จุลชีววิทยาของมัยโคแบคทีเรีย

ศุภร ฟุ้งลัดดา*
ประเสริฐ ทองเจริญ†

สกุล *Mycobacterium* มีเชื้อก่อโรคหลายชนิดพันธุ์ โดยเฉพาะในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex เช่น เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) และเชื้อโรคเรื้อน (*M. leprae*). นอกจากนี้ยังมีเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมอีกหลายชนิดพันธุ์ที่เรียกกลุ่มนี้ว่า nontuberculous mycobacteria (NTM). แต่เดิมเรียกกลุ่มนี้ว่า atypical mycobacteria หรือ mycobacteria other than tubercle bacilli ซึ่งก่อโรคติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียม (mycobacterioses) หลายรูปแบบ.

การจัดหมวดหมู่

ในวงศ์ *Mycobacteriaceae* มีสกุลเดียวคือ *Mycobacterium* เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวกอ่อน ๆ รูปร่างเป็นท่อนเรียว ขนาดกว้าง ๐.๓-๐.๖ ไมโครเมตร และยาว ๑-๔ ไมโครเมตร, ไม่เคลื่อนที่, ไม่สร้างสปอร์, มีปริมาณกวานีน และศัยโทสีน (G+C) ในดีเอนเอ สูงถึงร้อยละ ๖๑-๗๑ (ยกเว้น *M. leprae* มีร้อยละ ๕๕) และผนังเซลล์มีไขมันเป็นส่วนประกอบปริมาณมาก, เป็นกรดไขมัน (กรดมัยโคลิค) ต่อเป็นสายยาว ซึ่งแต่ละชนิดพันธุ์มีสัดส่วนองค์ประกอบแตกต่างกัน. แบคทีเรียอื่นที่มีโครงสร้างผนังเซลล์และลักษณะชีวภาพคล้ายกับสกุลนี้ ได้แก่ *Nocardia, Corynebacterium, Rhodococcus, Gordona, Tsukamurella* และ *Dietzia*. ไขมันนี้เป็นองค์ประกอบมากกว่าครึ่งของน้ำหนักแห้ง ซึ่งเป็นแหล่งให้คาร์บอนและพลังงานแก่แบคทีเรีย และมีผลถึงโครงสร้างและหน้าที่ของทั้งเยื่อหุ้มเซลล์และออร์แกเนลล์ภายในเซลล์. สัดส่วนของไขมันที่ประกอบมีการเปลี่ยนแปลงตามวงชีพการเพาะเลี้ยงและขึ้นกับสารอาหาร. ผนังเซลล์เช่นนี้แสดงลักษณะจำเพาะของมัยโคแบคทีเรียม ได้แก่ การติดสีทนกรด (acid fastness), การแยกจากสารน้ำ (hydrophobicity), ความทนทานต่อการบาดเจ็บจากสิ่งที่มากระทบ รวมทั้งโดยยาปฏิชีวนะ, และหลบรอดจากระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างดี, อีกทั้งทำให้การเจริญเติบโตช้าโดยการจำกัดอาหารที่นำเข้าในเซลล์.

Mycobacterium มีหลายชนิดพันธุ์ ส่วนมากอาศัยแบบอิสระในธรรมชาติและมักไม่ก่อโรค, มีเพียงไม่กี่ชนิดพันธุ์ที่สามารถก่อโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยอาศัยใน mononuclear phagocytes. มัยโคแบคทีเรียที่ไม่สามารถอยู่อาศัยอิสระในสิ่งแวดล้อม จำเป็นต้องอยู่ในผู้เหย้าคือ *Mycobacterium leprae, Mycobacterium lepraemurium, Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* และกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (โคล และคณะ, ๒๕๔๑). *M. tuberculosis* complex สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงได้ แต่ *M. leprae* and *M. lepraemurium* ต้องเพาะเลี้ยงในเซลล์เท่านั้น .

*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, †สำนักวิทยาศาสตร์ ราชบัณฑิตยสถาน

เชื้อก่อโรคที่อยู่ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex สามารถก่อวัณโรคในสัตว์และเป็นรังโรคได้คือ *M. tuberculosis* และ subtypes เช่น *M. africanum* และ *M. canettii* เป็นเชื้อก่อวัณโรคมนุษย์, *M. bovis* และ *M. microti* เป็นเชื้อก่อวัณโรคสัตว์ที่สามารถติดมายังมนุษย์ได้, บางสายพันธุ์ก่อโรคแพะคือ *M.caprae* และแมวน้ำคือ *M. pinnipedi* ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ *M. bovis* แสดงให้เห็นว่ามัยโคแบคทีเรียสามารถวิวัฒนาการเพื่ออาศัยในผู้เหย้าที่แตกต่างกันไป. เชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex และชนิดพันธุ์ที่ทำเป็นวัคซีน Calmette-Guérin (BCG) มีลักษณะแสดงออกทางชีวภาพคล้ายกัน และมีหน่วยพันธุกรรม (ยีน)ใกล้เคียงกันมาก.

ตาราง: ลำดับการจัดหมวดหมู่ของเชื้อวัณโรค (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=1763&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock)

Kingdom	Bacteria
Phylum	Actinobacteria
Class	Actinobacteria
Subclass	Actinobacteridae
Order	Actinomycetales
Suborder	Corynebacterineae
Family	Mycobacteriaceae
Genus	*Mycobacterium* (สกุลเดียวในวงศ์ มัยโคแบคทีริอาศีอี)
Species	*M. tuberculosis*
	M. bovis
	M. africanum
	M. microti
	M. canettii
	M. caprae
	M. pinnipedii

จุลสัณฐานวิทยา (Microscopic morphology)

ลักษณะที่เห็นทางกล้องจุลทรรศน์ไม่สามารถแยก *M. tuberculosis* (เชื้อวัณโรค) ออกจากมัยโคแบคทีเรียอื่นได้. เมื่อย้อมด้วย carbol fuchsin หรือ auramine ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เห็นรูปร่างเป็นเส้นสั้น ๆ โค้งเล็กน้อย ขึ้นกับสภาพที่เชื้ออาศัยเติบโตและอายุเชื้อ. บางครั้งอาจมีลักษณะเป็นเส้นสั้นหรือยาว ขนาดกว้าง ๐.๒-๐.๖ ไมโครเมตร ยาว ๑-๑๐ ไมโครเมตร (ส่วนใหญ่ยาว ๓-๕ ไมโครเมตร) ประมาณเทียบเท่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสเม็ดเลือดขาวลิย์มโฟ-ซัยต์. เชื้อวัณโรคไม่มีลักษณะรูปร่างหลากหลายต่างจากมัยโคแบคทีเรียกลุ่มโตเร็วและแบคทีเรียอันดับ actinomycetales. เชื้อวัณโรคไม่ยืดยาวเป็นสายและไม่แตกกิ่ง ทั้งในสิ่งส่งตรวจ และในการเพาะเลี้ยง. แต่ในการศึกษาการติดเชื้อในแมโครเฟจ พบว่าเชื้อวัณโรคมีความยาวมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารปรกติ และมีลักษณะคล้ายแตกหน่อได้ (ซอแฮน, ๒๕๔๙).

