วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 26 ฉบับที่ 2 มีนาคม - เมษายน 2560

Journal of Health Science
Vol. 26 No. 2, March - April 2017

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

การตรวจแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคด้วยวิธี Spoligotyping

เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ ปร.ด.*
สุปราณี บุญชู วท.บ.*
จณิศรา ฤดีอเนกสิน วท.ม.*
โสภา ศรีสังข์งาม วท.บ.*
กรวรรรณ นพพรพรร วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)*
รัชณีพร คำมินทร์ ปร.ด.**
วรศักดิ์ สุทาชัย วท.ม. (เทคนิคการแพทย์)***
สมชาย แสงกิจพร พ.บ., ปร.ด.*
** สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*
*** สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 จังหวัดพิษณุโลก กรมควบคุมโรค*
**** สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่ กรมควบคุมโรค*

บทคัดย่อ วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสาธารณสุข ทั่วโลกมีข้อมูลสายพันธุ์เชื้อวัณโรคหลายสายพันธุ์ แต่ในประเทศไทยข้อมูลสายพันธุ์มีจำกัด การแยกสายพันธุ์เป็นเครื่องมือทางระบาดวิทยา วิธีการที่เหมาะสมจะแยกสายพันธุ์เชื้อในท้องถิ่นและเปรียบเทียบกับเชื้อต่างถิ่นหรือสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั่วโลกได้ ใช้ประโยชน์ในการสอบสวนโรคติดตามการแพร่ติดต่อ แสดงความหลากหลายและความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ งานวิจัยนี้ทำการศึกษาวิธี spoligotyping ซึ่งใช้แพร่หลายในการแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรค โดยวิเคราะห์ความหลากหลายของ DNA 43 ตำแหน่ง ได้ผลตรวจพิสูจน์เชื้อและสายพันธุ์ จัดทำเป็นฐานข้อมูลสายพันธุ์เชื้อวัณโรค spoligotype ประยุกต์ใช้วิธีการเพื่อศึกษาสายพันธุ์เชื้อวัณโรคในจังหวัดอุตรดิตถ์ พิษณุโลก สุโขทัย และเพชรบูรณ์ จำนวนตัวอย่างเชื้อ 162 ตัวอย่าง แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคปอด นำผลการแยกสายพันธุ์ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลสายพันธุ์ในฐานข้อมูลสากล SpolDB4 พบเชื้อวัณโรคที่ศึกษามีรูปแบบสายพันธุ์ spoligotype 34 รูปแบบ และพบสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่มีในฐานข้อมูล สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ East African-Indian (EAI) และ Beijing รองลงมาได้แก่ สายพันธุ์ H3, U, T1, BOV, S และ Beijing Like ตามลำดับ สัดส่วนของกลุ่มสายพันธุ์ที่พบมากได้แก่ EAI และ Beijing คิดเป็นร้อยละ 43.83 (71/162) และ 35.80 (58/162) ตามลำดับ ในกลุ่มสายพันธุ์ EAI พบสายพันธุ์ EAI2_NTB (Nonthaburi) มากที่สุด ตรวจพบ *Mycobacterium bovis* ซึ่งแสดงการแพร่ติดต่อของวัณโรคจากสัตว์สู่คน วิธีการนี้เหมาะสมในการใช้แยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรค ทำให้ทราบสายพันธุ์เชื้อในผู้ป่วย ความหลากหลายของสายพันธุ์ สายพันธุ์หลักที่มีจำนวนมาก พบสายพันธุ์ใหม่ ข้อมูลสายพันธุ์เป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังและติดตามการแพร่ติดต่อของวัณโรค

คำสำคัญ: **วัณโรค, แยกสายพันธุ์, วิธี spoligotyping**

บทนำ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่เป็นปัญหาทั่วโลก สาเหตุเกิดจากการติดเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex ที่ทำให้เกิดโรคในคนและในสัตว์บางชนิด เชื้ออื่นในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Mycobacterium africanum* , *Mycobac-*

terium bovis, *Mycobacterium microti* , *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* , *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium suricattae* และ *Mycobacterium mungi* โดยมีเชื้อ *Mycobacterium bovis* เป็นเชื้อที่สำคัญในสัตว์ที่ทำให้เกิดวัณโรคในสัตว์และติดต่อคน[1]

วัณโรคในประเทศไทยเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ มีลักษณะโรคแพร่ติดต่อตลอดปี องค์การอนามัยโลกได้จัดให้ประเทศไทยเป็นหนึ่งใน 22 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรครุนแรง โดยมีผู้ป่วยจำนวนมาก ซึ่งมีผลมาจากหลายประการ ได้แก่ ผลกระทบจากโรคเอดส์ซึ่งประเทศไทยมีผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวนมาก ระดับความชุกของการป่วยด้วยโรควัณโรคที่ยังสูง ทำให้มีผู้ป่วยในระยะแพร่เชื้อจำนวนมาก ปัญหาการเคลื่อนย้ายถิ่นฐานของประชากร ปัญหาวัณโรคดื้อยา วัณโรคในกลุ่มแรงงานข้ามชาติ ผู้อพยพ การควบคุมรักษาวัณโรคในบางพื้นที่มีผลสำเร็จต่ำกว่าเป้าหมาย จึงยังคงมีจำนวนผู้ป่วยวัณโรคระยะแพร่โรคสูง รายงานขององค์การอนามัยโลกปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีความชุกของโรค 236 ต่อประชากรแสน อุบัติการณ์เกิดโรค 171 ต่อประชากรแสน จำนวนผู้ป่วยทั้งหมดรายงาน 71,618 ราย และมีอัตราการตาย 11 รายต่อประชากรแสนหรือประมาณ 9,800 ราย[2] ภาคเหนือในพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 จังหวัดพิษณุโลก ในปี พ.ศ. 2558 จำนวนผู้ป่วยวัณโรค 6,054 ราย เป็นผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียน จำนวน 3,257 ราย เปรียบเทียบกับในพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่ จำนวนผู้ป่วย 10,009 ราย เป็นผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียนจำนวน 5,073 ราย[3]

