



การวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium bovis* จาก *Mycobacterium* species ที่แยกได้ จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ Identification of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium* species isolated from patients in Srinagarind Hospital

มยุรี ศรีอุณข่าง¹, ศรีนัย พิลาคง², กรรณิการ์ จलयศรี²,
พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์¹, พรทิพย์ ปิ่นละอ¹, อรุณีย์ สังกา¹

บทคัดย่อ

เชื้อ *Mycobacterium bovis* จัดเป็นเชื้อวัณโรคในวัว ควาย และทำให้เกิดโรคในคนได้ การศึกษาครั้งนี้ได้วินิจฉัยเชื้อ *M.bovis* จาก *Mycobacterium* species ที่แยกได้จากเสมหะ และสิ่งส่งตรวจอื่น ได้แก่ ต่อม้ำเหลือง ไขกระดูก เนื้อเยื่อ และน้ำไขสันหลัง ของผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 43 ตัวอย่าง ที่เก็บระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2542 ถึงเดือนธันวาคม 2543 ทำการทดสอบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบทางชีวเคมี 7 การทดสอบ ดังนี้คือ การเจริญบน Thiophen-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) ความเข้มข้น 10 µg/ml การรีดิวซ์ไนเตรด การผลิตเอนไซม์อะเลสถึงปริมาณ การผลิตเอนไซม์อะเลสที่ทนความร้อน 68 องศาเซลเซียส การสลายทวิน 80 การผลิตเอนไซม์ยูรีเอส และการสร้างสารไนอะซิน ผลการศึกษาพบเชื้อ *M.bovis* จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 9.3) *M.tuberculosis* จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.7) และพบเชื้อในกลุ่ม

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² นักศึกษาระดับปริญญาตรีชั้นปีที่ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Mycobacterium other than tuberculosis (MOTT) จำนวน 36 ตัวอย่าง (ร้อยละ 83.7) และพิสูจน์สปีชีส์ไม่ได้จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.3) สำหรับเชื้อ *M.bovis* พบว่าแยกได้จากเสมหะทั้งหมดแต่ไม่ทราบว่าเป็นคนไข้รายเดียวกันหรือไม่และได้พิสูจน์ยืนยันชนิดเชื้อโดยวิธี PCR identification ที่จำเพาะต่อ *M. tuberculosis* complex (M.tb cpx) และ mtp 40 gene (specie-specific gene ต่อ *M. tuberculosis*) แล้ว พบว่าอาจเป็นเชื้อ *M.bovis* หรือ *M.bovis* BCG ซึ่งต้องพิสูจน์แยกทั้งสองชนิดนี้ต่อไปด้วยวิธี Southern blot hybridization กับ specific probe ผลการศึกษาครั้งนี้ น่าจะช่วยเป็นแนวทางในการวินิจฉัย *M.bovis* สำหรับห้องปฏิบัติการที่มีการวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* species เพื่อประโยชน์ในการรักษาและการศึกษาทางวิทยาการระบาดต่อไป

คำรหัส: วัณโรคในวัว ● การวินิจฉัย *M.bovis*

Abstract

Identification of Mycobacterium bovis from Mycobacterium species isolated from patients in Srinagarind Hospital

Mayuree Srilunchang¹, Sarun Pilakong², Kannika Chaluaysri²,
Pipat Sribenjalux¹, Porntip Pinlaor¹, Arunnee Sangka¹

Mycobacterium bovis is zoonotic tuberculosis. It is able to cause tuberculosis in the cattles and most other animal species including humans. This study was the identification of *M.bovis* from 43 clinical isolates of *Mycobacterium* species that were isolated from sputum, lymph node, bone marrow, tissue and cerebrospinal fluid from the patients of Srinagarind hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. The specimens were collected during November 1999–December 2000. The methods of this study were cultural examination and 7 biochemical tests by the followings: growth on Thiophen-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) 10 µg/ml, nitrate reduction test, semiquantitative catalase test, catalase 68 °C tolerance test, tween-80 hydrolysis test, urease test and niacin test. From 43 specimens, 4 isolates were *M.bovis* (9.3%), 2 isolates were *Mycobacterium tuberculosis* (4.7%), 36 isolates were *Mycobacterium other than tuberculosis* (MOTT) (83.7%) and 1 isolate could not be identified (2.3%). All *M.bovis* were isolated from sputum but loss of data

