



บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดมีจำนวน 113 สายพันธุ์ แบ่งเป็น เชื้อมัยโคแบคทีเรีย ชนิดเจริญเร็วที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม 53 สายพันธุ์, เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 36 สายพันธุ์ และเป็นเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงอีก 24 สายพันธุ์ รายละเอียดแหล่งที่มาของเชื้อ แสดงไว้ใน ตารางที่ 4-6

1. วิธีดำเนินการแยกเชื้อจากสิ่งแวดล้อม

1.1 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่นำมาแยกหาเชื้อคือ ดินโคลนเลน, ฝุ่นผงหรือ ดินที่อยู่ลึกประมาณ 10 เซนติเมตร จากผิวดิน, น้ำทะเล, น้ำกร่อยจากแม่น้ำ, น้ำคลองต่าง ๆ และน้ำประปา

1.2 สถานที่เก็บตัวอย่าง ใช้เขตการจ่ายน้ำประปาของการประปานครหลวง เป็นหลักซึ่งมีอยู่ 10 เขต โดยเก็บเขตละ 2 จุดห่างๆ กัน ยกเว้นเขตจ่ายน้ำสมุทรปราการ จะเก็บเพียงจุดเดียว(จุดที่ 1-19) ตามแผนผังรูปที่ 1 ก. นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดใกล้เคียงที่ติดทะเล(จุดที่ 20-39) ดังแสดงในแผนที่รูป 1 ข.รวมทั้งสิ้น 39 จุด รวม 136 ตัวอย่าง และตัวอย่างจะเก็บจากบริเวณเดียวกันหรือใกล้เคียงกันโดยแสดงจุดที่เก็บและชนิดของตัวอย่างที่เก็บในแต่ละจุดไว้ในตารางที่ 3

1.3 วิธีเก็บตัวอย่าง

1.3.1 น้ำคลอง ใช้ภาชนะที่ปราศจากเชื้อเก็บตัวอย่างจากน้ำคลองตามแหล่งต่างๆให้ได้ประมาณ 1000 มิลลิลิตร ปิดภาชนะให้แน่นนำกลับมาดำเนินการย้งห้องปฏิบัติการ

1.3.2 น้ำทะเล ใช้ภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างน้ำทะเลให้ได้ ประมาณ 1000 มิลลิลิตร ปิดภาชนะให้แน่นนำกลับมาย้งห้องปฏิบัติการ

1.3.3 น้ำประปา ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.3.1 และ 1.3.2 แต่การเก็บตัวอย่างจะใช้ภาชนะรองเอาจากก๊อกน้ำโดยเปิดทิ้งก่อนช่วงหนึ่ง แล้วจึงเก็บตัวอย่างประมาณ 1000 มิลลิลิตร ปิดภาชนะนำกลับมาย้งห้องปฏิบัติการ

1.3.4 ดินโคลนเลน ใช้เครื่องมือสำหรับตักดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างจากที่แหล่งน้ำในข้อ 1.3.1 ให้ได้น้ำหนักประมาณ 50-100 กรัม. ใส่ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อแล้วปิดฝาภาชนะให้แน่นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ

1.3.5 ฝุ่นผงหรือดินลึก 10 เซนติเมตร ใช้ช้อนขนาดเล็กหรือที่ตักดินที่ปราศจากเชื้อเก็บตัวอย่างจากบริเวณริมถนน, ริมทางเท้า, ผิวดินหรือดินที่อยู่ลึกลงไปประมาณ 10 เซนติเมตร ที่อยู่บริเวณใกล้กับแหล่งน้ำในภาชนะที่ปราศจากเชื้อเช่นกัน ประมาณ 10-50 กรัม. ปิดฝาภาชนะให้แน่นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ

1.3.6 น้ำกร่อยหรือน้ำจากแม่น้ำ ใช้ภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างน้ำกร่อยบริเวณแม่น้ำท่าจีนและแม่น้ำแม่กลอง ประมาณ 1000 มิลลิลิตร ปิดฝาภาชนะให้แน่นแล้วนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ

2. ขั้นตอนการแยกเชื้อ มัยโคแบคทีเรีย

แผนผังขั้นตอนการแยกเชื้อได้แสดงไว้ในรูปที่ 2

2.1 น้ำคลอง, น้ำทะเล และน้ำกร่อย

นำตัวอย่างมาใส่ภาชนะสำหรับปั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบ (2160 g.) นาน 30 นาที (Windshield MSE Rotor :- 43124-708, BS 4402 No. 851027) เพื่อส่วนในหลอดแก้วขนาด 13x100 มิลลิเมตร ประมาณ 10 มิลลิลิตร. 2 หลอด และปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว, เวลา เท่าครั้งแรก เพื่อส่วนในตั้งเอาตะกอนมารวมกัน จากนั้นใส่สารผสมระหว่าง 0.06% benzalkonium chloride ใน 10% trisodium phosphate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆที่ปนเปื้อนอยู่ แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว, เวลา เท่าครั้งแรก จากนั้นเก็บตะกอนมาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9 % ที่ปราศจากเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตร โดยปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบนาน 30 นาที จากนั้นใช้ Pasteur pipett ตูดตะกอนมาใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein - Jensens ชนิดธรรมดาและชนิดพิเศษที่ผสมยา antibiotic 3 ชนิดคือ lincomycin, spiramycin และ cycloheximide ในความเข้มข้น 4, 2 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ตัวอย่างละ 3 หลอด แล้วนำมาเข้าตู้อบเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 เดือน จนมีโคลนของเชื้อปรากฏให้เห็นจึงนำโคลนบางส่วนมาทำการย้อมสีด้วยวิธี Ziehl Neelsen (60) เพื่อคัดคุณสมบัติการเป็น acid - fast เป็นการยืนยันครั้งแรก จากนั้นทำเชื้อให้บริสุทธิ์ (purified) และขยายพันธุ์ (subculture) เตรียมไว้ใช้

ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อต่อไป

2.2 น้ำประปา

นำตัวอย่างน้ำประปาประมาณ 1000 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง (membrane filter) ที่มีขนาดรู (pore size) 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำแผ่นกระดาษกรองนั้นมาปั่นให้ละเอียดในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9% ที่ปราศจากเชื้อปริมาณ 20 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (high speed homogenizer) จนแหลกละเอียดจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายแขวนตะกอนมาใส่ในหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด แล้วปฏิบัติต่อไปเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำคลอง ในข้อ 2.1

2.3 ดินโคลนเลน, ฝุ่น, ดินลิก 10 เซนติเมตร

นำตัวอย่างดิน, ฝุ่น หรือดินลิกประมาณ 10 เซนติเมตร มาผสมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9% ที่ปราศจากเชื้อในปริมาณอัตราส่วน น้ำหนัก : ปริมาตร = 1:2 เขย่าแรง ๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นใช้ปิเปตดูดส่วนในสมาปฏิบัติเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำคลอง และน้ำประปา

3. เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย ได้รับมาโคโลนี (primary culture) จากสถานที่ต่าง ๆ จำนวน 36 สายพันธุ์ ดังนี้

