



MYCOBACTERIUM CULTURE*

เนตร สุวรรณคฤหาสน์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)**

การเพาะเลี้ยงเชื้อ Mycobacterium tuberculosis จะต้องเอาเข้าตู้อบ นาน กว่าเชื้อธรรมดา อบนานถึง 8 อาทิตย์ ถ้าตัวอย่างตรวจมีเชื้อที่บิ ส่วนมากจะเห็นเชื้อเจริญขึ้นในอาทิตย์ที่สอง เนื่องจากการเพาะเลี้ยง ที่บิ จะต้องเข้าตู้อบนาน ดังนั้นการ decontaminate จึงสำคัญมากกรองลงมาก็คืออาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ถ้าใช้อาหารที่ดีมีคุณสมบัติสูงจะทำให้เชื้อ ที่บิ ขึ้นได้ไวกว่าอาหารเก่าๆ เช่น Middlebrook 7H 10

เนื่องจากเชื้อที่บิ มีลักษณะที่แปลกกว่าเชื้อแบคทีเรียตัวอื่น ๆ คือ

ก. ทนต่อการ decolorize ด้วย acid alcohol (3% Hydrochloric acid in 95% ethanol)

ข. เชื้อที่บิทนต่อความเป็นกรดและ ความเป็นด่าง

ค. เชื้อที่บิมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคสูง ถึงแม้จะได้รับเชื้อเข้าไปจำนวนน้อยก็ทำให้เกิดอาการขึ้นได้

ดังนั้นการทำงานเกี่ยวกับเชื้อที่บิจะต้องทำ

ด้วยความระมัดระวังคือ ต้องทำในตู้ (Hood) เสมอ เมื่อทำงานเสร็จแล้วต้องเปิดไฟ Ultra-violet light ทั้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง หรือใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเช็ดโต๊ะที่ทำงานหรือในตู้ทุกครั้ง ก่อนหรือหลังจะทำงาน

การเก็บตัวอย่างตรวจ

การเก็บตัวอย่างตรวจมีความสำคัญมาก จะตรวจพบเชื้อที่บิมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับการเก็บตัวอย่างตรวจจะต้องรู้ว่าควรเก็บจากไหน และเวลาใด จึงจะพบเชื้อที่บิมาก

ผู้ป่วยเป็นวัณโรคปอด

1. เก็บเสมหะตอนเช้าก่อน แปรงฟัน ให้ได้อย่างน้อย 10 มล.

2. หรือเก็บ fasting gastric lavage ประมาณ 15 มล.

ผู้ป่วยเป็นวัณโรคไตหรือทางเดินปัสสาวะ

1. เก็บปัสสาวะตอน เช้าให้ได้ ประมาณ 50 มล. ดีกว่าการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง การเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจะทำให้มี contaminate

* วิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีวคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เพิ่มมากขึ้น หรือ toxicity จากปัสสาวะอาจ
จะทำลายเชื้อที่บักได้

**ผู้ป่วยเป็นวัณโรคลำไส้หรือทางเดินอา-
หาร**

1. เก็บอุจจาระที่ถ่ายตอนเช้าตกเอา ส่วน
บนมาประมาณ 10-15 มล. ผู้ป่วยเป็นวัณโรค
อื่นๆ ให้อยู่ในคลย์พินิจของนายแพทย์

การสเมียร์และการย้อมสี

ถ้าเป็นปัสสาวะ, น้ำไขสันหลัง, น้ำช่อง
ปอด, ฯลฯ ให้นำเอาส่วนที่ข้นมา smear บน
slide ส่วนตัวอย่างที่ข้นแล้วให้เอา smear บน
slide โดยตรง ทั้ง slide ที่ smear ไว้ใน
อุณหภูมิห้องให้นานพอ film แห้งหมาดๆ เอา
slide fix ด้วยไฟอ่อนๆ สองสามครั้ง แล้วนำ
ไปย้อมด้วยสี acid fast stain (A.C.F.) ใน
ที่นี้ใช้ Kinyoun stain

1. ลาด film ด้วย Kinyoun ทั้งไว้นาน
ประมาณ 1-5 นาที

2. ล้างด้วยน้ำประปา เอาสีที่เหลือออก
ให้หมด

3. ล้างสีออกด้วย acid alcohol จน film
หมดสี

4. ล้างด้วยน้ำประปาเอา acid alcohol
ที่เหลือสีออกให้หมด

5. ลาดสี Methylene blue ทับลงไปบน
film นาน 30 วินาที

6. ล้างด้วยน้ำประปา จนสีที่เหลือออก
ให้หมด

เอากะดาษซับๆ น้ำออกจาก slide แล้วทิ้งไว้
ให้แห้ง เมื่อ slide แห้งสนิทก็นำไปดูด้วยกล้อง
จุลทรรศน์ โดยดูด้วยหัวขยาย 100 x (oil im-
mersion lens)

การอ่าน slide ที่ย้อมด้วย A.C.F.