การติดสีแดงทนกรดของเชื้อนั้นจะติดได้สวยงามดีถ้าเป็นเชื้อกำลังเจริญเติบโตดี และจะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนคล้ายฟ่อนฟาง เช่นเดียวกับเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากผิวเซลล์เป็นสารกลัวน้ำ (hydrophobic). เชื้อในเนื้อ

ปอดผู้ป่วยอยู่ในเซลล์ชนิดจับกิน (phagocytic cells) เมื่อได้รับยารักษา เชื้อตายลง ทำให้ปริมาณเชื้อในเสมหะลดลงและติดสีจางลง เนื่องจากส่วนประกอบในเซลล์ลดลง.

ในเซลล์เชื้อวัณโรคมี lipid vacuoles (การ์ตอน, ๒๕๔๕) เป็นแหล่งสะสมอาหาร ทำให้การติดสีไม่สม่ำเสมอเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา. เมื่อดูด้วยกล้องอีเล็กทรอนเห็นเม็ดฝอยพอลีย์ฟอสเฟต ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่มีกระบวนการ oxidation-reduction เกิดขึ้น (เบรนแนน, ๒๕๓๗) และพบเยื่อหุ้มเซลล์ม้วนเป็นชั้นพันเข้าในเซลล์เป็นก้อนหรือแผ่นเพื่อช่วยกระบวนการเมแทบอลิสม.

สายพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค

การศึกษาลำดับเบสโดยสมบูรณ์ของสายพันธุกรรม (จีโนม) ของเชื้อวัณโรคชนิดพันธุ์มาตรฐาน (*M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv) รายงานโดยโคลเมื่อ พ.ศ. ๒๕๔๑ ทำให้ทราบว่าสายพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคเป็นโครโมโซมสายกลม มี ๔.๔๑๑๕๒๙ ล้านเบส มีองค์ประกอบของ G+C เป็นร้อยละ ๖๕.๖. สายพันธุ์ H37Rv นี้เพาะแยกได้เมื่อ พ.ศ. ๒๕๔๘ และใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วโลก เนื่องจากมีความสามารถก่อโรคในสัตว์ทดลองและไม่ดื้อยา.

เชื้อวัณโรคประกอบด้วยหน่วยพันธุกรรมประมาณ ๔,๐๐๐ หน่วย ส่วนมาก (ประมาณ ๒๕๐ หน่วย) คิดเป็นร้อยละ ๖ ของทั้งหมด เป็นหน่วยพันธุกรรมสำหรับการสร้างเอนซัยม์ในกระบวนการเมแทบอลิสมของกรดไขมัน คือการย่อยสลายไขมันเพื่อการดำรงชีพในผู้เหย้า และกำเนิดไขมัน (lipogenesis) เพื่อสร้างส่วนห่อหุ้มเซลล์.

ในสายพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคอุดมไปด้วยดีเอนเอที่ซ้ำ ๆ กัน โดยเฉพาะมีลำดับเบสที่แทรกซ้ำเป็นชุด ๆ ที่แทรกทั้งในระหว่างหน่วยพันธุกรรม และในบริเวณที่ไม่มีการถอดรหัสของเบส และมักอยู่ใกล้กับ tRNA โดยจะอยู่เป็นกลุ่มในตำแหน่งที่ถูกแทรกได้ง่าย (insertion hot spot) ซึ่งอาจช่วยป้องกันให้หน่วยพันธุกรรมสงบนิ่ง. การที่สายพันธุกรรมเป็นเช่นนี้น่าจะมีส่วนทำให้เชื้อวัณโรคสลายตัวช้า. ในการเพาะเลี้ยงประมาณร้อยละ ๕๙ ของหน่วยพันธุกรรมมีการถอดรหัสไปในทิศทางเดียวกัน. จากการวิเคราะห์พบเป็นโปรตีนที่ทราบแน่นอนแล้วประมาณร้อยละ ๔๐ และเป็นโปรตีนที่มีข้อมูลคล้ายกับโปรตีนอื่นประมาณร้อยละ ๔๔, ส่วนอีกร้อยละ ๑๖ เป็นโปรตีนที่ไม่รู้จักมาก่อน.

โปรตีนที่หลั่งมาจากเชื้อวัณโรคที่ทราบแล้วว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรค ได้แก่ ฟอสโฟไลเปส, ไลเปส และเอส-เทอเรส ซึ่งใช้ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มช่องว่าง เช่นเดียวกับเอนซัยม์โพรทีเอส เพราะการที่แบคทีเรียจะคงอยู่ได้ในฟาโกโสม ที่มีอาหารแวดล้อมจำกัดนี้จำเป็นต้องใช้ เอนซัยม์ฟอสโฟไลเปส.

ในลำดับเบสที่ โคลพบมีกลุ่มพื้นฐานเป็นลำดับที่มี G และ C หลายสัณฐานมากเรียงไม่แน่นอน (polymorphic G+C rich sequence variable elements) อยู่ในหน่วยพันธุกรรมของวัณโรคนั้นเป็นลำดับ. เบสที่อยู่ในกลุ่มที่เป็นรหัสให้เป็นโปรตีนกับสายเปปไทด์สั้น เรียก PE และ PPE ซึ่งโปรตีนกลุ่มนี้จะประกอบจากเปปไทด์ที่มีความซ้ำ ๆ. โปรตีนนี้พบมากถึงร้อยละ ๑๐ ของหน่วยพันธุกรรม ในขณะที่แบคทีเรียอื่นจะเป็นเพียงเศษส่วนเล็กน้อยที่เป็นแอนติเจนได้. การที่เชื้อวัณโรคมีแบบแผนการสร้างโปรตีนที่ต่างไปเช่นนี้เท่ากับเป็นเป้าหมายที่เป็นอุบายรบกวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจากร่างกาย โดยการยับยั้งขั้นตอนการนำเสนอแอนติเจน (antigen processing inhibition) มีประโยชน์ให้เชื้อวัณโรคมีโอกาสอยู่รอดได้ดียิ่งขึ้น.

