หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ (Introductions)

เชื้อมัยโคแบคทีเรีย (Mycobacteria) อื่น ๆ ที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรคมีลักษณะพิเศษซึ่งแตกต่างไปจากเชื้อวัณโรค หรือกลุ่มของเชื้อวัณโรค (Mycobacterium tuberculosis Complex) (1) คือ ไม่ทำให้เกิดโรคในหนูตะเภา (guinea pig), เจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี และไม่มีการติดต่อระหว่างคนโดยละอองฝอย (droplet nuclei) (2-4) จึงมีการจัดกลุ่มของเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรคเหล่านี้ เป็นกลุ่มหนึ่งต่างหากโดยมีการเรียกชื่อต่างๆ กันเช่น opportunistic mycobacteria, anonymous mycobacteria, atypical mycobacteria (5), หรือ environmental mycobacteria และ mycobacteria other than the tubercle and leprosy bacilli(2) ในปัจจุบันนี้มีเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ที่ค้นพบและตั้งชื่อเรียบร้อยแล้วทั้งหมด 54 สปีชี (Species) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 (6-7)

เชื้อมัยโคแบคทีเรียทั้งหมดจัดอยู่ในวงศ์ Mycobacteriaceae มีลักษณะเป็นแท่งมีรูปร่างได้ตั้งแต่ แท่งสั้น ๆ (coccobacillary) จนถึงยาวเป็นเส้นสาย (filamentous) มีขนาดกว้าง 0.2-0.6 ไมโครเมตร และยาว 1-10 ไมโครเมตร, ไม่เคลื่อนไหว, ไม่สร้างสปอร์, ไม่มีแคปซูล, ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต, มีผนังเซลล์หนา ภายในผนังเซลล์ประกอบด้วยไขมัน 60% ส่วนใหญ่จะเป็นไขมันประเภทกรดชนิด mycolic acid มีคุณสมบัติเป็น acid fastness คือเป็นเชื้อที่ติดสียาก แต่เมื่อย้อมติดสีแล้วก็ล้างออกยาก หรือล้างไม่ออก ด้วยน้ำยาที่เป็นกรดหรือกรดผสมแอลกอฮอล์ (acid alcohol) จึงเรียกเชื้อมัยโคแบคทีเรีย เหล่านี้ว่าเป็นเชื้อทนกรด (acid-fast bacilli) ซึ่งแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียสกุล อื่นๆ ที่มีคุณสมบัติของ acid fastness แต่เพียงเล็กน้อยเช่นเชื้อ Nocardia และเชื้อ Corynebacterium เชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรคหรือจะเรียกว่าเชื้อ atypical mycobacteria ที่ค้นพบเป็นครั้งแรกจาก smegma ของคนโดย Alvarez และ Tavel เมื่อ ค.ศ. 1885 (8) และตั้งชื่อว่า Mycobacterium smegmatis และต่อมาก็ได้พบเชื้อ atypical mycobacteria กันมากขึ้นแต่จัดให้เป็นพวก saprophyte ถ้า

พบใน clinical specimen ก็จะให้เป็นพวกเชื้อปนเปื้อน(contaminants) ไม่ได้รับความสนใจจนกระทั่ง Buhler และ Pollak ในปี ค.ศ. 1953 ได้รายงานผู้ป่วยโรคปอด 2 ราย ซึ่งตายด้วยเชื้อ atypical mycobacteeria (9) นับแต่นั้นมาจึงมีการศึกษาเชื้อ atypical mycobacteria กันมากขึ้น โดยมีการจัดแบ่งกลุ่มของเชื้อเหล่านี้ไว้หลายแบบ แต่วิธีที่ยอมรับ และใช้กันอย่างแพร่หลายคือวิธีของ Runyon ในปี ค.ศ. 1959 (10) โดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพเป็นหลัก ซึ่งได้แก่อัตราการเจริญเติบโต ลักษณะและสีของโคโลนี ซึ่งสามารถแบ่ง atypical mycobacteria ออกเป็นกลุ่ม 4 กลุ่ม เรียงตามอักษรโรมันดังนี้ คือ

กลุ่ม I Photochromogens มีลักษณะสำคัญประจำกลุ่มคือ เป็นเชื้อที่เจริญเติบโตช้าต้องใช้เวลามากกว่า 7 วันในการเจริญเติบโตจึงจะสามารถมองเห็นโคโลนีของเชื้อได้ โคโลนีของเชื้อจะไม่มีสี ถ้าอบบ่มเชื้อไว้ในที่มืด แต่จะสร้างสีเหลืองหลังจากนำไปสัมผัสกับแสงสว่างสิ่งที่เกิดขึ้นเป็นสารประเภท carotenoids ชนิด β-carotene (11) ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 4 สปีชี (species) คือ M. kansasii M. marinum, M. simiae และ M. asiaticum

กลุ่ม II Scotochromogens มีลักษณะสำคัญประจำกลุ่ม คือ เจริญเติบโตช้าเช่นเดียวกับกลุ่ม I แต่โคโลนีของเชื้อนั้นจะมีสีเหลือง ทั้งที่อบบ่มไว้ในที่มืด และถ้าสัมผัสกับแสงสว่างสีของโคโลนีนั้นก็จะเข้มขึ้นเล็กน้อย หรือเข้มขึ้นจนถึงสีส้มได้ ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 4 สปีชีคือ M. gordonae, M. scrofulaceum, M. xenopi และ M. szulgai

กลุ่ม III Nonphotochromogens มีลักษณะสำคัญประจำกลุ่มคือ เป็นกลุ่มเชื้อที่เจริญเติบโตช้าเช่นเดียวกัน แต่โคโลนีไม่มีสีทั้งที่เก็บอบบ่มไว้ในที่มืด และเมื่อนำมาสัมผัสกับแสงสว่างในกลุ่มนี้ ประกอบด้วยเชื้อ 10 สปีชี คือ M. avium, M. intracellulare, M. gastri, M. terrae, M. triviale, M. nonchromogenicum, M.ulceran, M. malmoense, M. haemophilum, และ M. shimoides

กลุ่ม IV Rapid growers มีลักษณะสำคัญประจำกลุ่ม คือ เป็นกลุ่มเชื้อที่เจริญเติบโตเร็ว สามารถมองเห็นโคโลนีของเชื้อได้ หลังจากอบบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ภายในเวลาน้อยกว่า 7 วัน ซึ่งบางสปีชีอาจจะงอกให้เห็นโคโลนีได้ภายใน 2-3 วัน มีทั้งโคโลนีที่มีสี และไม่มีสี ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 26 สปีชี คือ M. fortuitum,

M. chelonei, M. agri, M. aichiense, M. neoaurum, M. aurum, M. austroafricanum, M. smegmatis, M. phlei, M. duvalii, M. diernhoferi, M. chitae, M. fallax, M. gadium, M. gilvum, M. komossense, M. obuense, M. parafortuitum, M. pulveris, M. vaccae, M. rhodesiae, M. thermoresistibile, M. takaiense, M. sphagni, M. flavescens และ M. chubuense

จากเชื้อทั้ง 4 กลุ่มมีบางสปีชีเท่านั้นที่สามารถทำให้เกิดโรคในคนได้(ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2) ซึ่งรวบรวมโดย wolinsky ในปี ค.ศ. 1979 (12) แม้ว่าจะใช้วิธีของ Runyon ในบางครั้งก็ยังไม่สามารถที่จะแบ่งแยกชนิดของเชื้อ atypical mycobacteria ออกได้ จึงมีการนำเอาเครื่องคอมพิวเตอร์มาใช้ในการจัดกลุ่มของเชื้อเหล่านี้ (13) ซึ่งเป็นที่นิยมและประสบผลสำเร็จในการจัดกลุ่มของเชื้อ เชื้อ atypical mycobacteria ชนิดเจริญเร็ว (rapid growers) มีทั้งชนิดที่ทำให้เกิดโรค และชนิดที่เป็น saprophyte พวกที่ทำให้เกิดโรค ที่รู้จักกันดีคือ M. fortuitum และ M.chelonei ซึ่งทำให้เกิดโรคได้หลายชนิด เช่น โรคปอด (pulmonary disease), เยื่อบุหัวใจอักเสบ (carditis), กระจกตาอักเสบ (keratitis) และการอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (cutaneous infection) ซึ่งรวบรวมไว้โดย Wallace และคณะในปี ค.ศ 1983 (14) นอกจากนี้ยังมี เชื้อในกลุ่มของเชื้อที่เจริญเร็ว ซึ่งแต่เดิมจัดไว้เป็นพวก saprophyte แต่ต่อมาพบว่าทำให้เกิดโรคได้เช่น เชื้อ M. flavescens(15) และเชื้อ M. neoaurum(16) ซึ่งการทำให้เกิดโรคของเชื้อที่เดิมเป็น saprophyte นี้เชื่อว่ามีการแฝงตัวอยู่ ในร่างกายขณะหนึ่งก่อน โดยเข้าไปพร้อมกับสิ่งแวดล้อมต่างๆ แล้วจึงก่อโรคในเวลาต่อมา เมื่อความต้านทานของร่างกายลดต่ำลง และที่สำคัญมีเชื้อมัยโคแบคทีเรียชนิดเจริญเร็ว (rapid growers) ที่ยังไม่มีการจัดจำแนกจำแนกแบ่งกลุ่มอยู่มากมาย เนื่องจากเป็นกลุ่มใหญ่ และมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ (17)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาเชื้อ มัยโคแบคทีเรีย ชนิดเจริญเร็ว (rapid growers) ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม โดยวิธีการศึกษาแบบ Numerical Taxonomy ว่าเป็นสปีชีอะไร

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย (6-7)

Group	Species
Strict Pathogen	M. tuberculosis, M. leprae, M. bovis, M. africanum
Photochromogens	M. asiaticum, M. marinum, M. kansasii, M. simiae
Scotochromogens	M. scrofulaceum, M. szulgai, M. xenopi, M. gordonae
Nonphotochromogens	M. avium, M. intracellulare, M. haemophilum
	M. gastri, M. nonchromogenicum, M. terrae, M. triviale
	M. malmoense, M. shimoidei, M. ulceran
Rapid growers	M. fortuitum, M. chelonei, M. agri, M. aichiense
	M. austroafricanum, M. aurum, M. chitae, M. chubuense
	M. diernhoferi, M. duvalii, M. fallax, M. gadium
	M. gilvum, M. komossense, M. neoaurum, M. parafortuitum
	M. obuense, M. phlei, M. pulveris, M. rhodesiae
	M. smegmatis, M.sphagni, M. thermoresistibile
	M. tokaiense, M. vaccae, M. flavescens
Animal Pathogens	M. farcinogens, M. microti, M. lepraemurium
	M. paratuberculosis, M. porcinum, M. senegalense

ตารางที่ 2 สรุปโรคต่างๆที่เกิดจากเชื้อมัยโคแบคทีเรีย (12)

Disease	Common species	Others
Chronic pulmonary disease in adults	M. avium complex	M. xenopi, M. szulgai
	M. kansasii	M. simiae, M. scrofulaceum
		M. fortuitum complex
Local lymphdenitis in children	M. scrofulaceum	M. kansasii
	M. avium complex	M. fortuitum complex
Skin or soft tissue :		
Swimmingpool granuloma	M. marimum	
Sporotrichoid	M. marinum	
Local abscess	M. fortuitum complex	
Buruli ulcer	M. ulcerans	
Skeleton(bone,joint,tendon)	M. kansasii	M. fortuitum complex
	M. avium complex	M. marinum
Disseminated	M. avium complex	M. fortuitum complex
	M. kansasii	M. scrofulaceum

การสำรวจเอกสาร (Review literature)

นับตั้งแต่ Robert Koch ได้ค้นพบเชื้อ M. tuberculosis เมื่อค.ศ.1885 ได้มีนักวิจัยมากมายได้ศึกษา ค้นคว้า และแยกเชื้อ มัยโคแบคทีเรีย ออกจากสิ่งส่งตรวจต่างๆ ซึ่งในธรรมชาติเป็นแหล่งที่สำคัญที่สุดที่พบเชื้อนี้มากไม่ว่าจะเป็นดิน, น้ำ, ฝุ่นละออง(1) หรือแม้กระทั่งน้ำประปาก็สามารถแยกเชื้อเหล่านี้ออกมาได้ (18-20) จากการศึกษาของ Frey, กับ Frey และ Hogan ในปี ค.ศ.1930 และ ค.ศ.1931 สามารถแยกเชื้อ มัยโคแบคทีเรีย จากดินเป็นครั้งแรก (21-22) จากนั้นได้มีนักวิจัยอีกมากที่แยกเชื้อเหล่านี้ได้จากสิ่งแวดล้อม

อื่นๆ คือ Dawson ในปีค.ศ.1971 แยกเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ที่เป็น potential pathogen จากฝุ่นบ้าน (House dust) (23), Jefferies และคณะในปี ค.ศ. 1963 แยกเชื้อได้จากดิน (24), Kubica และคณะในปีค.ศ. 1963 แยกเชื้อได้จากตัวอย่างดินและน้ำ (25), Jone และ Jenkins ในปีค.ศ.1965 แยกเชื้อได้จากดินและฝุ่น(26),Kagamanov ในปี ค.ศ.1967 แยกเชื้อออกจากสิ่งแวดล้อมรอบๆบริเวณคอกวัว (27), Kasatiya และคณะในปีค.ศ.1974 แยกเชื้อได้จากผิวน้ำในประเทศ Quebec (28),Goslee และWolinsky ในปี ค.ศ.1976 แยกเชื้อได้จากน้ำและอธิบายว่าน้ำเป็นแหล่งของ potential pathogen mycobacteria (29) และล่าสุดคือ Byoung และคณะในปี ค.ศ.1984 ทำการศึกษาเชื้อ environmental mycobacteria ในประเทศเกาหลีโดยใช้ตัวอย่างดิน,ฝุ่น,น้ำเสีย และน้ำบ่อ (30) ซึ่งชนิดและปริมาณของเชื้อ มัยโคแบคทีเรีย ที่แยกได้จะแตกต่างกันตามลักษณะภูมิประเทศ และวิธีการของแต่ละคณะผู้วิจัย (6)

ตัวอย่างวัตถุส่งตรวจทั้งจากสิ่งแวดล้อม และผู้ป่วยที่ใช้สำหรับแยกเชื้อ มัยโค-แบคทีเรียนั้นมักจะมีจุลินทรีย์อื่นๆปนเปื้อนอยู่เป็นจำนวนมาก แต่เนื่องจากเชื้อมัยโคแยคทีเรียมีคุณสมบัติทนทานต่อสารเคมีต่างๆได้มากกว่าเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆดังนั้นจึงมีการใช้สารเคมีเป็นตัวกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเหล่านั้น ก่อนที่จะนำวัตถุส่งตรวจนั้นไปเพาะเลี้ยงต่อไป สารเคมีที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ sodium hydroxide ในความเข้มข้น 2-4 % อย่างเดียว ซึ่ง Petroff ค้นพบเป็นคนแรกในปี ค.ศ.1915 (31) และใช้กันอย่างแพร่หลายต่อมา และเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อปนเปื้อนให้มากขึ้นจึงมีการใช้สารเคมีตัวอื่นผสมกับ sodium hydroxide เช่น Tacquet และ Tison ในปีค.ศ.1961 ใช้ lauryl sulphate ผสมกับ sodium hydroxide (32), Kubica และคณะในปี ค.ศ.1963 ใช้ calcium hypochlorite ผสมกับ sodium hydroxide (33), นอกจาก sodium hydroxide แล้วยังมีสารเคมีตัวอื่นๆ อีกเช่น Corper และ Uyei ในปี ค.ศ.1927 ใช้กรดกำมะถัน (Sulphuric acid) (34), Paterson และคณะในปี ค.ศ.1956 ใช้ benzalkonium chloride ผสมกับ trisodium phosphate (35),Reznikov และ Leggo ในปี ค.ศ. 1974 ใช้ 0.01% polysorbate 80 (36) แต่แม้ว่าจะใช้สารเคมีต่างๆเหล่านี้แล้วในบางครั้งก็ประสบความล้มเหลวในการแยกเชื้อ เฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีปริมาณเชื้อปนเปื้อนอยู่มาก (37) หรือเกิดจากพิษของสารเคมีเหล่านั้นต่อตัวเชื้อ มัยโคแบคทีเรีย ที่ต้องการ (38-39) ดังนั้นจึงมีการเติม antibiotic

ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้เป็น selective media และลดจำนวนเชื้อปนเปื้อนได้อีกด้วยเช่น Lorian และ Maddock ในปีค.ศ.1966 ใช้ penicillin ในความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร (40), Gruft ในปี ค.ศ.1965 ใช้ nalidixic acid ในความเข้มข้น 35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (41), Corper และ Cohn ในปี ค.ศ.1952 ใช้ cycloheximide ในความเข้มข้น 10-10000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (42),Petran และ Vera ในปี ค.ศ.1971 ใช้ส่วนผสมของ cycloheximide,lincomycin และ nalidixic acid ในความเข้มข้น 400,2,และ35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (43) สำหรับการวิจัยครั้งนี้จะใช้วิธีกำจัดเชื้อปนเปื้อนโดยวิธีของ Jone และ Jenkins (26) แต่ดัดแปลง-ความเข้มข้นของ benzalkonium chloride เหลือเพียง 0.06% รวมทั้งวิธีการอีกเล็กน้อย ส่วน selective media ดัดแปลงวิธีของ Petran และ Vera (43)โดยใช้ spiramycin แทน nalidixic acid ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein - Jensens ก่อนจะทำให้อาหารแข็ง

การจัดจำแนกหมวดหมู่ของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจต่างๆนั้น แม้จะใช้วิธีของ Runyon (10) ในบางครั้งยังไม่สามารถบอกชนิดได้ จึงเพิ่มวิธีการทดลองใหม่ๆ เช่น การวิเคราะห์สารไขมันของเชื้อ มัยโคแบคทีเรีย โดยวิธี Chromatography เช่น Mark และ Szulga ใช้วิธี Thin-layer Chromatography ช่วยในการพิสูจน์เชื้อ M. fortuitum (44), Tisdollและคณะในปี ค.ศ.1982 ใช้วิธี Gas-liquid Chromotography (45) นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธีทางน้ำเหลืองวิทยา (Serology) โดย Tsong และคณะในปี ค.ศ. 1984 ช่วยแยกความแตกต่างๆระหว่าง M. fortuitum กับ M. chelonei (46), หรือใช้ทั้งสองวิธีรวมกัน โดย Jenkins และคณะ ในปี ค.ศ.1971 (47), รวมทั้งการดู G-C Content โดย Wayne ในปี ค.ศ.1968 (48),การศึกษา DNA Homology โดย Gross ในปี ค.ศ.1970 (49) และการใช้ DNA Hybridization โดย Bases ในปี ค.ศ.1979 และ 1982 (50-51) การใช้ Polyacrylamidegel electrophoresis โดย Haas และคณะในปี ค.ศ.1972 และ 1974 (52-53), รวมทั้งการดู Hemolysis โดย Takeya และคณะในปี ค.ศ.1963 (54)

แม้ว่าจะใช้วิธีต่างๆเหล่านี้เพิ่มขึ้นมาเพื่อช่วยในการจัดจำแนกหมวดหมู่ ก็ยังไม่สามารถแบ่งแยกชนิดของเชื้อมัยโคแบคทีเรียได้ เนื่องจากใช้คุณสมบัติแต่เพียงส่วนน้อย แต่ในปัจจุบันได้มีการนำเอาเครื่องคอมพิวเตอร์มาช่วยในการวิเคราะห์หาความเหมือนกันของเชื้อแต่

ละสายพันธุ์ (13) โดยใช้ลักษณะหลายๆลักษณะทั้งสันฐานวิทยา (morphological properties), สรีรวิทยา (physiological properties) และชีวเคมี (Biochemical properties) รวมกันเพื่อช่วยในการจัดจำแนกเชื้อ เรียกวิธีการแบบนี้ว่า อนุกรมวิธานเชิงตัวเลข (Numurical Taxonomy) เป็นวิธีการจัดกลุ่มที่ใช้หลักของตัวเลขที่แสดงออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่คำณวนได้จากผลลัพธ์ของลักษณะต่างๆที่ใช้ทดสอบของเชื้อแต่ละสายพันธ์ โดยใช้ตัวเลขแทนผลลัพธุ์ของแต่ละการทดสอบ แล้วแสดงการจัดกลุ่มออกมาเป็นรูปแบบของตารางเดนโดรแกรม (Dendrogram) ซึ่งจะแบ่งออกเป็น กลุ่ม (cluster) และกลุ่มย่อยๆ (Subcluster) แต่ต้องมีเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (reference strains) อยู่ในกลุ่มของเชื้อที่จะศึกษาด้วยเพื่อง่ายต่อการจัดแบ่งกลุ่มรวมทั้งต้องมีการผสมกันของลักษณะหลายๆ ลักษณะดังกล่าวแล้วอย่างน้อย 50 ลักษณะ ยิ่งใช้การทดสอบมากผลที่ได้จะมีความแตกต่างกันมากขึ้นทำให้แยกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ออกได้อย่างชัดเจน และต้องกำหนดให้ลักษณะทั้งหมดมีความสำคัญเท่าเทียมกัน และเชื้อที่จะใช้ศึกษาต้องมาจากหลายๆ แหล่งต่างๆ กันสำหรับกลุ่มเชื้อ มัยโคแบคทีเรียชนิดเจริญเร็ว (rapid growers) นั้นมีนักวิจัยหลายคนศึกษาและจัดแบ่งกลุ่มของเชื้อนี้ออกได้อย่างเด่นชัด ทั้งชนิดที่ไม่มีสี Nonphotochromogens และที่มีสี (Scotochromogens) โดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ และวิธีแบบ Numerical Taxonomy เริ่มจาก Kubica และคณะในปี ค.ศ.1972 (55),Saito และคณะในปี ค.ศ.1977 (56), Tsukamura ในปี ค.ศ.1981 (57), Tsukamura และคณะในปี ค.ศ.1983 (58), และล่าสุด Tsukamura และ Satochi ในปี ค.ศ.1986 (59)

<u>หลักการของการศึกษา Numerical Taxonomy</u>

1. เชื้อและลักษณะที่ใช้ทดสอบต้องมีการคัดเลือก
2. ผลของการทดสอบจะอยู่ในรูปของตัวเลข (Numeric code form)
3. คำนวนค่าความคล้ายคลึงระหว่างเชื้อที่ศึกษา (Similarity)
4. จัดแบ่งกลุ่มตามค่าความคล้ายคลึง (Grouping)
5. แสดงผลของการจัดแบ่งกลุ่มเป็นรูปแบบของตารางเดนโดรแกรม (Dendrogram)
6. หาการทดสอบที่สำคัญสำหรับแยกความแตกต่างของกลุ่ม