การแยกสายพันธุ์เป็นเครื่องมือทางระบาดวิทยาช่วยสนับสนุนการควบคุมโรคและสอบสวนโรค วิธีการแยกสายพันธุ์ที่ไม่ซับซ้อน ราคาต้นทุนไม่สูง สามารถแยกสายพันธุ์เชื้อได้อย่างละเอียด จะทำให้สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคในท้องถิ่นชุมชน ซึ่งเชื้อมักมีความสัมพันธ์ใกล้ชิด หรือเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่เกิดจากการแพร่ติดต่อ จึงสามารถใช้ติดตามการแพร่ติดต่อของโรคได้ วิธีการที่มีการใช้กันแพร่หลาย และผลการแยกสายพันธุ์ที่สามารถเปรียบเทียบผลได้ระหว่างห้องปฏิบัติการ จะทำให้สามารถเปรียบเทียบข้อมูลสายพันธุ์เชื้อและสามารถติดตามระบาดวิทยาของโรคได้เป็นอย่างดี อาจนำข้อมูลสายพันธุ์ท้องถิ่นไปเปรียบเทียบสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ทั่วโลก ทำให้ค้นพบสายพันธุ์ใหม่ ทราบความชุก การกระจายของสายพันธุ์ การแพร่ติดต่อในท้องที่ชุมชน การพัฒนางานตรวจแยกสายพันธุ์วัณโรคและประยุกต์ใช้ในการติดตามระบาดวิทยาจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสอบสวนเฝ้าระวังโรคและควบคุมวัณโรค โดยเฉพาะที่มีในพื้นที่ที่เป็นปัญหาการแพร่ติดต่อของโรคเป็นระยะเวลานาน

การตรวจแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลมีหลายวิธี อาศัยหลักการวิเคราะห์ความหลากหลายหรือความผันแปรของสารพันธุกรรม วิธีดั้งเดิมได้แก่ restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ที่ใช้ insertion element 6110 (IS6110) เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker)[4] มีรายงานการแยกเชื้อวัณโรคด้วย DNA marker ชนิดนี้ และศึกษาการแพร่ติดต่อเชื้อโรคของผู้ป่วยวัณโรคของประเทศไทย[5,6] วิธีการนี้เป็นวิธีที่แยกสายพันธุ์วัณโรคได้ละเอียด แต่มีข้อจำกัดในการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ การแยกสายพันธุ์โดยวิเคราะห์จำนวน DNA repeat ของ variable number of tandem repeat (VNTR) ซึ่งเป็น DNA ที่มีจำนวนชุดซ้ำ ๆ กัน ในจำนวนที่ต่างกันเป็นอีกวิธีหนึ่ง การแยกสายพันธุ์เชื้อด้วยวิธี spoligotyping เป็นวิธีที่ใช้แพร่หลาย[7,8] และอาจใช้ร่วมกับวิธีการแยกสายพันธุ์วิธีอื่น ทำให้สามารถแยกสายพันธุ์ได้ละเอียดมากขึ้น สามารถแยกเชื้อระหว่าง *M. tuberculosis* และ *M. bovis* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex ได้ การแยกสายพันธุ์ด้วยวิธี spoligotyping ใช้ genetic marker ซึ่งเป็น DNA ใน spacer region ที่อยู่ระหว่าง DNA repeat ที่เรียกว่า Direct repeat (DR repeat) จำนวน 43 ตำแหน่ง[9] genetic marker ที่ขาดหายไปในตำแหน่งต่าง ๆ

ทำให้เกิดรูปแบบที่หลากหลายของ DNA ของเชื้อวัณโรค (genetic polymorphism) สามารถวิเคราะห์และนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อวัณโรคได้ เนื่องจากเป็นวิธีการมาตรฐาน[7-8,10-12] จึงสามารถเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการได้ วิธีการนี้สามารถแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคได้อย่างละเอียด แม้ในสายพันธุ์วัณโรคที่มีความใกล้เคียงกันมาก บันทึกผลในระบบตัวเลข สามารถเปรียบเทียบสายพันธุ์เชื้อวัณโรคโดยใช้ฐานข้อมูลสากล SpolDB4[13] การแยกสายพันธุ์ด้วยวิธีนี้จะทำให้ได้ข้อมูล spoligotype ของสายพันธุ์เชื้อวัณโรคในพื้นที่และยังสามารถบันทึกเป็นฐานข้อมูลสายพันธุ์เชื้อวัณโรคของประเทศได้ต่อไป

ในประเทศไทย การแยกสายพันธุ์และข้อมูลสายพันธุ์เชื้อวัณโรคยังมีอยู่จำกัด การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้วิธี spoligotyping ในการแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรค ศึกษาสายพันธุ์เชื้อวัณโรค และพัฒนางานตรวจแยกสายพันธุ์ทางห้องปฏิบัติการ ทำการแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคที่เพาะเลี้ยงแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยวัณโรคปอดใน 4 จังหวัดภาคเหนือตอนล่าง วิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อโดยใช้ฐานข้อมูลสากล จัดทำฐานข้อมูลสายพันธุ์เชื้อที่ตรวจพบ ศึกษาการใช้ประโยชน์ของข้อมูลสายพันธุ์ด้านระบาดวิทยา เช่น วิเคราะห์การกระจายของเชื้อ การแพร่ติดต่อ ข้อมูลสายพันธุ์ทำให้ทราบสายพันธุ์ที่พบมาก พบสายพันธุ์ใหม่ และเชื้อวัณโรคในพื้นที่ที่ศึกษามีหลากหลายสายพันธุ์ พบการแพร่ติดต่อของวัณโรคจากสัตว์สู่คน เป็นต้น

วิธีการศึกษา

รูปแบบการวิจัยเป็นแบบเชิงพรรณนา โดยวิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อวัณโรคด้วยการตรวจวิเคราะห์ DNA ของเชื้อด้วยวิธี spoligotyping และวิเคราะห์ข้อมูลสายพันธุ์เชื้อ ดำเนินการระหว่างปี 2556-2558

ตัวอย่างเชื้อวัณโรค

ตัวอย่างในการศึกษาเป็นเชื้อวัณโรคจำนวน 162 ตัวอย่าง เพาะเลี้ยงได้จากเสมหะผู้ป่วยวัณโรคปอด ในเขตจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง ได้แก่ จังหวัดอุตรดิตถ์ จำนวน 86 ตัวอย่าง จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 57 ตัวอย่าง จังหวัดสุโขทัย จำนวน 12 ตัวอย่าง และ จังหวัดเพชรบูรณ์ จำนวน 7 ตัวอย่าง ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดเก็บรักษาไว้ที่ -20 °C ในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างเชื้อที่เก็บรักษามาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein-Jensen เชื้อที่เพาะเลี้ยงได้นำมาสกัด DNA และแยกสายพันธุ์

การสกัดสารพันธุกรรม DNA

สกัด DNA จากตัวอย่างเชื้อตามวิธีการของ Phetsuksiri และคณะ[14] โดยดัดแปลงดังนี้ นำเชื้อวัณโรคที่เพาะขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 loop ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก (microtube) ขนาด 1.5 ml ซึ่งบรรจุน้ำกลั่นสะอาด 100 µl จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 20 นาที จะได้สารละลายที่มี DNA นำ DNA ที่ได้เก็บที่ -20 °C รอการตรวจวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

การแยกสายพันธุ์ด้วยวิธี Spoligotyping

ขั้นตอนประกอบด้วยการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายบริเวณ direct repeat ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และตรวจสอบหา DNA marker ด้วย DNA probe โดยวิธี Hybridization ในการศึกษานี้ดำเนินการตาม Kamerbeek และคณะรายงาน[15] การเพิ่ม DNA เป้าหมายโดยเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ direct repeat ใช้ primer DRa (GGTTTTGGGTCTGACGAC) และ primer DRb (CCGAGAGGGGACGGAAAC) ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 10x buffer 1.5 µl, PCR DIG labeling mix 1.5 µl, primer DRa (10 µmol) 1 µl, primer DRb (10 µmol) 1 µl และ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN, Germany) ซึ่งมี Q5x solution 3 µl และ *Taq* polymerase (5 unit) 0.25 µl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 µl แล้วเติมสารละลาย DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างเชื้อ 5 µl โดยมีปริมาตรรวม 15 µl ทำปฏิกิริยา PCR โดยเครื่องเพิ่มสารปริมาณพันธุกรรม (Eppendoff, Germany) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นตอน denaturation ที่ 98°C 60 วินาที 1 รอบ เข้าสู่ 35 รอบของขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA โดย denaturation ที่ 98°C 5 วินาที annealing ที่ 55°C 10 วินาที และ

extension ที่ 72°C 30 วินาที เข้าสู่ขั้นตอน extension รอบสุดท้ายที่ 72°C 1 นาที และ 4°C ตามลำดับ โดยใช้เชื้อวัณโรคสายพันธุ์อ้างอิง (*M. tuberculosis* H37Ra) เป็น Positive control และ distilled water free DNA/RNA เป็น Negative control เมื่อปฏิกิริยา PCR เรียบร้อยแล้ว เก็บ PCR product ที่ −20°C รอวิเคราะห์ DNA marker จำนวน 43 ตำแหน่ง ด้วยปฏิกิริยา hybridization

การทำปฏิกิริยา hybridization เพื่อตรวจสอบ DNA marker ด้วย DNA probe 43 ตำแหน่ง มีขั้นตอนคือ ผสม PCR product และ Hybri-buffer ลงใน หลอดขนาดเล็ก 1.5 ml นำไป denature โดยบ่มที่ 95°C จนครบเวลาที่ต้องการ แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมตัวอย่างดังกล่าวลงในหลอดที่มี spoligo membrane โดย membrane มี DNA probe 43 ตำแหน่ง นำไปอุ่นที่ 60°C เกิดปฏิกิริยา hybridization แล้วล้าง spoligo membrane 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 60°C ด้วย 1X TBST-E buffer เพื่อล้าง DNA ส่วนที่ไม่จับกับ DNA probe ออก ตรวจสอบหา DNA marker โดยบ่มปฏิกิริยา spoligo membrane ในน้ำยา POD (POD 1 µl : 1X TBST-E 1.5 ml) แล้วล้าง spoligo membrane อีก 3 ครั้ง ด้วย 1X TBST-E buffer ทำการตรวจสอบสีที่แถบ DNA จับกับ DNA probe ด้วยการบ่ม spoligo membrane ในสารละลาย TMB จนแถบ DNA ของ spoligo pattern ปรากฏสี ขึ้นชัดเจนแล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำ

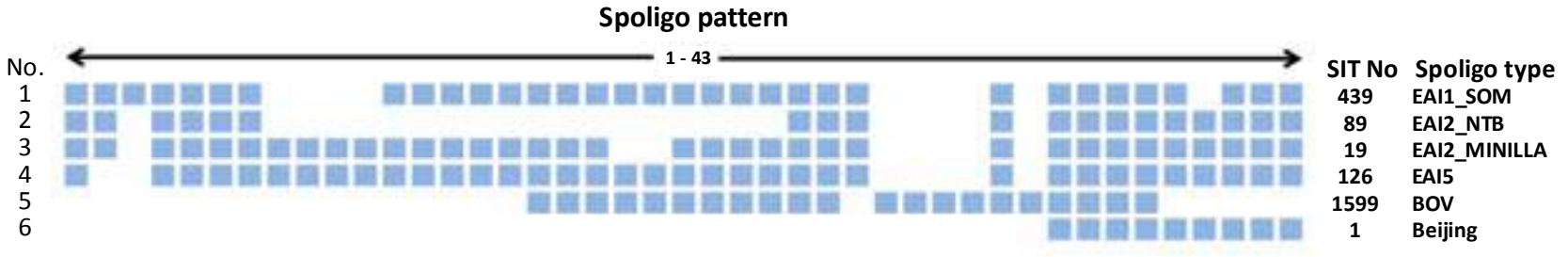
การอ่านผลและแปลผล Spoligotype

อ่านผลบน spoligo membrane ซึ่งมี DNA probe จุดเล็กๆ จำนวน 43 จุด หลังทำปฏิกิริยา hybridization แล้วจะปรากฏจุดขึ้นบน spoligo membrane ซึ่งคือ Direct repeat spacer (DR spacer) ที่มีแตกต่างกันตามแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรค ทำให้สามารถแยกสายพันธุ์ของวัณโรคได้ การอ่านจุดที่พบบน spoligo membrane ใช้โปรแกรม MS Excel (Microsoft®) ที่มีสูตรในการวิเคราะห์คำนวณ โดยแทนตำแหน่งที่พบจุดบน spoligo membrane เป็น 1 และตำแหน่งที่ไม่พบจุดเป็น 0 จนครบทั้ง 43 ตำแหน่ง เมื่อบันทึกผลลงในตารางของโปรแกรม MS Excel แล้วจะประมวลผลคำนวณเป็นตัวเลข 15 หลัก จากนั้นนำตัวเลข 15 หลักที่ได้ไปเทียบหาสายพันธุ์โดยเปรียบเทียบกับตัวเลขของสายพันธุ์เชื้อในฐานข้อมูล SpolDB4 ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ต่างกันจะมีตัวเลขต่างกัน และมี spoligo pattern ต่างกันด้วย ตัวอย่าง spoligo pattern ในฐานข้อมูล SpolDB4 ดังภาพที่ 1 ซึ่งแสดง spoligo pattern ของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ EAI1_SOM, EAI2_Nonthaburi, EAI2_Manila, EAI5 และแสดง spoligo pattern ของเชื้อ *M. bovis* เปรียบเทียบกับ spoligo pattern ของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ Beijing ฐานข้อมูล SpolDB4 มีการรวบรวม spoligo pattern ของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ต่างๆ ทั่วโลกไว้ พร้อมกับเลข SIT No (spoligotype international type number) ซึ่งเป็นเลขประจำสายพันธุ์ ดังภาพที่ 2 ฐานข้อมูลดังกล่าวยังคงมีการเพิ่มเติมข้อมูลสายพันธุ์ที่มีการค้นพบใหม่อยู่เป็นระยะๆ โดย Pasteur Institute of Guadeloupe [13] ในการแยกสายพันธุ์ด้วยวิธี Spoligotyping นี้ หากวิเคราะห์แล้วไม่พบว่ามีสายพันธุ์ในฐานข้อมูล ให้แปลผลว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่

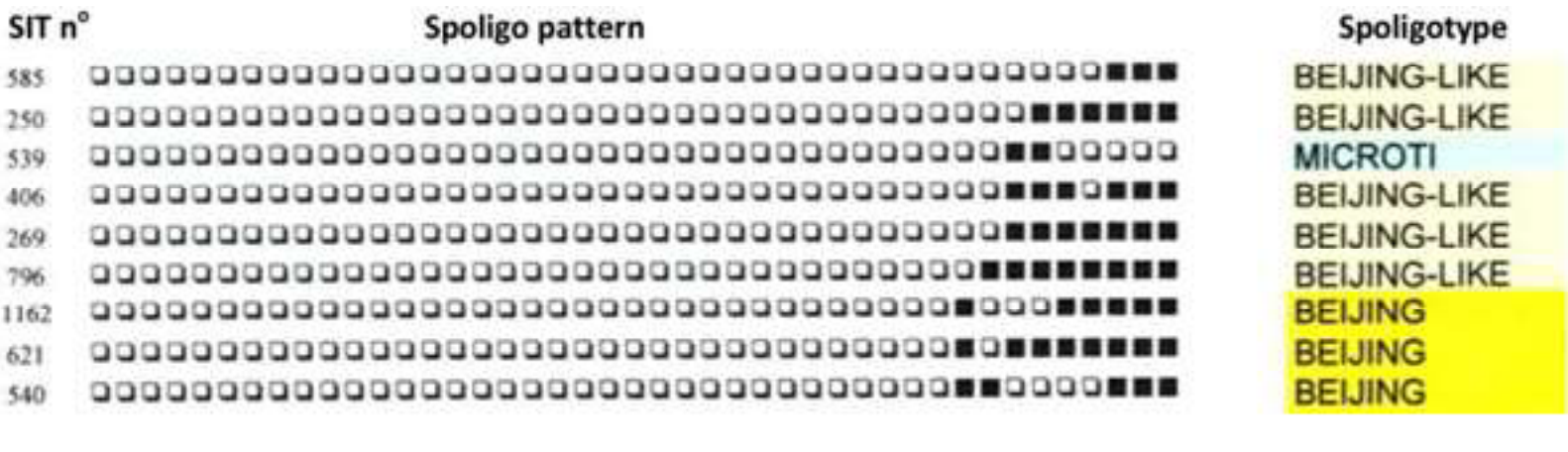
ผลการศึกษา

จากการศึกษาสายพันธุ์วัณโรคจากผู้ป่วยในเขตภาคเหนือตอนล่าง 162 ตัวอย่าง ใน 4 จังหวัด นำผลการแยกสายพันธุ์ที่ได้ไปเทียบกับ spoligo pattern ในฐานข้อมูลสากล SpolDB4 พบเชื้อวัณโรคในจังหวัดอุตรดิตถ์ พิษณุโลก สุโขทัย และเพชรบูรณ์ มีความหลากหลายของสายพันธุ์ (ตาราง 1 และภาพที่ 3) โดยมีรูปแบบ spoligo pattern ที่ต่างกัน 34 รูปแบบ ซึ่ง spoligo pattern ที่ต่างกันจะมี SIT No ต่างกัน และ SIT No เดียวกัน เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน spoligo pattern ที่คล้ายกันสามารถจัดกลุ่มได้ ในการศึกษานี้ เชื้อทั้งหมดสามารถจัดกลุ่มได้ 9 กลุ่มสายพันธุ์ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 3) นอกจากนี้พบเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ใหม่ 14 ตัวอย่าง ซึ่งสายพันธุ์ใหม่นี้มี spoligo pattern ต่างกัน รวม 11 รูปแบบ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 3)

ภาพที่ 1 Spoligo pattern ของ DR spacersจำนวน 43 ตำแหน่ง แสดง spoligo pattern ของเชื้อ*M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่าง ๆ และ spoligo pattern ของเชื้อ *M. bovis*



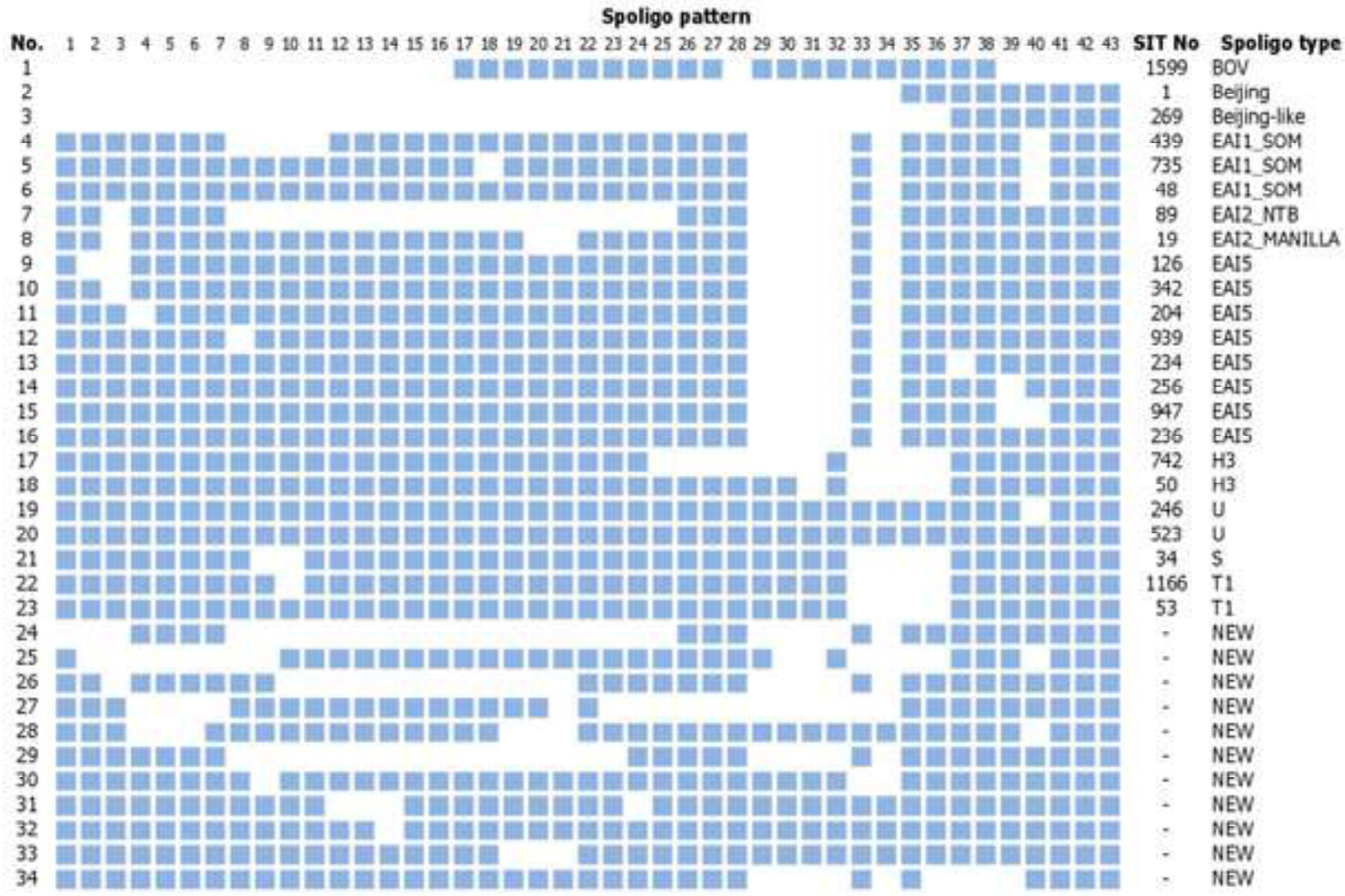
ภาพที่ 2 แผนภาพผลวิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อวัณโรคด้วย SpolDB4 แสดง SIT No และ spoligo pattern ใช้ค้นหาสายพันธุ์-วัณโรค จุดแสดง DR spacersจำนวน 43 ตำแหน่ง เรียงกันบน spoligo membrane โดยจุดสีดำแสดงตำแหน่งของ DR spacer ที่พบ และจุดสีขาวคือตำแหน่งของDR spacer ที่ไม่พบในสายพันธุ์นั้น ๆ ส่วนแถบสีแสดงผลการวิเคราะห์เป็นชื่อของสายพันธุ์ตามรูปแบบจุดของspolilgo pattern ที่พบบน spoligo membrane



ตารางที่ 1 สายพันธุ์เชื้อวัณโรคที่พบในเขตจังหวัดอุตรดิตถ์ พิษณุโลก สุโขทัย และเพชรบูรณ์ แยกสายพันธุ์ด้วยวิธีspoligotyping

กลุ่มสายพันธุ์	จำนวนตัวอย่างเชื้อวัณโรค				
	จังหวัดอุตรดิตถ์	จังหวัดพิษณุโลก	จังหวัดสุโขทัย	จังหวัดเพชรบูรณ์	รวม
EAI Groups	39	24	6	2	71
- EAI2_NTB	18	15	4	1	38
- EAI5	12	7	1	1	21
- EAI2_MANILLA	5	1	-	-	6
- EAI1_SOM	4	1	1	-	6
BEIJING	28	21	5	4	58
New type	7	7	-	-	14
H3	4	2	-	-	6
U	2	2	1	1	6
T1	1	1	-	-	2
BOV	2	-	-	-	2
S	2	-	-	-	2
BEIJING LIKE	1	-	-	-	1
จำนวนรวม	86	57	12	7	162

ภาพที่ 3 Spoligo pattern ที่พบทั้งหมดในการศึกษานี้จำนวน 34 รูปแบบ การปรากฏของ DNA marker ในแต่ละตำแหน่งทำให้เกิดรูปแบบที่แตกต่างกันของ spoligo pattern เมื่อเปรียบเทียบกับ spoligo pattern ใน SpolDB4 จะมี spoligo pattern ที่เหมือนกัน จะได้เลขประจำสายพันธุ์ (identity, ID) ที่เรียกว่า SIT number เดียวกัน SIT number (SIT no) และมีชื่อเรียกแต่ละสายพันธุ์



เมื่อวิเคราะห์สัดส่วนของกลุ่มสายพันธุ์ กลุ่มสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ East African-Indian (EAI) คิดเป็นร้อยละ 43.83 (71/162) ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย EAI2_NTB, EAI5, EAI2_Manila และ EAI1_SOM โดยพบสายพันธุ์ EAI2_NTB (Nonthaburi) (SIT no 89) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 23.46 (38/71) รองลงมาคือกลุ่ม Beijing (SIT no 1) คิดเป็นร้อยละ 35.80 (58/162) และสายพันธุ์อื่น ได้แก่ H3, U, T1, BOV, S และ Beijing Like ซึ่งพบน้อย จากตัวอย่างเชื้อที่ศึกษากล่าวได้ว่า เชื้อวัณโรคสายพันธุ์ EAI และ Beijing เป็นสายพันธุ์ที่มีความชุกสูงในภาคเหนือตอนล่าง 4 จังหวัดนี้ นอกจากนี้ spoligotyping สามารถตรวจแยกเชื้อ *M. bovis* (BOV, SIT no 1599) (ตาราง 1 และภาพที่ 3) จำนวน 2 ตัวอย่าง แสดงถึงการแพร่ติดต่อของวัณโรคจากสัตว์สู่คน

วิจารณ์

เชื้อวัณโรคมีหลายสายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์มีความรุนแรงในการก่อโรค และมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิต้านทานของร่างกายที่แตกต่างกัน บางสายพันธุ์มักเป็นเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา เช่น สายพันธุ์ Beijing มักดื้อต่อยาหลัก isoniazid และหรือ rifampicin การศึกษาสายพันธุ์เชื้อวัณโรค ทำให้เข้าใจระบาดวิทยาและการแพร่ติดต่อของวัณโรคดียิ่งขึ้น

การศึกษาสายพันธุ์เชื้อวัณโรคในที่แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคในจังหวัดอุตรดิตถ์ พิษณุโลก สุโขทัย และเพชรบูรณ์ที่รายงานนี้ ใช้วิธี spoligotyping ในการวิเคราะห์แยกสายพันธุ์ สามารถแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคได้เช่นเดียวกับที่มีรายงานการศึกษาวิจัย[16-19] ข้อมูลสายพันธุ์ทำการจัดเก็บรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูล spoligotype SIT

No ต่าง ๆ วิธีการมีความเหมาะสม ใช้กันอย่างแพร่หลาย มีฐานข้อมูลสากล จึงเป็นวิธีการที่ใช้ประโยชน์ในวิเคราะห์สายพันธุ์ได้อย่างกว้างขวาง สามารถที่จะใช้ติดตามการแพร่ติดต่อของวัณโรคได้ในพื้นที่เฉพาะ เช่น พื้นที่หรือชุมชนที่มีการแพร่ระบาด หรือศึกษาในกลุ่มประชากรที่สนใจ ในการศึกษานี้ เนื่องจากตัวอย่างเชื้อที่ศึกษาเป็นตัวอย่างที่ได้จากคลังเก็บรักษาเชื้อ คัดเลือกตัวอย่างจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ และเนื่องจากเชื้อไม่ได้คัดเลือกจากทุกภาคส่วนของจังหวัดหรือภูมิภาค จึงเป็นการศึกษาระบาดวิทยาโมเลกุลโดยวิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อวัณโรคในพื้นที่เฉพาะ ซึ่งไม่เคยมีการแยกสายพันธุ์เชื้อในพื้นที่นี้มาก่อน

จากการวิเคราะห์ข้อมูลสายพันธุ์ในการศึกษานี้ ทำให้ทราบสายพันธุ์เชื้อวัณโรคในผู้ป่วยแต่ละราย สายพันธุ์เชื้อที่มีในท้องถิ่นชุมชน สายพันธุ์ที่มีการแพร่ติดต่อจำนวนมาก และพบเชื้อวัณโรคมีหลายสายพันธุ์ ขณะเดียวกันก็มีการพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ การกระจายของเชื้อใน 4 จังหวัดเปรียบเทียบแล้วมีรูปแบบที่คล้ายกัน อาจเนื่องมาจากมีพื้นที่ติดกัน และประชากรมีการเดินทางติดต่อกัน ทำให้เชื้อมีการแพร่ติดต่อหรือเป็นเชื้อประจำถิ่น โดยเชื้อสายพันธุ์กลุ่มใหญ่พี่พบมากที่สุด ได้แก่ EAI และกลุ่ม Beijing ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการแพร่ติดต่อมากเหมือนกันทั้งใน 4 จังหวัด สายพันธุ์ Beijing มีรายงานเป็นสายพันธุ์เชื้อวัณโรคที่พบมากทั่วโลก และมักพบในภูมิภาคเอเชียตะวันออก สอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อน[20-21] และสายพันธุ์ Beijing ส่วนใหญ่มักดื้อยา[22] เชื้อวัณโรคสายพันธุ์ที่พบกลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่ม EAI และ Beijing นี้ สามารถแยกเป็นสายพันธุ์ย่อย (subtype) ด้วยวิธีการอื่น นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *M. bovis* (Bov) ซึ่งเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มของ *M. tuberculosis* complex จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยเชื้อ *M. bovis* มักพบในปศุสัตว์ แต่สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ ทำให้ทราบว่าเชื้อมีการแพร่ติดต่อจากสัตว์สู่คน ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจเนื่องจากจะช่วยทำให้มีติดตามสัตว์ป่วยเป็นวัณโรคในปศุสัตว์ รวมถึงการสอบสวนโรคในผู้ที่ดูแลสัตว์เลี้ยงแล้วป่วยเป็นวัณโรคเพื่อลดการแพร่กระจายของโรค สิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาอีกประการหนึ่งได้แก่ การตรวจพบเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ใหม่ จำนวน 14 ตัวอย่าง ซึ่งมีรูปแบบ spoligo pattern ที่ต่างกัน 11 รูปแบบ หากวิเคราะห์สายพันธุ์ต่อไป อาจพบมีการแพร่ติดต่อของสายพันธุ์ใหม่ ทำให้มีการตรวจพบสายพันธุ์ใหม่แต่ละสายพันธุ์มีจำนวนมากกว่า 1 ตัวอย่างหรือมีจำนวนมากขึ้น สำหรับการแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคด้วยวิธีอื่นและข้อมูลการแยกสายพันธุ์ในพื้นที่อื่นในประเทศไทยจะมีการศึกษาวิจัยต่อไป

สรุป

วิธี spoligotyping สามารถแยกสายพันธุ์ของวัณโรคได้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก เหมาะสม สามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ฐานข้อมูลสายพันธุ์สากล SpolDB4 ทำให้ทราบสายพันธุ์เชื้อที่ก่อโรค การกระจายของสายพันธุ์ ความหลากหลายของสายพันธุ์ การแพร่ติดต่อ ข้อมูลสายพันธุ์เชื้อสนับสนุนการดำเนินงานควบคุมและป้องกันโรค และการศึกษาด้านระบาดวิทยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้บริหาร และเจ้าหน้าที่ของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 จังหวัดพิษณุโลก และสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่ ที่สนับสนุนการดำเนินงานวิจัย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สนับสนุนงบประมาณ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขสนับสนุนการดำเนินงาน และขอขอบคุณ Professor Dr. Yasuhiko Suzuki และ Professor Dr. Chie Nakajima มหาวิทยาลัยออกไกโด ประเทศญี่ปุ่น ในการให้คำปรึกษาการศึกษาวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Wikipedia. *Mycobacterium tuberculosis* complex [Internet]. [cited 2016 Mar 19]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_tuberculosis_complex

2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015 [Internet]. [cited 2016 Mar 19]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/97892415 65059_ eng.pdf
3. กรมควบคุมโรค. การจัดทำแผนปฏิบัติราชการ กรมควบคุมโรค ปีงบประมาณ 2560. นนทบุรี: กรมควบคุมโรค; 2559.
4. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, GicqueI B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993;31:406-9.
5. Sukkasem S, Yanai H, Mahasirimongkol S, Yamada N, Rienthong D, Palittapongarnpim P, et al. Drug resistance and IS*6110*-RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with recurrent tuberculosis in northern Thailand. Microbiol Immunol 2013;57:21-9.
6. Faksri K, Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Brown T, Prammananan T, Palittapongarnpim P, et al. Epidemiological trends and clinical comparisons of *Mycobacterium tuberculosis* in Thai TB meningitis. Tuberculosis 2011;91:594-600.
7. Noguti EN, Leite CQF, Malaspina AC, Santos AC, Hirata RD, Hirata MH, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Paraná in southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010;105:779-85.
8. Githui WA, Jordaan AM, Juma ES, Kinyanjui P, Karimi FG, Kimwomi J, et al. Identification of MDR-TB Beijing/W and other *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Nairobi, Kenya. Int J Tuberc Lung Dis 2004;8:352-60.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Guide to the Application of Genotyping to Tuberculosis Prevention and Control (Internet). 2012 Available from: http://www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/chap3/3_cdclab_2description.htm
10. Goyal M, Lawn S, Afful B, Acheampong JW, Griffin G, Shaw R. Spoligotyping in molecular epidemiology of tuberculosis in Ghana. J Infect 1993;38:171-5.
11. Gori A, Bandera A, Marchetti G, Degli EA, Lidia C, Piero NG, et al. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. Emerg Infect Dis 2005;11:1242-8.
12. Hasan Z, Tanveer M, Kanji A, Hasan Q, Ghebremichael S, Hasan R. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan reveals predominance of Central Asian Strain 1 and Beijing isolates. J Clin Microbiol 2006;44:1763-8.
13. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 2006;6:1-17.
14. Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Bunchoo S, Rienthong D, Mukai T, et al. Applicability of in-house loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex grown on solid media. Jpn J Infect Dis 2013;66:249-51.
15. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997;35:907-14.
16. Rohani M, Farnia P, Nasab MN, Moniri R, Torfeh M, Amiri MM. Beijing genotype and other predominant *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes observed in Mashhas city, Iran. Indian J Med Microbiol 2009;27:306-10.
17. Gehre F, Antonio M, Faïhun F, Odoun M, Uwizeye C, de Rijk P, et al. The first phylogeographic population structure and analysis of transmission dynamics of *Mycobacterium africanum* West African 1-combining molecular data from Benin, Nigeria and Sierra Leone. PLoSONE 2013;8:e77000.
18. Filliol I, Driscoll JR, Soolingen DV, Kreiswirth BN, Kremer K, Valétudie G, et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. Emerg Infect Dis 2002;8:1347-9.

19. Eldholm V, Matee M, Mfinanga SG, Heun M, Dahle UR. A first insight into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Dares Salaam, Tanzania, assessed by spoligotyping. BMC Microbiol 2006;6:76.
20. Bifani PJ, Mthema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W. Beijing family strain. Trends Microbiol 2002;10:45-52.
21. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. J Clin Microbiol 1995;33:3234-8.
22. Tran N, van Soolingen BD, Huyen MNT. Increased transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with resistance to streptomycin a population-based study. PLoSONE 2012;7:e42323.

Abstract: Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* by Spoligotyping

Benjawan Phetsuksiri, Ph.D.*; Supranee Boonchu, B.Sc.*; Janisara Rudeeaneksin, M.Sc.*; Sopa Srisangngam, B.Sc.*; Korawan Noppornpun, M.Sc.*; Rachneeporn Khummin, Ph.D.; Worasak Suthachai, M.Sc.***; Somchai Sangkitporn, M.D., Ph.D.***

** National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand; ** The Office of Disease Prevention and Control 2, Phitsanulok; *** The Office of Disease Prevention and Control 1, Chiang Mai*

Journal of Health Science 2017;26:447-55.

Tuberculosis (TB) remains an infectious disease causing a public health problem. Presence of different lineages of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) has been noted while there are very limited genotype data available pertaining strains circulated in Thailand. Genotypic method is an epidemiological tool to differentiate local strains and allow the comparison of strains with global isolates. Genotyping is useful for epidemiological investigation and tracking of TB transmission. The genotypes elucidate diversity of strains circulating and the genetic link among the isolates. This study manipulated spoligotyping and aimed to investigate strains circulating in Uttaradit, Phitsanulok, Sukhothai and Phetchabun provinces of Thailand. A total of 162 MTC isolates collected from pulmonary tuberculosis patients were genotyped by spoligotyping, and the strains were compared with those in the international spoligotype database (SpolDB4). Altogether 34 different spoligotype patterns were identified; and new genotypes were found as unidentified families or had individual non-clustering genotypes of *M. tuberculosis*. The East African-Indian (EAI) groups were the predominant strains followed by Beijing, H3, U, T1, BOV, S and Beijing Like. The proportions of majorities, EAI and Beijing were 43.30% (71/162) and 35.80% (58/162), respectively. EAI2_NTB (Nonthaburi) was the most frequent spoligotype among the EAI groups. In addition, 2 isolates were identified to be *Mycobacterium bovis* suggesting the transmission of tuberculosis between human and animals. Therefore, spoligotyping revealed the diversity of MTC strains circulating in this region. The major and the minor groups as well as the new MTC strains could be identified. Thus, data of genotypes should be useful in supporting surveillance and control of tuberculosis.

Key words: **tuberculosis, genotyping, spoligotyping**