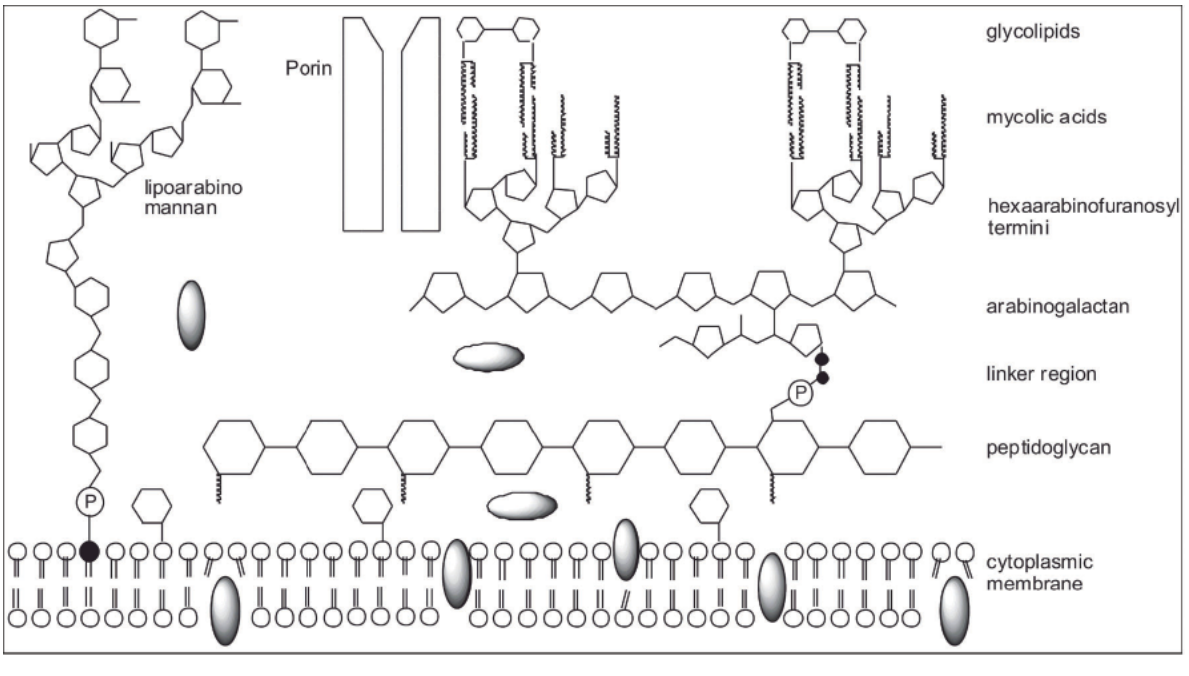
ในระดับโปรตีน เชื้อวัณโรคมีความแตกต่างจากแบคทีเรียอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ในสัดส่วนของกรดอะมิโนเหล่านี้สูงคือ อลานีน, กลัยซีน, โพรลีน, อาร์จินีน และทริพโทแฟน ซึ่งถอดรหัสมาจากดีเอนเอที่มี G และ C สูง และมีสัดส่วนของกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากดีเอนเอที่มี A และ T ที่ต่ำกว่า ได้แก่ แอสพาราจีน, ไอโสลิวซีน, ลัยสีน, เฟนีย์ลอลานีน และทัยโลสีน ซึ่งจากการตรวจสอบศึกษาระดับหน่วยพันธุกรรมทำให้ทราบชัดเกี่ยวกับเมแทบอลิสมไขมัน, เอนซัยม์ในกระบวนการสลายกลัยโคเจน, ทางผ่านเพนโทสฟอสเฟต และกรดไทรคาร์บอกซีย์ลิค และวงจรกลัยออกซีย์เลตในเชื้อวัณโรค (โคลและคณะ, ๒๕๔๑).

โครงสร้างผนังเซลล์

โมเลกุลในโครงสร้างผนังเซลล์เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ทำให้มัยโคแบคทีเรียสามารถอยู่ได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อก่อโรคและหลบรอดระบบภูมิคุ้มกันได้ (ไรลีย์, ๒๕๔๙, สมิธ, ๒๕๔๖). ผิวของมัยโคแบคทีเรียประกอบด้วยเยื่อพลาสมา (plasma membrane), ผนังเซลล์ และชั้นผิวนอกคล้ายหลอด (outer capsular like layer) (เบรนแนน, ๒๕๔๖; ดุคาตี, ๒๕๔๙).

เยื่อหุ้มเซลล์มีส่วนประกอบสำคัญคือไลโพพอลีย์แส็คฆาไรด์ ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียในอันดับ Actinomycetales (มหาภัทร, ๒๕๔๘) ช่วยป้องกันออสโมติก, ช่วยจัดการการไหลเวียนของสารน้ำในศัยโทพลาสม. ในเยื่อหุ้มเซลล์มีโปรตีนซึ่งทำหน้าที่ต่าง ๆ เช่น ตรวจวัดโมเลกุลในสิ่งที่แวดล้อม, ส่งสัญญาณให้กระบวนการของสารพันธุกรรม, เมแทบอลิสม และการสร้างพลังงาน เป็นพาหะเลือกอาหารและอิออนผ่านเข้าออกเซลล์, เป็นเอนซัยม์สำหรับการสร้างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ในการสร้างผนังกั้นเพื่อการแบ่งเซลล์ในการรวบรวมหรือขับออกของโปรตีนภายนอกศัยโตพลาสม และการสร้างดีเอนเอ.

ผนังเซลล์ช่วยคงรูปทรงแบคทีเรีย ประกอบด้วยชั้นในเป็นเพปทิโดกลัยแคนเป็นส่วนโครงสร้างที่แข็งแรงให้เกิดรูปร่าง มีส่วนประกอบต่างจากแบคทีเรียอื่นคือเป็นกรด N - glycolylmuramic ในขณะที่แบคทีเรียทั่วไปเป็น กรด N - aceltylmuramic และมีการเชื่อมไขว้ (cross-links) มากกว่าแบคทีเรียอื่น โดยของเชื้อวัณโรคมีร้อยละ ๗๐-๘๐ ในขณะที่ของ *E. coli* มีร้อยละ ๒๐-๓๐. ด้านปลายนอกของ เพปทิโดกลัยแคน ต่อด้วยพันธะโควาเลนท์กับแอราบิโนกาแลคแทน ซึ่งเป็น branched polysaccharide โดยที่ประมาณร้อยละ ๑๐ ของแอราบิโนส ในแอราบิโนกาแลคแทน ถูกแทนที่ด้วยกรดมัยโคลิค (และเชื่อมกันด้วยพันธะเอสเตอร์กับกรดมัยโคลิค ซึ่งเป็นกรดไขมันมวลโมเลกุลสูง เนื่องจากมีสายคาร์บอนประกอบกันยาว ๖๐-๙๐ อะตอม (แมคนีล และเบรนแนน, ๒๕๓๔, เบรนแนน และนิไคโดะ, ๒๕๓๘) (รูปที่ ๑) เกิดเป็นโครงร่างหลักเรียก mycolylarabinogalactan-peptidoglycan complex. การเรียงตัวของกรดมัยโคลิค เป็นความจำเพาะของแต่ละชนิดพันธุ์ จำแนกได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีย์ของเหลว หรือชั้นบาง



รูปที่ ๑ โครงร่างแสดงชั้นของผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรค (ดุคาตี และคณะ, ๒๕๔๙)

(high-performance liquid หรือ thin-layer chromatography). เชื้อวัณโรคมีกรดมัยโคลิคชนิดอัลฟามัยโคเลต (จำนวน คาร์บอน ๗๖-๘๒ อะตอม), คีโทมัยโคเลต (จำนวน คาร์บอน ๘๔-๘๙ อะตอม) และเมธ็อกซีย์มัยโคเลต (จำนวน คาร์บอน ๘๓-๑๐๐ อะตอม).

ในผนังเซลล์ยังมีไขมันอิสระแทรกอยู่หลายชนิดโดยไม่ได้สร้างพันธะโควาเลนต์กับโครงร่างหลัก. ไขมันอิสระนี้เป็นแอนติเจน (เบรนแนน และ นิไคโดะ, ๒๕๓๘). มัยโคแบคทีเรียบางชนิดมีไขมันอิสระที่ชั้นนอกของผนังเซลล์ เป็น phthiocerol dimycoserosates (PDIM), phenolic glycolipids (PGL), trehalose ที่มี กลัยโคไลปิด และสัลโฟไลปิด (SL) ประกอบอยู่. แต่ไม่พบในเชื้อวัณโรค. มัยโคแบคทีเรียที่มีไขมันอิสระนี้ได้แก่ *M. canettii* มี ฟีโนลิคกลัยโคไลปิด (แวน สุลิงเกน, ๒๕๔๐). ส่วน *M. bovis* และ *M. bovis* (BCG) สร้าง PGL ขนาดจำเพาะเรียก มัยโคไสด์ บี.

ที่เปลือกนอกของมัยโคแบคทีเรียมีกลัยโคไลปิดฝังตัวเป็นสายจากเยื่อหุ้มเซลล์ถึงผนังเซลล์ด้านนอก ได้แก่ phosphatidyl-myoinositol mannosides, lipomannan (LM) and lipoarabinomanan (LAM) และมีโปรตีนกระจายอยู่ ทำหน้าที่ต่างๆเช่น สร้างผนังเซลล์ในระหว่างการแบ่งตัว, ทำหน้าที่เป็นช่องเรียก porin, มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) ส่งผ่านสารที่ละลายน้ำให้ผ่านชั้นกรดมัยโคลิคเข้าออกในเซลล์ได้, ควบคุมหรือจำกัดการส่งผ่านสารเข้าออกเซลล์ (จาร์ลิเยร์ และนิไคโดะ, ๒๕๓๗) เชื้อวัณโรคจึงยอมให้ยาต้านวัณโรคอีแธมบูทอล ผ่านเข้าในเซลล์ได้ดี จึงไม่ค่อยดื้อยานี้ (เบรนแนน และนิไคโดะ, ๒๕๓๘). ลักษณะ porin ของมัยโคแบคทีเรียนี้ต่างจากแบคทีเรียแกรมลบอื่น. โดยหลักการแล้วโมเลกุลที่ชอบไขมันจะผ่านเข้าในเยื่อหุ้มเซลล์ได้ง่าย ด้วยการละลายเข้าในส่วนฮัยโดรคาร์บอนของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นไขมันสองชั้น แต่มัยโคแบคทีเรียมมีกรดมัยโคลิคที่ไหลเวียนช้าและหนาเป็นด่านป้องกันยาที่ละลายในไขมันเป็นอย่างดี. อย่างไรก็ตามยาที่ละลายได้ดีในไขมันก็สามารถยับยั้งมัยโคแบคทีเรียได้ดีกว่า (จาร์ลิเยร์ และนิไคโดะ, ๒๕๓๗).

ในขณะที่เชื้อวัณโรคเจริญในร่างกายมนุษย์หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจะสร้างสารห่อหุ้มชั้นนอกคล้ายเป็นหลอด (pseudo-capsule) ประกอบด้วยโปรตีน, พอลีย์แสัคฆาไรด์ และมีไขมันในชั้นในเล็กน้อย. หลอดหุ้มนี้กระจายหลุดออกจากผนังเซลล์ได้ง่าย สามารถพบละลายอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ และในเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ; คาดว่ามีส่วนช่วยป้องเซลล์และเกี่ยวข้องกับชีววิถีของเซลล์ (ไรลีย์, ๒๕๔๙, สมิธ, ๒๕๔๖).

ส่วนประกอบของโครงสร้างผิวเซลล์นี้มีความเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาในวงชีวิตและสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกับแบคทีเรียทั่วไป. หากเชื้อวัณโรคอยู่ในภาวะที่ถูกรบกวน การสร้างผนังเซลล์ก็เปลี่ยนรูปเป็นทรงกลมมีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (spheroplasts) ได้ ซึ่งลักษณะเช่นนี้จะหมดฤทธิ์ก่อโรค (แรตแนน และจันทรเสขาร์, ๒๔๑๙). หากเชื้ออยู่ในภาวะขาดออกซิเจนผนังเซลล์จะหนาขึ้น (คันนิงก์แฮม, ๒๕๔๑). นอกจากนี้หากต้องอยู่ในช่องว่างในแมโครเฟจ หรือในภาวะกรด พบว่ามีการเสดงออกของหน่วยพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้าง porins เพิ่มขึ้น (แดรเปอร์, ๒๕๔๘).

การติดสีทนกรด

การที่มัยโคแบคทีเรียมีผนังเซลล์ต่างจากแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ทำให้ไม่สามารถกักสีย้อม คริสตัลไวโอเลตไว้ในเซลล์ได้ จึงเห็นลักษณะว่างใสภายใน และผนังเซลล์มีไขมันเคลือบจึงไม่ยอมให้สีผ่านเข้าเซลล์ได้ นอกจากจะใช้ฟีนอลผสม.

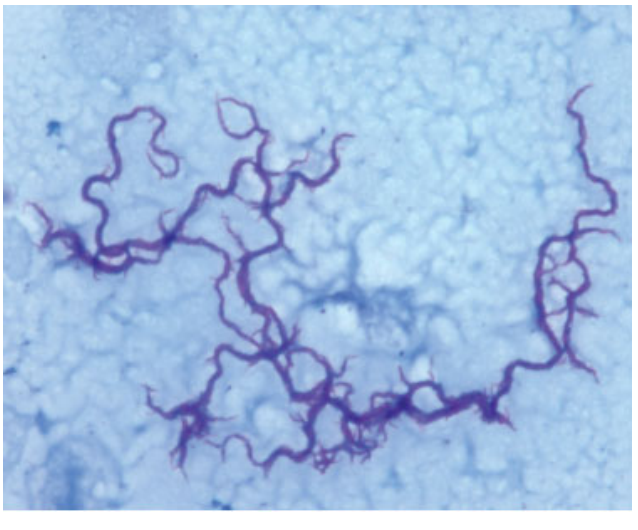
การค้นพบเชื้อวัณโรคโดยโรเบิร์ดโค๊ค เมื่อ พ.ศ. ๒๔๒๕ โดยใช้สีย้อมที่เป็นด่าง. ส่วนผู้ที่คิดค้นการใช้สมบัติการติดสีทนกรดของเชื้อวัณโรคในการตรวจเชื้อคือเอหร์ลิช เมื่อ พ.ศ. ๒๔๕๒ และใช้มาจนถึงปัจจุบัน เป็นสมบัติเฉพาะเรียก “‘acid fastness” ซึ่งหมายถึงจุลชีพที่ทนต่อการล้างสีออกด้วยกรดในแอลกอฮอล์เมื่อย้อมด้วยสีชนิด arylmethane เช่น carbon fuchsin. การติดสีทนกรดนั้นขึ้นกับการมีสายยาวของกรดมัยโคลิค ซึ่งพบในสกุล *คอรีย์นอีแบคทีเรียม, โนคาร์เดีย,* และ *มัยโคแบคทีเรียม* (กลิคค์แมน และ เจคอบส์, ๒๕๔๔).

การติดสีทนกรดนี้อยู่นาน ทนต่อความร้อน แต่สมบัตินี้ลดลงเมื่อแบคทีเรียตาย, เมื่อเซลล์มีการสลาย, ถูกทำลาย,

ติดเชื้อด้วยมัยโคแบคทีริโอเฟจ, หรือได้รับยาที่มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ เช่น ไอโสไนอะซิด (INH) (โมฮาแมด, ๒๕๔๗). การติดสีทนกรดนี้ขึ้นกับอาหารและออกซิเจนที่เซลล์ได้รับ เพราะมีผลต่อลักษณะของผนังเซลล์ (นัยค่า, ๒๕๑๔). เชื้อวัณโรคที่สงบในร่างกายไม่แบ่งตัวก่อโรคจะมีผังเซลล์ที่เปลี่ยนไป ทำให้ไม่สามารถตรวจหาเชื้อด้วยการย้อมวิธี Ziehl-Neelsen ได้.

การจัดเรียงตัวเป็นสาย (Cord formation)

โรเบิร์ด โค๊ค ได้อธิบายการเรียงตัวเป็นสายของเชื้อวัณโรคที่พบจากกล้องจุลทรรศน์เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ก่อโรค (virulent strains). โดยทั่วไปกลุ่มเชื้อวัณโรคที่เพาะบนผิวอาหารแข็งมีผิวหน้าขรุขระ หากเป็นอาหารเหลวก็จะลอยเป็นฝ้าบนผิวหน้า และเมื่อนำมาส่องกล้องดูพบลักษณะเป็นสาย (รูปที่ ๒). แต่ถ้าเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคหรือถูกทำให้อ่อนฤทธิ์โดยการเพาะเลี้ยงซ้ำ ๆ หลาย ๆ ครั้ง กลุ่มเชื้อที่งอกบนอาหารแข็งจะมีผิวหน้าเรียบลง และอยู่กระจัดกระจายในอาหารเหลวไม่จับตัวเป็นก้อน. ลักษณะการจับตัวเป็นฟ่อนนี้ทำให้นักจุลชีววิทยาสามารถสันนิษฐานจากเสมหะ หรือการเพาะเชื้อได้ว่าเป็นเชื้อวัณโรค.



รูปที่ ๒ ลักษณะการเรียงตัวเป็นสายเกลียวของเชื้อวัณโรคที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ย้อมด้วยวิธี Ziehl-Neelsen จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย ๔๐๐ เท่า

ลักษณะจำเพาะนี้มาจากสารประกอบ trehalose 6, 6'-dimycolate (TDM) ที่สกัดได้จากกลัยโคไลปิด ประกอบด้วย ๒ โมเลกุลของกรดมัยโคลิค จับกันหลวมๆในผนังเซลล์ชั้นนอก เชื่อว่าเกี่ยวกับการก่อโรค และการหลบรอดอยู่ในผู้เหย้า แต่ไม่มีความจำเป็นในการมีชีวิตเพิ่มจำนวนในหลอดเพาะเลี้ยง (อินดริโก, ๒๕๔๕). TDM นี้หลั่งออกมาจากเชื้อวัณโรคทำให้เกิดระยะห่างแยกตัวจากน้ำ (hydrophobic) เป็นเหตุให้เห็นลักษณะการจับกันเป็นเกลียวที่มั่นคงของเชื้อก่อโรคดังกล่าว. หน่วยพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างสาร TDM ที่มี ๕ หน่วย แต่ยังไม่เป็นที่ทราบชัด (กาโอะ, ๒๕๔๗).

แนวกั้นการซึมผ่านได้ (Permeability barriers)

เชื้อวัณโรคมีความสามารถสูงในการปกป้องตนเองจากยาทำลายเชื้อ โดยยอมให้มีการผ่านเข้าออกเซลล์ได้ยาก (ดูเคตี, ๒๕๔๙) โดยอาศัยแนวผนึกแน่นหนาของกรดมัยโคลิคที่ช่วยปกป้อง และแคปซูลที่มีคาร์โบฮัยเดรตและโปรตีนเป็นแนวถัดจากชั้นไขมัน ช่วยขัดขวางการซึมผ่านของโมเลกุลใหญ่ ๆ เช่น เอนซัยม์ และยังช่วยปกป้องส่วนไขมันเองด้วย. ชั้นนี้จะป้องกันโมเลกุลที่ผ่านไขมันได้. ส่วนสารอาหารจะผ่านทางรูของ porins ซึ่งเชื้อวัณโรคมีจำนวน porins น้อยกว่าแบคทีเรียอื่น และยอมให้ผ่านได้เฉพาะโมเลกุลขนาดเล็กที่ละลายน้ำได้เท่านั้น (นีเดอร์ไวส์, ๒๕๔๖).

จากหลายการทดสอบทำให้เชื่อได้ว่า การที่เชื้อวัณโรคยอมให้สารผ่านได้น้อยเป็นเหตุให้เชื้อวัณโรคเจริญเติบโตช้าและดื้อยา มีการศึกษาพบว่าอัตราการแทรกผ่านของยาพบว่าการแทรกผ่านของยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactam ที่ผ่านเข้าในเซลล์ของเชื้อวัณโรคเทียบเท่ากับ *Pseudomonas aeruginosa* แต่ต่ำกว่าของ *Escherichia coli* ถึง ๑๐๐ เท่า (แชมเบอร์ส, ๒๕๓๘). ไมลันเดอร์ (๒๕๔๗) พบว่าการมีรู porin เพิ่มที่ผนังเซลล์จะทำให้เชื้อวัณโรคไวต่อยาต้านวัณโรคดีขึ้น อีกทั้งทำให้เพิ่มการนำกลูโคสเข้าในเซลล์และการเพิ่มอัตราการเจริญได้.

การใช้ยารักษาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่ผิวเซลล์มีผลเพิ่มความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค (เฟวอร์บีเลน, ๒๕๔๙) โดย

พบว่ายา ethambutol และ สาร dimethylsulfoxide ในขนาดต่ำ ๆ สามารถเพิ่มความสามารถให้ยาต้านวัณโรคกับเชื้อที่เดิมดื้อยาได้.

