

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

ระบาดวิทยาและสายพันธุ์เชื้อวัณโรคในเขตพื้นที่ระบาดวัณโรคต้อยา
จังหวัดกาญจนบุรี**Epidemiology and genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* at an outbreak area
in Kanchanaburi province**

อนุพงศ์ สุจริยากุล* พ.บ., ประด.

Anupong Sujariyakul* M.D., Ph.D.

จณิสรา ฤทธิเนกสิน** พ.บ.

Janisara Rudeeaneksin** M.Sc.

ณัฐกัญญา ทิพย์เครือ* พ.บ.

Nattakan Tipkrua* M.Sc.

เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ** ประด.

Benjawan Phetsuksiri** Ph.D.

*สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5

*Office of Disease Prevention and Control Region 5,

จังหวัดราชบุรี กรมควบคุมโรค

Ratchaburi, Department of Disease Control

**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

**National Institute of Health,

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข การแยกสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคมีประโยชน์ในการสอบสวนด้านระบาดวิทยาและติดตามการแพร่ติดต่อของโรค การศึกษานี้ทำการแยกสายพันธุ์และศึกษาการแพร่ติดต่อของเชื้อวัณโรค ในเขตอำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งมีการระบาดของเชื้อวัณโรคต้อยา โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprint) ของเชื้อวัณโรคที่เพาะเลี้ยงจากเสมหะผู้ป่วยที่ได้รับการขึ้นทะเบียนรักษาวัณโรคระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557 จำนวน 68 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้เป็นเชื้อต้อยาลายพิมพ์ (การติดเชื้อ isoniazid และ rifampicin) จำนวน 20 ตัวอย่าง และเป็นเชื้อต้อยาหลัก isoniazid หรือ rifampicin ชนิดเดียว จำนวน 5 ตัวอย่าง ใช้วิธีการที่เป็นสากลในการแยกสายพันธุ์ ได้แก่ spoligotyping และการวิเคราะห์ Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat (MIRU-VNTR) ผลการแยกสายพันธุ์พบเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ Beijing มีจำนวนมาก คิดเป็นร้อยละ 50.00 (34/68) สายพันธุ์อื่น 12 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ใหม่ 7 สายพันธุ์ ผลการแยกย่อยสายพันธุ์ (subtype) ในกลุ่ม Beijing พบเชื้อ 14 ตัวอย่าง เป็นสายพันธุ์เดียวกัน และเป็นเชื้อต้อยาลายพิมพ์ ผลการจำแนกสายพันธุ์ในครั้งนี้เชื่อมโยงการระบาดของเชื้อวัณโรคต้อยาในเขตอำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี ตั้งแต่ พ.ศ. 2545 จนถึงปัจจุบันได้ บ่งชี้สายพันธุ์ที่สำคัญซึ่งเป็นสาเหตุการแพร่ระบาดของเชื้อวัณโรคต้อยาที่ยากต่อการควบคุมกำจัดการแพร่ติดต่อได้ ควรมีการติดตามการระบาดโดยตรวจแยกสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง และกำหนดมาตรการในการควบคุมการแพร่ติดต่อ การป้องกันและรักษาอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

Abstract

Tuberculosis (TB) is one of the leading public health problems. Genotypic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is useful for epidemiological investigation and tracking of TB transmission. This study aimed to genetically identify and observe transmission of MTB by analyzing DNA fingerprints of

tubercle bacilli isolated from pulmonary TB patients who were registered at an outbreak area of Thamaka district, Kanchanaburi province in 2013–2014. Sixty-eight DNA samples including twenty multidrug-resistant (MDR), and five mono-resistant MTB either to isoniazid or rifampicin were genotyped based on spoligo-typing and subtyped using Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat (MIRU-VNTR). The results revealed that 34 of 68 (50.00%) isolates belonged to Beijing genotype (SIT No. 1). Other twelve and seven new spoligotypes were identified. The major cumulative subtype of Beijing cluster was MDR-TB, and 14 of these had identical MIRU-VNTR genotype. This evidence linked to the strains of *M. tuberculosis* that have been found at an MDR-TB outbreak in Thamaka district, Kanchanaburi province since the year 2002. It suggests that this area still has MDR-TB transmission which cannot be eliminated over the time. MTB genotyping, proper measures of TB prevention and control should be continued.