หาตัว acid fast bacilli ที่ดัดสีแดง ส่วนเชื้อ
อื่นๆ จะติดสีน้ำเงินของ Methylene blue และ
อ่านผลดังนี้

เมื่อพบเชื้อที่บ 10 หรือมากกว่า 10 ตัวต่อ 1
field ของ oil immersion ให้อ่านเป็น +++
or numerous

เมื่อพบเชื้อที่บ 10 หรือมากกว่า 10 ตัวต่อ slide
ให้รายงาน ++ หรือ few

เมื่อพบเชื้อที่บ 3-9 ตัวต่อ slide ให้รายงาน +
หรือ rare

Decontamination

Decontaminating solution (ZAP) โดย
ตุน้ำยา 17% zephiran (zephriol)* มา 1.2
มล. ใส่ volumetric flask ซึ่งมีน้ำกลั่น
sterile ประมาณ 50 มล. และเติมน้ำยา am-
picillin ที่เข้มข้น 2 มก. ต่อ มล. ลงไป 0.3
มล. เติมน้ำกลั่น sterile ให้ครบ 100 มล. (ZA)
เอาน้ำยา ZA มาแล้วเติมน้ำยา 10% pepsin
ลงไป 1 มล. (ZAP) น้ำยา ZAP จะต้อง

* Bayer Germany

เตรียมใหม่ทุก ๆ ครั้งเมื่อจะทำการเพาะเลี้ยงที่

เอา sample ใส่หลอดแก้ว centrifuge ประมาณ 10 มล. แล้วเติมน้ำยา ZAP ลงไปเท่าตัวผสมให้เข้ากันดีแล้ว นำหลอดแก้วใส่ water bath ที่ 37°C นาน 30 นาที หรือเอาเข้าตู้บ่ม ที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเอาหลอดแก้วไป centrifuge ที่ 2000 r.p.m. นาน 15 นาที เทเอาส่วนน้ำทิ้งใช้ swab บ้ายหรือ capillary pipet ดูประมาณ 0.1 มล. ใส่ลง slant media อย่างน้อย 2 หลอด แล้วปิดจุกเกลียวอย่าให้แน่น ปลอยให้น้ำบน slant media แห้งก่อน จึงปิดจุกเกลียวแน่นพอควร แล้วเอาหลอดแก้ว culture เข้าตู้บ่มในบรรยากาศ 10% คาร์บอนไดออกไซด์

เอาตะกอนส่วนที่เหลือ smear บน slide และย้อมด้วย Kinyoun ตามวิธีข้างต้น แล้วนำ slide ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ ส่วนมากเตรียมเป็น slant ในหลอดแก้วจุกเกลียว บางแห่งเตรียมเป็น plate media ที่ใช้โดยทั่วไปก็มี Lowen stein Medium, Lowen stein-Jensen Medium, Middlebrook 7H 10 Medium, Tarshis penicillin glycerol Blood Agar, Dubos Broth, Dubos Agar.

การบ่มเชื้อ

ปกติเอา culture เข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศธรรมดา (Aerobe) เมื่อเพิ่มบรรยากาศให้มีคาร์บอนไดออกไซด์ 10% จะทำให้เชื้อที่บ่มเจริญได้ดี โคโลนีจะโตและเจริญเป็นจำนวนมากกว่าบรรยากาศธรรมดา

การอ่านผลอาหารที่เพาะเชื้อแล้ว

ดู culture หูอาทิตย์ ถ้ามีโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นทบีให้ย้อม A.C.F. ดูโคโลนีของทบีเมื่อขึ้นบน slant จะมีลักษณะแบน คล้ายดอกกระหล่ำ มีสีขาวนวล, แข็ง, ละลายน้ำได้ยาก

ถ้าเป็น Atypical strain จะมีสีทอง ถึงสีม่วงแดง ถ้าเชื้อไม่ขึ้น ทั้งหลอดแก้วไว้ในตู้บ่ม

จนครบ 8 อาทิตย์ จึงรายงานว่า T.B. culture negative for T.B.