สารอาหารและสภาพแวดล้อมเพื่อการเจริญของเชื้อวัณโรค

เชื้อวัณโรคเป็นจุลชีพ prototrophic คือสร้างโครงสร้างของเซลล์จากอาหารพื้นฐานคือ คาร์บอนและไนโตรเจน และเป็น heterotrophic คือใช้อินทรียสารโดยตรงเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างของเซลล์และเป็นผลถึงเมแทบอลิสมที่ต้องการสภาพแวดล้อมที่เฉพาะ. ดังนั้นคุณภาพอาหารและสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงจึงมีส่วนสำคัญที่กำหนดวิถีความเป็นอยู่ของเชื้อ เช่น สภาวะออกซิเจน, อุณหภูมิ, ความเป็นกรด-ด่าง, และเกลือ. หากมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมก็จะโยงถึงการเปลี่ยนแปลงวิถีในเซลล์เพื่อการอยู่รอดด้วย ซึ่งเป็นกลยุทธ์ที่เป็นประโยชน์ต่อการดำรงสายพันธุ์ไว้ไม่ใช่เพียงเพื่อการก่อโรค ซึ่งพบว่าเชื้อวัณโรคจะเปลี่ยนวิถีชีวิตจากการใช้ออกซิเจน (aerobic) ใช้เมแทบอลิสมของคาร์โบไฮเดรต มาใช้อากาศน้อย ๆ (microaerophilic) และเผาผลาญไขมันในขณะที่ก่อโรคในหนูทดลอง. จากการศึกษาระดับหน่วยพันธุกรรมทำให้ทราบว่าความสามารถในการก่อโรคในเนื้อเยื่อผู้เหย้าได้ เชื้อวัณโรคจะใช้พลังงานจากกรดไขมัน (นีย์โรลลีส, ๒๕๔๙).

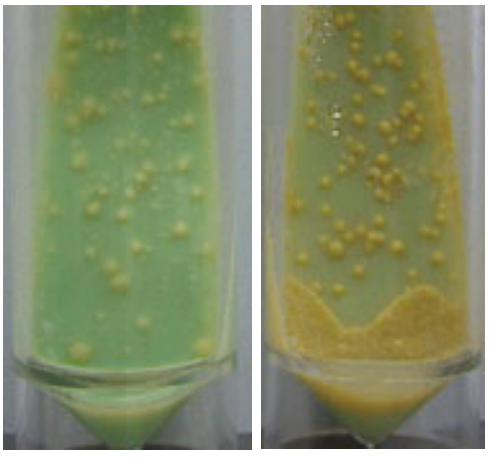
เชื้อวัณโรคเพาะเลี้ยงได้ไม่ยาก ครั้งแรกที่โค๊คเพาะเลี้ยงเชื้อใช้เพียงซีรั่ม. เชื้อวัณโรคสามารถเจริญได้ในสารละลายที่มีเกลือ, กลีย์เซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน, แอมโมเนียมอิออนและแอสพาราจีนเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อวัณโรคจะเปลี่ยนกลีย์เซอรอลเป็นพัยรูเวต ในขณะที่ *M. bovis* ทำไม่ได้ เนื่องจาก *M. bovis* ขาดหน่วยพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องทำให้ต้องเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีพัยรูเวต. ส่วนอัลบูมินที่ใส่ลงในอาหารเพาะเชื้อ ได้แก่ ไข่หรือ ซีรั่มอัลบูมินวัว จะช่วยส่งเสริมให้เชื้อเจริญได้ดี. สารอื่นที่ใส่ในการเพาะเชื้อเช่น Tween 80 จะช่วยให้เซลล์เชื้อกระจายในน้ำเลี้ยงได้ดี. ในอาหารเพาะเลี้ยงมิดเดิลบรู๊ค จะมีไบโอติน และแคทาเลส ช่วยฟื้นชีวิตให้เชื้อที่อ่อนแอในสิ่งส่งตรวจ (เวย์น, ๒๕๒๕).

ธาตุอื่นเล็กน้อยที่เชื้อวัณโรคต้องการได้จากน้ำ ทั้งอิออนอนินทรีย์ โมเลกุลเล็กและใหญ่ นำมาใช้เป็นปัจจัยช่วยในการทำงานของเซลล์. ธาตุเหล็กและแมกนีเซียมจำเป็นสำหรับการมีชีวิต หากขาดจะทำให้ความสามารถก่อโรคลดลง. ธาตุเหล็กในสภาพแวดล้อมที่จุลชีพนำมาใช้ได้จะอยู่ในรูปเกลือเฟอร์ริคไม่ละลายน้ำ โดยเชื้อวัณโรคจะหลั่ง exochelins ซึ่งเป็น hydrophilic peptides ออกมาเพื่อรวบรวมธาตุเหล็ก และอาศัย mycobactins เป็นสารประกอบ hydrophobic ที่ผนังเซลล์ช่วยนำเข้าในศัยโทพลาสม โดยมีหน่วยพันธุกรรมในระบบปฏิบัติ mbt เกี่ยวข้องกับการผลิต mycobactins core (เดอ วอสส์, ๒๕๔๓).

ในกระบวนการหายใจแบบใช้อากาศ (aerobic respiration) ของเชื้อวัณโรคต้องใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน. ในขั้นสุดท้ายของกระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอน ออกซิเจนจะกลายเป็นน้ำ. จะเห็นว่าโดยธรรมชาติเชื้อเจริญได้ดีในเนื้อเยื่อที่มีออกซิเจนสูงเช่น ปอด โดยเฉพาะกลีบบนที่มีอากาศผ่านดี และเชื้อก็ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสามารถได้จากอากาศแวดล้อมหรือสารคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนต. ดังนั้นตู้เพาะเลี้ยงเชื้อจึงนิยมใช้คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ ๕-๑๐ ตรงข้ามกับ M. bovis ที่ต้องการอากาศน้อยจึงชอบเจริญได้ในที่มีออกซิเจนต่ำ.

ในสิ่งแวดล้อมที่เชื้อวัณโรคแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้มีความจำเพาะคือต้องเป็นกลางเช่นใน สัตว์เลือดอุ่น อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเสียส และมี พีเอช เป็นกลาง ต้องการทั้งในอุณหภูมิและความเข้มข้นของฮัยโดรเจนอิออนที่พอเหมาะเท่านั้น ซึ่งจะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ ๕ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อวัณโรคได้.

นิคมของเชื้อวัณโรคมีลักษณะที่จำเพาะแตกต่างจากมัยโคแบคทีเรียอื่น คือ เจริญเติบโตบนอาหารแข็งช้ากว่า ๗ วัน รูปทรงนูน ผิวหน้าขรุขระ สีครีมจาง คล้ายดอกกะหล่ำ ในขณะที่มัยโคแบคทีเรียอื่นจะมีผิวหน้าเรียบและอาจมีสีหลืองถึงสีส้มได้ (รูปที่ ๓).



รูปที่ ๓ บนอาหารเลี้ยง Löwenstein-Jansen: ด้านขวามือ นิคมเชื้อวัณโรค สีครีมจาง ผิวหน้าขรุขระ. ด้านซ้ายมือ นิคมของ *Mycobacterium avium* สีเหลือง ผิวหน้าเรียบ.

ช่วงเวลาการแบ่งตัว (Generation time)

ในอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะ เชื้อวัณโรคจะแบ่งตัวเป็น ๒ ทุก ๑๒-๒๔ ชั่วโมง ซึ่งช้ามากเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่นที่ใช้เวลาเพียง ๑๕ นาที ถึง ๑ ชั่วโมง เท่านั้น.

