2 สปีชีส์ของมัยโคแบคทีเรียที่ตั้งใหม่หลังจากปี 1980[15]

Slowly growing		
M.shimoidei	*M.celatum*	
Rapidly growing		
M.diernhoferi	*M.agri*	*M.austroafricanum*
M.aichense	*M.chubuense*	*M.obuense*
M.rhodesiae	*M.tokaiense*	*M.shinshuense*
M.porcium	*M.fallax*	*M.pulveris*
M.sphagni		
Non-cultivable (or very fastidious growth)		
M.genavense	*M.confluentis*	*M.intermedium*
M.interjectum		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค. การพิสูจน์เชื้อ

การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย อาศัยลักษณะต่าง ๆ เช่น การย้อมสีทนกรด อัตราการเจริญ ลักษณะโคโลนีของเชื้อ การสร้างสีของโคโลนี อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ และปฏิกิริยาทางชีวเคมี ในปัจจุบันได้มีการนำ molecular technique มาใช้ในการทดสอบ เช่น gas liquid chromatographic analysis (GLC)[16] , polymerase chain reaction (PCR)[17] , nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [18] , hybridization[19], sequencing[17] และ restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis[23]

1. การย้อมสีทนกรด (Acid - fast staining)

การย้อมสีนี้เป็นขั้นตอนแรกของการพิสูจน์เชื้อ และยังเป็นการยืนยันว่าเชื้อที่เพาะได้มีการปนเปื้อนหรือไม่ เชื้อมัยโคแบคทีเรียทุกสปีชีส์จะติดสีเมื่อย้อมด้วยวิธีนี้ แต่ยังไม่สามารถบอกว่าเป็นสปีชีส์ใด กลไกของการติดสีเชื่อว่าเกิดจาก mycolic acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งของผนังเซลล์ ทำให้ติดสีผิดต่างจากบัคเตรีอื่น ๆ คือติดสียาก และเมื่อติดสีแล้วก็ล้างออกยากเช่นกัน (acid fastness)

2. ลักษณะการเจริญของเชื้อ (Growth characteristics)

2.1 อัตราการเจริญ และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญ (growth rate and optimal temperature) อัตราการเจริญของโคโลนีใน primary culture นั้น บางครั้งไม่อาจบอกอัตราการเจริญที่แท้จริงได้ เช่น *M.fortuitum* บางสายพันธุ์เจริญช้าใน primary culture[21] ดังนั้นการศึกษาอัตราการเจริญของมัยโคแบคทีเรียเพื่อประกอบการพิสูจน์ชนิดของมัยโคแบคทีเรีย จะต้องทำในเชื้อที่ subculture แล้ว Marks[22] ได้แนะนำให้ใช้อุณหภูมิต่าง ๆ 3 ระดับคือ 25° , 37° และ 45° ซ ในการเพาะเลี้ยงมัยโคแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 3

2.2 ลักษณะของโคโลนีเป็น presumptive test ในการแยกสปีชีส์ เพื่อประโยชน์ในการเลือกการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี [23] หรือ nucleic acid probes ต่อไป (ตารางที่ 4) ถ้าเห็นลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจะต้องนึกถึงเชื้อหลายชนิด(mixed organism)หรือมีการปนเปื้อน (contamination)

ตารางที่ 3 อุณหภูมิสำหรับการเจริญของมัยโคแบคทีเรีย[22]

กลุ่ม	อุณหภูมิสำหรับการเจริญ(°ซ)		
	ดีที่สุด	เจริญบ้าง	ไม่เจริญ
Psychophile	25	37	45
M.marinum			
M.gordonae			
M.chelonae			
M.ulcerans			
Mesophile	37	25	45
M.tuberculosis			
M.bovis			
M.kansasii			
M.flavescens			
M.fortuitum			
M.terrae complex			
M.intracellulare			
Thermophile	45	37	25
M.xenopi			
Wide range	37 และ 45	25	-
M.avium			
M.smegmatis			
M.phlei			