คำสำคัญ
วัณโรคดื้อยา

Key words

drug resistant tuberculosis, spoligotype, MIRU-VNTR

บทนำ

วัณโรคเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุข หน่วยงานขององค์การอนามัยโลกปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทย มีผู้ป่วยวัณโรครวม 67,722 ราย จัดอยู่ในกลุ่ม 22 ประเทศ ที่มีผู้ป่วยวัณโรคจำนวนมาก มีอัตราการดื้อยาหลายขนาน ในผู้ป่วยใหม่ร้อยละ 3.70 (มีจำนวน 9,000 ราย) และ ในผู้ป่วยที่เคยรักษามาก่อนมีอัตราร้อยละ 18.00 (มีจำนวน 2,900 ราย)⁽¹⁾ จังหวัดกาญจนบุรีเป็นจังหวัด ที่มีปัญหาวัณโรคดื้อยามากแห่งหนึ่งของประเทศ สถานการณ์วัณโรคของจังหวัดตั้งแต่ปีงบประมาณ 2549–2557 มีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ทุกประเภท คนไทย ปีละประมาณ 700 ราย ต่างชาติ 200 ราย ในจำนวนนี้เป็นผู้ป่วยวัณโรครายใหม่เสมหะพบเชื้อคนไทยประมาณ 400 ราย ต่างชาติ 100 ราย อัตราผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ เสมหะพบเชื้อต่อแสนประชากร ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2552–2557 เท่ากับ 46.50, 49.59, 44.14, 45.10, 47.56 และ 43.85 ตามลำดับ การแพร่ระบาดของวัณโรค ดื้อยาหลายขนานในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรีเกิดขึ้น ตั้งแต่ก่อนปี 2549 และมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น ในปี 2552 ทำให้มีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานมาก ของประเทศไทย โดยเฉพาะอำเภอท่ามะกา สำหรับปี

2557 ผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาส่วนใหญ่อยู่ในอำเภอท่ามะกา พบร้อยละ 50.00 รองลงมาคือ อำเภอท่าม่วงและ พนมทวน ร้อยละ 10.00 อำเภอเมืองและบ่อพลอย ร้อยละ 8.00 ตามลำดับ จากข้อมูลตั้งแต่ปี 2552–2557 ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีสัญชาติไทย จำนวน 35 ราย 26 ราย 40 ราย 39 ราย 30 ราย และ 38 รายตามลำดับ ใน กลุ่มต่างชาติ ตั้งแต่ปี 2552–2557 มีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา 2 ราย 1 ราย 0 ราย 5 ราย 1 ราย และ 1 ราย ตามลำดับ สำหรับผลการรักษาผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ในกลุ่มผู้ป่วยคนไทย อัตราความสำเร็จมีแนวโน้มสูงขึ้น ส่วนในกลุ่มต่างชาติ ผลการรักษาส่วนใหญ่ขาดยาเนื่องจาก ย้ายกลับประเทศ⁽²⁾

วัณโรคเป็นโรคติดต่อเรื้อรังอุบัติซ้ำมีผลกระทบ ต่อผู้ป่วยมาก ทั้งด้านสุขภาพ ผลทางสังคมจากการ รั้งเกยจกการติดต่อ ผลทางเศรษฐกิจ ขาดงาน และค่าใช้จ่ายในการรักษาติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งค่าใช้จ่าย เพิ่มสูงขึ้นมากในผู้ป่วยดื้อยาซึ่งมักล้มเหลวในการรักษา หรือเสียชีวิต มีการแพร่ติดต่อ เกิดปัญหาในการควบคุม โรค วิธีควบคุมวัณโรคที่ดีคือ การวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องรวดเร็ว ให้การรักษาวัณโรคด้วยยาที่ได้ผลมี ประสิทธิภาพ ป้องกันไม่เกิดปัญหาวัณโรคดื้อยา เนื่องจาก

เชื้อวัณโรคเจริญช้า การทดสอบความไวของเชื้อดื้อยาโดยอาศัยการเพาะเชื้อจะใช้เวลานาน การตรวจวัณโรคและวัณโรคดื้อยาที่ได้ผลเร็ว จะเป็นประโยชน์ในการรักษาและควบคุมโรค⁽³⁾ การรักษาผู้ป่วยวัณโรคทั่วไป จะใช้ยาสูตรมาตรฐานประกอบด้วยยาหลายชนิด เพื่อป้องกันปัญหาการดื้อยา ใช้เวลารักษาอย่างน้อย 6 เดือน ยาที่เลือกใช้เมื่อวัณโรคดื้อยาหลักหลายขนาน (multi-drug resistant tuberculosis, MDR-TB) ซึ่งดื้อต่อยา isoniazid และ rifampicin ใช้ยาสำรอง เช่น ofloxacin ปัญหาเชื้อวัณโรคดื้อยาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และผู้ป่วยวัณโรคที่เคยรักษาวัณโรค⁽³⁻⁵⁾

ในปี พ.ศ. 2554 มีรายงานพบวัณโรคดื้อยาระบาดต่อเนื่องในชุมชน อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545⁽⁴⁾ และมีการตรวจลายพิมพ์ DNA ของเชื้อวัณโรคในพื้นที่นี้⁽⁶⁻⁷⁾ เพื่อวิเคราะห์การระบาด ค้นหาแหล่งแพร่โรค ความรุนแรงของโรค ศึกษาแนวโน้มการแพร่ติดต่อ วิวัฒนาการของเชื้อวัณโรคในการกลายพันธุ์ ซึ่งดื้อต่อยาต้านวัณโรค และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคในพื้นที่ซึ่งจะช่วยให้ทราบสถานการณ์ของวัณโรคและวัณโรคดื้อยา มีการติดตามประสิทธิผลในการรักษา และดำเนินการป้องกันและควบคุมวัณโรค พบเชื้อวัณโรคที่ระบาดส่วนใหญ่ในพื้นที่กาญจนบุรีตั้งแต่ปีพ.ศ. 2545 ถึง พ.ศ. 2553 เป็นสายพันธุ์ Beijing และเชื้อสายพันธุ์ Beijing ส่วนใหญ่ดื้อยา ปัจจุบันปัญหาเชื้อวัณโรคดื้อยาระบาดยังคงมีอยู่ในพื้นที่นี้ การพัฒนางานตรวจแยกสายพันธุ์วัณโรคและประยุกต์ใช้ในการติดตามระบาดวิทยา⁽⁶⁻²⁰⁾ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเฝ้าระวังและควบคุมวัณโรค โดยเฉพาะที่มีในพื้นที่ที่เป็นปัญหาการแพร่ติดต่อของโรคเป็นระยะเวลานาน

การแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคมีหลายวิธี เช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นวิธีดั้งเดิมใช้ DNA marker ชนิด IS6110 ซึ่งมีเฉพาะในเชื้อวัณโรค สามารถใช้แยกเชื้อวัณโรคจากเชื้อมัคโคแบคทีเรียอื่นได้ และใช้แยกสายพันธุ์ในการศึกษาด้านวิวัฒนาการของเชื้อและระบาดวิทยา⁽⁹⁻²³⁾ มีรายงานการตรวจแยกเชื้อวัณโรคด้วย DNA marker ชนิดนี้

และศึกษาการแพร่ติดต่อเชื้อของผู้ป่วยวัณโรคของประเทศไทย⁽¹⁰⁾ วิธีการนี้เป็นวิธีที่แยกสายพันธุ์วัณโรคได้ละเอียด แต่มีข้อจำกัดในการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ วิธีที่สอง spoligotyping เป็นวิธีแยกสายพันธุ์ด้วย DNA marker ระหว่าง direct-repeat จำนวน 43 ตำแหน่งใน chromosomal DNA เชื้อวัณโรค มีความหลากหลายเนื่องจากเชื้อวัณโรคในแต่ละสายพันธุ์จะมีหรือไม่มี DNA marker นี้ใน 43 ตำแหน่งที่ต่างกัน⁽¹⁰⁻¹¹⁾ วิธีที่สาม วิเคราะห์ Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat (MIRU-VNTR) ซึ่งเป็น DNA repeat อีกรูปแบบหนึ่ง สายพันธุ์ที่ต่างกันจะมีจำนวน DNA repeat ของ MIRU-VNTR ที่ต่างกัน ปัจจุบันมี MIRU-VNTR ไม่น้อยกว่า 24 ตำแหน่ง ในการวิเคราะห์ที่เป็นชุดมาตรฐาน จะใช้อย่างน้อย 12 ตำแหน่งเป็นต้น⁽¹²⁾ การแยกสายพันธุ์ด้วย spoligotyping ร่วมกับการใช้ MIRU-VNTR สามารถแยกย่อยสายพันธุ์ (subtyping) ให้ได้ความละเอียดมากขึ้น มีการใช้แพร่หลายทั่วไป สามารถบันทึกผลในระบบตัวเลขทำให้เปรียบเทียบสายพันธุ์ระหว่างประเทศทั่วโลกได้โดยใช้ฐานข้อมูลสากล Spol4DB⁽¹⁰⁻¹⁴⁾ และยังสามารถบันทึกเป็นฐานข้อมูลสายพันธุ์เชื้อวัณโรคของประเทศไทยได้ต่อไป

การศึกษาวิจัยนี้ได้แยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคในพื้นที่อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสายพันธุ์เชื้อในพื้นที่ที่มีการระบาดมาก และประยุกต์ใช้วิธีการแยกสายพันธุ์ในการติดตามการแพร่ติดต่อและการกระจายของเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา ในช่วงระหว่างปี 2556-2557 เพื่อสนับสนุนการควบคุมวัณโรค นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาความสามารถของห้องปฏิบัติการในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อวัณโรค โดยวิธี spoligotyping ร่วมกับการวิเคราะห์ MIRU-VNTR ซึ่งเป็นการแยกสายพันธุ์ในระดับโมเลกุลที่ใช้กันแพร่หลาย เปรียบเทียบสายพันธุ์เชื้อวัณโรคในพื้นที่และวิเคราะห์สายพันธุ์ใหม่ ซึ่งไม่มีในฐานข้อมูลสายพันธุ์เชื้อวัณโรคนานาชาติ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ได้ทั้งในระดับท้องถิ่นและระดับภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก และเพื่อ

จัดเก็บเป็นฐานข้อมูลสายพันธุ์เชื้อวัณโรคระดับโมเลกุลของประเทศไทย ข้อมูลที่ได้ทำให้ทราบสายพันธุ์ที่ตรวจพบมาก (dominant strain) ความหลากหลายของสายพันธุ์ (diversity) สายพันธุ์ใหม่ ความสัมพันธ์ระหว่าง genotype และ phenotype ของเชื้อดื้อยา เช่น ความสัมพันธ์กับการดื้อยา ความรุนแรงของเชื้อ เป็นต้น

วัสดุและวิธีการศึกษา

รูปแบบการวิจัยเป็นการศึกษาวิจัยเชิงพรรณนา โดยวิเคราะห์สายพันธุ์ด้วยการตรวจลายพิมพ์ DNA ของเชื้อวัณโรค

ตัวอย่างเชื้อวัณโรค

คัดเลือกตัวอย่างเชื้อวัณโรคทั้งหมดในช่วงระหว่างปี 2556-2557 โดยเชื้อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการวัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี เป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้จากตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยวัณโรคที่เข้ารับการรักษาวัณโรคในโรงพยาบาลมะเร็งลำปาง อำเภอลำปาง จังหวัดกาญจนบุรี มีผลทดสอบความไวของเชื้อต่อยารักษาวัณโรค รวบรวมรายละเอียดตัวอย่างจากแบบบันทึกการส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรม DNA

นำตัวอย่างเชื้อที่เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 500 มิลลิลิตร เพาะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวด้วยเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติ BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) ปั่นตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง เก็บตะกอนเซลล์ สกัด DNA จากตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องสกัดอัตโนมัติ SEEPREP 12 (Seegene, Inc. Korea) ได้ปริมาณสารละลาย DNA 30 ไมโครลิตร นำตัวอย่างสารละลาย DNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ก่อนนำไปใช้ในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี spoligotyping และ MIRU-VNTR ต่อไป

การตรวจแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคด้วยวิธี spoligotyping

นำตัวอย่าง DNA อย่างน้อย 10 นาโนกรัม ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) และทำปฏิกิริยา hybridization วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สรุปดังนี้ การทำปฏิกิริยา PCR เป็นการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนบริเวณ direct repeat ซึ่งเป็นบริเวณที่มี DNA marker ในการแยกสายพันธุ์ ปฏิกิริยาประกอบด้วย 1x PCR buffer, 1x Q solution, PCR dig labeling 1.5 ไมโครลิตร (Roche Diagnostics, Germany), 10 ไมโครลิตร primer DRa (GGTTTTGGGTCTGAC-GAC), 10 ไมโครลิตร primer DRb (CCGAGAGGG-GACGGAAAC), 2.5 Unit Taq polymerase (QIAGEN, Germany) และ DNA ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ใช้สภาวะของปฏิกิริยาตามขั้นตอนต่อไปนี้ pre-amplification 98°C 60 วินาที 1 รอบ, Amplification 35 รอบ ประกอบด้วย 98°C 5 วินาที, 55°C 10 วินาที และ 72°C 30 วินาที และ post-amplification 72°C 1 นาที

การทำปฏิกิริยา hybridization เพื่อตรวจสอบ DNA marker ด้วย DNA probe มี 43 ตำแหน่ง มีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้ ผสม PCR product และสารละลาย buffer ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 95°C จนครบเวลาที่ต้องการแล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมตัวอย่างดังกล่าวลงในหลอด Spoligo Membrane นำไปอุ่นที่ 60°C แล้วล้าง Spoligo Membrane 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 60°C ด้วย 1X TBST-E buffer จากนั้น บ่ม Spoligo Membrane ในน้ำยา POD (POD 1 ul: 1X TBST-E 1.5 ml) แล้วล้าง Spoligo Membrane อีก 3 ครั้ง ด้วย 1X TBST-E buffer ให้เกิดสีด้วยสารละลาย TMB จนแถบ DNA ปรากฏสีชัดเจนแล้ว จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำ และตากแผ่น Spoligo Membrane ให้แห้ง อ่านผลจุดสีซึ่งเป็น DNA marker ตำแหน่งต่างๆ 43 ตำแหน่ง ที่ปรากฏบนแผ่น Spoligo Membrane บันทึกผลในระบบเลขฐานสองคือ บันทึก 1 เมื่อพบจุดสี และบันทึก 0 เมื่อไม่พบจุดสี ในโปรแกรม Excel ประมวลผลเป็นระบบดิจิทัล

15 หลัก (15-digit octal code) แล้วนำไปเทียบกับสายพันธุ์เชื้อในฐานข้อมูล SpolDB4 ซึ่งได้มีการรวบรวมสายพันธุ์พร้อมกับเลขสายพันธุ์อ้างอิง spoligotype-international type number (SIT No.) ไว้แล้ว โดย Pasteur Institute of Guadeloupe⁽¹⁵⁾

การแยกสายพันธุ์ย่อยของเชื้อวัณโรคด้วย MIRU-VNTR

เลือกตัวอย่าง DNA ที่มีผล spoligotype เหมือนกัน นำมาแยกสายพันธุ์ย่อย (subtype) ด้วย MIRU-VNTR ซึ่งตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยวิเคราะห์ DNA repeat ของ DNA marker 15 ตำแหน่ง ดังนี้ MIRU04, MIRU10, MIRU16, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR-A, QUB11b, QUB26(VN4052), VN424, VN1955, VN2401, VN3690, VN4156 ทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA marker แต่ละตำแหน่งด้วยส่วนผสมปฏิกิริยาดังนี้ 1x PCR buffer, 0.25 mM dNTP, 1 mM MgCl₂, 1 M Betaine, 0.05 Unit Taq DNA Polymerase (Prom-

ega, USA) ทำปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ pre-amplification ที่ 95°C 5 นาที 1 รอบ, amplification ที่ 95°C 15 วินาที, 55°C 20 วินาที, 72°C 45 วินาที ทำซ้ำ 35 รอบ และ post-amplification ที่ 72°C 5 นาที 1 รอบ ตรวจวัดขนาด DNA ด้วยวิธีเปรียบเทียบกับ DNA ladder ขนาด 50 bp เพื่อบันทึกจำนวน tandem repeat ของแต่ละ marker โดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis และเทียบขนาด DNA ที่ได้ตามหลักการทำงานของ Supply และคณะ⁽¹⁶⁾

ผลการศึกษา

ข้อมูลทั่วไป

การกระจายของเชื้อวัณโรคทั้งหมดมาจากอำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี เป็นคนไทยร้อยละ 97.00 เป็นเชื้อที่มาจากผู้ป่วยวัณโรคเพศชาย ร้อยละ 57.00 และเป็นเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานที่เป็นยา INH และ RIF ร้อยละ 29.40 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนและสัดส่วนเป็นร้อยละของเชื้อวัณโรคที่มีแหล่งที่มาของเชื้อวัณโรคจากตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยวัณโรคปอด และลักษณะการดื้อยาของเชื้อวัณโรคจำนวน 68 ตัวอย่างเชื้อที่ศึกษาวิจัย

ข้อมูล	รายละเอียด	จำนวน	ร้อยละ
แหล่งที่มา สัญชาติ	อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี	68	100
	ไทย	66	97.00
	ต่างดาว	2	3.00
อายุ	≤30 ปี	7	10.00
	31-60 ปี	18	26.00
	>60 ปี	17	25.00
	ไม่ทราบอายุ	26	38.00
เพศ	ชาย	39	57.00
	หญิง	22	32.00
	ไม่ทราบเพศ	7	10.00
ลักษณะการดื้อยาต่อยาต้านวัณโรค	ไวต่อยา INH RIF EMB และ STM	40	59.00
	ดื้อยา STM	3	4.00
	ดื้อยา INH	1	1.00
	ดื้อยา RIF	3	4.00
	ดื้อยา RIF และ STM	1	1.00
	ดื้อยา INH และ RIF	2	3.00
	ดื้อยา INH RIF และ STM	12	18.00
	ดื้อยา INH RIF EMB และ STM	6	9.00

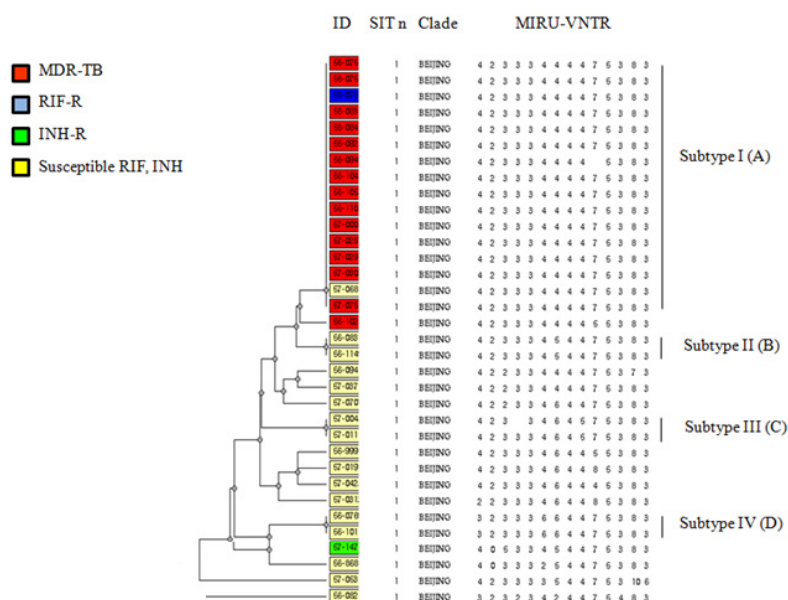
หมายเหตุ : INH ย่อมาจาก isoniazid, RIF ย่อมาจาก rifampicin, STM ย่อมาจาก streptomycin, EMB ย่อมาจาก ethambutal

ตัวอย่าง DNA ของเชื้อวัณโรคที่นำมาศึกษาครั้งนี้ให้ผล spoligotype 20 แบบไม่ซ้ำกัน ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเชื้อ 7 cluster ในจำนวน 55 ตัวอย่าง และเป็นเชื้อสายพันธุ์เดี่ยว 13 ตัวอย่าง กลุ่มเชื้อวัณโรค cluster I เป็นสายพันธุ์ Beijing แบบ SIT No. 1 มีสัดส่วน 34 ใน 68 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.00 ในจำนวนนี้ประกอบด้วยเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคปอดที่เป็นชาวไทย 32 ราย และเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคที่เป็นต่างด้าว 2 ราย เชื้อ cluster II เป็นสายพันธุ์ EAI2_NTB (Nonthaburi) มี SIT No. 89 มีสัดส่วน 6 ใน 68 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.00 เชื้อ cluster III และ IV เป็นของสายพันธุ์ EAI5 ซึ่งมี spoligotype 2 รูปแบบ ได้แก่ แบบ SIT No. 236 มีสัดส่วน 3 ใน 68 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4.00 และแบบ SIT No. 256 มีสัดส่วน 4 ใน 68 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.00 เชื้อ cluster V เป็นสายพันธุ์ EAI6_BGD1 แบบ SIT No. 591 มีสัดส่วน 2 ใน 68 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.00 เชื้อ cluster VI เป็นสายพันธุ์ T1 มีสัดส่วน 2 ใน 68 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.00 และเชื้อ cluster VII เป็นสายพันธุ์ U แบบ

SIT No. 523 มีสัดส่วน 4 ใน 68 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.00 และพบสายเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ที่มีเพียงตัวอย่างเดียว แต่พบมีในฐานข้อมูลสากลมีดังนี้ เชื้อสายพันธุ์ EAI6_BGD1 แบบ SIT No. 292 และ 1414 สายพันธุ์ H3 แบบ SIT No. 50 และเชื้อสายพันธุ์ U แบบ SIT No. 1189 และ 1391 และสายพันธุ์ใหม่ (NEW) 7 ตัวอย่าง (แบบใหม่ไม่มีในฐานข้อมูลสากล) และเมื่อวิเคราะห์ spoligotype กับการดื้อยาพบเชื้อดื้อยาหลายขนาน มีจำนวน 20 ตัวอย่าง เป็นสายพันธุ์ Beijing 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 75.00 สายพันธุ์ U แบบ SIT No. 523 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.20 สายพันธุ์ EAI6_BGD1 และสายพันธุ์ใหม่ (NEW) อย่างละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.00

ผลการแยกสายพันธุ์ย่อยของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี MIRU-VNTR

สายพันธุ์ Beijing แยกสายพันธุ์ย่อยตามวิธี MIRU-VNTR สามารถแสดงความสัมพันธ์โดยการจัดกลุ่มสายพันธุ์ย่อยให้เห็นได้ดังในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 dendrogram จัดกลุ่มและวิวัฒนาการของเชื้อวัณโรค เมื่อวิเคราะห์กลุ่มเชื้อ Beijing ด้วย MIRU-VNTR typing
 กล่องสีเหลือง หมายถึง เชื้อวัณโรคโหยหลัก INH และ RIF กล่องสีแดงเชื้อดื้อยาหลักหลายขนาน INH และ RIF
 กล่องสีน้ำเงินเชื้อดื้อยา RIF กล่องสีเขียวเชื้อดื้อยา INH

เนื่องจากกลุ่มสายพันธุ์ Beijing SIT No. 1 เป็นกลุ่มที่มีจำนวนมากที่สุด เมื่อจำแนกแยกย่อยสายพันธุ์นี้ จำนวน 34 ตัวอย่าง ด้วยวิธี MIRU-VNTR โดยใช้ DNA marker 15 ตำแหน่ง ต่อหนึ่งตัวอย่าง แต่ละตำแหน่งของ DNA marker ในเชื้อวัณโรคจะมีจำนวนชุดที่เป็น DNA repeat ได้หลากหลายรูปแบบชุดตั้งแต่ 1-10 แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ย่อย จึงทำให้แยกย่อยสายพันธุ์ Beijing ต่อไปได้ ผลตรวจพบว่าสามารถแยกสายพันธุ์ย่อยได้ 4 subtype ได้แก่ subtype I (A) ถึง subtype IV (D) และสายพันธุ์เดี่ยว 12 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 2 เชื้อวัณโรค subtype I (A) เป็นกลุ่มใหญ่มีสัดส่วน 16 ใน 34 ตัวอย่าง คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 41.00 เชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อวัณโรคที่มีลักษณะดื้อยาหลัก INH และ RIF 14 ตัวอย่าง เชื้อ subtype II (B), III (C), IV (D) มีกลุ่มละ 2 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์เชื้อกับการก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยพบว่า เชื้อ subtype I (A) ซึ่งมีสัดส่วนขนาดใหญ่ เป็นเชื้อที่มีลักษณะก่อโรครุนแรง เนื่องจากดื้อยาหลายขนาน เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมพบในผู้ป่วยชาวไทย ก่อโรคในผู้ป่วยอายุตั้งแต่ 22-73 ปี และในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ทราบอายุ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ cluster ในผู้ป่วยต่างด้าว ซึ่งมีจำนวน 2 ตัวอย่าง

วิจารณ์

เชื้อวัณโรคที่นำมาแยกสายพันธุ์ด้วยวิธี spoligotyping และวิธี MIRU-VNTR ในการศึกษาครั้งนี้ ตามเกณฑ์การคัดตัวอย่างซึ่งมาจากโรงพยาบาลมะเร็ง และเพาะเลี้ยงเจริญได้เฉพาะของปี พ.ศ. 2556-2557 มีจำนวนตัวอย่างเชื้อ 68 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อได้ 20 สายพันธุ์ โดยพบสายพันธุ์หลักเป็นเชื้อสายพันธุ์ Beijing มีการแพร่ระบาดมากในพื้นที่อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 50.00 (34 ใน 68 ตัวอย่าง) สอดคล้องกับงานวิจัยทั่วโลกได้รายงานการแพร่ระบาดของสายพันธุ์ Beijing ทั่วโลก^(10-11, 17-21) และพบเชื้อสายพันธุ์ Beijing ที่มีอัตราการดื้อยาสูงสำหรับประเทศไทย สอดคล้องกับการศึกษาวิจัยของ Regmi และ

คณะ⁽⁶⁾ และ Disratthakit⁽⁷⁾ พบเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ Beijing ที่เป็น MDR-TB และการดื้อยารุนแรง (XDR-TB) ในพื้นที่กาญจนบุรีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 ถึง พ.ศ. 2553 เมื่อแยกย่อยสายพันธุ์ Beijing ด้วยผล MIRU-VNTR พบเชื้อ subtype I (A) ซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่ในจำนวนนี้พบมีเชื้อดื้อยาหลัก INH และ RIF จำนวน 14 ตัวอย่าง และเมื่อวิเคราะห์เทียบกับผล MIRU-VNTR ของ Disratthakit ให้ผลตรงกัน และเป็นเชื้อที่มีการดื้อยาหลายขนานเช่นเดียวกัน ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อวัณโรค subtype I (A) เป็นสายพันธุ์ที่สำคัญเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดของวัณโรคดื้อยาหลายขนาน และอาจมีการแพร่ติดต่อกันตั้งแต่ปี 2545 จนถึงปัจจุบัน⁽⁴⁾ สอดคล้องกับงานศึกษาวิจัยหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ Beijing เป็นเชื้อไวต่อการก่อให้เกิดวัณโรคในผู้ป่วยจำนวนมาก และเป็นสายพันธุ์ที่มีวิวัฒนาการเป็นเชื้อดื้อยาต่อไป^(13, 22-24) สิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาค้นนี้ยังพบว่า ในพื้นที่ศึกษานี้มีเชื้อวัณโรคที่เป็นสายพันธุ์ใหม่ซึ่งไม่เคยมีในฐานข้อมูล SpolDB4 รวม 7 ตัวอย่าง คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 10.00 (7 ใน 68 ตัวอย่าง) และมีเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยชาวต่างด้าว (2 ตัวอย่าง) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ Beijing แต่ให้ผลแยกย่อยสายพันธุ์ด้วยวิธี MIRU-VNTR แตกต่างจากผลของสายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยคนไทย เนื่องจากจำนวนตัวอย่างเชื้อที่ศึกษามีกรอบเวลาศึกษาจากเชื้อที่เพาะขึ้นระหว่างปี 2556-2557 จำนวนตัวอย่างเชื้อที่เพาะขึ้นและเก็บรักษาไว้มีไม่มาก เป็นข้อจำกัดของการสรุปสายพันธุ์เชื้อที่พบเฉพาะในคนไทยหรือคนต่างชาติ จากข้อมูลสายพันธุ์เชื้อที่ตรวจพบอาจกล่าวได้ว่า เชื้อวัณโรคที่พบระบาดในอำเภอท่ามะกา ส่วนใหญ่เป็นเชื้อท้องถิ่น ในขณะเดียวกันก็มีส่วนของเชื้อต่างถิ่นที่แยกได้เป็นเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ใหม่ และเชื้อจากผู้ป่วยต่างด้าวยังไม่พบมีการแพร่ติดต่อเชื้อวัณโรคในคนไทย จากการวิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อวัณโรคด้วย spoligotyping และ MIRU-VNTR ทำให้ทราบสายพันธุ์เชื้อที่มีในท้องถิ่นชุมชน มีการแพร่ติดต่อ และทำให้ทราบสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อวัณโรคและเชื้อวัณโรคดื้อยาที่เกิดขึ้น

ในอำเภอท่ามะกา พบเชื้อวัณโรคดื้อยาสายพันธุ์เดียวกัน ในประชากรทั้งในวัยทำงานและวัยผู้สูงอายุ แสดงให้เห็นว่า มีการแพร่ติดต่อกัน เชื้อวัณโรคส่วนหนึ่งไวต่อยาและมีวิวัฒนาการกลายพันธุ์เป็นเชื้อดื้อยาต้านวัณโรคมีการแพร่ติดต่อทำให้พบเชื้อดื้อยาจำนวนมาก เชื้อส่วนใหญ่ที่พบเป็นเชื้อประจำถิ่นซึ่งยากต่อการควบคุม แม้ว่า จะควบคุมมานานแต่ยังควบคุมไม่ได้ ประกอบกับการมีเชื้อใหม่เพิ่มขึ้นในพื้นที่ ทำให้การควบคุมวัณโรคในพื้นที่นี้ยังไม่ได้ผลดี ข้อมูลนี้น่าจะเป็นประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา การเฝ้าระวัง และการควบคุมป้องกันวัณโรค โดยเฉพาะวัณโรคดื้อยาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ Professor Yasuhiko Suzuki และ Professor Chie Nakajima มหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี กรมควบคุมโรค และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015 [Internet]. [cited 2016 Mar 19]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf
2. สำนักข่าวแห่งชาติ กรมประชาสัมพันธ์. สาธารณสุขจังหวัดกาญจนบุรีพัฒนาระบบการจัดบริการดูแลรักษา ลดอัตราการเสียชีวิตและการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยาหลายขนานในจังหวัดกาญจนบุรี [อินเทอร์เน็ต]. [สืบค้นเมื่อ 18 มิ.ย. 2559]. แหล่งข้อมูล: http://thainews.prd.go.th/website_th/news/news_detail/TNSOC5805140010105
3. สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการดำเนินงานควบคุมวัณโรคแห่งชาติ พ.ศ. 2556 [อินเทอร์เน็ต]. [สืบค้นเมื่อ 19 ม.ค. 2559]. แหล่งข้อมูล: <http://e-lib.ddc.moph.go.th/pdf/eb333/eb333.pdf>
4. ชุติพร จิระพงษา, ธนพล หวังธีระประเสริฐ, ณรงค์เห็นประเสริฐแท้, จันทิรา สุขะสิริชัยมงคล, นาฎพฐ์ สงวนวงศ์, ลัดดาวัลย์ ปัญญา, และคณะ. การระบาดของวัณโรคดื้อยาในชุมชน อ.ท่ามะกา จ. กาญจนบุรี 2545 - มิถุนายน 2553. วารสารสมาคมเวชศาสตร์ป้องกันแห่งประเทศไทย 2554;3:262-71.
5. Wells CD, Cegielski JP, Nelson LJ, Laserson KF, Holtz TH, Finlay A, et al., HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis: the perfect storm. J Infect Dis 2007;196 Suppl 1:S86-107.
6. Regmi SM, Chaiprasert A, Kulawongnuchai S, Tongsima S, Coker OO, Prammananan T, et al. Whole genome sequence analysis of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates from an outbreak in Thailand. Mol Genet Genomics 2015; doi 10.1007/s00438-015-1048-0.
7. Disratthakit A, Meada S, Prammananan T, Thaipisuttikul I, Doi N, Chaiprasert A. Genotypic diversity of multidrug-, quinolone- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Thailand. Infect Genet Evol 2015; 32:432-9.
8. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993;31:406-9.

9. Sukkasem S, Yanai H, Mahasirimongkol S, Yamada N, Rienthong D, Palittapongarnpim P, et al. Drug resistance and IS6110-RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with recurrent tuberculosis in northern Thailand. *Microbiol Immunol* 2013;57:21–9.
10. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj 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.
11. Filliol I, Driscoll JR, Soolingen DV, Kreiswirth BN, Kremer K, Valtudie G, et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerging Infectious Diseases* 2002;8: 1347–9.
12. Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU–VNTRplus, multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2008;46: 2692–9.
13. Homolka S, Post E, Oberhauser B, George AG, Westman L, Dafaie F, et al. High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strain from Sierra Leone. *BMC microbiol* 2008;8:103.
14. Faksri K, Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Brown T, Prammananan T, Palittapongarnpim P, et al. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family based on IS6110, SNP, LSP and VNTR profiles from Thailand. *Infect Genet Evol* 2011;11:1142–9.
15. Demay C, Liens B, Burguiere T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB– a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 2012;12:755–66.
16. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit–variable–number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006;44: 4498–510.
17. 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.
18. European concerted action on new generation genetic markers and techniques for the epidemiology and control of tuberculosis. Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis* 2006;12:736–43.
19. Bifani PJ, Mthema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W. Beijing family strain. *Trends Microbiol* 2002;10:45–52.
20. Wang J, Liu Y, Zhang CL, Ji BY, Zhang LZ, Shao YZ, et al. Genotypes and characteristics of clustering and drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Heilongjiang Province, China. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1354–62.

21. Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Aye KS, et al. Simple multiplex PCR Assay for Identification of Beijing Family *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with a lineage-specific mutation in Rv0679c. *J Clin Microbiol* 2014;51:2025-32.
22. Klopper M, Warren RM, Hayes C, Pittius NCGV, Streicher EM, Müller B, et al. Emergence and spread of extensively and totally drug-resistant tuberculosis, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2013;19:449-55.
23. Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Bugar M, Espitia C, Ritacco V, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003;133:30-37.
24. Mokrousov I, Ly HM, Otten T, Lan NN, Vyshnevskiy B, Hoffner S, et al. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues for human phylogeography. *Genome Res* 2005;15:1357-64.