¹ Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

² The 4th year students, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

to know that it infected with the same patient or the different patients. They were confirmed species by PCR identification with *M.tb* cpx and *mtp* 40 gene and found that they might be *M.bovis* or *M.bovis* BCG. However, it should be further confirmed the species by Southern blot hybridization with specific probe. This study provides data for identification of *M.bovis* in the laboratory with diagnostic of *Mycobacterium* species which will be useful for treatment and epidemiology study.

Key words: *Mycobacterium bovis* ● *M.bovis*

บทนำ

เชื้อวัณโรควัหรือเชื้อ *Mycobacterium bovis* ทำให้เกิดวัณโรคในวัว ควาย และสัตว์เลี้ยงอื่นๆ เช่น สุนัข แมว ตลอดจนมนุษย์ ทำให้เกิดวัณโรคชนิดแพร่กระจายในวัว ควาย แต่เกิดโรคเฉพาะที่ในคน เชื้อวัณโรควัติดต่อมายังคนโดยทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่ ทางระบบหายใจเป็นส่วนน้อย วัณโรคจากเชื้อวัณโรควัจึงมักเป็นนอกปอด (extrapulmonary) ซึ่งในคนส่วนมากจะเกิดที่ต่อมน้ำเหลืองคอ ต่อมน้ำเหลือง mesenteric กระดูกและข้อ นอกจากนี้อาจพบในอวัยวะที่อยู่ในช่องท้อง หรือตามผิวหนัง และพบได้ในเด็กเป็นส่วนใหญ่ สาเหตุจากการดื่มน้ำนมโคที่มีเชื้อนี้อยู่ ดังนั้นการเกิดโรคจึงเกิดที่ระบบทางเดินอาหารในช่องท้องเป็นส่วนใหญ่¹ อย่างไรก็ตามมีบางรายงานพบว่า *M. bovis* ทำให้เกิดวัณโรคปอดได้ โดยติดต่อทางละอองอากาศ^{1,2} ผู้ป่วยหรือสัตว์ที่เป็นโรคสามารถติดต่อมาสู่คนหรือสัตว์ด้วยกัน โดยมีระยะเวลาการแพร่เชื้อได้นานเป็นเดือนหรือหลายปี ถ้าไม่มีการควบคุมหรือป้องกันให้ดี การป้องกันและการรักษาพื้นที่ที่มีการวินิจฉัยที่ถูกต้องจะทำให้ป้องกันการระบาดของเชื้อได้ดีที่สุด แต่ในทางปฏิบัติแล้ววิธีการนี้ค่อนข้างเป็นไปได้ยากโดยเฉพาะในประเทศด้อยพัฒนาหรือกำลังพัฒนา ทั้งนี้เพราะประชาชนหรือเจ้าของสัตว์ที่ป่วยไม่มีความรู้เกี่ยวกับการเกิดโรคนี้ และห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยอาจไม่เพียงพอ

การทำ strain typing ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นวิธีเดียวที่จะพิสูจน์ได้ว่าเป็นวัณโรคแบคทีเรียชนิดใด ในปัจจุบันอาศัยวิธีการเพาะเชื้อและการทดสอบทางชีวเคมีก็สามารถที่จะช่วยในการวินิจฉัยแยกเชื้อ *M.bovis* ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex ได้³ เนื่องจากเชื้อวัณโรคแบคทีเรียแต่ละชนิดสร้างสารเคมีและเอ็นไซม์ต่างๆ ได้ไม่เท่ากัน ทำให้มีปฏิกิริยาทางชีวเคมีไม่เหมือนกันจึงอาศัยการศึกษาอัตราการเจริญ การดูลักษณะโคโลนีและปฏิกิริยาทางชีวเคมีเป็นหลักสำคัญในการแยกชนิดของเชื้อวัณโรคแบคทีเรีย

การพิสูจน์สปีชีส์ของ *M. bovis* จะช่วยนำร่องให้ทราบถึงแนวโน้มของการติดเชื้อในแต่ละพื้นที่ได้ และยังช่วยสนับสนุนถึงแหล่งที่มาของเชื้อได้อีกด้วย ดังนั้นจึงควรมีการเตรียมการเพื่อการวินิจฉัยแยกสปีชีส์ของ *M. bovis* เพื่อรองรับกับสถานการณ์การเพิ่มขึ้นของผู้ติดเชื้อ *M. bovis* ในอนาคตที่อาจเกิดร่วมกับการติดเชื้อเอชไอวีซึ่งมีแนวโน้มสูงขึ้น เพื่อป้องกันรักษาและควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อก่อนที่จะลุกลามเป็นปัญหาสำคัญระดับประเทศ

วัสดุและวิธีการ

1. เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง

เป็นแบคทีเรียกลุ่มวัณโรคแบคทีเรียที่แยกได้

จากเสมหะและสิ่งส่งตรวจชนิดอื่นจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2542 ถึงเดือนธันวาคม 2543 จำนวน 43 ตัวอย่าง เชื้อตัวอย่างเหล่านี้ได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้นว่าเป็น เชื้อกลุ่มมัคโคแบคทีเรีย โดยอาศัยคุณสมบัติอัตราการเจริญ ลักษณะโคโลนี รวมทั้งการสร้างสารสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein Jensen medium (LJ medium) การติดสีทึบกรด^{3-5,7} ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มคือ 1) Photochromogens, 2) Scotochromogens, 3) Non-chromogens และ 4) Rapid growers โดยกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เป็นเชื้อที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า ใช้เวลามากกว่า 2 สัปดาห์ จึงจะเห็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับเชื้อในกลุ่มที่ 4 มีอัตราการเจริญเร็วภายใน 1 สัปดาห์ ก็สามารถเห็นโคโลนีได้ เชื้อในกลุ่มที่ 1 สามารถสร้างสารสีเหลืองในที่ที่มีแสงสว่างได้ กลุ่มที่ 2 สามารถสร้างสารสีเหลืองในที่มืด และกลุ่มที่ 3 ไม่สามารถสร้างสารสีทั้งในที่มืดและที่สว่าง เชื้อทุกชนิดในกลุ่มมัคโคแบคทีเรียนี้มีคุณสมบัติการติดสีเหมือนกันหมด คือเป็นแบบติดสีทึบกรด (acid-fastness) สำหรับลักษณะโคโลนีแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อ เช่น มีลักษณะขรุขระ ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าแห้งคล้ายดอกกะหล่ำหรือลักษณะกลมแบน ขอบเรียบ ผิวมัน เป็นต้น

2. การทดสอบพิสูจน์ชนิด *M. bovis*

2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ^{5,6} นำเชื้อที่เจริญบน LJ medium มาเพาะเลี้ยงต่อใน LJ medium ที่ผสม 0.4% pyruvate เป็นระยะเวลา 2-4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

2.2 การย้อมสีทึบกรด โดยวิธี Kinyoun⁷

2.3 การทดสอบทางชีวเคมี⁵

2.3.1 การสร้างสารในอะซิน

เติมน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือปราศจากเชื้อจำนวน 1.5 มิลลิลิตร ลงในขวดเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งมีจำนวนโคโลนีอย่างน้อย 50-100 โคโลนี วางขวดในแนว

นอนให้น้ำท่วมผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อ (อาจจะชุดหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นริ้วเพื่อให้สกัดสารในอะซินให้ดีขึ้น) ทิ้งไว้ 20 -30 นาที (ใช้เวลานานกว่านี้ถ้ามีจำนวนโคโลนีน้อย) นำน้ำสกัดในอะซินนั้นมาทดสอบกับแผ่น Bacto - TB niacin test strip (Difco) อ่านผลที่เวลา 12 - 15 นาที (ไม่เกิน 30 นาที) ผลบวกคือน้ำที่สกัดในอะซินเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง ผลลบคือน้ำที่สกัดในอะซินไม่เปลี่ยนสี ใช้เชื้อควบคุมคุณภาพผลบวก คือ *M.tuberculosis* ATCC 27294 เชื้อควบคุมคุณภาพผลลบ คือ *M. phlei* ATCC 23042