3.1 กองวัดโรค โดย นพ.ประชา เขียววิทย์ จำนวน 17 สายพันธุ์

3.2 โรงพยาบาลโรคทรวงอก โดย พญ.ศรีบุศย์ วงศ์วัฒนะ จำนวน 5 สายพันธุ์

3.3 โรงพยาบาลศิริราช โดย อ.นงนุช วัฒนชัยนาคม จำนวน 8 สายพันธุ์

3.4 โรงพยาบาลศิริราช โดย พญ.เสาวรส อิมวิทยา จำนวน 1 สายพันธุ์

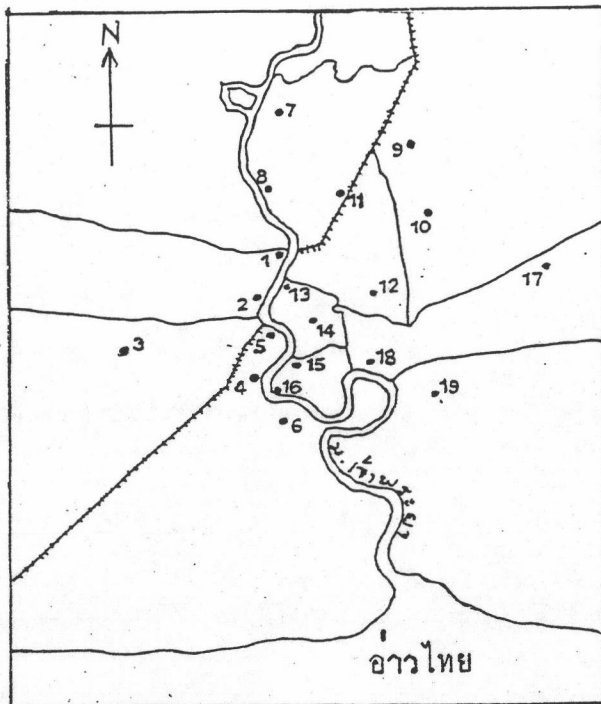
3.5 โรงพยาบาล สยามบรมราชกุมารี โดย พญ.อาภรณ์ บุญยเกียรติกุล

จำนวน 5 สายพันธุ์

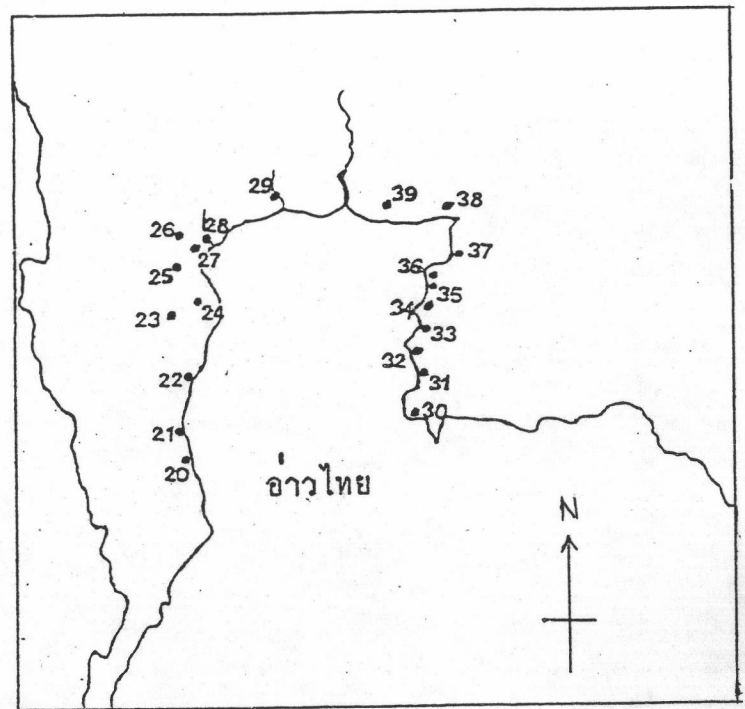
รายละเอียดแสดงไว้ใน ตารางที่ 5

4. เชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (reference strains) จำนวน 24 สายพันธุ์