Identification

1. ให้ย้อม A.C.F. จากโคโลนีที่ขึ้นบน media และหา acid fast bacilli จากกล้องจุลทัศน์จะเห็น A.C.F. bacilli จะติดสีแดง บางตัวจะติดสีเข้มเป็นจุด ๆ คือ เป็น bead หรือเป็น pleomorphic ของเชื้อทบี คล้าย diphtheria แต่ตัวเชื้อทบีจะพอมกว่า

2. ดู Cord formation

ก. ดูจากโคโลนีที่ขึ้นบน media (plate) โดยใช้กล้องจุลทัศน์ขยาย 100 เท่า (ดูด้วยหัว low) สำหรับ M.tuberculosis จะดู

cord ได้ 90.8% ถ้าเป็น Atypical Mycobacteria จะดูไม่ได้ต้องย้อม A.C.F

ข. ดูจากการย้อม A.C.F โคโลนีของเชื้อที่มีพื้นบน solid media บน slide แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทัศน์โดยใช้ oil immersion lens วิธีนี้จะดูได้ทั้ง *M. tuberculosis* และ Atypical mycobacteria

ค. ดูได้จากการย้อม A.C.F จาก liquid media เช่น Dubos Broth เชื้อที่บีบเป็นสาเหตุของวัณโรคของคนจะ form cord ที่เรียกว่า serpentine cord เชื้อที่บีบที่ไม่ใช่สาเหตุจะไม่ form cord

3. Niacin test เชื้อ Human tuberculosis จะให้ niacin positive อย่างแรง ส่วน เชื้อ *M. bovis*, *M. ulcerans* (ที่เป็นสาเหตุของวัณโรคผิวหนัง) จะให้ niacin positive อย่างอ่อน

วิธีทำ

ชุดเอาโคโลนีเชื้อที่มีมา 3-5 โคโลนี ใส่ porcelian spot plate หยดน้ำกลั่นลงไป 5 หยด ทิ้งไว้ 5-10 นาทีหลังจากนั้นเติม 2 หยด ของ 4% aniline ใน 95% ethanol ให้สีน้ำใสและเติม 2 หยดของ 10% aqueous cyanogen bromide น้ำยาทั้งสองอย่างนี้ต้องเก็บในขวดสีน้ำตาล และเก็บไว้ในตู้เย็นได้นานหนึ่งเดือนจะต้องเตรียมใหม่ทุกเดือน

ปกติถ้าจะมีสีเหลือง ถ้า niacin positive จะเกิดเป็นสีชมพูขึ้นที่หน้า

4 Catalase activity เชื้อ A.C.F bacilli จะสร้างน้ำย่อย catalase ซึ่งจะทดสอบได้โดยการเติม Hydrogen peroxide ลงไป catalase จะ break down Hydrogen peroxide ให้แกสออกซิเจน

การทดสอบหา catalase ใช้วิเคราะห์ได้ 2 อย่าง

ก. เชื้อที่บีบที่ต้านยา Isoniazide จะให้ catalase น้อยหรือ negative

ข. เชื้อที่บีบ Human หรือ bovine type น้ำย่อย catalase จะถูกทำลายด้วยความร้อน

วิธีทำ

1. ทดสอบที่อุณหภูมิห้องธรรมดาโดยหยด 0.5 มล. ของ 1:1 ของ 10% Tween 80 กับ 30% hydrogen peroxide บน culture slant (ที่ไม่มีเลือด) positive test จะเห็นแกสออกซิเจนผลุดขึ้นภายใน 2 นาที

2. ชุดโคโลนีของเชื้อที่บีบละลายใน phosphate buffer pH7, 0.5 ml. ในหลอดแก้ว จุกเกลียว เอาต้มที่ 68°C นาน 20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติม 0.5 มล. ของน้ำยาผสมของ Tween 80 กับ hydrogen peroxide (v:v=1:1) สังเกตดูแกสออกซิเจน

ที่เกิดขึ้นเหมือนครั้งแรก

5. Neutral Red test เชื้อที่บีบเป็นสาเหตุของวัณโรคสามารถจับสี neutral red ในน้ำยาที่เป็นด่าง ส่วนเชื้อที่บีบไม่เป็นสาเหตุของวัณโรคจะไม่จับสี neutral red

วิธีทำ

ชุดเอาโคโลนีจาก culture slant ใส่หลอด centrifuge ที่มีจุลเกลียวขนาด 15 มล. เติม 5 มล. ของ Methanol เอาเข้าตู้ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วเอาหลอดแก้วมาปั่น ให้โคโลนีตกลงก้นหลอดแก้ว เทเอา Methanol ทั้ง เติม Methanol ลงไปล้างซ้ำอีก (เชื้อที่จะทดสอบต้องไม่แก่เกิน 3 อาทิตย์) ละลายเชื้อที่บีบใน 5% sodium chloride และ 1% sodium barbiturate เติม 1 มล. ของ 20% neutral red ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที น้ำยาจะมีสีเหลือง ส่วน pathogenic Mycobacteria tuberculosis จะมีโคโลนีเป็นสีม่วงหรือแดง ส่วนเชื้อ Nonpathogenic Mycobacteris tuberculosis จะมีโคโลนีเป็นสีเหลืองอย่างเดิม

6. Auramine test เชื้อ Mycobacterium tuberculosis เมื่อบีบโคโลนีบนกระดาษกรองที่จุ่ม auramine ซึ่งมีสีเหลืองสดแล้วหยด 0.5% sodium hydroxide สีเหลืองของ Auramine รอบๆ โคโลนี จะคงทนอยู่นานกว่า 2 นาที ส่วน nonpathogenic Mycobac-

terium tuberculosis สีของ Auramine รอบๆ โคโลนีจะถูก decolorize หมดเกลี้ยง Unclassified Mycobacterium สีจะเปลี่ยนไปจากสีเหลืองเป็นสีอิฐ

7. Thioglycollate test* เป็นการทดสอบการเจริญของเชื้อที่บีบเชื้อ Mycobacterium tuberculosis จะไม่เจริญใน Thioglycollate Medium, Unclassified Mycobacteria เจริญได้ภายใน 2-4 สัปดาห์ ส่วน saprophytic strain เจริญได้ดี (1-2 วัน) เมื่อเชื้อเจริญจะต้องย้อม ACF ดู เพื่อให้แน่ใจว่าความขุ่นของ Thioglycollate medium ไม่ได้เกิดจาก flocculent ของ Agar หรือเกิดจาก crystalline ของ material

น้ำยาและอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเป็น

1. Acid-fast stain (Kinyoun carbolfuchsin)

Basic fuchsin	4 GM.
phenol	8 ML.
Alcohol, 95%	20 ML.
Distilled water	100 ML.

ละลาย Basic fuchsin ใน alcohol แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย ขณะที่เติมต้องเขย่าไปด้วย จนครบ 100 มล. ละลาย (melt) phenol ที่ 56°C ใน water bath ใช้ pipette ดูดมา 8 มล. เติกลงไป

* Thioglycollate medium without indicator

2. Acid alcohol

Hydrochloric acid, concentrated 3 Ml.

Ethanol, 95% 97 ml.

3. Counter stain (Methylene blue)

Methylene blue 0.3 gm.

Distilled water 100 ml.

Trashis penicillin-blood agar medium

Plain agar 1.5 gm.

Glycerol, analytical grade 1 ml.

Human bank blood (with ACD solution)
25 ml.

Distilled water 74 ml.

Penicillin, crystalline potassium G

50-100 units per milliliter *

(Final pH, approximately 6.3)

วิธีทำ ละลายเอการ์ใน glycerol-water
โดยการต้ม sterilize โดย autoclave ที่ 15
pounds (121°C) นาน 15 นาที ทำให้เย็น

ใน water bath 45°C แล้วเติมเลือดลงไป
พร้อมกับยา เพนนิซิลลิน ผสมให้ดีแล้วเอาใส่
หลอดแก้วจุดเกลียว วาง slant เมื่อเอการ์เย็น
ตัวให้เก็บ media นี้ไว้ในตู้เย็น

Thioglycollate medium without indicator

peptone 20 gm.

L-Cystine 0.25 gm.

glycerol 6 gm.

sodium Chloride 2.5 gm.

sodium thioglycollate 0.5 gm.

sodium sulfite 0.1 gm.

Agar 0.7 gm.

Distilled water 1,000 ml.

(Final pH 7.2 ±)

Medium นี้เมื่อใส่ในหลอดแก้วแล้ว จะต้อง
ให้มีส่วนลึก 7 ซม. sterile ใน Autoclave
ที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วเก็บ medium
ไว้ในอุณหภูมิห้องธรรมดา .

* ให้ 100 units ถ้า media นั้นเก็บนานกว่า 1 เดือน

References

1. Bailey and Scott. Diagnostic Microbiology, Saint Louis, The C.V. Mosby Company, Second Edition, 1966, p.191.
2. Beam, R.E. and Kubica, G.P.: Stimulatory Effects of Carbondioxide on the Primary Isolation of Tubercle Bacilli on agar-containing Medium. Tech. Bull. Reg. Med. Techn. 38:215-217, 1968.
3. Kestle, D.G. and Kubica, G.P.; Sputum collection for cultivation of Mycobacteria an early morning specimen or the 24-27 hours pool. Tech. Bull. Reg. Med. Techn. 37:213-215, 1967.
4. Lorian, V.: Direct Cord reading agar in routine Mycobacteriology, App. Micro. 17:559-562, 1969.
5. Morse, W.C., Blair, E.B., Weiser, O.L., Sproat, E.F.: Mycobacteriology Laboratory Methods. U.S. Army Medical Research & Nutrition Lab. Denver, Colorado, May 1968.
6. Natre, S. and Kampol, P.: Tuberculosis in Nakorn Chiang Mai Hospital. Bull. Chiang Mai Med. Techn. 1:43-48, 1968.
7. Oatway, W.H., Salkin, D., Wilson, N. J., Thedos, P.A., and Wolinsky, E.: Diagnostic Standard and Classification of Tuberculosis. N.T.A. 1790 Broadway, New York 19, 1961, p. 16-25.