การที่เชื้อโตช้านั้นคาดว่าบางส่วนมาจากที่มีลักษณะผนังเซลล์ที่ไม่ยอมให้อาหารผ่านเข้าได้ดี แต่ที่สำคัญคือ มีอัตราการสร้าง RNA จาก DNA ต่ำกว่า ของ *E. coli* ถึง ๑๐ เท่า (ฮาร์ฌีย์, ๒๕๒๐) ซึ่งเชื้อวัณโรคนั้นมีเพียงหนึ่งระบบปฏิบัติการ (operon) สำหรับการสังเคราะห์สาย RNA. อีกทั้งพบว่าแม้จะเปลี่ยนระยะนิ่งมาเป็นระยะแบ่งตัวจำนวน RNA เพิ่มขึ้นมาเพียง ๒ เท่า ซึ่งบอกถึงการสร้างโปรตีนได้ช้าตามไปด้วย (เฟวอร์มา, ๒๕๔๒).

การมีอัตราการเพิ่มจำนวนที่ช้ามาก อธิบายถึงลักษณะการก่อโรคแบบช้าเรื้อรัง และการใช้เวลานานในการเพาะเชื้อ. ถึงแม้จะมีการพยายามปรับปรุงอาหารและภาวะแวดล้อมการเพาะเลี้ยงให้ดีก็ไม่สามารถทำให้เชื้อแบ่งตัวเร็วกว่า ๑๒ ชั่วโมงได้ ทำให้ต้องพัฒนาการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่กำลังเจริญ เช่น อาหารวุ้นเพาะเชื้อใสมองเห็นนิคมเล็ก ๆ ได้. ในปัจจุบันใช้ biosensor ตรวจปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดจากเมแทบอลิสมของจุลชีพ.

สมบัติทางเมแทบอลิสมและชีวเคมี

ลักษณะเฉพาะทางชีวภาพของเชื้อวัณโรคเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อเพื่อการดำรงชีพและการก่อโรค สามารถใช้แยกบอกชนิดพันธุ์ในการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ.

ไนอะซิน (กรดนิโคทินิค) เป็นสารอินทรีย์สำคัญเกี่ยวข้องในกระบวนการออกซิเดชั่นรีดักชั่นเพื่อให้เกิดพลังงาน และช่วยซ่อมแซมดีเอนเอ. เชื้อวัณโรคสร้างและสะสมไนอะซิน (คาสะรอฟว์, ๒๕๑๕) ในหลอดเพาะเลี้ยง. *M. tuberculosis, M. canettii* และบางสายพันธุ์ของ *M. africanum* หลั่งไนอะซินละลายมาในอาหารเพาะเลี้ยง ใช้ในการระบุชนิดพันธุ์ได้.

เช่นเดียวกับแบคทีเรียเจริญใช้อากาศชนิดอื่น ๆ เชื้อวัณโรคมีเอนซัยม์ไว้ใช้ในการลดพิษของอนุมูลออกซิเจน เช่น เปอร์ออกไซด์ และฮัยโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เกิดในกระบวนการหายใจ หรือมาจากเซลล์ผู้เหย้า. เอนซัยม์นี้ ใน *M. tuberculosis* complex มี catalase-peroxidase ซึ่งไม่ทนความร้อน (heat labile) สลายฮัยโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำ. ใน *M. tuberculosis* ยังมี alkyl-hydroperoxidase. การที่เชื้อวัณโรคมีแคทะเลสนี้ทำให้การใช้ยาต้านวัณโรค เช่น ไอโสไนอะซิด ในรูปยาที่ไม่ออกฤทธิ์เปลี่ยนเป็นยาที่ออกฤทธิ์ในเซลล์ของเชื้อวัณโรค. ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่หน่วยพันธุกรรมที่ควบคุมเอนซัยม์เหล่านี้ได้แก่ *katG* และ *ahpC* ทำให้เชื้อทนยาได้. นอกจากนี้การดื้อยาไอโสไนอะซิดนั้นสามารถมาจากฤทธิ์ที่ไม่คงตัวของเอนซัยม์ก็ได้. ดังนี้การตรวจเอนซัยม์แคทะเลสในการทดสอบแยกชนิดมัยโคแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการจึงไม่แน่นอนได้.

เชื้อวัณโรคเลือกใช้ไนโตรเจนจากแอมโมเนียมและแอสพาราจีน แต่ในภาวะที่ขาดแคลนก็สามารถใช้ไนโตรเจนจากไนเทรตและไนไทรต์ได้. เชื้อวัณโรคเมื่อเข้าในร่างกายถูกจับอยู่ในแมโครเฟจ เป็นระยะแฝง (latent stage) หรือในแกรนุโลมา ซึ่งขาดแคลนทั้งอาหารและออกซิเจน เชื้อวัณโรคจะใช้ไนโตรเจนจากไนเทรตเป็นตัวรับอีเลคทรอน โดยใช้เอนซัยม์ ไนเทรตรีดัคเทส ซึ่งจับอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไนเทรต (NO_3^-) ให้เกิด

การสะสมไนไทรต์ (NO_2^-). ในการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคพบว่าเอนซัยม์ ไนเทรต รีดัคเทส ยังคงมีฤทธิ์ดีทั้งในภาวะภาวะขาดออกซิเจนและในอาหารเลี้ยงที่มีไนตริคออกไซด์. แต่เชื้อที่ดื้อยาไอโสไนอะซิด และยากรดพาราอะมิโนสะลิศีย์ลิค (PAS) จะไม่สามารถเปลี่ยนไนเทรตให้เป็นไนไทรต์ได้. การสร้างเอนซัยม์ไนเทรตรีดัคเทสนี้มาจากหน่วยพันธุกรรมใน *narGHJI* operon (วีเบอร์, ๒๕๔๓) ซึ่งมีใน *M. tuberculosis* และ *M. bovis* แต่ *M. bovis* ริดิวซ์ไนเทรตได้ต่ำและไม่ริดิวซ์ไนเทรตในภาวะขาดออกซิเจนเนื่องจากต่างกันที่หน่วยพันธุกรรมสั่งการ (promoter) (โสแฮสคีย์, ๒๕๔๖).

เชื้อวัณโรคสามารถสร้างแอมโมเนียจากยูเรีย โดยใช้เอนซัยม์ ยูรีเอส จากหน่วยพันธุกรรม *ureABC* (รีย์แรต, ๒๕๓๘) เป็นผลให้เกิดภาวะด่างขึ้นรอบๆเซลล์จากแอมโมเนีย ซึ่งอาจขัดขวางการทำงานใน phagosomes ทำให้โมโนศัยต์ ของร่างกายไม่สามารถเกิด MHC class II ที่สมบูรณ์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ (เสนไดด์, ๒๕๔๗).

ความทนทานสภาพเคมีและกายภาพ

มัยโคแบคทีเรียทนทานในสิ่งแวดล้อมได้ดีแม้จะเป็นจุลชีพที่ไม่สร้างหลอดหุ้ม คาดว่ามาจากโครงสร้างที่แน่นหนาของผนังเซลล์ ทำให้สามารถทนต่อการถูกจับกินโดยแมโครเฟจ, ทนต่อน้ำยาเชื้อที่ละลายน้ำ และยาปฏิชีวนะ เช่น ทนเกลือคลอไรด์ และเกลือโบรไมด์ ในน้ำยา cetyl-pyridinium chloride ได้นานถึง ๑๔ วัน (พาร์ดินี, ๒๕๔๘). น้ำยานี้ใช้ในการถนอมเสมหะส่งตรวจที่ต้องล่าช้า.

ตามที่กล่าวแล้วว่าเชื้อวัณโรคจะสร้างเอนซัยม์และแบ่งตัวในสิ่งแวดล้อมเฉพาะเช่น สารอาหาร อุณหภูมิ, พีเอช ที่เหมาะและออกซิเจนที่เพียงพอเท่านั้น. แต่เชื้อวัณโรคทนทานต่อภาวะที่ไม่เหมาะได้ดีมาก เช่น กรด ด่างในทางเดินอาหาร, ทนต่อกรดด่างเจือจางในห้องปฏิบัติการเช่น กรดกำมะถัน และโซเดียมฮัยดรอกไซด์ ที่ใช้ในวิธีการกำจัดแบคทีเรียอื่นที่อยู่ในเสมหะ .

เชื้อวัณโรคทนทานต่อความเย็นจัด จึงสามารถเก็บไว้ที่ ๒-๔ องศาเซลเสียส ถึง -๗๐ องศาเซลเสียส ได้ แต่ไม่ทนต่อความร้อน แสงแดด และรังสีอัลตราไวโอเลต. เชื้อที่อยู่ในเสมหะหรือของเหลวจะตายเมื่ออยู่ที่ ๒๐-๓๗ องศาเซลเสียส นานหนึ่งสัปดาห์ และหากถูกรังสีอัลตราไวโอเลตจะตายภายใน ๑-๒ นาที (คอลลินส์, ๒๕๑๔).

ในภาวะขาดออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เชื้อจะไม่แบ่งตัว แต่ยังคงมีชีวิตได้นานเป็นปี โดยพบว่าเชื้อมีผนังเซลล์ที่หนาขึ้น (คันนิงก์แฮม, ๒๕๔๑) และมี heat shock protein เพิ่มขึ้น.

บรรณานุกรม

๑. Brennan PJ, Draper P. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis.* In: Bloom BR, editor. Tuberculosis, pathogenesis, protection and control. Washington DC: American Society for Microbiology;1994.p.271-84.

๒. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis 2003; 83 : 91-7.

๓. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. Annu Rev Biochem 1995; 64: 29-63. Barrera L. The basics of clinical bacteriology. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V, editors. Tuberculosis 2007 From basic science to patient care.2007. p 93-112.

๔. Chauhan A, Madiraju MV, Fol M. *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. J Bacteriol 2006; 188: 1856-65.

๕. Chambers HF, Moreau D, Yajko D. Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2620-4.

๖. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature1998; 393: 537-544.

๗. Collins FM. Relative susceptibility of acid-fast and non-acid-fast bacteria to ultraviolet light. Appl Microbiol 1971; 21: 411-3.

๘. Cunningham AF, Spreadbury CL. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. J Bacteriol 1998; 180: 801-8.

๙. De Voss JJ, Rutter K, Schroeder BG, Su H, Zhu Y, Barry CE. 3rd. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 1252-7.

๑๐. Draper P, Daffe M. The cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* with special reference to the capsule and outer permeability

barrier. In Tuberculosis and the Tubercle bacillus. ASM Press, Washington DC 2005, p 261-73.

๑๑. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101: 697-714.

๑๒. Gao Q, Kripke K, Arinc Z, Voskuil M, Small P. Comparative expression studies of a complex phenotype: cord formation in *Mycobacterium tuberculosis.* Tuberculosis 2004; 84: 188-96.

๑๓. Garton NJ, Christensen H, Minnikin DE, Adegbola RA, Barer MR. Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria in vitro and in sputum. Microbiology 2002; 148: 2951-8.

๑๔. Glickman MS, Jacobs Jr WR. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. Cell 2001; 104: 477-85.

๑๕. Harshey RM, Ramakrishnan T. Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. J Bacteriol 1977; 129: 616-22.

๑๖. Indrigo J, Hunter RL Jr, Actor JK. Influence of trehalose 6,6_-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. Microbiology 2002; 148: 1991-8.

๑๗. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiol Lett 1994; 123: 11-8.

๑๘. Kasarov LB, Moat AG. Metabolism of nicotinamide adenine dinucleotide in human and bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis.* J Bacteriol 1972; 110: 600-3.

๑๙. Mailaender C, Reiling N, Engelhardt H, Bossmann S, Ehlers S, Niederweis M. The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis.* Microbiology 2004; 150: 853-64.

๒๐. McNeil M, Brennan PJ. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance. Res Microbiol 1991; 142: 451-63.

๒๑. Mohamad S, Ibrahim P, Sadikun A. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and its derivative, 1-isonicotinyl-2-nonanoyl hydrazine: investigation at cellular level. Tuberculosis (Edinb) 2004; 84: 56-62.

๒๒. Neyrolles O, Hernandez-Pando R, Pietri-Rouxel F. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? PLoS ONE 2006; 1: e43.

๒๓. Niederweis M. Mycobacterial porins' new channel proteins in unique outer membranes. Mol Microbiol 2003; 49: 1167-77.

๒๔. Nyka W. Influence of oxidation and reduction on the acid-fastness of mycobacteria. Infect Immun 1971; 4: 513-5.

๒๕. Pardini M, Varaine F, Iona E. Cetyl-pyridinium chloride is useful for isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from sputa subjected to long-term storage. J Clin Microbiol 2005; 43: 442-4.

๒๖. Ratnan S and Chandrasekhar S. The pathogenicity of spheroplasts of *Mycobacterium tuberculosis.* Amer Rev Respir Dis 1976; 114: 549-54.

๒๗. Reyrat JM, Berthet FX, Gicquel B. The urease locus of *Mycobacterium tuberculosis* and its utilization for the demonstration of allelic exchange in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 8768-72.

๒๘. Riley LW. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. J Clin Invest 2006; 116: 1475-8.

๒๙. Sendide K, Deghmane AE, Reyrat JM, Talal A, Hmama Z. *Mycobacterium bovis* BCG urease attenuates major histocompatibility complex class II trafficking to the macrophage cell surface. Infect Immun 2004; 72: 4200-9.

๓๐. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 463-96.

๓๑. Sohaskey CD. Regulation of nitrate reductase activity in *Mycobacterium tuberculosis* by oxygen and nitric oxide. Microbiology 2005; 151: 3803-10.

๓๒. Verbelen C, Dupres V, Menozzi FD. Ethambutol-induced alterations in *Mycobacterium bovis* BCG imaged by atomic force microscopy. FEMS Microbiol Lett 2006; 264: 192-7.

๓๓. Wayne LG. Microbiology of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis 1982; 125: 31-41.

๓๔. Verma A, Sampla AK, Tyagi JS. *Mycobacterium tuberculosis* rrn promoters: differential usage and growth rate-dependent control. J Bacteriol 1999; 181: 4326-33.

๓๕. Weber I, Fritz C, Ruttkowski S, Kreft A, Bange FC. Anaerobic nitrate reductase (nar-GHJI) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. Mol Microbiol 2000; 35: 1017-25.