รายละเอียดแสดงไว้ใน ตารางที่ 6



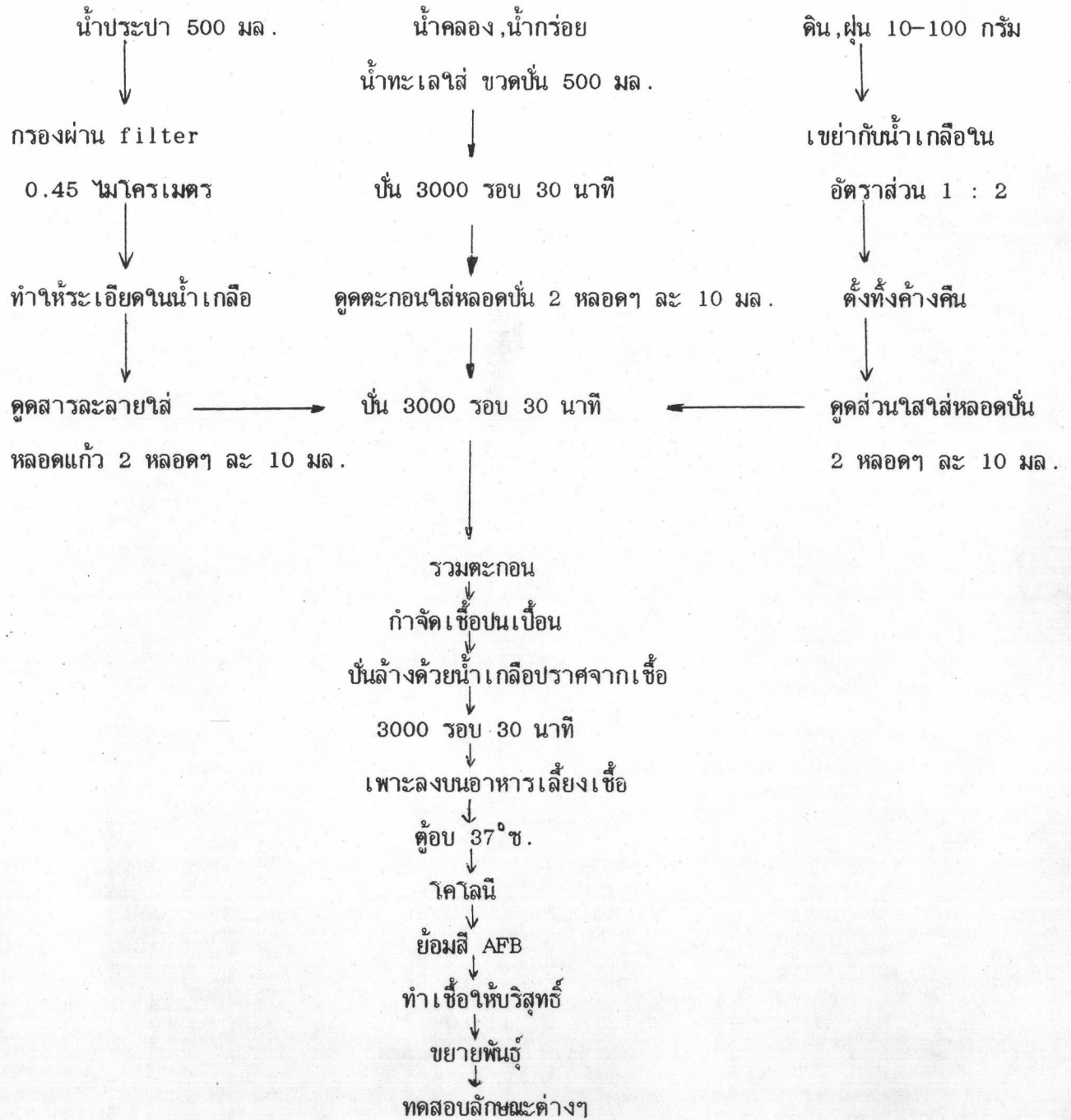
ก.



ข.

รูปที่ 1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างจากเขต กทม.(ก) และจังหวัดใกล้เคียงที่ติดทะเล (ข)