Organism	Growth rate (days)	Pigment production		Colonial morphology on Middlebrook 7H10 agar	Features of suspension in Middlebrook 7H9 broth
		Light	Dark		
MAC	10–21	Buff to yellow	Buff to yellow	Thin, transparent, glistening or matte, smooth, entire, rounded; some colonies rough and wrinkled	Uniformly homogeneous suspension
M. bovis	25–90	Colorless to buff	Colorless to buff	Small, thin, often nonpigmented, raised, rough, later wrinkled and dry; some colonies inhibited on this medium	Heterogeneous; finely granular suspension
M. chelonae	3–7	Buff	Buff	Rounded, smooth, matte, periphery entire or scalloped, no branching filaments; some colonies rough and wrinkled	Heterogeneous; coarsely granular suspension
M. fortuitum	3–7	Buff	Buff	Circular, convex, wrinkled or matte; obvious branching filaments on periphery	Heterogeneous; coarsely granular suspension
M. gastri	10–21	Colorless to buff	Colorless to buff	Round, smooth, convex, glistening; often resembles *M. avium-M. intracellulare* complex	Uniformly homogeneous suspension
M. genavense[a]	5–67	Colorless	Colorless	Tiny, transparent (dysgonic) or dense and creamy or flat and dry (eugonic); resembles MAC on prolonged incubation; requires mycobactin J for growth	Heterogeneous finely granular suspension
M. gordonae	10–25	Yellow to orange	Yellow to orange	Round, smooth, convex, yellow to orange, glistening	Uniformly homogeneous suspension
M. haemophilum	14–28	Buff to gray	Buff to gray	Grayish white, smooth to rough	Usually homogeneous suspension
M. kansasii	10–21	Yellow	Buff	Raised, smooth; some rough and wrinkled; carotene crystals numerous after exposure to light	Usually heterogeneous finely granular suspension; some isolates give uniformly homogeneous suspension
M. marinum	5–14	Yellow	Buff	Round, smooth; some may be wrinkled	Uniformly homogeneous suspension
M. scrofulaceum	10–14	Yellow	Yellow	Smooth, moist, yellow, round	Uniformly yellow and homogeneous
M. simiae	7–14	Yellow	Buff	Smooth, domed, slightly pigmented	Heterogeneous coarsely granular suspension
M. smegmatis	3–7	Buff to yellow	Buff to yellow	Raised, rough to wrinkled, scalloped edges	Heterogeneous finely granular suspension
M. szulgai	14–28	Yellow to orange	Buff at 25°C; yellow at 37°C	Smooth to rough; periphery somewhat irregular	Heterogeneous finely granular suspension
M. terrae	10–21	Buff	Buff	Round, smooth, glistening, sometimes colorless	Uniformly homogeneous suspension
M. tuberculosis	12–28	Buff	Buff	Flat, rough, spreading to irregular periphery	Uniformly heterogeneous coarsely granular suspension
M. xenopi	28–42	Yellow	Yellow	Small, domed, yellow, smooth or rough; at 45°C, resembles miniature bird's nest	Uniformly homogeneous suspension

ตารางที่ 4 ลักษณะการเจริญเชื้อมัยโคแบคทีเรีย[23]

2.3 การสร้างสีและปฏิกิริยาต่อแสง (pigmentation and photoreactivity)

การสร้างสีของโคโลนี (pigmentation) เกิดจากสาร carotenoid pigment ซึ่งส่วนใหญ่เป็น β-carotene ความเข้มข้นของสีแตกต่างกันตั้งแต่เหลืองอ่อน เหลืองแก่ไปจนถึงสีส้ม และแดง กลุ่ม scotochromogens สร้างสีของโคโลนี โดยไม่อาศัยแสงสว่าง โคโลนีจึงมีสีเกิดขึ้นในที่มืด อย่างไรก็ตามแสงสว่างยังกระตุ้นให้มีสีเข้มขึ้นอีกภายหลังถูกแสงกระตุ้น ส่วนกลุ่ม photochromogen นั้น ต้องอาศัยแสงสว่างในการกระตุ้นให้สร้างสีของโคโลนี จึงไม่มีสีเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในที่มืด แต่จะเกิดสีภายหลังถูกกับแสงสว่าง

3. การทดสอบทางชีวเคมีที่ทำเป็นประจำ (Conventional biochemical tests)

นอกจากจะอาศัยลักษณะของการเจริญ การเกิดสีและปฏิกิริยาต่อแสงแล้ว ต้องทดสอบด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี เพื่อแยกสปีชีส์ ต่อไป (ตารางที่ 5)[23] ปฏิกิริยาทางชีวเคมีหลักที่ใช้ในการจัดกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย เป็นกลุ่มใหญ่ๆได้ 5 กลุ่มแสดงไว้ในตารางที่ 6 [23]

การทดสอบที่ใช้วินิจฉัยเชื้อมัยโคแบคทีเรียทั่วๆไปในห้องปฏิบัติการขั้นแรก (presumptive identification) อาศัยคุณสมบัติของลักษณะการเจริญของเชื้อ ได้แก่อัตราการเจริญ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญ ลักษณะโคโลนี การสร้างสีและปฏิกิริยาต่อแสง การวินิจฉัยที่แน่นอน (definitive identification) อาศัยการทดสอบคุณสมบัติปฏิกิริยาทางชีวเคมี ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ เมตะบอลิซึ่ม(metabolism) และการทดสอบความไวต่อยาชนิดต่างๆ ซึ่งการทดสอบดังกล่าวต้องใช้เชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture) จะเห็นว่าปัญหาที่พบคือการอ่านผลต้องใช้เวลานานประมาณ 4-8 สัปดาห์ นอกจากนี้แต่ละเชื้อต้องทำการทดสอบด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมีจำนวนมากซึ่งการทดสอบมีความซับซ้อน(complexity) ให้ผลที่แตกต่างกัน(variability)แม้จะทดสอบสปีชีส์เดียวกัน และเมื่อทำการทดสอบซ้ำจะให้ผลที่ต่างจากเดิม (non-reproducible)[24] และที่สำคัญยังไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ที่พบใหม่ และต้องทดสอบกับเชื้อที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น

Descriptive term	Species	Growth rate[b]	Optimal temp (°C)	Usual colony morphology[c]	Pigmentation[d]	Niacin	Growth on T2H (10 μg/ml)	Nitrate reduction
TB complex	*M. tuberculosis*	S	37	R	N (100)	+ (95)	+	+ (97)
	M. africanum	S	37	R	N	−	V	−
	M. bovis	S	37	Rt	N (100)	− (4)	−	− (9)
Nonchromogens	MAC	S	37	St/R	N (87)	− (0)	+	− (4)
	M. xenopi	S	42	S	S (21)	− (0)	+	− (7)
	M. haemophilum	S[f]	30	R	N	−	+	−
	M. malmoense	S	37	S	N (88)	− (0)	+	− (1)
	M. shimoidei	S	37	R	N	−	+	−
	M. genavense	S	37	St	N	−	+	−
	M. celatum	S	37	S/St	N (100)	−	+	− (0)
	M. ulcerans	S	30	R	N	−	+	−
	M. terrae complex	S	37	SR	N (93)	− (1)	+	± (67)
	M. triviale	M	37	R	N (100)	− (0)	+	+ (89)
	M. gastri	S	37	S/SR/R	N (100)	− (0)	+	− (0)
	M. nonchromogenicum	S	37	SR	N	−	+	−
Photochromogens	*M. kansasii*	S	37	SR/S	P (96)	− (4)	+	+ (99)
	M. marinum	M	30	S/SR	P (100)	−/+ (21)	+	− (0)
	M. simiae	S	37	S	P (90)	± (63)	+	− (28)
	M. asiaticum	S	37	S	P (86)	− (0)	+	− (5)
Scotochromogens	*M. gordonae*	S	37	S	S (99)	− (0)	+	− (1)
	M. scrofulaceum	S	37	S	S (97)	− (0)	+	− (5)
	M. szulgai	S	37	S or R	S/P (93)	− (0)	+	+ (100)
	M. flavescens	M	37	S	S (100)[h]	− (0)	+	+ (92)
Rapid growers	*M. fortuitum* group	R	28	Sf/Rf	N (100)	−/+	+	+ (100)
	M. chelonae group	R	28	S/R	N (100)	−/+	+	− (1)
	M. smegmatis	R	28	R/S	N		+	+
	M. phlei	R	28	R	S		+	+
	M. vaccae	R	28	S	S		+	+

[a] Plus and minus signs indicate the presence and absence, respectively, of the feature; blank spaces indicated either that the information is not currently available or that the property is unimportant. V, Variable; ±, usually present; −/+, usually absent. Percentage of CDC-tested strains positive in each test is given in parentheses, and test result is based on these percentages.

[b] S, slow; M, moderate; R, rapid.

[c] R, rough; S, smooth; SR, intermediate in roughness; t, thin or transparent; f, filamentous extensions.

[d] P, photochromogenic; S, scotochromogenic; N, nonphotochromogenic. *M. szulgai* is scotochromogenic at 37°C and photochromogenic at 24°C.

[e] Urease test was performed by the method of Stead.

[f] Requires hemin as growth factor.

[g] Arylsulfatase reaction at 14 days is positive.

[h] Young cultures may be nonchromogenic or possess only pale pigment that may intensify with age.

[i] *M. chelonae* is negative; *M. abscessus* is positive.

ตารางที่ 5 ปฏิกิริยาชีวเคมีของมัยโคแบคทีเรีย[23]

Descriptive term	Semiquantitative catalase (mm of bubbles)	68°C catalase	Tween hydrolysis	Tellurite reduction	Tolerance to 5% NaCl	Iron uptake	Arylsulfatase, 3 days	MacConkey agar	Urease[c]	Pyrazinamidase, 4 days	Nucleic acid probes available
TB complex	<45 (89)	(1)	± (68)	/+ (36)	(0)	–	– (0)	–	± (64)	+	+
	<45					–		–	+	–	–
	<45 (69)	– (2)	– (21)		(0)	–	– (0)		± (50)	–	+
Nonchromogens	<45 (98)	± (60)	– (2)	+ (81)	(0)	–	– (1)	–/+	– (2)	+	+
	>45 (85)	± (31)	– (12)	+ (65)	(0)	–	± (36)		– (0)	V	–
	<45					–	–			+	–
	<45 (99)	± (66)	+ (99)	+ (74)	(0)	–	– (0)		– (9)	+	–
	<45		+		–	–	–	–	–	+	–
	>45	+	+			–			+	+	–
	<45 (100)	+ (100)	(0)	+ (100)	(0)	– (0)	+ (100)	– (0)	– (0)	+ (100)	–
	<45	+			–				V	–	–
	>45 (93)	+ (92)	+ (99)	–/+ (46)	– (2)	–	(2)	V	– (13)	V	–
	>45 (100)	+ (100)	+ (100)	– (25)	+ (100)	–	± (56)	–	–/+ (33)	V	–
	<45 (100)	– (11)	+ (100)	± (50)	– (0)	–	– (0)	–	–/+ (44)	–	–
	>45	+	+	–	–	–	–	V	–	V	–
Photochromogens	>45 (93)	+ (91)	+ (99)	–/+ (31)	– (0)	–	– (0)	–	–/+ (49)	–	+
	<45 (98)	– (30)	+ (97)	–/+ (39)	– (0)	–	–/+ (41)[e]	–	+ (83)	+	–
	>45 (93)	+ (95)	– (9)	+ (82)	– (0)	–	– (0)		± (69)	+	–
	>45 (95)	+ (95)	+ (95)	– (20)	– (0)	–	– (0)		– (10)	–	–
Scotochromogens											
	>45 (90)	+ (96)	+ (100)	– (29)	– (0)	–	V (0)	–	V (31)	–/+	+
	>45 (84)	+ (94)	– (2)	± (64)	– (0)	–	V (0)	–	V (31)	±	–
	>45 (98)	+ (93)	–/+ (49)	± (53)	– (0)	–	V (0)	–	+ (72)	+	–
	>45 (94)	+ (100)	+ (100)	–/+ (44)	± (62)	–	– (0)	–	+ (72)	+	–
Rapid growers											
	>45 (93)	+ (90)	–/+ (43)	+ (92)	+ (85)	+	+ (97)	+	+ (70)	+	–
	>45 (92)	± (53)	–/+ (39)	+ (89)	V	–	+ (95)	+	+ (89)	+	–
	>45	+	+	+	+	+	–	–			–
	>45	+	+	+	+	+	–	–			–
	>45	+	+	+	V	+	–	–			–

ตารางที่ 5 (ต่อ) ปฏิกิริยาชีวเคมีของมัยโคแบคทีเรีย[23]

Species group	Key biochemical tests
M. tuberculosis complex	Niacin, nitrate reduction, 68°C catalase
Nonphotochromogens	Nitrate and tellurite reduction, semiquantitative and 68°C catalase, Tween 80 hydrolysis
Scotochromogens	Nitrate reduction, Tween 80 hydrolysis, urease, 5% NaCl tolerance
Photochromogens	Nitrate reduction, Tween 80 hydrolysis, semiquantitative catalase, urease
Rapid growers	Arylsulfatase, nitrate reduction, iron uptake, growth on MacConkey agar

ตารางที่ 6 ปฏิกิริยาชีวเคมีหลักที่แยกมัยโคแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ[23]

4. เทคนิคทางโมเลกุล (Molecular techniques)

Molecular biology เป็นการศึกษาทางเคมีและฟิสิกส์ของ biological macromolecule เช่น lipopolysaccharide (LPS), fatty acid, protein และ nucleic acid[24] ปัจจุบันได้นำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ตรวจแยกสปีชีส์ของมัยโคแบคทีเรีย เช่นเทคนิค PCR, GLC, NASBA, RFLP, hybridization และ sequencing เป็นต้น เทคนิคดังกล่าวมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน กล่าวคือ การหาส่วนประกอบของไขมันที่ผนังเซลล์ด้วยวิธี chromatography นั้น มีความยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายสูง และยังใช้กันในบางแห่งเท่านั้น[25] วิธี hybridization ซึ่งมีชุดสำเร็จรูปของ Gen-Probe, Inc. , San Diego , Calif. เป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว นิยมใช้ทั่วๆไป อย่างไรก็ตามมีความสามารถจำแนกสปีชีส์ได้บางสปีชีส์เท่านั้นและยังพบปัญหาของความไวและความจำเพาะ[26] วิธี NASBA ค่าใช้จ่ายสูง และต้องใช้ probe อีกขั้นตอนหนึ่ง[18] วิธีRFLP ต้องใช้ gel ที่มีคุณภาพดี และใช้ปริมาณ DNA มาก[27]

ได้มีการนำวิธีการหาลำดับเบสของ ดี เอ็น เอ ที่ควบคุมการสร้าง 16S rRNA (16 S r DNA) มาใช้วินิจฉัยเชื้อมัยโคแบคทีเรีย 16S rDNA เป็นส่วนที่ลำดับเบสคงตัวและมีความจำเพาะสำหรับแต่ละสปีชีส์ [5,6,7] สามารถนำมาใช้ได้อย่างรวดเร็ว มีความถูกต้อง สามารถแยกสปีชีส์ที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี ทำให้ตรวจพบสปีชีส์ใหม่ๆ และสปีชีส์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้หรือเพาะเลี้ยงยาก ดังจะเห็นได้จากการศึกษาของ Rogall และคณะ[17] ใน ปี 1990 ซึ่งได้ศึกษาเชื้อมาตรฐานและ *M. tuberculosis* complex ที่แยกจากผู้ป่วย 17 ราย ผลการหาลำดับเบสของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้ง 17 รายเหมือนกับเชื้อมาตรฐาน ปี 1992 Bottger และคณะ [8] ทำการแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย HIV 18 ราย ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ แต่ผลการย้อมด้วย AFB ให้ผลบวกทั้ง 18 ราย เมื่อหาลำดับเบสพบว่าเป็น *M. genavense* ปี 1996 Springer และคณะ[28] ได้ศึกษาเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 37 ราย พบว่าการทดสอบด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมีให้ผลต่างกับการหาลำดับเบสมีจำนวนหนึ่ง และพบสปีชีส์ใหม่ที่มีความสัมพันธ์ (related) กับ *M.simiae* และ ในปี 1997 Tortoli และคณะ[29] ได้ศึกษาเชื้อจำนวน 14 ราย ที่ผลการทดสอบด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี ที่คล้ายกับ *M. avium* complex และ *M. simiae* ผลการหาลำดับเบสในตำแหน่ง 129 - 294 แตกต่างกัน แล้วจัดได้เป็น 6 genotypes แต่ตำแหน่ง 430 - 497 เหมือนกับ *M. simiae*

เทคนิค PCR และ sequencing ที่ใช้ทำการศึกษาครั้งนี้มีหลักการดังต่อไปนี้

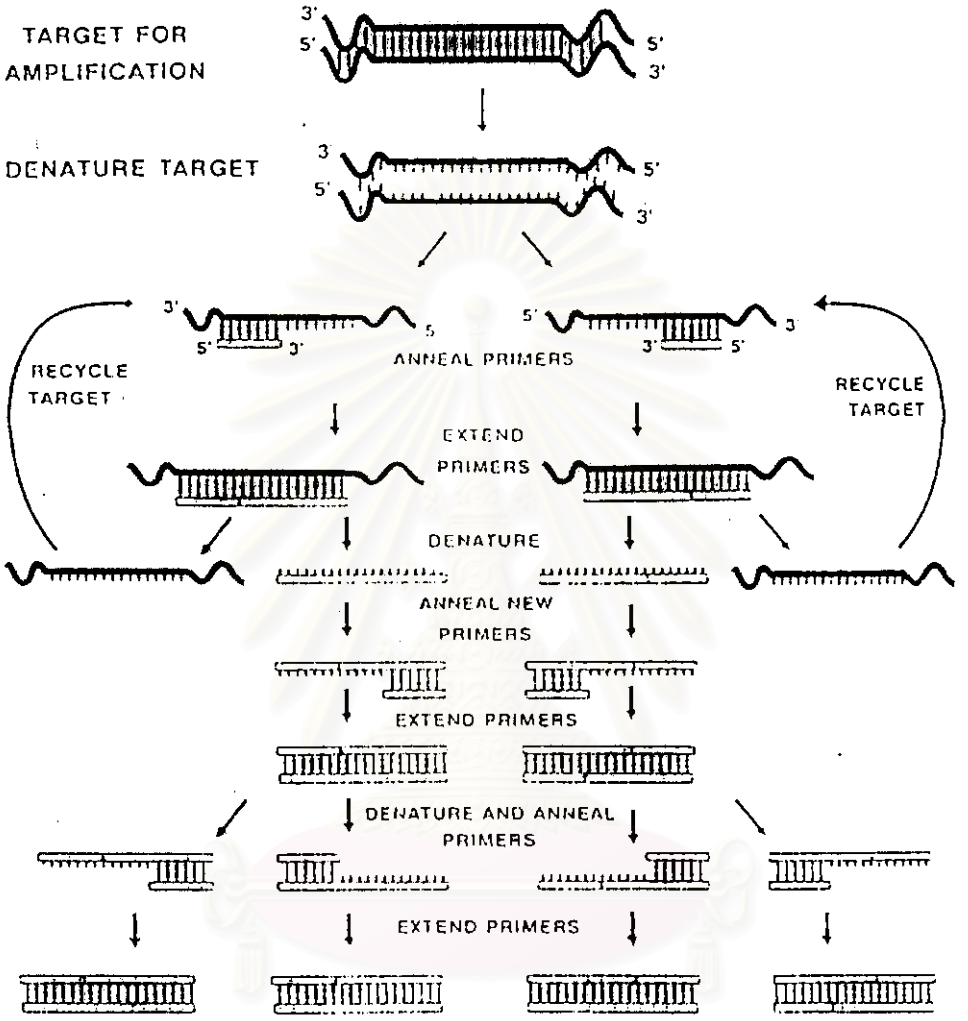
4.1 PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลอง โดยมี 3 ขั้นตอน (รูปที่ 2)[30] คือ

1) Denaturation เป็นขั้นตอนที่แยก double-stranded DNA โดยอาศัยความร้อนประมาณ 93°ซ.

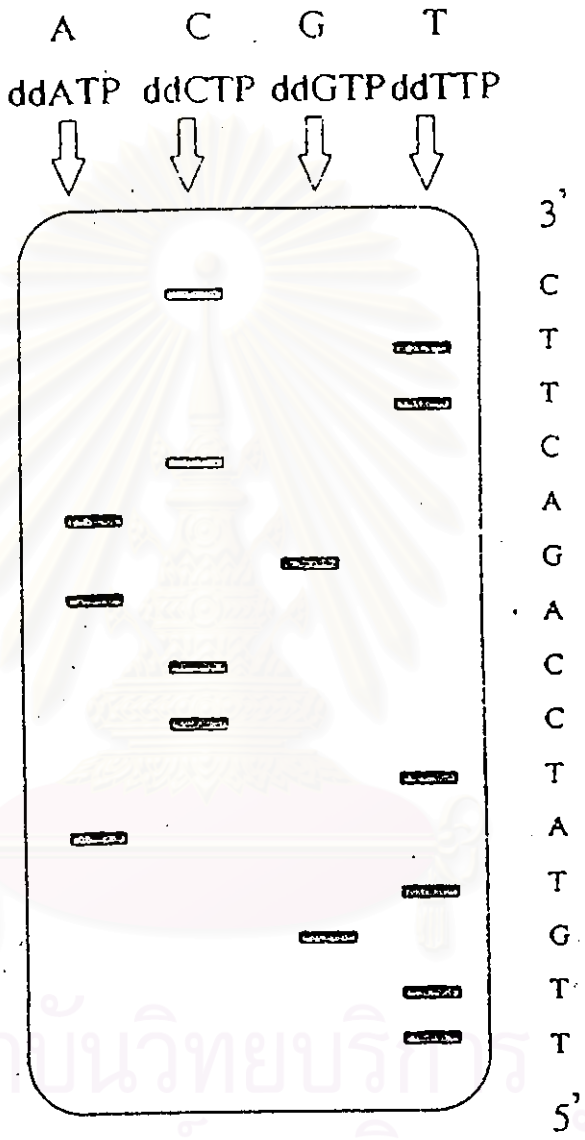
2) Annealing เป็นขั้นตอนให้ primer ไปจับกับ template อุณหภูมิ ที่ใช้ขึ้นกับคุณสมบัติของ primer แต่ละชนิด

3) Extention เป็นขั้นตอนการสร้างสาย DNA ใหม่ ที่ complementary กับ template อาศัยภาวะที่เหมาะสม, Taq polymerase,[31] d NTPs และ $MgCl_2$ ที่อุณหภูมิ ประมาณ 72°ซ

4.2 Sequencing เป็นเทคนิคการหาลำดับเบส มีอยู่ด้วยกัน 2 วิธี คือ chemical method (Maxam &Gillbert's)[32] และ dideoxy methods (Sanger's)[33] พบว่าในปัจจุบันเทคนิคของ Sanger เป็นที่นิยมเนื่องจากมีความปลอดภัย สะดวก และสามารถอ่านลำดับเบสได้มาก การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีของ Sanger ซึ่งมีหลักการคือ เมื่อ primer จับกับ template ที่ complementary กันแล้ว DNA polymerase จะนำนิวคลีโอไทด์มาต่อเพิ่มความยาวขึ้นจาก 5′ ไปยัง 3′ การเชื่อมต่อจะเป็นการเชื่อม 3′ hydroxy ของ polydeoxynucleotides กับ 5′ phosphate ของ deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) เมื่อการสังเคราะห์ใช้ dideoxynucleoside triphosphate (dd NTPs) ซึ่งตำแหน่ง 3′ ของน้ำตาล ribose ไม่มี hydroxy จะหยุดการสังเคราะห์ nucleotide การทดลองใช้จำนวน template จำนวนมาก จะได้ daughter strands หลาย ๆ เส้นที่เริ่มจากจุดเดียวกันตรงที่ primer จับแล้วสิ้นสุดแบบ random ทำให้ได้ daughter strands ที่มีสาย oligonucleotide ที่ยาวที่สุดเท่าชิ้น DNA ที่ต้องการหาลำดับ แล้วสิ้นสุดลงทีละ nucleotide จนสิ้นสุดเท่า primer นำมาแยกขนาดของความยาวด้วยการ run ใน polyacrylamide gel สายที่สั้นจะวิ่งได้ระยะทางไกลกว่า (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 ขั้นตอนของ Polymerase Chain Reaction[30]



รูปที่ 3 Autoradiogram ของ sequencing gel เพื่อหาลำดับเบสโดยวิธีของ Sanger

ง ระบาดวิทยาและการก่อให้เกิดโรค

วัณโรคสามารถติดต่อได้ทางระบบทางเดินหายใจ การป้องกันเป็นสิ่งที่กระทำยาก ประกอบกับโรคมีระยะเวลาการดำเนินของโรคเป็นอย่างช้าๆจึงมีผลต่อการค้นหาโรค การหาอัตราชุก หรืออุบัติการณ์ อาศัยการตรวจหาเชื้อจากเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination of sputum) และ การทดสอบปฏิกิริยาทูเบอร์คูลิน (tuberculin test)[13] อย่างไรก็ตามในระยะ 40 ปี ที่ผ่านมา ปัญหาวัณโรคได้ลดลงและดูเหมือนจะถูกกำจัดหมดสิ้นไป ในบรรดาประเทศอุตสาหกรรม แต่มิได้ลดลงในประเทศที่กำลังพัฒนา ตรงกันข้ามในทศวรรษที่ผ่านมานี้ วัณโรคกลับแพร่ระบาดมากขึ้นทั้งในสหรัฐอเมริกา และประเทศอุตสาหกรรมอื่น ๆ ตลอดจนประเทศที่กำลังพัฒนาทั่วโลก ประมาณว่าทั่วโลกในปี 1991 มีประชากรติดเชื้อวัณโรคถึง 1,700 ล้านคน มีผู้ป่วยใหม่อุบัติขึ้น 8 ล้านคน และผู้ป่วยตายถึง 2.9 ล้านคน ดังแสดงในตารางที่ 7[34] นอกจากนี้ยังพบว่า ในปี 1994 มีผู้ป่วยที่ตายจากวัณโรคเป็นอันดับที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 8[34]

Mycobacterium tuberculosis สามารถก่อให้เกิดโรคกับอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ วัณโรคปอด (pulmonary tuberculosis) และวัณโรคนอกปอด (extrapulmonary tuberculosis)[35] ซึ่งพบที่ต่อมน้ำเหลืองได้มากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 9[34] ปัจจุบันการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรีย เป็นปัญหาสำคัญโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ human immunodeficiency virus จะมีการติดเชื้อทั้ง tuberculous และ nontuberculous mycobacteria (NTM) พบว่าในปี 1989 Robert และคณะ[36] ทำการศึกษา ผู้ป่วย AIDS พบ disseminated non-tuberculous mycobacteria (DNTM) infection 5.5% ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Mycobacterium avium* complex 96.1%, *Mycobacterium kansasii* 2.9%, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium fortuitum* และ *Mycobacterium chelonae* อย่างละ 0.3% ในปี 1991 ผู้ป่วย AIDS ติดเชื้อ *M.tuberculosis* ถึง 25-43% และติดเชื้อ *M.avium* complex ถึง 17-24%[37] ในปี 1994 Armbroster[38] ได้รายงานว่าพบ *M.tuberculosis* ในผู้ป่วย AIDS มากกว่าในผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติถึง 500 เท่าโรคที่เกิดจากกลุ่ม NTM นี้ ที่พบได้บ่อยคือ pulmonary disease, lymphadenitis และ disseminated disease ตามลำดับ ในปี พ.ศ. 2541 เจริญและคณะ [39]ได้ทำการศึกษาหาความชุกของการติดเชื้อ NTM ในผู้ป่วยที่โรงพยาบาลโรคทรวงอก ระหว่าง 1 มิถุนายน 2534- 31 พฤษภาคม 2535 พบ *M .avium complex* 6 ราย, *M.kansasii* 2 ราย , *M. scrofulaceum* 2 ราย , *M. chelonae subs abcessus* 3 ราย, *M. gordonae* 1 ราย และ *M. flavescens* 1 ราย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ความเสียหายทั่วโลกที่เกิดจากวัณโรคใน ปี ค.ศ. 1991[34]

Region	Individuals infected (millions)	New cases	Deaths
Africa	171	1,400,000	660,000
South/Central America	117	560,000	220,000
Eastern Mediterranean	52	594,000	160,000
South-East Asia	426	2,480,000	940,000
Western Pacific	574	2,560,000	890,000
Industrialized	382	410,000	40,000
Totals	1,722	8,004,000	2,910,000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 การตายของประชากรที่อายุมากกว่า 5 ปี จากโรคติดเชื้อชนิดต่าง ๆ[34]

Disease	Deaths	External aid (US Dollars)
Tuberculosis	1,900,000	16,000,000
Diarrhea	400,000	55,000,000
Malaria	300,000	47,000,000
AIDS	200,000	185,000,000
Parasitic disease	200,000	74,000,000
Leprosy	2,000	77,000,000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 การแพร่กระจายตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย จากการติดเชื้อวัณโรคนอกปอด [34]

	years			
	European		ISC	
Site of lesion	1977 – 83	1984 – 91	1977-83	1984- 91
Lymph node	30.3	36.6	55.6	59.6
Bone and joint	19.5	19.7	24.7	19.2
Genito-urinary	37.6	27.2	6.4	8.4
Central nervous	6.7	4.4	4.3	3.7
Abdominal	5.1	7.8	6.8	8.3
Disseminated	0.8	4.2	0.7	0.6
Actual numbers	1470	861	1914	1794

Increase in incidence of disseminated tuberculosis in the 1984-91 period in the European group is due to infection with human immunodeficiency virus (HIV)

ISC: Indian subcontinent

ในกลุ่มของ NTM พบว่า สปีชีส์ ที่มีความสามารถก่อให้เกิดโรคในคนนั้นมีหลายสปีชีส์ดังแสดงในตารางที่ 10[40] และในกลุ่มของ saprophytic *Mycobacterium species* นาน ๆ ครั้งก็พบว่าก่อให้เกิดโรคได้ ดังแสดงในตารางที่ 11[40] นอกจากนี้ยังมีการแบ่งกลุ่มของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ตามลักษณะและความสำคัญทางคลินิค ออกได้เป็น 5 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 12[41] และกลุ่มเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogens) นั้นแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยคือ[41]

1. AIDS-related opportunistic ได้แก่ *M.avium - intracellulare*
2. pulmonary group ได้แก่ *M. kansasii* และ *M. xenopi*
3. rapid growers ได้แก่ *M.fortuitum* และ *M.chelonae*

M.tuberculosis ติดต่อจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่ง โดยระบบทางเดินหายใจ *M. bovis* ติดต่อโดยการกินนมที่มีเชื้อปนเปื้อน, *M.avium-intracellulare* ติดต่อโดยการหายใจ หรือการกิน *M.leprae* ติดต่อจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่ง โดยเชื่อว่าน่าจะเกิดจากการหายใจหรือการสัมผัส *M.fortuitum* และ *M.chelonae* เกิดจาก trauma หรือการให้ IV catheters[42]

ตารางที่ 10 nontuberculous mycobacteria ที่สามารถก่อโรคในคน[40]

M.avium-intracellulare
M.kansasii
M.fortuitum-chelonae complex
M.fulceum
M.xenopi
M.szulgai
M.malmoense
M.simiae
M.marinum
M.ulcerans
M.haemophilum

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 เชื้อกลุ่ม saprophytic mycobacteria ที่นาน ๆ ครั้งก่อโรคได้[40]

Growth rate species
Slow
M.gordonae
M.astaticum
M.terrae-triviae
M.gastri
M.nonchromogenicum
M.paratuberculosis (?)
Intermedmediate:
M. flavescens
Rapid
M.thermoresistibile
M.smegmatis
M.vaccae
M.parafortuitum complex
M.phlei

ตารางที่ 12 การจัดจำแนกมัยโคแบคทีเรียตามลักษณะอาการทางคลินิก[41]

Group	Example(species)
1. Obligate pathogens	*M.tuberculosis, M.bovis, M.leprae*
2. Skin pathogens	*M.marinum, M.ulcerans*
3. Opportunistic pathogens	*M.kansasii, M.avium-intracellulare, M.xenopi*
4. Non-or rarely pathogenic	*M.gordonae, M.smegmatis*
5. Animal pathogens	*M.paratuberculosis, M.lepraemurium*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จ. การรักษา

ในปัจจุบันการรักษาวัณโรคสามารถใช้เวลารักษาเพียง 6 - 8 เดือน จากเดิม 1-2 ปี ยิ่งกว่านี้ความเห็นของสมาคมต่างๆ เรื่องการใช้ยารักษาวัณโรคที่เหมาะสมที่สุดก็ค่อนข้างจะตรงกันทั่วโลก ทั้งจาก สมาคม American Thoracic Society ในปี ค.ศ.1986 British Thoracic Society ในปี ค.ศ.1990 WHO Tuberculosis unit ในปี ค.ศ.1991 และ International Union Against Tuberculosis and Lung Disease ในปี ค.ศ. 1988 การรักษาให้มีประสิทธิภาพดีทำให้โรคหายขาดได้ขึ้นอยู่กับการใช้ยาอย่างถูกต้อง และผู้ป่วยได้กินยา/รับยาบางขนานโดยครบถ้วน ยาที่ใช้รักษาวัณโรคที่มีประสิทธิภาพดี ได้แก่ isoniazid, rifampicin, streptomycin, pyrazinamide และ ethambutol และยาสำรองที่มีประสิทธิภาพปานกลาง หรือต่ำ และมีฤทธิ์ข้างเคียงสูง ได้แก่ thiacetazone, amikacin, kanamycin, ofloxacin, ciprofloxacin, paraaminosalicylic acid(PAS) และ cycloserine

การรักษาโรคติดเชื้อ non-tuberculous mycobacteria (NTM) ทำได้ยาก เนื่องจากเชื้อแต่ละสปีชีส์ จะไวต่อยาแตกต่างกัน การรักษามักต้องอาศัยผลการทดสอบความไวของเชื้อแต่ละตัว และในบางครั้งการตอบสนองต่อยาก็ไม่เป็นไปตามการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้การที่มีจำนวนผู้ป่วยไม่มากพอที่จะศึกษาถึงผลของการใช้ยาจึงไม่สามารถให้ข้อสรุปถึงการรักษาแบบมาตรฐานดังเช่นการรักษาวัณโรคได้

การติดเชื้อ *M.avium* complex(MAC) พบมากขึ้น เนื่องจากมีคนไข้โรคเอดส์มากขึ้น จึงทำให้ได้ข้อมูลของยาใหม่ ๆที่ต่างจากของ American Thoracic Society ในปี ค.ศ.1990 คือให้ใช้ยากลุ่มมาโครไลด์ ซึ่งได้แก่ clarithromycin แทน isoniazid นอกจากนี้ยังพบว่า rifabutin (ansamycin) มีฤทธิ์ต่อ MAC ดีกว่า rifampin ในหลอดทดลอง

การรักษาการติดเชื้อ *M.kansasii* น่าจะได้ผลดีเนื่องจากเชื้อนี้ยังไวต่อยาต้านวัณโรคหลายชนิด ยกเว้น pyrazinamide American Thoracic Society แนะนำให้ใช้ยา isoniazid , rifampin และ ethambutol

MAC และ *M. scrofulaceum* ที่แยกได้จากต่อมน้ำเหลือง การรักษาที่ดีที่สุดคือ การตัดรอยโรคออกและให้ clarithromycin หลังจากการผ่าตัด

กลุ่ม rapid grower เช่น *M.fortuitum*, *M.chelonae* จะดื้อต่อยาต้านวัณโรคค่อนข้างมาก แต่ไวต่อยาปฏิชีวนะที่รักษาแบคทีเรีย เช่น amikacin, imipenem, fluoroquinolone, sulfonamide, cefoxitin และ doxycyclin

การรักษาการติดเชื้อ *M. xenopi* จะใช้ยาประกอบด้วย isoniazid, rifampin และ ethambutol ดังแสดงในตารางที่ 13[23]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Mycobacterium	Established regimen	Additional or suggested agents
MAC (chronic pulmonary), *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. simiae*	RIF, ETH, INH, STM, or AMIK	CLAR (AZI), CIP, CLOF
MAC (disseminated)[b]	CLAR (AZI), ETH	CLOF, RIFB, RIF, CIP, AMIK
M. kansasii, *M. szulgai*	RIF, INH, ETH	STM, CIP, CLAR
M. xenopi	RIF, INH, ETH	STM
M. marinum	ETH, RIF, DOX, or TMP-SMX	STM, CIP
M. haemophilum		RIF, CFOX, DOX, TMP-SMX
M. fortuitum	AMIK, CIP, SULF	CLOF, CLAR, CFOX, DOX, IPM
M. abscessus	AMIK	CLOF, CLAR, CLOX
M. chelonae	TOB (AMIK)	CLOF, CLAR, DOX

Abbreviations: RIF, rifampin; ETH, ethambutol; INH, isoniazid; STM, streptomycin; AMIK, amikacin; CLAR, clarithromycin; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLOF, clofazimine; RIFB, rifabutin; DOX, doxycycline; TMP-SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole; CFOX, cefoxitin; SULF, sulfonamides; IPM, imipenem; TOB, tobramycin.

[b]Recommended by U.S. Public Health Service Task Force on Prophylaxis and Therapy of MAC

ตารางที่ 13 ยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ใช่วัณโรค[25]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย