

ความน่าไม่น่าเชื่อถือในการใช้การเกิด Cord พิสูจน์ชนิดเบื้องต้นของเชื้อ

Mycobacterium tuberculosis Complex

Unreliability of Cord Formation for Presumptive Identification of

Mycobacterium tuberculosis Complex

อนุกุล บุญคง วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3

จังหวัดนครสวรรค์

Anugoon Bunkhong B.Sc. (MT)

Office of Disease Prevention and Control 3

Nakhon Sawan Province

บทคัดย่อ

การเกิด cord ของเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* complex : MTBC เป็นคุณสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งของเชื้อที่ใช้ในการพิสูจน์ชนิดของเชื้อมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตามกลไกและปัจจัยการเกิด cord นั้น แม้ในปัจจุบันยังคงไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในอดีตนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าการเกิด cord มีความสัมพันธ์กับสาร glycolipid ที่พบบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อ MTBC เรียกว่า cord factor หรือ trehalose 6,6'-dimycolate : TDM ซึ่งเป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ MTBC สาร TDM สามารถพบได้ในเชื้อ mycobacteria เกือบทุกสปีชีส์ยกเว้น *M. leprae* แต่การเกิด cord กับเกิดได้น้อยในเชื้อ mycobacteria ชนิดอื่น หรือที่เรียกว่า Non-tuberculous mycobacteria : NTM ดังนั้นอาจมีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้เกิด cord ได้เช่นกัน เนื่องจากเชื้อ NTM บางสปีชีส์สามารถเกิด cord ได้ และเชื้อ MTBC บางสายพันธุ์ไม่สร้าง cord ทำให้เกิดผลบวกปลอมและลบปลอมขึ้น ดังนั้นการใช้ cord เพียงอย่างเดียวจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้แยกเชื้อ MTBC ออกจาก NTM คงต้องใช้ร่วมกับคุณลักษณะอื่นๆ ของเชื้อ เช่น ลักษณะโคโลนี และอัตราการเจริญเติบโตช่วยในการแยก วิธีเหล่านี้เป็นเพียงการพิสูจน์ชนิดเบื้องต้นเท่านั้น ยังจำเป็นต้องใช้วิธีที่มีความจำเพาะที่สูงกว่าเพื่อยืนยันการพิสูจน์ชนิดของเชื้อ MTBC ต่อไป

ABSTRACT

Cord formation is the important characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) that is used for identification of MTBC from the past until now. The mechanism and factors for cord formation are still unknown at the present time. In the past, scientists believed that cord formation was associated with glycolipid on cell wall of MTBC that is called cord factor or trehalose 6,6'-dimycolate (TDM), the important virulence factor of MTBC. Almost mycobacterial species, with the exception of *M. leprae*, have TDM but mycobacteria other than tuberculosis or Non-tuberculous mycobacteria (NTM) rarely form cord so there may be multiple factors that cause the cord as well. Because some species of NTM can form cord and some strains of MTBC cannot form cord, false positive

and false negative can be occurred. Therefore, the use of cord formation alone is not appropriate to distinguish MTBC from NTM. It must be used in conjunction with other macroscopic characteristics such as colony morphology and growth rate for separation. All of these are only presumptive identification. It is necessary to use a higher specific test to confirm the identification of MTBC.

คำสำคัญ

เชื้อวัณโรค

การเกิด cord

Keywords

Mycobacterium tuberculosis complex

Cord formation

บทนำ

เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) เป็นกลุ่มของเชื้อก่อวัณโรคซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยและอีกหลายประเทศทั่วโลก เชื้อในกลุ่มนี้ในปัจจุบันประกอบด้วยเชื้อจำนวน 8 สปีชีส์ ได้แก่ *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinipipedii*, *M. caprae*, และ *M. mungi*¹⁻⁶ เชื้อกลุ่มนี้มีความเหมือนกันในระดับนิวคลีโอไทด์ประมาณร้อยละ 99.9 และมีลำดับของ 16S rRNA ที่เหมือนกันทุกประการ⁷ เชื้อ *M. tuberculosis* complex ทุกสปีชีส์ก่อวัณโรคได้ แต่แตกต่างกันที่ความจำเพาะต่อโฮสต์ (host), การแสดงออกทางฟีโนไทป์ (phenotype) และความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity) โดยเชื้อที่พบเป็นสาเหตุวัณโรคในคนส่วนใหญ่ คือ เชื้อ *M. tuberculosis* ดังนั้นเมื่อกล่าวถึงเชื้อวัณโรคปกติจะหมายถึง *M. tuberculosis* เชื้อนี้มีแหล่งรังโรคอยู่เฉพาะในคนและยังไม่พบแหล่งรังโรคในสัตว์⁸ เชื้อสามารถก่อวัณโรคในสัตว์ได้ แต่ไม่สามารถแพร่จากสัตว์สู่สัตว์หรือสัตว์สู่คนได้ ปัจจัยที่สำคัญในการก่อโรค (virulence factor) ของเชื้อที่มีหลักฐานการศึกษาวินิจฉัยยืนยัน^{9,10,11} คือ สาร glycolipid ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ผนังเซลล์ที่เรียกว่า cord factor หรือ trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)

เหตุผลที่สาร TDM ถูกเรียกว่า cord factor เนื่องจากในอดีตเชื่อว่าสารนี้เป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อเกิดลักษณะของ cord (cord formation) คือ ทำให้เชื้อวัณโรคที่เจริญในอาหารมีลักษณะเกาะกันแน่นตามแนวยาว รวมเป็นสายคล้ายเส้นเชือก (rope-like) หรือคล้ายงู (serpentine) ตรวจพบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งในความเป็นจริงนั้น TDM พบในเชื้อ mycobacteria เกือบทุกสปีชีส์ยกเว้นเชื้อ *M. leprae* ซึ่งมีเฉพาะสาร trehalose 6,6'-monomycolate (TMM) เท่านั้น^{11,12} แต่กับพบว่า การสร้าง cord ในเชื้อ MTBC นั้นเกิดขึ้นมากกว่าเชื้อ mycobacteria สปีชีส์อื่นๆ หรือที่เรียกว่าเชื้อ Non-tuberculous mycobacteria (NTM) ซึ่งพบ cord ได้น้อยกว่า จึงเรียก cord ของเชื้อ NTM ว่า pseudocord หรือ cord เทียม ดังนั้นในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงได้นำลักษณะการเกิด cord จากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาใช้พิสูจน์ชนิดของเชื้อ MTBC เพื่อแยกออกจากเชื้อ NTM เพราะเป็นวิธีที่ถูก ทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตาม ด้วยเทคโนโลยีในปัจจุบันได้มีการศึกษาเชื้อ NTM ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเชื้อ NTM บางสปีชีส์ และบางสายพันธุ์สร้าง cord ได้จริง ไม่ใช่ pseudocord อย่างที่เคยเข้าใจในอดีต^{12,13} ซึ่งจากหลักฐานที่ค้นพบนี้ย่อมส่งผลอย่างยิ่งต่อความเชื่อที่ว่า การเกิด cord มีความจำเพาะกับเชื้อ

MTBC และมีผลต่อการใช้ cord พิสูจน์ชนิดของเชื้อ MTBC

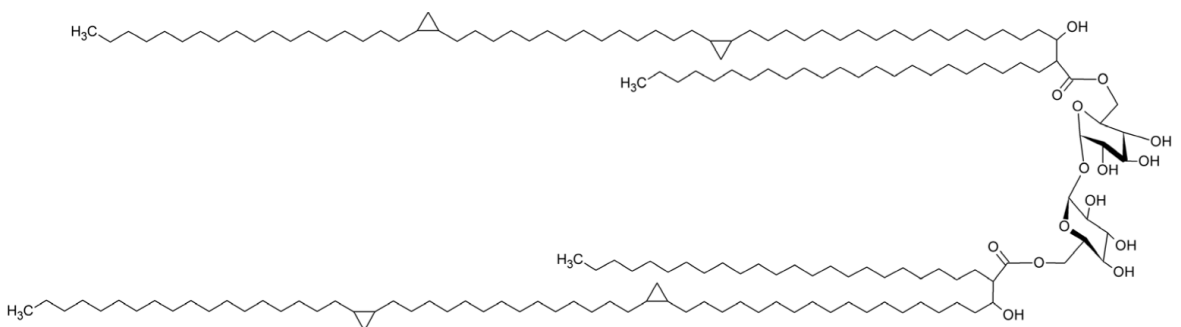
ประวัติการค้นพบ cord factor

Robert Koch แพทย์ชาวเยอรมันได้ประกาศการค้นพบเชื้อวัณโรคเมื่อปี พ.ศ. 2425 โดย Koch ได้อธิบายลักษณะของเชื้อวัณโรคที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อว่ามีลักษณะคล้ายเส้นเชือก¹⁴ และในปี พ.ศ. 2490 Middlebrook และคณะ⁹ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv เป็นสายพันธุ์ก่อโรครุนแรง (virulent strain) และสายพันธุ์ H37Ra ซึ่งไม่มีความรุนแรง (avirulent strain) พบว่าสายพันธุ์ H37Ra ไม่มีการสร้าง cord เลย โดยเซลล์ของเชื้อเพียงแค่จับกลุ่มกันและไม่มีรูปร่างที่ชัดเจน แต่สายพันธุ์ H37Rv สามารถสร้าง cord ได้ จึงเชื่อว่าการเกิด cord (cord formation) เป็นตัวบ่งบอกความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ หลังจากนั้นสามปีต่อมา Bloch ได้ให้ชื่อสาร glycolipid ที่เชื่อว่าจะทำให้เกิด cord ว่า cord factor และในปี พ.ศ. 2499 Noll ได้ศึกษาโครงสร้างของ cord factor พบว่าเป็น สาร trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) โดยพบมากในเชื้อกลุ่ม mycobacteria¹⁴

กระบวนการสังเคราะห์และโครงสร้างของ cord factor

TDM เป็น สาร glycolipid ที่ เป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ด้านนอกของเชื้อ mycobacteria องค์ประกอบของ TDM ได้แก่ น้ำตาล trehalose 1 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ mycolic acid 2 โมเลกุล สำหรับ mycolic acid นั้นประกอบด้วยสายคาร์บอน 2 สาย สายสั้นเรียกว่าสาย α อยู่ด้านที่มีหมู่ carboxylic มีความยาวประมาณ 20 - 26 คาร์บอน และสายยาวเรียกว่าสาย meromycolate มีความยาวประมาณ 50 - 60 คาร์บอน ความยาวโดยรวมของสาย mycolic acid แตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ ปกติจะมีความยาวอยู่ในช่วง 20 - 80 คาร์บอน¹⁵

การสังเคราะห์ TDM ของเชื้อ MTBC เป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนเกิดขึ้นทั้งภายในและผิวนอกเซลล์ ในขั้นตอนแรกจะมีกระบวนการทางชีวเคมีสังเคราะห์น้ำตาล trehalose และ mycolic acid ขึ้นภายในเซลล์เพื่อสร้าง TMM precursor แล้วส่งออกไปนอกเซลล์ เมื่อ TMM ถูกสร้างและส่งออกนอกเซลล์ จะถูกโปรตีนที่ชื่อว่า antigen 85 complex ซึ่งอยู่ที่ผิวด้านนอกของเซลล์จับรวมกับ TMM อีก 1 โมเลกุล กลายเป็น TDM (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ cord factor หรือ trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)¹⁴

คุณสมบัติการก่อโรคและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ cord factor

จากโครงสร้างของ TDM จะเห็นได้ว่ามีคุณสมบัติเป็นสาร amphiphilic คือโครงสร้างโมเลกุลแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ เรียกว่า hydrophilic ได้แก่ ส่วนที่เป็นน้ำตาล trehalose และอีกส่วนคือส่วนที่ชอบไขมัน เรียกว่า lipophilic หรือ hydrophobic ได้แก่ ส่วนของ mycolate

TDM มีโครงสร้าง 3 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 เป็น asymmetrical intercalated bilayer ที่ผนังเซลล์ โดยเกาะกับ lipoarabinomannan (LAM) ซึ่งเป็น virulence factor ที่สำคัญอีกตัวหนึ่งของ *M. tuberculosis* แบบที่ 2 คือ micelle เป็นโครงสร้างที่เกิดขึ้นเมื่ออยู่ในสารละลาย โดย TDM จะเรียงตัวในลักษณะทรงกระบอก (cylindrical micelle) จากการเรียงตัวเป็นทรงกระบอกนี้จึงเชื่อ

ว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด cord ของเชื้อ MTBC โดยรูปแบบ micelle นี้เป็นรูปแบบที่ไม่มีความเป็นพิษ และสำหรับโครงสร้างแบบที่ 3 คือ monolayer มี ความเป็นพิษสูง รูปแบบ monolayer จะเกิดบริเวณรอยต่อของสาร เช่น ระหว่างรอยต่อของน้ำมันกับน้ำ (oil-water), พลาสติกกับน้ำ (plastic-water) และอากาศกับน้ำ (air-water) เป็นต้น TDM monolayer ปริมาณ 10 µg สามารถฆ่าหนูทดลองได้

หากฉีด TDM ออกจากผิวเซลล์ ด้วยวิธี petroleum ether จะพบว่า ร้อยละ 99 ของเชื้อ MTBC ที่ไม่มี TDM จะถูกฆ่าโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว macrophage ของคนและหนูได้ภายใน 3 วัน และพบอีกว่าเซลล์ที่ติดเชื้อ MTBC ที่ไม่มี TDM จะสร้างสาร cytokine บางประเภทได้ลดลง เช่น IL-1β, IL-6, TNF-alpha และ IL-12 แต่กลับสร้างสาร IL-10 ได้มากขึ้น

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของ micellar form และ monolayer form ของ TDM¹¹

TDM Micelle

- เกิดขึ้นเมื่อมี TDM จำนวนมากที่ผิวเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ก่อโรครุนแรง
- ไม่เป็นพิษ LD₅₀ > 50,000 µg
- ป้องกันเชื้อ MTBC จากการถูกฆ่าโดยเซลล์ macrophage
- ป้องกันการเกิด phagosome/lysosome fusion
- กระตุ้นให้เกิดการอักเสบเล็กน้อยหรือไม่กระตุ้นเลย
- ขัดขวางกระบวนการ antigen presentation

TDM Monolayer

- เกิดขึ้นเองบนรอยต่อสารส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น ไขมันกับน้ำ (lipid-water) หรืออากาศกับน้ำ (air-water)
 - เป็นพิษ LD₅₀ < 50 µg
 - ฆ่าเซลล์ macrophage ได้ภายใน 5 นาที
 - กระตุ้นให้เกิด granuloma ในหนูที่ไม่เคยติดเชื้อ
 - กระตุ้นให้เกิด hypersensitivity granuloma ในหนูที่เคยติดเชื้อ
 - กระตุ้นให้เกิด caseating granuloma ในหนูที่เคยติดเชื้อ
 - เป็น immunogen ของ T cell
 - ส่งเสริมให้เกิดวัณโรคแบบเฉียบพลันและเรื้อรังในหนู
-

การใช้ cord พิสูจน์ชนิดของเชื้อ MTBC

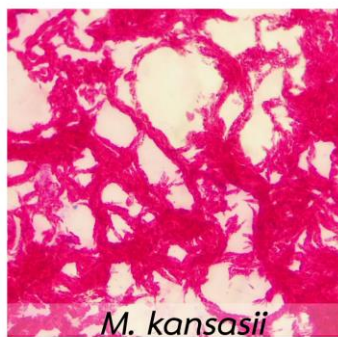
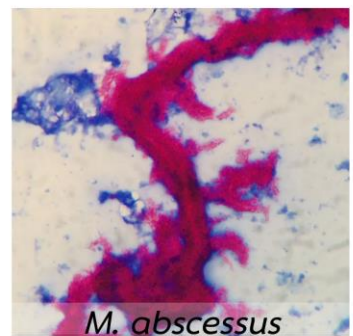
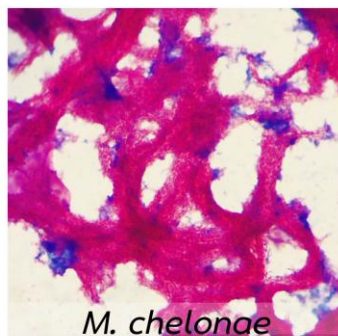
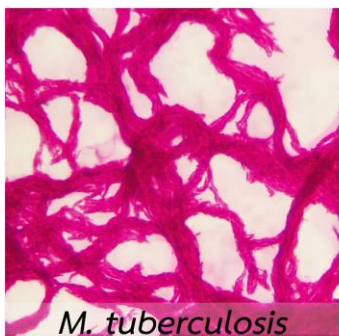
ตั้งแต่มีการค้นพบเชื้อวัณโรคและอธิบายถึงเชื้อที่เจริญในอาหารมีลักษณะเหมือนเส้นเชือก ได้มีหลายงานวิจัยที่ทำการศึกษาความน่าเชื่อถือของ cord เพื่อใช้แยกเชื้อ MTBC ออกจาก NTM¹⁶⁻²³ โดยมีความไว (sensitivity) อยู่ในช่วงร้อยละ 22.9 – 99.7 ค่าความจำเพาะ (specificity) อยู่ในช่วงร้อยละ 54.0 – 99.2 ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) อยู่ในช่วงร้อยละ 82.9 – 99.2 ค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) อยู่ในช่วงร้อยละ 42.4 – 96.9^{16-20,22,23} จะเห็นได้ว่าค่าที่มีช่วงต่างกันมากคือค่าความไว นั้นแสดงถึงความน่าเชื่อถือในการพิสูจน์ชนิดของเชื้อ MTBC เพราะถ้าค่าความไวต่ำย่อมเป็นตัวบ่งชี้ว่าเชื้อ MTBC ที่ไม่สร้าง cord มีจำนวนมาก เช่นเดียวกันหากค่าความจำเพาะต่ำ ย่อมบ่งบอกว่าเชื้อ NTM สามารถสร้าง cord ได้เช่นกัน สาเหตุของความแตกต่างของค่าความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวกและลบที่ต่างกันอาจเกิดขึ้นได้หลากหลายปัจจัย ตั้งแต่สายพันธุ์ของเชื้อ กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ สภาพที่เชื้อเจริญ การเตรียมเชื้อก่อนย้อมสีทึบกรด จำนวนวงกลิ้งที่ตรวจ และประสิทธิภาพของผู้ตรวจ²² นอกจากนี้ระยะเวลาที่นำเชื้อมาย้อมดู cord ก็มีผลต่อการตรวจพบ cord เชื้อที่บ่มไว้นานปริมาณเชื้อจะมีมากโอกาสเกิด cord ย่อมมีมากกว่า ดังเช่นการศึกษาของ Badak และคณะ¹⁸ ที่นำเอาเชื้อ MTBC ที่ไม่สร้าง cord เพราะมีปริมาณเชือน้อยจำนวน 15 ตัวอย่าง บ่มเพาะเชื้อใหม่เป็นเวลา 1 สัปดาห์พบว่าเชื้อสร้าง cord ถึง 10 ตัวอย่าง และในการศึกษานี้ยังพบอีกว่าไม่มีความแตกต่างของการเกิด cord ของเชื้อในตัวอย่างเดียวกันที่มีการ vortex ก่อนย้อมสีและเชื้อที่ไม่ได้ vortex ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Morris และคณะ¹⁶ นอกจากนี้การย้อมสีทึบกรดโดยวิธี Kinyoun และ

วิธี Fluorochrome สำหรับดูการเกิด cord นั้นก็ไม่พบว่ามีความแตกต่างกัน¹⁸

ประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อทึบกรด หรือ Acid-fast bacilli (AFB) มีความสำคัญมากกับการดู cord สำหรับผู้ไม่มีประสบการณ์จะพบว่าอาจเกิดผลบวกปลอม (false positive) สูง ซึ่งทำให้ค่าความจำเพาะต่ำ¹⁸ เนื่องจากขาดประสบการณ์ทำให้อ่าน pseudocord ของเชื้อ NTM เป็น cord ของเชื้อ MTBC ได้ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ NTM หลายสปีชีส์สามารถสร้างลักษณะที่เหมือน cord ได้ เช่น *M. goodii*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. avium* complex, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. chelonae*, *M. phlei*, *M. terrae*, *M. fallax* และ *M. abscessus*^{13,16,17,18,24,25} โดยเฉพาะเชื้อ NTM ในกลุ่ม rapid grower มักพบลักษณะของ cord ได้มาก ซึ่งสามารถแยกได้โดยใช้อัตราการเจริญ (growth rate)¹⁹ การใช้ cord ร่วมกับลักษณะโคโลนีถือเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยเพิ่มค่าความไวและความจำเพาะได้ ทำให้ผลถูกต้องมากยิ่งขึ้น^{20,21} แต่การดูโคโลนีต้องระวังถ้าอาหารแห้งเกินไปอาจทำให้โคโลนีของเชื้อ NTM ดูหยาบเหมือนเชื้อ MTBC และถ้าอาหารมีความชื้นมากเกินไปอาจทำให้โคโลนีของเชื้อ MTBC ดูเรียบเหมือนเชื้อ NTM ได้ นอกจากนี้เชื้อ NTM บางสปีชีส์พบว่ามีลักษณะโคโลนี และ cord เหมือนเชื้อ MTBC เช่น *M. fallax* ในปัจจุบันได้มีการค้นพบเชื้อ mycobacterium สปีชีส์ใหม่บางสปีชีส์เกิด cord ได้เช่นเดียวกับเชื้อ MTBC แต่ที่สำคัญกว่านั้นคือไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาอย่าง Hain GenoType CM ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้หลักการ line-probe assay และนิยมใช้กันในปัจจุบันกลับไม่สามารถแยกออกจากเชื้อ MTBC ได้ นำไปสู่สาเหตุของการรักษาที่ผิดพลาด^{26,27} เพราะฉะนั้นนอกจากประสบการณ์ในการตรวจแล้วยังคงต้องอาศัยความระมัดระวังอีกด้วย

ด้วยเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าขึ้นได้มีการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ตรวจสอบลักษณะ cord ที่เกิดขึ้นในเชื้อ NTM พบว่า cord ที่เกิดขึ้นนั้นเป็น cord จริง ไม่ใช่ pseudocord อย่างที่เข้าใจกันในอดีต และพบว่าสัมพันธ์กับลักษณะโคโลนีหายา โดยอาจเป็นไปได้ว่าความยาวของกรดไขมันใน TDM และปฏิกิริยาระหว่างองค์ประกอบของผนังเซลล์ในเชื้อ mycobacteria แต่ละสปีชีส์อาจมีส่วนทำให้เกิด cord แต่อย่างไรก็ตามกลไกและปัจจัยที่

แท้จริงการเกิด cord แม้ในปัจจุบันก็ยังคงไม่มีคำอธิบาย^{13,24} เช่นเดียวกับการไม่เกิด cord ในเชื้อ MTBC บางสายพันธุ์ ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุ แต่ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่เจริญได้ที่ 42 องศาเซลเซียส (thermophilic variant) ไม่พบการสร้าง cord²⁸ และถ้ามีการกลายพันธุ์แล้วทำให้ยีน *kasB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* หายไป (deletion mutation) จะทำให้เชื้อโคโลนีเล็ก ไม่สร้าง cord และไม่ติดสีทนกรด²⁹



ภาพที่ 2 แสดงการเกิด cord ของเชื้อ *M. tuberculosis* และเชื้อ NTM บางสปีชีส์

สรุป

การใช้ cord เพื่อพิสูจน์ชนิดของเชื้อ MTBC เบื้องต้นยังคงมีประโยชน์อย่างมากเพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย แต่ด้วยการเกิดปัญหาผลบวกปลอม (false positive) และผลลบปลอม (false negative) จึงไม่ควรใช้การดู cord เพียงอย่างเดียว แต่ควรใช้

ร่วมกับการดูรูปร่างของเชื้อ ลักษณะโคโลนี การเกิดสีของโคโลนี และอัตราการเจริญ (growth rate) ที่สำคัญคือวิธีเหล่านี้เป็นเพียงการพิสูจน์ชนิดเบื้องต้นไม่สามารถใช้รายงานสปีชีส์ของเชื้อ MTBC ได้ทันที แต่ใช้เพื่อช่วยเป็นแนวทางในการเลือกวิธีพิสูจน์ชนิดของเชื้อที่มีความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องที่สูงกว่าเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

1. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, Georgia: CDC; 1985.
2. Emmanuel FX, Seagar AL, Doig C, Rayner A, Claxton P, Laurenson I. Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. Emerg Infect Dis 2007; 13(12): 1924-7.
3. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53: 1305-14.
4. Kriz P, Kralik P, Slany M. *Mycobacterium pinnipedii* in a captive southern sea lion (*Otaria flavescens*): a case report. Vet Med 2011; 56(6): 307-13.
5. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS 2002; 99(6): 3684-9.
6. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, Helden PDV, Warren RM, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emerg Infect Dis 2010; 16(8): 1296-9.
7. Jordao L, Vieira OV. Tuberculosis: New aspects of an old disease. Int J Cell Biol 2011; 2011: 1-13.
8. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1376-95.
9. Middlebrook G, Dubos RJ, Pierce C. Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. J Exp Med 1947; 86(2): 175-84.
10. Darzins E, Fahr G. Cord-forming property, lethality and pathogenicity of mycobacteria. Chest 1956; 30(6): 642-8.
11. Hunter RL, Olsen MR, Jagannath C, Actor JK. Review: Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. Ann Clin Lab Sci 2006; 36(4): 371-86.
12. Julián E, Roldán M, Sánchez-Chardi A, Astola O, Agustí G, Luquin M. Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. J Bacteriol 2010; 192(7): 1751-60.
13. Sánchez-Chardi A, Olivares F, Byrd TF, Julián E, Brambilla C, Luquin M. Demonstration of cord formation by rough *Mycobacterium abscessus* variants: Implications for the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2011; 49(6): 2293-5.
14. Elamin AA, Stehr M, Singh M. The cord factor: Structure, biosynthesis and application in drug research - Achilles heel of *Mycobacterium tuberculosis*?. In: Cardona PJ, editor. Understanding tuberculosis - New approaches to fighting against drug resistance. InTech; 2012. p. 187-206.

Available from: <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-new-approaches-to-fighting-against-drug-resistance/the-cord-factor-structure-biosynthesis-and-application-in-drug-research> achilles-heel-of-mycobacteri

15. Rajni, Rao N, Meena LS. Biosynthesis and virulent behavior of lipids produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and cord factor: An overview. SAGE-Hindawi 2011.

Available from: <http://www.hindawi.com/journals/btri/2011/274693/>

16. Morris AJ, Reller LB. Reliability of cord formation in BACTEC media for presumptive identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 1993; 31(9): 2533-4.

17. McCarter YS, Ratkiewicz IN, Robinson A. Cord formation in BACTEC medium is a reliable, rapid method for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1998; 36(9): 2769-71.

18. Badak FZ, Goksel S, Sertoz R, Guzelant A, Kizirgil A, Bilgic A. Cord formation in MB/BacT medium is a reliable criterion for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in laboratories with high prevalence of *M. tuberculosis*. J Clin Microbiol 1999; 37(12): 4189-91.

19. Tu HZ, Chang SH, Huaug TS, Huaug WK, Liu YC, Lee SSJ. Microscopic morphology in smears prepared from MGIT broth medium for rapid presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium*

kansasii. Ann Clin Lab Sci 2003; 33(2): 179-83.

20. Monteiro PHT, Martins MC, Ueki SYM, Giampaglia CMS, Telles MAS. Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Braz J Microbiol 2003; 34: 171-4.

21. Simeão FCS, Chimara E, Oliveira RS, Yamauchi JU, Latrilha FO Telles MAS. Cord factor detection and macroscopic evaluation of mycobacterial colonies: an efficient combined screening test for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex on solid media. J Bras Pneumol 2009; 35(2): 1212-6.

22. Kadam M, Govekar A, Shenai S, Sadani M, Salvi A, Shetty A, et al. Can cord formation in BACTEC MGIT 960 medium be used as a presumptive method for identification of *M. tuberculosis* complex? Indian J Tuberc 2010; 57: 75-9.

23. Singhal R, Arora J, Bhalla M, Lal P, Reza S, Behera D, et al. Presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex based on cord formation in BACTEC MGIT medium. 2012; 30: 218-21.

24. Staropoli JF, Branda JA. Cord formation in a clinical isolate of *Mycobacterium marinum*. J Clinical Microbiol 2008; 46(8): 2814-6.

25. Lévy-Frébault V, Rafidinarivo É, Promé J, Grandry J, Boisvert H, David HL. *Mycobacterium fallax* sp. nov.. Int J Syst

Bacteriol 1983; 33(2): 336-43.

26. Tortoli E, Rogasi PG, Fantoni E, Beltrami C, Francisci AD, Maariottini A. Infection due to a novel mycobacterium, mimicking multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 1130-4.

27. Ingen JV, Al-Hajoj SAM, Boeree M, Al-Rabiah F, Enaim Mi, Zwaan RD, et al. *Mycobacterium riyadhense* sp. nov., a nontuberculous species identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex by a commercial line-probe assay. Int J Syst Evol Microbiol 2009; 59: 1049-53.

28. Tsukamura M. Loss of cord formation of thermophilic variants of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiol Immunol 1983; 27(8): 709-10.

29. Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, Gurcha SS, Kremer L, Chen B, et al. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. PNAS 2007; 104(12): 5157-62.