- | | | |
|----------------------|--------------------|---------------------------|
| 1. บางกรวย | 14. สะพานหัวช้าง | 27. กม.78 ชนบุรี - ปากท่อ |
| 2. สะพานอรุณอมรินทร์ | 15. วัดยานนาวา | 28. แม่กลอง |
| 3. บางแค | 16. สะพานกรุงเทพฯ | 29. ท่าจีน |
| 4. ดาวคนอง | 17. หมู่บ้านเสรี | 30. สัตหีบ |
| 5. คลองบางกอกใหญ่ | 18. ช่องนนทรี | 31. บางเสา |
| 6. บางปะกอก | 19. บางจาก | 32. พัทยา |
| 7. ห้าแยกปากเกร็ด | 20. ปากน้ำปราณบุรี | 33. ศรีราชา |
| 8. นนทบุรี | 21. หัวหิน | 34. บางละมุง |
| 9. หลักสี่ | 22. ชะอำ | 35. บางแสน |
| 10. สะพานวังหิน | 23. เพชรบุรี | 36. อ่างศิลา |
| 11. ลาดยาว | 24. เขาย้อย | 37. ชลบุรี |
| 12. สามเหลี่ยมดินแดง | 25. ท่าช้าง | 38. บางปะกง |
| 13. วัดโบสถ์สามเสน | 26. ปากท่อ | 39. บางพลี |



รูปที่ 2 แผนผังแสดงขั้นตอนการแยกเชื้อมัยโคแบคทีเรียจากตัวอย่างต่างๆ



ตารางที่ 3 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างชนิดต่างๆ

จุดที่เก็บ	สถานที่	ชนิดของตัวอย่าง					
		น้ำประปา	น้ำคลอง	น้ำทะเล	น้ำกร่อย	ดินโคลน	ฝุ่นผง
1	บางกรวย	✓	✓			✓	✓
2	สะพานอรุณอมรินทร์	✓	✓			✓	✓
3	บางแค	✓	✓			✓	✓
4	ดาวคนอง	✓	✓			✓	✓
5	คลองบางกอกใหญ่	✓	✓			✓	✓
6	บางปะกอก	✓	✓			✓	✓
7	ห้าแยกปากเกร็ด	✓	✓			✓	✓
8	นนทบุรี	✓	✓			✓	✓
9	หลักสี่	✓	✓			✓	✓
10	สะพานวังหิน	✓	✓			✓	✓
11	ลาดยาว	✓	✓			✓	✓
12	สามเหลี่ยมดินแดง	✓	✓			✓	✓
13	วัดโบสถ์สามเสน	✓	✓			✓	✓
14	สะพานหัวช้าง	✓	✓			✓	✓
15	วัดยานนาวา	✓	✓			✓	✓
16	สะพานกรุงเทพฯ	✓	✓			✓	✓
17	หมู่บ้านเลวี	✓	✓			✓	✓
18	ช่องนนทรี	✓	✓			✓	✓
19	บางจาก	✓	✓			✓	✓
20	ปากน้ำปรวานบุรี				✓	✓	✓
21	หัวหิน				✓	✓	✓
22	ชะอำ				✓	✓	✓
23	เพชรบุรี		✓			✓	✓
24	เขาย้อย		✓			✓	✓

จุดที่เก็บ	สถานที่	ชนิดของตัวอย่าง					
		น้ำประปา	น้ำคลอง	น้ำทะเล	น้ำกร่อย	ดินโคลน	ฝุ่นผง
25	ท่ายาง		✓			✓	✓
26	ปากท่อ		✓			✓	✓
27	กม. 78 ชลบุรี-ปากท่อ					✓	✓
28	แม่กลอง		✓		✓	✓	✓
29	ท่าจีน				✓	✓	✓
30	สัตหีบ		✓	✓		✓	✓
31	บางเสวี		✓	✓		✓	✓
32	พืथा		✓	✓		✓	✓
33	ศรีราชา		✓	✓		✓	✓
34	บางละมุง		✓			✓	✓
35	บางแสน					✓	✓
36	อ่างศิลา					✓	✓
37	ชลบุรี					✓	✓
38	บางปะกง					✓	✓
39	บางพลี					✓	✓

ตารางที่ 4 แหล่งที่มาของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมที่นำมาศึกษา Numerical Taxonomy