2.3.2 การรีดิวซ์ไนเตรด

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบให้เต็มหลอดผสมลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม substrate (0.01 M sodium nitrate ใน 0.022 M phosphate buffer, pH 7.0) 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เชื้อแตกและปิดฝาเกลียว นำไปอุ่นในอ่างน้ำอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Reagent 1 (50 มิลลิลิตร HCl เข้มข้นในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร) จำนวน 1 หยด Reagent 2 (0.2 กรัม sulphanilamide ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) จำนวน 2 หยด และ Reagent 3 (0.1 กรัม N-naphthylethylenediamine dihydrochloride ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) จำนวน 2 หยด เขย่าและอ่านผลการทดสอบทันที ผลบวกจะเกิดสีชมพูอ่อนถึงแดงเข้มโดยเปรียบเทียบกับสีมาตรฐาน อ่านผลเป็นบวกเมื่อให้สีระดับ 3+ ถึง 5+ ผลลบจะไม่มีสีเกิดขึ้น ใช้เชื้อควบคุมคุณภาพผลบวกคือ *M. fortuitum* ATCC 3841 เชื้อควบคุมคุณภาพผลลบคือ *M. bovis* BCG

2.3.3 การสลายทวิน 80

เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบจำนวน 1 หลอดใส่ในหลอดที่มีสารละลายทวิน 80 อยู่ นำไปอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการเปลี่ยนสีในวันที่ 1, 5 และ 10 โดยห้ามเขย่าหลอดขณะอ่านผล ผลบวกสารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็น

ชมพูหรือแดง ผลบยังคงเป็นสีส้มเมื่ออบนานถึง 10 วัน ใช้เชื้อควบคุมคุณภาพผลบวค คือ *M. kansasii* ATCC 12478 (ผลบวคแรง), *M. gordonae* ATCC 14470 (ผลบวคอ่อน) เชื้อควบคุมคุณภาพผลบคคือ *M. avium* ATCC 25291

2.3.4 การผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

เชื้อเชื้อที่ต้องการทดสอบจำนวน 1 หลูปเต็ม ใส่ลงในหลอดทดสอบยูเรีย นำไปอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน อ่านผลการเปลี่ยนสีของอาหารในวันที่ 5 เท่านั้น ถ้านานกว่านี้อาจเกิดผลบวคปลอมได้ ผลบวคอาหารเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีชมพูหรือแดง ผลบคอาหารไม่เปลี่ยนสี ใช้เชื้อควบคุมคุณภาพผลบวคคือ *M. fortuitum* ATCC 6841 เชื้อควบคุมคุณภาพผลบคคือ *M. gordonae* ATCC 14470

2.3.5 การผลิตเอนไซม์อะเลสทีนปริมาณ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบจำนวน 1 หลูปเต็ม ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ medium อบที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ เติมน้ำละลายทวินเพอร์ออกไซด์ (เตรียมสารละลายทวิน 80 และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอัตราส่วน 1:1 ทันทีก่อนจะใช้) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที สังเกตการเกิดฟองและวัดความสูงของฟองอากาศเป็นมิลลิเมตร ผลบวคจะเกิดฟองอากาศสูงกว่า 45 มิลลิเมตร ผลบคฟองอากาศต่ำกว่า 45 มิลลิเมตร เชื้อควบคุมคุณภาพผลบวคคือ *M. fortuitum* ATCC 6841 เชื้อควบคุมคุณภาพผลบคคือ *M. tuberculosis* ATCC 27294

2.3.6 การผลิตเอนไซม์อะเลสทีนที่ทนต่อความร้อน 68 องศาเซลเซียส

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในหลอดฝาเกลียวที่มี 0.067 M phosphate buffer pH 7.0 ที่ปราศจากเชื้ออยู่หลอดละ 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 2 หลอด หลอดละ 1 หลูปเต็ม ปิดฝาเกลียว นำหลอดทดสอบวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 1 หลอด อีกหลอดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาทีโดยห้ามเขย่า เติมน้ำทวินเพอร์ออกไซด์

หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยหลอดทดสอบที่ 68 องศาเซลเซียสทั้งให้เย็นก่อนเติมน้ำทวินเพอร์ออกไซด์ สังเกตการเกิดฟองอากาศ ผลบวคจะมีฟองอากาศเกิดขึ้น ผลบคไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น เชื้อควบคุมคุณภาพผลบวค (ให้ผลบวคทั้งสองหลอดทดสอบ) คือ *M. fortuitum* ATCC 6841 เชื้อควบคุมคุณภาพผลบค (ให้ผลบคที่ 68 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิห้องให้ผลบวค) คือ *M. bovis* BCG

2.3.7 การเจริญบน Thiophen-2- carboxylic acid hydrazide (TCH)

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบจำนวน 1 หลูปเต็ม ผสมลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เชื้อแตกกระจายดี แล้วป้ายเชื้อที่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ Medium ที่ผสมกับ TCH ความเข้มข้น 10 g/ml อบเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ผลบวคคือ มีเชื้อเจริญมากกว่าร้อยละ 1 ของเชื้อหลอดควบคุม (เชื้อหลอดควบคุมหมายถึงเชื้อที่เจริญในหลอดที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ Medium เท่านั้น) ถือว่าเชื้อคือดื้อยา (resistance) ผลบคคือ มีเชื้อเจริญน้อยกว่าร้อยละ 1 ของเชื้อหลอดควบคุม ถือว่าเชื้อไวต่อยา (susceptible) เชื้อควบคุมคุณภาพผลบวคคือ *M. tuberculosis* ATCC 27294 เชื้อควบคุมคุณภาพผลบคคือ *M. bovis* BCG

2.4 การอ่านผลและพิสูจน์เชื้อ⁷

โดยแปลผลจากตารางแสดงอัตราการเจริญและลักษณะโคโลนีของเชื้อ การสร้างสารสีและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียจึงจำแนกโคแบคทีเรีย

ผลการศึกษา

การวินิจฉัยเชื้อ *M. bovis* จาก *Mycobacterium* species ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ส่งเพาะเชื้อมายังโคแบคทีเรียในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จำนวน 43 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเชื้อ *M. bovis* จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 9.3) *M. tuberculosis* จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.7) และพบเชื้อในกลุ่ม MOTT

จำนวน 36 ตัวอย่าง (ร้อยละ 83.7) โดยแยกได้ทั้งหมด 12 สปีชีส์ และพิสูจน์สปีชีส์ไม่ได้จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.3) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับเชื้อ *M.bovis* พบว่าแยกได้จากเสมหะทั้งหมด ซึ่ง *M.bovis* 2 ตัวอย่าง ได้ตรวจพิสูจน์เชื้อในระดับโมเลกุลแล้วโดยวิธี PCR amplification ที่จำเพาะต่อ *M.tb* cpx แต่ไม่จำเพาะต่อ *mtp* 40 gene ซึ่งอาจเป็น *M.bovis* หรือ *M.bovis* BCG โดยสามารถที่จะแยกทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกันได้โดยวิธี Southern blot hybridization กับ specific probe ต่อไป ส่วน *M.bovis* อีก 2 ตัวอย่างเชื้อตายในระหว่างส่งตัวอย่างพิสูจน์เชื้อในระดับโมเลกุล

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาพบตัวอย่างจาก Pus จำนวน 1 ตัวอย่างที่ไม่สามารถพิสูจน์ชนิดได้ ซึ่งควรใช้การทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น การผลิตเอนไซม์เอริทริลซัลฟาเทส ไอออนอ็อปเทก การทนต่อโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 การรีดิวซ์เทลลูไรท์ หรือ DNA probe ส่วนผลการทดสอบจำนวน 7 ตัวอย่างที่ให้ผลเป็น MOTT สองสปีชีส์ร่วมกันนั้น เชื้อ *M.shimoidei* และ *M.gastri* สามารถวินิจฉัยแยกกันได้โดยอาศัยประวัติผู้ป่วย การวินิจฉัยโรค สิ่งส่งตรวจที่ส่งเพาะเชื้อ รวมทั้งการทดสอบทางชีวเคมี เช่น ทดสอบ *Pyrazinamidase* ส่วนเชื้อที่อาจเป็น *M.avium* complex (MAC) หรือ *M.celatum* วินิจฉัยแยกโดยใช้การทดสอบการผลิตเอนไซม์เอริทริลซัลฟาเทส ซึ่ง MAC ให้ผลลบ ส่วนเชื้อ *M.celatum* ให้ผลบวก โดยมี 1 ตัวอย่าง ซึ่งผลทดสอบทางชีวเคมีน่าจะเป็น *M.bovis* แต่ผลการทดสอบยืนยันเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* (PCR amplification จำเพาะต่อ *M.tb* cpx (+) และ *mtp* 40 (+) ซึ่งตรงจุดนี้ชี้ให้เห็นว่าการแปลผลจากผลการทดสอบทางชีวเคมีอย่างเดียวอาจเกิด

ความผิดพลาดได้ เช่น *M. tuberculosis* ตัวนี้ให้ผลลบต่อการทดสอบในอะซิน ซึ่งโอกาสพบน้อยเพียงร้อยละ 5 เท่านั้น⁷ ดังนั้นในงานตรวจวินิจฉัยประจำวัน ถ้าผลการทดสอบทางชีวเคมีที่ได้เป็นเชื้อ *M.bovis* จำเป็นต้องได้รับการตรวจยืนยันโดยวิธีทางชีวโมเลกุลต่อไป

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบ *M.bovis* หรือ อาจจะเป็น *M.bovis* BCG จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 9.3) จากเสมหะ แต่ไม่ทราบข้อมูลว่าเป็นเสมหะจากผู้ป่วยรายเดียวกันหรือไม่ ทำให้ไม่ทราบความชุกที่แท้จริงในการเกิดวัณโรคปอดจากเชื้อ *M.bovis* ซึ่งจากรายงานในอดีต¹ อัตราความชุกต่ำไม่ถึงร้อยละ 1 ในประเทศไทย และรายงานของ Cosivi และคณะ⁸ ที่ศึกษาในประเทศอุตสาหกรรม พบอัตราการติดเชื้อ *M.bovis* ร้อยละ 3.1 ของวัณโรคทั้งหมด โดยร้อยละ 3.1 เป็นวัณโรคในปอด และร้อยละ 9.4 เป็นวัณโรคนอกปอด ส่วนในรายงานของ Fanning⁹ พบอัตราความชุกของเชื้อ *M.bovis* ในประเทศเยอรมัน ออสเตรเลีย และอเมริกา ร้อยละ 13.5, 12.1 และ 11.7 ตามลำดับ สำหรับในประเทศไทยที่มีรายงานอัตราการติดเชื้อชนิดนี้ต่ำ ผู้วิจัยคิดว่าสาเหตุหนึ่งอาจเนื่องมาจากห้องปฏิบัติการตรวจมัยโคแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่ค่อยได้ทำการทดสอบทางชีวเคมีให้ครอบคลุมเชื้อนี้ โดย การทดสอบทางชีวเคมีที่สำคัญที่ใช้แยกระหว่างเชื้อ *M.bovis* ออกจาก *M.tuberculosis* ได้แก่ การทดสอบในอะซิน การรีดิวซ์ไนเตรท และการเจริญบน TCH ถ้าทำการทดสอบเพียงในอะซินชนิดเดียว อย่างเช่นที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ก็จะทำให้ไม่สามารถตรวจพบ *M.bovis* ได้เลย และอาจทำให้แปลผลว่าเป็นกลุ่ม MOTT แทน ดังนั้นถ้าห้องปฏิบัติการตรวจมัยโคแบคทีเรียทั่วไปรวมทั้งที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ด้วยทำการทดสอบทางชีวเคมีทั้ง 3 อย่างนี้ร่วมกับการดูลักษณะโคโลนี และอัตราการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ medium ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยเชื้อ *M.bovis* ได้เบื้องต้น ซึ่งจะเป็นข้อมูลในการให้การ

ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์ชนิดของเชื้อมัคโคแบคทีเรีย

ผลการพิสูจน์ชนิดของเชื้อ (จำนวนที่พบ)	ชนิดของตัวอย่างตรวจ (จำนวน)				
	Sputum	Bone marrow	Tissue	Fluid	Pus
กลุ่ม Slowly growing *					
<i>M.bovis</i> (4)	4				
<i>M.tuberculosis</i> (2)	2				
MAC (<i>M.avium</i> complex) (8)	6	1		CSF (1)	
<i>M.xenopi</i> (3)	3				
<i>M.nonchromogenicum</i> (2)	1		Right shoulder (1)		
<i>M.simiae</i> (1)	1				
<i>M.malmoense</i> (1)		1			
<i>M.terrae</i> (2)	1		Testis (1)		
<i>M.gastri</i> (1)			Right arm (1)		
<i>M.gordonae</i> (2)	2				
อาจเป็น MAC หรือ <i>M.celatum</i> (3)		3			
อาจเป็น <i>M.shimoidei</i> หรือ <i>M.gastri</i> (4)	2	1	Liver (1)		
กลุ่ม Rapidly growing **			Lymph node		
<i>M.fortuitum</i> (2)	1		(1)		
<i>M.chelonae</i> (7)		1	Lymph node (2)	CSF (2) Ascitic (2)	
พิสูจน์ชนิดไม่ได้ (1)					1

* หมายถึง เชื้อใช้เวลาในการเจริญมากกว่า 7 วัน

** หมายถึง เชื้อใช้เวลาในการเจริญน้อยกว่า 7 วัน

รักษาของแพทย์ ซึ่งถ้าตรวจพบว่าคนไข้ติดเชื้อจาก *M.bovis* ก็สามารทำให้ยารักษาใกล้เคียงกับยาที่ใช้ในกลุ่ม *M. tuberculosis* ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *M.bovis* เชื้อจะไวต่อยากลุ่มนี้เหมือนกัน แต่ *M.bovis* จะดื้อต่อยา *Pyrazinamide* ทุกสายพันธุ์ ซึ่งเป็นการดื้อยาตามธรรมชาติของเชื้อ และประโยชน์ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือเพื่อทราบข้อมูลการระบาดของเชื้อซึ่งจะมีความสำคัญต่อการดำเนินงานป้องกันและควบคุมการระบาดของเชื้อต่อไป เพราะเป็นเชื้อที่สามารถแพร่ระบาดจากการสัมผัสวัวที่มีเชื้อมนุษย์ และแพร่โดยทางละอองอากาศได้จากสัตว์ไปสู่คน จากคนสู่คน และจากคนกลับไปสู่สัตว์ได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัย ขอขอบคุณหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างทดสอบที่ใช้ในการศึกษานี้ และขอขอบคุณ รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ หัวหน้าสาขาและมัคโคแบคทีเรียวิทยาภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจพิสูจน์ชนิดเชื้อ *Mycobacterium spp.* โดยวิธีทาง Molecular technique ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. ชัยเวช นุชประยูร. เชื้อวัณโรค. ใน: บัญญัติ ปริชยานนท์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ, บรรณาธิการ. วัณโรค. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, 2542:150-70.
2. บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ, องุ่น เกียรติวุฒิ, ศุภกิจ อังศุภากร. วัณโรค โรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน (แบคทีเรีย ปาราสิต ไวรัส เชื้อรา และสารพิษจากเชื้อรา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตการพิมพ์, 2527:114-26.
3. เจริญ ชูโชติถาวร. การวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการและการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรค. ใน: บัญญัติ ปริชยานนท์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ, บรรณาธิการ. วัณโรค. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, 2542:171-94.
4. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Willium ST. The Mycobacteria. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994:597-603.
5. Herbert M, Sommers, Robert C. *Mycobacterium*. Manual of clinical microbiology. Washington D.C.: ASM, 1985:216-45.
6. GIBCO BRL. Lowenstein Jensen Medium Base. The manual of microbiological culture media. (n.p.): Gibco BRL, 1988:53-4.
7. Nolte FS, Mettchok B. *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. Manual of clinical microbiology. 6th. ed. Washington D.C.: ASM, 1995:418-9.
8. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Geneva 1998:4:1-23.
9. Fanning EA. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. In: Davies PDO, ed. Clinical tuberculosis. 2nd. ed. Great Britain: Lippincott-Raven Publishers, 1998:535-50.