



การตรวจวินิจฉัยเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ทางห้องปฏิบัติการ Laboratory diagnosis for *Mycobacterium* species

อรุณณี สังกา

บทคัดย่อ

วัณโรคมีสาเหตุจากเชื้อในกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย (*Mycobacterium* species) โรคนี้มีมานานและยังเป็นปัญหาที่สำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขของโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเอดส์ (HIV) โดยเชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญในผู้ป่วยโรคเอดส์ (AIDS) การวินิจฉัยเชื้อที่ถูกต้อง และรวดเร็วมีความจำเป็นในการให้การรักษาแก่ผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ วิธีวินิจฉัยเชื้อแบบดั้งเดิม คือการย้อมด้วยสีทนกรด การเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อแยกสปีชีส์ ต้องใช้สารเคมีจำนวนมาก และใช้ระยะเวลานาน 4-8 สัปดาห์ในการทดสอบ จึงได้มีการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยอื่นๆ ขึ้นมามากมายเพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะ เช่น การเพาะเชื้อในอาหารชนิดเหลวโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ การหาองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ การตรวจหาแอนติเจน การตรวจหาแอนติบอดี และการทดสอบทางชีวพันธุศาสตร์ การใช้เทคโนโลยีก้าวหน้า ที่ศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอ (DNA) เช่น nucleic acid probe hybridization, nucleic acid amplification (polymerase chain reaction ; PCR), nucleotide sequencing และ PCR-restriction enzyme analysis (PCR-REA) วิธีต่างๆ เหล่านี้ ได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการวินิจฉัยเชื้อให้สูงขึ้น ซึ่งจะเป็นทางเลือกของห้องปฏิบัติการชั้นสูงที่จะนำไปใช้ เพื่อประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่จะได้รับการรักษาอย่างถูกต้อง และรวดเร็วต่อไป

คำรหัส: มัยโคแบคทีเรีย ● การตรวจวินิจฉัย

ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Abstract

Laboratory diagnosis for Mycobacterium species

Arunnee Sangka

Tuberculosis is one of the most important infectious diseases reported around the world particularly in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. The causative agents are bacteria in genus *Mycobacterium*. Conventional methods such as acid-fast bacilli (AFB) staining, culture on solid medium and biochemical tests, provide a definitive diagnosis of mycobacterial infection, but they are time-consuming. Thus, several methods with high sensitivity and specificity were developed. These included broth culture with automated detection system, analysis of cellular composition, antigen and antibody detection and skin test. In addition, modern molecular genetic methods such as nucleic acid probe hybridization, nucleic acid amplification, nucleotide sequence determination and PCR-restriction enzyme analysis, were also applied for diagnosis of mycobacterial infection. These methods are rapid and improve the reliability of identification of *Mycobacterium* species in clinical laboratory.

Key words: *Mycobacterium* species ● diagnosis

บทนำ

วัณโรค เป็นโรคที่มีมานานแล้ว ซึ่งพบได้ทั้งในคน และสัตว์ โดยมีบันทึกไว้ว่า พบโรคนี้ในเยอรมัน และอียิปต์ ตั้งแต่ 1,000-2,500 ปีก่อนคริสตกาล¹ ส่วนประวัติการเป็นโรคในประเทศไทยนั้น ยังไม่มีการบันทึกไว้ ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีวัคซีน BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) ที่ใช้ในการป้องกันโรคแล้วก็ตาม แต่ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคจะแตกต่างกันไปตามพื้นที่ที่ใช้ ซึ่งอยู่ระหว่าง ร้อยละ 0-85² ดังนั้นวัณโรคจึงยังคงเป็นปัญหาทางการแพทย์และสาธารณสุขที่สำคัญของโลก ในประเทศไทยวัณโรคเป็นโรคติดเชื้อที่ทำให้ประชากรไทยเสียชีวิตมากเป็นอันดับหนึ่ง ในกลุ่ม

โรคติดต่อทั้งหมด³ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง (AIDS; Acquired Immuno deficiency Syndrome) ซึ่งเชื่อในกลุ่มนี้ได้เข้ามาเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญ จากการประเมินสถานการณ์ของ WHO พบว่าในปี พ.ศ. 2543 จะมีผู้ติดเชื้อวัณโรค 2,000 ล้านคน โดยเป็นผู้ป่วยใหม่ 8 ล้านรายต่อปี และเสียชีวิตปีละ 3 ล้านคน หรือวันละ 8,000 ราย⁴ ในประเทศไทยจากการรวบรวมสถิติสาธารณสุข 30 ปี ระหว่าง ปี พ.ศ. 2511 ถึง ปี พ.ศ. 2540 พบว่า วัณโรคเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต หนึ่งในห้าอันดับแรกของคนไทย⁵ ดังนั้นการวินิจฉัยเชื้อวัณโรคจึงมีความสำคัญในการ ให้การรักษา และควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อต่อไป

Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University.

การจำแนกเชื้อ

วัณโรคเกิดจากเชื้อในจีนัสมัคโคแบคทีเรีย (*Mycobacterium*) ชื่อจีนัสนี้ถูกนำมาใช้ครั้งแรกโดย Lehmann และ Neumann ในหนังสือ Atlas of Bacteriology ในปี ค.ศ. 1896 โดยจำแนกเชื้อในจีนัสนี้เป็น 2 สปีชีส์ คือ *Mycobacterium tuberculosis* และ *Mycobacterium leprae*

ในปี ค.ศ. 1959 Runyon ได้ทำการศึกษาและแบ่งเชื้อตามคุณสมบัติการใช้เวลาในการเจริญเติบโต (speed of growth) และการสร้างสี (pigmentation) ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ Photochromogens เป็นกลุ่มที่สร้างสารสีเหลืองได้ในที่มีแสงสว่าง กลุ่มที่สองคือ Scotochromogens เป็นกลุ่มที่สร้างสารสีเหลืองได้ในที่มีดกลุ่มที่สามคือ Non-chromogens เป็นกลุ่มที่ไม่สร้างสีทั้งในที่มืดและที่สว่าง และกลุ่มสุดท้ายคือ Rapid growers เป็นกลุ่มที่เจริญเติบโตเร็ว มีนิคม (colony) ให้เห็นได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ภายใน 1 สัปดาห์ ในขณะที่สามกลุ่มแรกเจริญเติบโตช้าใช้เวลาเกินกว่า 2 สัปดาห์

ในปี ค.ศ. 1976 ได้มีการตั้งคณะกรรมการระหว่างประเทศ (Judicial Commission of ICSB; 1976) เพื่อทบทวน และรวบรวมชื่อสปีชีส์ของมัคโคแบคทีเรีย เพื่อให้การเรียกชื่อเป็นไปในแนวเดียวกัน ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 40 สปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 1⁶

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อ

มัคโคแบคทีเรียเป็น แอโรบิกแบคทีเรีย (aerobic bacteria) มีลักษณะเป็นท่อนโค้ง หรือท่อนตรง อาจแตกแขนง มีขนาด 0.2-0.6 x 1-10 ไมโครเมตร ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ (nonspore-forming) ผนังเซลล์ (cell wall) ประกอบด้วยชั้นไขมันหนา และกรด mycolic ซึ่งมีคาร์บอนประมาณ 60-90 อะตอม จึงทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เมื่อย้อมด้วยสีอะนิลีน

(aniline dye) แล้วจึงล้างออกได้ยาก ถึงแม้จะล้างด้วยส่วนผสมของกรด และแอลกอฮอล์

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจหาตัวเชื้อโดยตรง

1.1 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมสีที่ตัวเชื้อ อาศัยคุณสมบัติของผนังเซลล์ที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียกลุ่มอื่น โดยการย้อมสีแบบทนกรด (Acid-fast bacilli staining) เช่น วิธีของ Ziehl-Neelsen หรือ Kinyoun และการย้อม Fluorochrome โดยใช้สาร auramine-O และ rhodamine การตรวจหาเชื้อโดยวิธีการย้อมสีนี้มีข้อจำกัด คือต้องมีแบคทีเรียจำนวน 5,000-10,000 เซลล์ต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ของสิ่งส่งตรวจ (เสมหะ) จึงสามารถตรวจพบเชื้อได้ และมีรายงานการศึกษาถึงความไวของวิธีนี้ซึ่งจะอยู่ระหว่างร้อยละ 22-81⁷ ส่วนข้อจำกัดของความจำเพาะก็คือ มีเชื้อแบคทีเรียอื่นที่สามารถย้อมติดสีทนกรดได้เช่นกัน เช่น *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Legionella micdadei*, ซีสต์ของ *Cryptosporidia* spp และ *Cyclospora* spp เป็นต้น

1.2 การเพาะเชื้อ

เป็นการเพิ่มโอกาสในการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมี 2 แบบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว การเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ ให้ความจำเพาะ และความไวสูงกว่าวิธีการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ โดยจำนวนเชื้อเพียง 10-100 เซลล์ ในสิ่งส่งตรวจเท่านั้นก็สามารถเพาะพบเชื้อได้^{3,8} แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงใช้เวลานาน 4-8 สัปดาห์ในการเพาะเชื้อ

1.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด

ตารางที่ 1 เชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียที่ค้นพบและตั้งชื่อไว้แน่นอน

ตารางที่ 1 เชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียที่ค้นพบ และตั้งชื่อไว้แน่นอน

ชื่อ สปีชีส์	ผู้ค้นพบ	ปี ค.ศ.	type ^a	strain
<i>M. africanum</i>	Castets, Rist and Boisvert	1969	ATCC	25420
<i>M. asiaticum</i>	Weiszfeiler, Karassova and Karczag	1971	-	
<i>M. aurum</i>	Tsukamura	1966	ATCC	23366
<i>M. avium</i>	Chester	1901	ATCC	25291
<i>M. bovis</i>	Karlson and Lessei	1970	ATCC	10210
<i>M. chelonae</i>	Bergey et al.	1923	NCTC	947
<i>M. chitae</i>	Tsukamura	1966	ATCC	19627
<i>M. duvalii</i>	Stanford and Gunthorpe	1971	-	
<i>M. farcinogenes</i>	Chamoiseau	1979	-	
<i>M. flavescens</i>	Bojalil, Cerbon and Trujillo	1962	ATCC	14474
<i>M. fortuitum</i>	Da Costa Cruz	1938	ATCC	684
<i>M. goodii</i>	Casal and Calero	1974	ATCC	15754
<i>M. goodii</i>	Wayne	1966	-	
<i>M. goodii</i>	Stanford and Gunthorpe	1971	-	
<i>M. goodii</i>	Bojalil, Cerbon and Trujillo	1962	ATCC	14470
<i>M. haemophilum</i>	Sompolinsky et al.	1978	ATCC	13950
<i>M. intracellulare</i>	Cutino and McCabe, Runyon	1965	ATCC	13650
<i>M. kansasii</i>	Hauduroy	1955	ATCC	12478
<i>M. leprae</i>	Hansen, Lehman and Neumann	1986	-	
<i>M. leprae</i>	Mauchoux and Sorel	1912	-	
<i>M. malmoense</i>	Schroder and Juhlin	1977	-	
<i>M. marinum</i>	Aronson	1926	ATCC	927
<i>M. microti</i>	Reed	1957	-	
<i>M. nonchromogenicum</i>	Tsukamura	1965	ATCC	19530
<i>M. neoaurum</i>	Tsukamura	1972	-	
<i>M. parafortuitum</i>	Tsukamura, Toyama and Mizuno	1965	ATCC	19686
<i>M. paratuberculosis</i>	Bergey et al.	1923	-	
<i>M. phlei</i>	Lenmann and Neuman	1988	ATCC	11758
<i>M. scrofulaceum</i>	Prissick and Masson	1956	ATCC	19981
<i>M. senegalense</i>	Chamoiseau	1978	-	25275
<i>M. simiae</i>	Karassova, Weiszfeiler and Krasznay	1965	ATCC	14468
<i>M. smegmatis</i>	Trevisan, Lehmann and Neumann	1988	ATCC	
<i>M. szulgai</i>	Marks, Jenkins and Tsukamura	1972	-	15755
<i>M. terrae</i>	Wayne	1966	ATCC	10409
<i>M. thermoresistibile</i>	Tsukamura	1966	NCTC	23292
<i>M. triviale</i>	Kubica		ATCC	27294
<i>M. tuberculosis</i>	Lahmann and Neumann		ATCC	19423
<i>M. ulcerans</i>	Mac Callum et al.		ATCC	15483
<i>M. vaccae</i>	Bonnicke and Juhasz		ATCC	19250
<i>M. xenopi</i>	Schwabacher		ARCC	

^a ATCC, American Type Culture Collection; NCTC, National Collection of Type Culture; ARCC, Average Rate of Correct Classification

(จาก Kubica GP. Phage typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a time for standardization. AM Rev Respir Dis 1982;126:3-4.)

เลือก (selective media) ซึ่งมีส่วนประกอบของยาต้านจุลชีพต่อแบคทีเรียชนิดอื่น และเชื้อรา โดยอาหารที่นิยมใช้จะมีส่วนประกอบของไข่เป็นหลัก (egg-based media) ได้แก่ Lowenstein-Jensen (LJ), Mycobactosel-LJ และอาหารเลี้ยงเชื้ออีกชนิดหนึ่งคือ agar-based media ได้แก่ Middlebrook 7H10 หรือ 7H11, Mitchensen's, Mycobactosel-7H11 เป็นต้น

1.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเหมาะสำหรับสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ แต่ก็สามารถใช้ได้กับสิ่งส่งตรวจอื่นๆ เช่น น้ำคูดจากกระเพาะเนื้อเยื่อ อูจระ และสิ่งส่งตรวจจากบริเวณที่ปราศจากเชื้อของร่างกาย ในกรณีของเลือด และน้ำไขสันหลัง จะเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดเท่านั้น เช่น ESP Myco System (Difco) และ BACTEC 13 A (Becton-Dickinson) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวนี้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 Radiometric systems อาหารเลี้ยงเชื้อในกลุ่มนี้

อาศัยการตรวจวัดการเจริญของเชื้อ โดยใช้สารคาร์บอนกัมมันตรังสี (14C) ได้แก่ BACTEC 12B BACTEC 13A มีส่วนประกอบหลักคือ Middlebrook 7H12 broth และยาต้านจุลชีพ Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim และ Azocillin (PANTA) กลุ่มที่ 2 Nonradiometric systems เนื่องจากการใช้สารกัมมันตรังสีก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ และขบวนการกำจัดกากก็ยุ่งยาก จึงได้มีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสีขึ้นมา ได้แก่

a) BBL *Mycobacterium* growth indicator tube (MGIT) ประกอบด้วย modified 7H9 broth base และ oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) เป็นสารช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อ และ PANTA ช่วยในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มอื่น

b) BACTEC 9000 MB/Myco/F ประกอบด้วย modified 7H9 broth และ BACTEC

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวแบบ nonradiometric systems

คุณลักษณะ	MGIT (Becton-Dickinson)	BACTEC 9000MB (Becton-Dickinson)	ESP-AFB (Difco)	MB/Bac T (Organon-technika)
Format	หลอดทดลอง (manual)	ขวด (เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ)	ขวด (เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ)	ขวด (เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ)
Blood specimens	ไม่ได้	ไม่ได้	ได้	ได้
การตรวจวัด	การใช้ O ₂ , ตรวจวัดสารเรืองแสง	การใช้ O ₂ , ตรวจวัดสารเรืองแสง	การใช้ และการสร้างแก๊ส	การสร้าง CO ₂
ปริมาณของสิ่งส่งตรวจ	0.5 มล.	0.5-1.5 มล.	0.5-10 มล.	0.5 มล.

(ดัดแปลงจาก Isenberg HD.Ed.Essential Procedure of Clinical Microbiology.Washington,DC:ASM Press;1998:185.)

เจริญของแบคทีเรียกลุ่มอื่น

b) BACTEC 9000 MB/Myco/F ประกอบด้วย modified 7H9 broth และ BACTEC supplement F

c) ESP Myco systems (Difco) ประกอบด้วย Middlebrook 7H9, OADC supplement และ antimicrobial agent solution (MycoPVNA)

d) MB/Bac T system (organon Technika) ประกอบด้วย Middlebrook broth base, pancreatic digest of casein, Bovine serum albumin (BSA) และ catalase

คุณลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวแบบ nonradiometric systems และการเลือกใช้ที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 2

1.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

การแยกสปีชีส์ของ *Mycobacterium* ทำได้หลายวิธี วิธีดั้งเดิมที่ใช้อยู่คือ การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ซึ่งมีข้อเสียคือ ใช้เวลานาน 4-8 สัปดาห์ ใช้สารเคมี และวิธีการทดสอบอย่างน้อย 12 ชนิด⁹ ได้แก่ Niacin test, Susceptibility to thiophene-2-carboxylic acid hydrozide (TCH) 5 (g/ml, Nitrate reduction, Semiquantitative catalase (> 45mm), 68 oC Catalase, Tween 80 hydrolysis (5 days), Tellurite reduction, Tolerance to 5 % NaCl, Iron uptake, Arylsulfatase (3 days), Growth on MacConkey agar, Urease, Pyrazinamidase (4 days) test

1.4 การตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์

เป็นการตรวจหาเชื้อโดยอาศัยองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ ที่สามารถแยกเชื้อมัคโคแบคทีเรียออกจากเชื้อแบคทีเรียตัวอื่นได้ เช่น mycolic acid¹⁰⁻¹¹, tuberculostearic acid¹²⁻¹³ และ

mycobactin¹⁴ ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยใช้ gas liquid chromatography (GLC)-mass spectrometry, high performance liquid chromatography (HPLC) หรือ thin layer chromatography (TLC) ซึ่งวิธีต่างๆเหล่านี้จะให้ค่าความไวและความจำเพาะสูง แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จในการตรวจจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง¹⁵ เครื่องมือที่ใช้มีราคาสูง และต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญมากพอจึงจะทำการตรวจวัดได้

1.5 การตรวจหาแอนติเจน

มีการศึกษาเพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อโดยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) โดยใช้แอนติบอดี 2 ตัว (double-antibody sandwich) ตรวจหาเชื้อในเสมหะ น้ำไขสันหลัง น้ำจากช่องปอดและน้ำจากช่องท้อง¹⁶ ทั้งนี้ได้มีการพัฒนาแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจน ทั้งที่เป็น polyclonal และ monoclonal antibodies¹⁷⁻¹⁸ โดยได้ศึกษาถึงความไวและความจำเพาะต่อเชื้อแต่ละสปีชีส์ พบว่า ความไวและความจำเพาะต่อ *M. tuberculosis* complex สูงถึงร้อยละ 100 ความไวต่อ *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* (MAIS) complex ร้อยละ 70 และความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 100¹⁸ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการตรวจโดยดูปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (Agglutination test) โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ lipoarabinomannan (LAM) เคลือบบนเม็ดเลือดแดงแกะ¹⁹ หรือใช้ rabbit antibodies ต่อ LAM เกาะติดกับเชื้อ *Staphylococcus aureus*²⁰ ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ การเคลือบแอนติบอดีบนเม็ดลาเท็กซ์ (latex beads)^{20,21} ปัจจุบันมีชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจหา *M. tuberculosis*, MAIS complex และ *M. kansasii* โดยใช้ monoclonal antibodies เคลือบบน polystyrene particles ได้แก่ ชุดตรวจวัดของ Myco AKT (DynaGen Inc., Cambridge, MA USA) ซึ่งมีราคาถูก และง่ายต่อการตรวจวัด

โดยใช้เวลาประมาณ 1.5 ชั่วโมง

1.6 Nucleic acid probe hybridization

เป็นการตรวจหา RNA หรือ DNA ของเชื้อโดยอาศัยหลักการ การจับคู่กันระหว่างตัวนำจับ (probe) ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของ DNA หรือ RNA ของเชื้อ^{22,23} โดยมีการพัฒนา การติดฉลาก probe ด้วยสารฟลูออโรเจนี เช่น acridinium ester ซึ่งจะเข้าจับกับ rRNA (ribosomal RNA) ของเชื้อ *M. tuberculosis* complex, MAIS complex, *M. gordonae* และ *M. kansasii* (AccuProbe; Gen-Probe San Diego, CA) USA ซึ่งจะทำให้การตรวจวัดสารเรืองแสง (Chemiluminescence) โดยใช้เครื่อง luminometer²⁴⁻²⁶ การตรวจวัดด้วยวิธีดังกล่าวนี้จะให้ความรวดเร็วและความจำเพาะสูง แต่ความไวยังต่ำอยู่²⁷⁻²⁹ อย่างไรก็ตามหากนำวิธีดังกล่าวมาใช้รวมกันกับการเพิ่มจำนวน DNA โดยเทคนิค PCR จะสามารถเพิ่มความไวในการตรวจวัดได้^{28,30,31} แต่ยังคงมีข้อจำกัดอยู่ คือ probe ยังไม่สามารถครอบคลุมได้ทุกสปีชีส์ ปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจจับโดยตรวจจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงที่เรียกว่า Fluorescence in situ hybridization (FISH) assay โดยใช้การตรวจหาสารเรืองแสง ซึ่งสามารถแยกเชื้อกลุ่ม tuberculosis และ non-tuberculosis (NTM) ออกจากกันได้³²

1.7 Nucleic acid amplification

เป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวน DNA หรือ RNA เป้าหมายในหลอดทดลอง โดยใช้ DNA เริ่มต้นจำนวนน้อย อาศัยเอนไซม์ polymerase และ dNTP (deoxy-nucleotide triphosphate) ในการเพิ่มจำนวน DNA หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวนี้ได้พัฒนากันเป็นอย่างมากในปัจจุบัน โดยได้ทำการศึกษาในจีนที่หลากหลาย เช่น insertion sequence IS 6110 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *M. tuberculosis* complex³³, IS 900 จำเพาะต่อ *M. paratuberculosis*³⁴, 65 kDa antigen ที่จำเพาะต่อ

M. tuberculosis complex^{30,35,36}, MPB 70 ที่จำเพาะต่อ *M. bovis*³⁷ 38 kDa protein antigen b (Pab) ที่จำเพาะต่อ *M. tuberculosis* และ *M. bovis*³⁸ และ mtp40 ที่จำเพาะต่อ *M. tuberculosis* เท่านั้น³⁹ ถึงแม้ว่าวิธี PCR จะทำได้รวดเร็วมีความไวและความจำเพาะสูง แต่ปัญหาที่พบเสมอ คือ การปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ DNA (amplicons) โดยผ่านทางอากาศ แต่ก็ได้มีการศึกษาเพื่อลดปัญหาดังกล่าว โดยใช้ uracil DNA glycosylase (UDG) digestion^{40,41}, UV irradiation^{42,43}, isopsoralen⁴⁴, exonuclease III⁴⁵, γ -irradiation⁴⁶, restriction enzymes^{47,48}, DNase I⁴⁹, hydroxylamine hydrochloride⁵⁰ และ 8-methoxypsoralen (MOPS)⁵¹ เป็นต้น และการป้องกันทางกายภาพ (physical separation) ซึ่งเป็นวิธีการป้องกันเบื้องต้นที่สามารถทำได้ง่าย โดยแยกบริเวณหรือสถานที่ที่ใช้สำหรับเตรียมอุปกรณ์ สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนก่อน และหลังปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอ (pre and post PCR work) ออกจากกันเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ ดีเอ็นเอที่เป็นสาเหตุของการเกิดผลบวกปลอมได้

1.8 Nucleotide sequencing

เป็นวิธีการแยกสปีชีส์ของเชื้อมายโคแบคทีเรียอีกวิธีหนึ่ง โดยการหาลำดับเบสของเชื้อแต่ละสปีชีส์ โดยมีเงินเป้าหมายที่ทำการศึกษได้แก่ 16S rDNA ซึ่งเป็นจีนที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด^{52,53}, 16S rDNA-23S rDNA spacer⁵⁴⁻⁵⁶, 23S rDNA⁵⁵, 32 kDa protein gene⁵⁷ และ *dnaJ* gene⁵⁸ อย่างไรก็ตามการหาลำดับเบส เป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก และต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญในการตรวจวัด อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้มีราคาสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสแบบอัตโนมัติ

1.9 PCR-restriction enzyme analysis (PCR-REA)

เป็นการตรวจวินิจฉัยเชื้อโดยใช้เอนไซม์ตัด

จำเพาะของสายนิวคลีโอไทด์ โดยได้มีการพัฒนาขึ้นมาใช้ร่วมกับวิธี PCR เพื่อเพิ่มความสามารถในการแยกสปีชีส์ของแบคทีเรียต่างๆ ให้ได้มากขึ้น ในการวินิจฉัยเชื้อมัคโคแบคทีเรียนั้น ได้มีการศึกษามาเป็นลำดับ โดยในช่วงแรก มีการศึกษาใน chromosomal DNA แต่พบปัญหาในการแปลผลเนื่องจากจีนมีขนาดใหญ่เกินไป⁵⁹⁻⁶¹ จึงได้มีการศึกษาจีนเฉพาะส่วนที่เล็กลงมา ได้แก่ hsp 65 heat shock protein gene (*gro EL*) เมื่อเพิ่มจำนวน DNA ได้แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst* NI และ *Xho* I ซึ่งสามารถแยกเชื้อกลุ่มมัคโคแบคทีเรียได้หลายสปีชีส์ ยกเว้นในกลุ่มของ *M. tuberculosis* complex⁶² หลังจากนั้นก็มีผู้ศึกษาโดยใช้เอนไซม์ *Bst* EII และ *Hae* III แต่ก็ยังได้ผลเหมือนเดิม⁶³ ต่อมาผู้ศึกษาโดยใช้จีนตัวอื่น เช่น 16S rDNA โดยใช้เอนไซม์ *Cfo* I, *Mbo* I และ *Rsa* I และ *dnal* gene ซึ่งจากการศึกษาจีนทั้ง 2 กลุ่มนี้ กลับให้ผลการแยกสปีชีส์ของเชื้อได้น้อยลง⁶⁴ ต่อมาผู้สนใจศึกษาจีนในส่วนของ 16S rDNA-23S rDNA spacer โดยใช้เอนไซม์ *Bst* XI, *Msp* I และ *Hae* III ซึ่งสามารถแยกสปีชีส์ของเชื้อได้ครอบคลุมหลายสปีชีส์มากขึ้น ยกเว้น กลุ่มของ *M. tuberculosis* complex ซึ่งยังไม่สามารถแยกสปีชีส์ได้ และต่อมาจึงทราบว่าลำดับเบสของ DNA ในเชื้อกลุ่มนี้มีความเหมือนกันถึง ร้อยละ 100 ทำให้ไม่สามารถแยกสปีชีส์ของเชื้อในกลุ่มนี้ได้ด้วยวิธี PCR-REA^{31,65}

2. การตรวจโดยทางอ้อม

2.1 การตรวจหาแอนติบอดี

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ โดยวิธี ELISA เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับ และพัฒนามากที่สุด การเตรียมแอนติเจนบริสุทธิ์มีหลายวิธี เช่น ion-exchange chromatography, gel filtration, isoelectric focusing electrophoresis และ affinity chromatography⁶⁶ หรือการเตรียมแอนติเจน

จากโคลน (clone) ของ *E. coli*⁶⁷ โดยแอนติเจนที่นิยมใช้ในการศึกษา คือ 38 kDa แอนติเจนจากเชื้อ *M. tuberculosis*^{68,69} อย่างไรก็ตามยังมีแอนติเจนตัวอื่นๆ ที่มีผู้ทำการศึกษา เช่น 10 kDa และ 24 kDa protein จาก *M. tuberculosis*⁷⁰ นอกจากนี้ยังได้มีการใช้สายเปปไทด์ (peptides) ที่สังเคราะห์ จากกรดอะมิโน มาทดลองใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีเช่นกัน ซึ่งสายเปปไทด์แต่ละสายจะมีความจำเพาะต่อเชื้อที่แตกต่างกันไป^{71,72}

2.2 การทดสอบทางผิวหนัง (skin tests)

การทดสอบทางผิวหนัง โดยอาศัยปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายชนิด delayed type hypersensitivity (DTH) หลังจากได้รับ tuberculin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จาก tubercle bacilli ที่เรียกว่า Purified Protein Derivative (PPD) เรียกวิธีทดสอบนี้ว่า Mantoux skin test, tuberculin test หรือ PPD skin test แต่การทดสอบนี้ไม่สามารถแยกผู้ติดเชื้อเฉียบพลัน กับผู้ที่ได้รับเชื้อมาก่อน หรือผู้ที่ได้รับวัคซีนออกจากกันได้ นอกจากนี้ก็มีผู้ทำการศึกษาโดยใช้สารกระตุ้นตัวอื่น เช่น 38 kDa protein, สายเปปไทด์ 38 G (T-cell-stimulatory epitope)⁷³, 10 kDa protein⁷⁴, 18 kDa protein⁷⁵ และ 24 kDa protein⁷⁶ ซึ่งพบว่าให้ผลที่จำเพาะมากกว่า PPD

โดยสรุปแล้วการวินิจฉัยเชื้อมัคโคแบคทีเรียมีอยู่หลายวิธีตั้งแต่วิธีการเพาะเชื้อ และแยกสปีชีส์ โดยใช้การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิม และเป็นมาตรฐาน (gold standard) หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาวิธีอื่นๆ มากมาย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัย ทั้งในด้านความไว และความจำเพาะให้สูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิคทางด้านอนุพัณธุศาสตร์ ที่ได้รับความนิยม และมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการเลือกใช้วิธีเพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อมัคโคแบคทีเรียนั้นก็ขึ้นอยู่กับความพร้อมของห้องปฏิบัติการชั้นสูงในแต่ละแห่ง ทั้ง

ในด้านวัสดุ อุปกรณ์ และบุคลากรที่เกี่ยวข้อง ในการเพิ่มประสิทธิภาพของห้องปฏิบัติการ เพื่อประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่จะได้รับจากการรักษาที่ถูกต้องและทันทั่วทั้ง

เอกสารอ้างอิง

1. David S. Tuberculosis and non tuberculous mycobacterial infection. 4th ed. United state of America: Saunders Company;1999:3.
2. McMurray DN. Mycobacteria and nocardia. last accessed by the author in September 2001. <http://gsbs.utmb.edu/microbook/cho33.htm>.
3. อังคณา ฉายประเสริฐ. วัณโรค. ในอังคณา ฉายประเสริฐ, สิริฤกษ์ ทรงศิริไธ, เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ, โกวิท คัมภีรภาพ. บรรณาธิการ. PCR ในโรคติดต่อ. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์;2537:50.
4. บัญญัติ ปริษณานนท์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ. วัณโรค. พิมพ์ครั้งที่ 4 (ฉบับปรับปรุง). กรุงเทพมหานคร: สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์; 2542: 31-53.
5. บุญส่ง พันสนุนทร. วัณโรคในบุคลากรทางการแพทย์. ใน บุญส่ง พันสนุนทร, วิภา ธีชัยพิชิตกุล. บรรณาธิการ. วัณโรคในบุคลากรทางการแพทย์. ขอนแก่น: กลุ่มวิจัยวัณโรค คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น;2543:3.
6. Kubica GP. Phage typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a time for standardization. AM Rev Respir Dis 1982;126:3-4.
7. Salfinger M, Pfyffer HE. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:961-79.
8. Woods GL, Witebsky FG. Current status of mycobacterial testing in clinical laboratories. Arch Pathol Lab Med 1993;117: 876-84.
9. Latta PD, Weitzman I. Identification Procedures from culture: Mycobacteriology. In: Isenberg HD, ed. Essential procedures for clinical microbiology. Washington, DC: ASM Press;1998:187-97.
10. Butter WR, Kilburn JO. Identification of major slow-growing pathogenic mycobacteria and *Mycobacterium gordonae* by high-performance liquid chromatography of their mycolic acids. J Clin Microbiol 1988;26:50-3.
11. Glickman SE, Kilburn JO, Butler WR, Ramos LS. Rapid identification of mycolic acid patterns of mycobacteria by high-performance liquid chromatography using pattern recognition software and a *Mycobacterium* library. J Clin Microbiol 1994;32:740-5.
12. Larsson L, Odham G, Westerdahl G, Olsson B. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by selected-ion monitoring: improved analysis of tuberculostearate in sputum using negative-ion mass spectrometry. J Clin Microbiol 1987;25:893-6.
13. French GL, Chan CY, Cheung SW, Oo KT. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of tuberculostearic acid in sputum by using gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. J Infect Dis 1987;156:356-62.
14. Robert MC, McMillan C, Coyle MB. Whole chromosomal DNA probes for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. J Clin Microbiol 1987;25:1239-43.

15. Larsson L, Odham G. Diagnosis of mycobacterial infections using gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. In: *Mycobacteria of clinical interest*. Amsterdam CM, ed. Elsevier Science Publishers BV; 1986:42-50.
16. Rattan A, Gupta SK, Singh S. Detection of antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in patients of infertility by monoclonal antibody based sandwiched enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tuberc Lung Dis* 1993;74:200-3.
17. Verstijnen CPHJ, Ly HM, Polman K. Enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies for identification of mycobacteria from early cultures. *J Clin Microbiol* 1991;29:1372-5.
18. Cho SN, Shin JS, Daffe M, Chong Y, Kim SK, Kim SK, Kim JD. Production of monoclonal antibody to a phenolic glycolipids of *Mycobacterium tuberculosis* and its use in detection of the antigen in clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1992;30:3065-9.
19. Sada E, Aguitar D, Torres M, Herrera T. Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1992;30:2415-8.
20. Cambiaso CL, Van Vooren JP, Farber CM. Immunological detection of mycobacterial antigens in infected fluids, cells and tissues by latex agglutination: annual model and clinical application. *J Immunol Meth* 1990;129:9-14.
21. Krambovitis E, McIlmurray MB, Lock PE, Hendrickse W, Holzel H. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by latex particle agglutination. *Lancet* 1984;2:1229-31.
22. Hampson SJ, Portaels F, Thompson J, et al. DNA probes demonstrate a single highly conserved strain of *Mycobacterium avium* infecting AIDS patients. *Lancet* 1989; 1: 65-8.
23. McFadden J, Kunze Z, Seechurn P. DNA probes for detection and identification. In: McFadden J, ed. *Molecular biology of the mycobacteria*. London: Surrey University Press 1990;139-73.
24. Goto M, Oka S, Okuzumi K, Kimura S, Shimada K. Evaluation of aridinium-ester-labelled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. *J Clin Microbiol* 1991;29:2473-6.
25. Evans KD, Nakasune AS, Sutherland PA, de la Maza LM, Peterson EM. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-M. intracellulare* directly from primary BACTEC cultures by using acridinium-ester labelled DNA probes. *J Clin Microbiol* 1992;30:2427-31.
26. Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, Vincent-Levy-Frebaut V. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1992;30:2476-8.
27. Sherman I, Harrington N, Rothrock A, George H. Use of a Cut-off Range in Identifying mycobacteria by the Gen-Probe Rapid Diagnostic System. *J Clin Microbiol* 1989;27:241-4.

28. Musial CE, Tice LS, Stockman L, Roberts GD. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1988;26:2120-3.
29. Robert MC, McMillan C, Coyle MB. Whole chromosomal DNA probes for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. J Clin Microbiol 1987;25:1239-43.
30. Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol Microbiol 1989;3:843-9.
31. Sansila A, Hongmanee P, Chuchottaworn C, Rienthong S, Rienthong D, Palittapongarnpim P. Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* by amplification of the 16S-23S Ribosomal DNA Spacer. J Clin Microbiol 1998;36:2399-403.
32. Hongmanee P, Stender H, Rasmussen OF. Evaluation of a fluorescence in situ hybridization assay for differentiation between tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species in smears of Lowenstein-Jensen and mycobacteria growth indicator tube cultures using peptide nucleic acid probes. J Clin Microbiol 2001;39:1032-5.
33. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol 1990;28:2668-73.
34. Green EP, Tizard MLV, Moss MT et al. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *M. paratuberculosis*. Nucleic Acid Res 1989; 17:9063-73.
35. Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 1989;2:1069-71.
36. Pao CC, Ym TSB, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J Clin Microbiol 1990;28: 1877-80.
37. Woods PR, Ripper J, Radford AJ. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium bovis*. J Gen Microbiol 1988;134:2599-604.
38. Kadival G, Chaparas S, Hussons D. Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of a 38-kDa antigen isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 1987;139:2447-51.
39. Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME. Amplification of species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. J Clin Microbiol 1991;29:2163-8.
40. Longo MC, Berniger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene 1990;93:125-8.
41. Pang J, Modlin J, Yolken R. Use of

- modified nucleotides and uracil-DNA glycosylase (UDG) for the control of contamination in the PCR-based amplification of RNA. *Mol Cell Probes* 1992; 6:251-6.
42. Ou CY, Moore JL, Schochetman G. Use of UV irradiation to reduce false positivity in polymerase chain reaction. *BioTechniques* 1991;10:442-5.
 43. Pao CC, Hor JJ, Tsai PL, Horng MY. Inhibition of in vitro enzymatic DNA amplification reaction by ultra-violet light irradiation. *Mol Cell Probes* 1993;7:217-9.
 44. Cimino GD, Metchette KC, Tessman JW, Hearst JE, Isaacs ST. Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res* 1990;19:99-107.
 45. Sheng ZY, Isaacs ST, Cimino GDS, Hearst JE. The use of exonuclease III for polymerase chain reaction sterilization. *Nucleic Acid Res* 1991;19:2511.
 46. Deragon JM, Sinnott D, Mitchell G, Potier M, Labuda D. Use of γ -radiation to eliminate DNA contamination for PCR. *Nucleic Acid Res* 1990;18:6149.
 47. DeFilippes FM. Decontaminating the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 1991;10:26-30.
 48. Dougherty RM, Phillips PE, Gibson S, Young L. Restriction endonuclease digestion eliminates product contamination in reverse transcribed polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993;41:235-8.
 49. Furrer B, Candrian U, Wieland P, Luthy J. Improving PCR efficiency. *Nature* 1990;346:324.
 50. Azlanzadeh J. Application of hydroxylamine hydrochloride for post-PCR sterilization. *Mol Cell Probes* 1993;7:145-50.
 51. Meier A, Persing DH, Finken M, Bottger E. Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. *J Clin Microbiol* 1993;31:646-52.
 52. Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC. Isolation and direct sequencing of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acid Res* 1989;17:7843-53.
 53. Rogall T, Flohr T, Bottger E. Differentiation of Mycobacterial species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol* 1990;136:1915-20.
 54. Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:945-52.
 55. Vander Giessen JWB, Haring RM, Van der Zeijst BAM. Comparison of the 23S ribosomal RNA genes and the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes of the closely related *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* and the fast-growing *Mycobacterium phlei*. *Microbiol* 1994;140:1103-8.
 56. Glennon M, Smith T, Cormican M. The ribosomal intergenic spacer region a target for the PCR based diagnosis of tuberculosis. *Tuberc Lung Dis* 1994;75:353-60.
 57. Soini H, Bottger EC, Viljanen MK. Ident-

- tification of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene. *J Clin Microbiol* 1994;32:2944-7.
58. Takewaki S, Okuzumi K, Manabe I. Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44(1):159-66.
 59. Patel R, Kvach JT, Mounts P. Isolation and restriction endonuclease analysis of mycobacterial DNA. *J Gen Microbiol* 1986;132:541-51.
 60. Palittapongarnpim P, Rienthong S, Panbangred W. Comparison of restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from cerebrospinal fluid and sputum: a preliminary report. *Tuberc Lung Dis* 1993;74:204-7.
 61. Lau CF, Sheu SS. Rapid and direct recovery of DNA fragments from agarose gels: an extremely simple method. *Methods Mol Cell Biol* 1992;3:190-2.
 62. Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakus MA. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1992;30:1815-22.
 63. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottgar EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31:175-8.
 64. Vaneechoutte M, Beenhouwer HD, Claeys G, Verschraegen G, Rouck AD, Paepe N, Elaichauni A, Portaels F. Identification of *Mycobacterium* species by using ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31:2061-5.
 65. Lappayawichit P, Rienthong S, Rienthong D, Chuchottaworn C, Chaiprasert A, Panbangred W, Palittapongarnpim P. Differentiation of *Mycobacterium* species by restriction enzyme analysis of amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer sequences. *Tuberc Lung Dis* 1996; 77: 257-63.
 66. Daniel TM, Janicki BW. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiol Rev* 1987;42:84-113.
 67. Young DB, Kaufmann SHE, Hermans PWM, Thole JER. Mycobacterial proteins; a complication. *Mol Microbiol* 1992;6:133-45.
 68. Young D, Kent L, Rees A, Lamb J, Ivanyi J. Immunological activity of 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immunol* 1986;54:177-83.
 69. Jaccottet P, Bothamley GH, Batra HV, Mistry A, Young DB, Ivanyi J. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1988;26:2313-8.
 70. Verbon A, Weveling GL, Kuijper S, Speelman P, Jansen HM, Kolk AHJ. Evaluation of different tests for the serodiagnosis of tuberculosis and the use of likelihood ratios in serology. *Am Rev*

- Respir Dis 1993;148:378-84.
71. Verbon A, Hartskeerl RA, Kolk AHJ. Murine and human B cell epitope mapping of the *Mycobacterium tuberculosis* 10-kD heat shock protein using over-lapping peptides. Clin Exp Immunol 1991;86:6-12.
72. Verbon A, Hartskeerl RA, Moreno C, Kolk AHJ. Characterization of B cell epitopes on the 16K antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Exp Immunol 1992;89:395-401.
73. Vordermeier HM, Harris DP, Mehrotra PK. *M. tuberculosis*-complex specific T-cell stimulation and DTH reactions induced with a peptide from the 38-kDa protein. Scand J Immunol 1992;35:711-8.
74. Minden P, Kelleher PJ. Immunological evaluation of a component isolated from *M. bovis* BDG. Infect Immunol 1984;46:519-25.
75. Nagai S, Matsumoto J, Nagasuga T. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immunol 1981;13:1152-60.
76. Anderson AB, Ljungqvist L, Haslov K, Bentzon MW. MPB 64 possesses "tuberculosis-complex"-specific B- and T-epitopes. Scand J Immunol 1991;34:365-72.

 BLOOD TRANSFUSION SERVICES CO., LTD.	บริษัท บลัดทรานส์ฟิวชั่นเซอร์วิส จำกัด 32/3 ซ.จันทิมา ถ.ลาดพร้าว 80 แขวง/เขต วังทองหลาง กรุงเทพฯ โทร. 5303003-7 แฟกซ์ 539-2384
"BLOOD BANK PRODUCTS SPECIALTY"	
ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC. / USA. : BLOOD BANK REAGENT AND AIDS/HEPATITIS DIAGNOSTIC HEMOPHARM / FRANCE : BLOOD COLLECTION MONITOR AND TUBE SEALER. MOBILE DESIGN / USA. : MOBILE DONOR LOUNGES. HAEMONETICS / USA. : AUTOMATIC BLOOD CELL SEPARATOR (HAEMAPHERESIS). PEL FREEZE / USA : HLA TYPING. NORLAKE / USA. : BLOOD BANK REFRIGERATORS AND FREEZERS. HELMER / USA. : PLATELET STORAGE SYSTEMS AND PLASMA THAWING SYSTEMS. PALL / USA. : LEUKOCYTE REDUCTION FILTER FOR BLOOD TRANSFUSION. CBS / USA : LIQUID NITROGEN STORAGE SYSTEMS	