จำนวน 53 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ตัวอย่าง	จำนวน	พื้นที่จุดเก็บ*	ได้รับจาก
S068,S015,S178,S067,S016,S134	น้ำประปา	6	9,17,8,15,17,3	แยกได้เอง
S119,S026,S007,S060,S057,S039	น้ำคลอง		34,16,12,8,7,14	"
S122,S014,S021,S047,S013,S061			30,18,6,5,15,1	"
S023,S170,S109,S037,S130,S058		18	4,18,10,13,11,7	"
002B,003B,006B,007B	น้ำคลอง	4	-	นางนุช วัฒนชัยนาคม
S159,S147	น้ำทะเล	2	30,31	แยกได้เอง
S095	น้ำกร่อย	1	29	"
S001,S187,S111,S171,S041,S002	ดินโคลนเลน		15,37,14,9,2,12	"
S044,S168,S186,S053		10	2,7,25,17	"
S079,S042,S114,S082,S005,S112	ฝุ่นผง		19,6,31,23,15,31	"
S085,S003,S031,S156,S118,S091		12	28,15,12,19,34,26	"

* คูรูปที่ 1 ก และ 1 ข

ตารางที่ 5 แหล่งที่มาของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 36 สายพันธุ์

สายพันธุ์	จำนวน	แหล่งที่มา
7121 ,R121 ,8192 ,6056 ,3483 ,5272 ,4206 2872 ,2983 ,S983 ,019A ,028A ,031A ,001A 002A ,014A ,018A F ,C ,H ,E , SSBB	17 5	นพ.ประจำ เชียงวิทย์ กองวิมโรค พญ.ศรีบุศย์ วงศ์วัฒนะ รพ.โรคทรวงอก นนทบุรี
1319 ,1323 ,0001 ,0002 ,4954	5	พญ.อาภรณ์ บุญยเกียรติกุล รพ.สมาคมปราบวัณโรคฯ
029A ,009A ,010A ,008A ,007A ,006A ,005A 004A	8	อ.นงนุช วัฒนชัยนาคม รพ.ศิริราช
0019	1	พญ.เสาวรส อิมวิทยา รพ.ศิริราช

ตารางที่ 6 แหล่งที่มาของเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่พิสูจน์ชนิดแล้ว (reference strains)

จำนวน 24 สายพันธุ์

Strains	Species	Receive from*
ATCC 23043	<u>M. fortuitum</u>	Dr. H.C. Engbaek ¹
ATCC 23048	<u>M. fortuitum</u>	"
ATCC 14474(T)	<u>M. flavescens</u>	"
ATCC 23035	<u>M. flavescens</u>	"
ATCC 23032	<u>M. smegmatis</u>	"
ATCC 14468(T)	<u>M. smegmatis</u>	"
ATCC 19249	<u>M. phlei</u>	"
ATCC 23042	<u>M. phlei</u>	"
ATCC 23005	<u>M. vaccae</u>	"
ATCC 23016	<u>M. chelonae</u>	"
ATCC 23366	<u>M. aurum</u>	M. Tsukamura ³
ATCC 25795	<u>M. neoaurum</u>	"
30004	<u>M. austroafricanum</u>	"
30005	<u>M. austroafricanum</u>	"
MNC 927	<u>M. fortuitum</u>	Dr. M. Magnusson ²
MNC 455	<u>M. vaccae</u>	"
MNC 451	<u>M. chitae</u>	"
MNC 442	<u>M. duvalii</u>	"
MNC 974	<u>M. aurum</u>	"
S-458	<u>M. lactis</u>	"
S-586	<u>M. neolactis</u>	"
0152	<u>M. neolactis</u>	ดร. เกียรติศักดิ์ สายธนู ⁴
0182	<u>M. selandiae</u>	"
0139 a	<u>M. selandiae</u>	"

(T) = Type strain.

1 Dr. H.C. Engbaek.,Head of the Tuberculosis Department

Statens Seruminstitut,Copenhagen.

2 Dr. M. Magnusson.,Head of the Tuberculin department

Statens Seruminstitut, Copenhagen.

3 Dr. M. Tsukamura. The National Chubu Hospital,Obu,Aichi 474,Japan.

4 อ. นสพ. ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตว-
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย