

## รายงานผลการปฏิบัติงาน

## Result of Operation

การศึกษาแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคด้วยวิธี spoligotyping ในพื้นที่รับผิดชอบของ  
สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลาGenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* by spoligotyping in the area of The  
Office of Disease Prevention and Control Region 12, Songkhlaนาสโรน เจ๊ะเลาะ<sup>1</sup>Nasron Jekloh<sup>1</sup>ดารีส มูเก็ม<sup>1</sup>Daris Mukem<sup>1</sup>ตันซีล เหมหมัด<sup>1</sup>Tonseal Hemmhud<sup>1</sup>นุรุลซะฮิดะห์ साल<sup>1</sup>Nurulsahidah Salaeh<sup>1</sup>เบญจวรรณ เพชรสุศิริ<sup>2</sup>Benjawan Phetsuksiri<sup>2</sup>เสรี สิงห์ทอง<sup>3</sup>Seri Singthong<sup>3</sup><sup>1</sup>สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา<sup>1</sup>Office of Disease Prevention and Control  
Region 12, Songkla<sup>2</sup>สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข<sup>2</sup>National Institute of Health,

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Department of Medical Sciences

<sup>3</sup>สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 7 ขอนแก่น<sup>3</sup>Office of Disease Prevention and Control  
Region 7, Khon Kaen

DOI: 10.14456/dcj.2021.76

Received: October 31, 2019 | Revised: December 15, 2020 | Accepted: December 28, 2020

## บทคัดย่อ

วัณโรค เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทยและทั่วโลก มีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) ซึ่งปัจจุบันมีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อวัณโรคในประเทศไทยยังมีน้อย การแยกสายพันธุ์สามารถใช้ประโยชน์ทางระบาดวิทยาได้ และใช้ในการสอบสวนโรคติดตามแหล่งแพร่เชื้อได้ แสดงความหลากหลายของสายพันธุ์ การศึกษารั้งนี้ใช้วิธี spoligotyping ในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรค ซึ่งวิเคราะห์จากตำแหน่งบนสาย DNA ที่ซ้ำ (repeat) จำนวน 43 ตำแหน่ง พบสายพันธุ์เชื้อวัณโรค ในเขตพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลา ได้แก่ จังหวัดยะลา จังหวัดปัตตานี จังหวัดนราธิวาส จังหวัดตรัง จังหวัดสงขลา จังหวัดสตูล และจังหวัดพัทลุง จากผู้ป่วยวัณโรคปอด 138 ราย วิเคราะห์แยกสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลสายพันธุ์ในฐานข้อมูลสากล SpolDB4 พบเชื้อวัณโรคที่มีรูปแบบสายพันธุ์ spoligotype 53 รูปแบบ และพบกลุ่มสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่มีในฐานข้อมูล 35 สายพันธุ์ และมี spoligotype ที่มีรูปแบบแตกต่างกัน 32 รูปแบบ กลุ่มสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ East African-Indian (EAI) รองลงมาคือ Beijing ร้อยละ 36.23 (50/138) และ 32.61 (45/138) ตามลำดับ ในกลุ่มสายพันธุ์ EAI พบสายพันธุ์ EAI5 มากที่สุด รองลงมาเป็น EAI6\_BGD1 (Bangladesh) และ EAI2\_NTB (Nonthaburi) ร้อยละ 36.00 (18/50), 30.00 (15/50) และ 18.00 (9/50) ตามลำดับ วิธีการนี้เหมาะสมในการใช้แยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคเนื่องจากมีความเป็นมาตรฐานสูง มีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก พบสายพันธุ์ใหม่จำนวนมาก

ติดต่อผู้พิมพ์ : เสรี สิงห์ทอง

อีเมล : seri\_si@hotmail.com

## Abstract

Tuberculosis (TB) remains an deadly infectious disease causing a serious public health problem in many parts of the world as well as in Thailand caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) in which less genotypic diversity data available in Thailand. Genotypic differentiate method is an epidemiological tool (epidemiological investigation and tracking of TB transmission) to differentiate local strains and allow the comparison of strains with global isolates. This study manipulated spoligotyping and aimed to investigate strains circulating in 8 provinces: Songkhla, Yala, Pattani, Narathiwat, Trang, Songkhla, Satun and Phatthalung under The Office of Disease Prevention and Control Region 12. A total of 138 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 15 different spoligotype patterns were identified, and 37 strains were found as new genotype patterns. The East African-Indian (EAI) groups were the most frequent strains investigated followed by Beijing, 36.23% (50/138) and 32.61% (45/138), respectively. Among EAI groups EAI5 were the most commonly investigated followed by EAI6\_BGD1 (Bangladesh) and EAI 2\_NTB (Nonthaburi), 36.00% (18/50), 30.00% (15/50) and 18.00% (9/50) respectively.

This standard and practical spoligotyping is able to identify the diversity of MTC strains circulating in this region.

**Correspondence:** Seri Singthong

**E-mail:** seri\_si@hotmail.com

## คำสำคัญ

เชื้อวัณโรค การตรวจแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรค spoligotyping พื้นที่รับผิดชอบของ สคร.12

## Keywords

*M. tuberculosis* complex, spoligotyping, Provinces under ODPC Region 12

## บทนำ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่เป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทยและทั่วโลก เกิดจากการติดเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) ขนาดปัญหาวัณโรคในประเทศไทย องค์การอนามัยโลกได้จัดให้ประเทศไทยเป็นหนึ่งใน 14 ประเทศ ที่มีปัญหาวัณโรครุนแรง โดยมีผู้ป่วยจำนวนมาก ซึ่งมีปัจจัยมาจากหลายประการ ได้แก่ ผลกระทบจากโรคเอดส์ ซึ่งประเทศไทยมีผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวนมาก ระดับความชุกของการป่วยด้วยโรควัณโรคที่ยังสูง ทำให้มีผู้ป่วยในระยะแพร่เชื้อจำนวนมาก การเคลื่อนย้ายถิ่นฐานของประชากร ปัญหาวัณโรคดื้อยา วัณโรคในกลุ่มแรงงานข้ามชาติ

ผู้อพยพ การควบคุมรักษาวัณโรคในบางพื้นที่ที่มีผลสำเร็จต่ำกว่าเป้าหมาย จึงยังคงมีจำนวนผู้ป่วยวัณโรคระยะแพร่โรคสูง รายงานขององค์การอนามัยโลกปี พ.ศ. 2560 ประเทศไทยมีอุบัติการณ์เกิดโรค 156 ต่อประชากรแสนจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดรายงาน 82,008 ราย และมีอัตราการตาย 13 ราย ต่อประชากรแสนหรือประมาณ 9,300 ราย<sup>(1)</sup> ในขณะที่ พื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลา มีการค้นพบผู้ป่วยรายใหม่ได้เพียงร้อยละ 70.70 อัตราการรักษาสำเร็จเพียงร้อยละ 84.00 อัตราการตายจากวัณโรคร้อยละ 8.10 และขาดยาถึงร้อยละ 3.30<sup>(2)</sup>

การแยกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพเป็นเครื่องมือทางระบาดวิทยาช่วยสนับสนุนการควบคุมโรค

และสอบสวนโรค สามารถแยกสายพันธุ์เชื้อได้อย่างละเอียด จะทำให้สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคได้ จึงสามารถใช้ติดตามการแพร่ของโรคได้ และอาจนำข้อมูลสายพันธุ์ท้องถิ่นไปเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของเชื้อในภูมิภาคต่างๆ ได้ทั่วโลก ทำให้ค้นพบสายพันธุ์ใหม่

การตรวจแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลมีหลายวิธี อาศัยหลักการวิเคราะห์ความหลากหลายหรือความผันแปรของสารพันธุกรรมวิธีดั้งเดิม ได้แก่ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA (restriction fragment length polymorphism ; RFLP) ที่ใช้ insertion element 6110 (IS6110) เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker)<sup>(3)</sup> มีรายงานการแยกเชื้อวัณโรคด้วย DNA marker ชนิดนี้ และศึกษาการแพร่ติดต่อเชื้อโรคของผู้ป่วยวัณโรคของประเทศไทย<sup>(4-5)</sup> วิธีการนี้เป็นวิธีที่แยกสายพันธุ์วัณโรคได้ละเอียด แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการได้ การแยกสายพันธุ์โดยวิเคราะห์จำนวน DNA repeat ซึ่งเป็น DNA ที่มีจำนวนชุดซ้ำๆ กัน ในจำนวนที่ต่างกัน (variable number of tandem repeat: VNTR) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีการใช้แยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรค และวิธี spoligotyping กำลังเป็นวิธีที่นำไปใช้แพร่หลาย<sup>(6-8,10-19)</sup> และอาจใช้ร่วมกับวิธีการแยกสายพันธุ์วิธีอื่นๆ จะทำให้สามารถแยกสายพันธุ์ได้ละเอียดมากขึ้น สามารถแยกเชื้อระหว่าง *M. tuberculosis* และ *M. bovis* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม MTC ได้ การแยกสายพันธุ์ด้วยวิธี spoligotyping ใช้ genetic marker ซึ่งเป็น DNA ใน spacer region ที่อยู่ระหว่าง DNA repeat ที่เรียกว่า direct repeat (DR repeat) จำนวน 43 ตำแหน่ง<sup>(8-9)</sup> genetic marker ที่ขาดหายไป ในตำแหน่งต่างๆ ทำให้เกิดรูปแบบที่หลากหลายของ DNA ของเชื้อวัณโรค (genetic polymorphism) สามารถวิเคราะห์และนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อวัณโรคได้ เนื่องจากเป็นวิธีการมาตรฐาน<sup>(9-11)</sup> จึงสามารถเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการได้ วิธีการนี้สามารถแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคได้อย่างละเอียด แม้ในสายพันธุ์วัณโรคที่มีความใกล้เคียงกันมาก บันทึกผลในระบบตัวเลข สามารถเปรียบเทียบสายพันธุ์เชื้อวัณโรค

โดยใช้ฐานข้อมูลสากล SpolDB4<sup>(12)</sup> การแยกสายพันธุ์ด้วยวิธีนี้จะทำให้ได้ข้อมูล spoligotype ของสายพันธุ์เชื้อวัณโรคในแต่ละพื้นที่ และยังสามารถเป็นฐานข้อมูลสายพันธุ์เชื้อวัณโรคของประเทศได้ ในประเทศไทยมีการศึกษายังไม่มากนัก<sup>(8,19)</sup> โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างซึ่งเป็นพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลา ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาในลักษณะนี้มาก่อน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อวัณโรค โดยวิธี spoligotyping ที่เพาะเลี้ยงแยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคปอดในพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลา (ภาคใต้ตอนล่าง)

## วัสดุและวิธีการศึกษา

รูปแบบการศึกษาเป็นเชิงพรรณนา (descriptive study) ตรวจวิเคราะห์แยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคที่เก็บไว้จากการปฏิบัติงานปกติ ในปีงบประมาณ 2558 โดยการตรวจวิเคราะห์สาย DNA ของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี spoligotyping เนื่องจากมิได้เก็บข้อมูลโดยตรงจากผู้ป่วยวัณโรค และไม่มีการย้อนดูประวัติการป่วย หรือข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย และไม่สามารถทราบชื่อ-สกุล ที่อยู่ของผู้ป่วยได้ จึงมิได้ยื่นขอรับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

### ตัวอย่างเชื้อวัณโรค

ตัวอย่างในการศึกษาเป็นเชื้อวัณโรค จำนวน 150 ราย ที่เพาะเลี้ยงได้จากเสมหะผู้ป่วยวัณโรคปอดทั้งหมด 494 ราย ปีงบประมาณ 2558 ในเขตจังหวัดภาคใต้ตอนล่าง จำนวน 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดยะลา จังหวัดปัตตานี จังหวัดนราธิวาส จังหวัดตรัง จังหวัดสงขลา จังหวัดสตูล และจังหวัดพัทลุง ตัวอย่างเชื้อทั้งหมดเก็บรักษาไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ในห้องปฏิบัติการ ไม่มีการคัดเลือกหรือสุ่มแต่อย่างใด นำตัวอย่างโคโลนีเชื้อที่เก็บรักษา มาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein-Jensen ได้เพียง 150 ราย นอกนั้นเชื้อไม่อยู่ในสภาพที่จะนำไปศึกษาต่อได้ นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้นำมาสกัด DNA และ

เพื่อแยกสายพันธุ์ จำนวน 150 ราย โดยส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการสถาบันสุขภาพแห่งชาติ (NIH) ซึ่งทำการตรวจโดยผู้เชี่ยวชาญที่มีความชำนาญในการตรวจอย่างสูง จึงน่าจะไม่มี ความผิดพลาดเกิดขึ้นในขณะทำการทดสอบ ค่าใช้จ่ายรายละเอียดประมาณ 3,000 บาท แต่เนื่องจากเป็นโครงการศึกษาของสถาบัน NIH จึงไม่มีค่าใช้จ่ายแต่อย่างใดในการศึกษาครั้งนี้

### การสกัดสารพันธุกรรม (DNA)

สกัด DNA จากตัวอย่างเชื้อตามวิธีการของ Phetsuksiri B, et al(13) โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำเชื้อวัณโรคที่เพาะขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 loop ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก (micro tube) ขนาด 1.5 ml. ซึ่งบรรจุ น้ำกลั่นสะอาด 100  $\mu$ l. จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 20 นาที จะได้สารละลายที่มี DNA นำ DNA ที่สกัดได้เก็บที่ -20°C

### การแยกสายพันธุ์ด้วยวิธี Spoligotype

ขั้นตอนประกอบด้วย การเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมาย บริเวณ direct repeat (DR) ด้วยวิธีปฏิกิริยา ลูกโซ่ (polymerase chain reaction ; PCR) และตรวจสอบหา DNA marker ด้วย DNA probe โดยวิธี hybridization ในการศึกษาครั้งนี้ดำเนินการตาม<sup>(14)</sup> การเพิ่ม DNA เป้าหมายโดยเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ DR โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) DRa (GGTTTTGGGTCTGACGAC) และ primer DRb (CCGAGAGGGGACGGAAAC) ปฏิกริยา PCR ประกอบด้วย 10x buffer 1.5  $\mu$ l. PCR DIG labeling mix 1.5  $\mu$ l., primer DRa (10  $\mu$ mol) 1  $\mu$ l., primer DRb (10  $\mu$ mol) 1  $\mu$ l. และ Taq DNA polymerase (QIAGEN, Germany) ซึ่งมี Q5x solution 3  $\mu$ l. และ Taq polymerase (5 unit) 0.25  $\mu$ l. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10  $\mu$ l. แล้วเติมสารละลาย DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างเชื้อ 5  $\mu$ l. โดยมีปริมาตรรวม 15  $\mu$ l. ทำปฏิกิริยา PCR โดยเครื่องเพิ่มสารปริมาณ พันธุกรรม (Eppendorf, Germany) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นตอน denaturation ที่ 98°C 60 วินาที 1 รอบ เข้าสู่ 35 รอบ ของขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ 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* H37Rv) เป็น positive control และ distilled water free DNA/ RNA เป็น negative control เมื่อปฏิกิริยา PCR เสร็จเรียบร้อยแล้ว 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 Hybrid-buffer ลงในหลอดขนาดเล็ก 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 1XTBST-E buffer เพื่อล้าง DNA ส่วนที่ไม่จับกับ DNA probe ออก ตรวจสอบหา DNA marker โดยบ่มปฏิกิริยา spoligo membrane ในน้ำยา POD (POD 1  $\mu$ l. : 1XTBST-E 1.5 ml.) แล้วล้าง spoligo membrane อีก 3 ครั้ง ด้วย IX TBST-E buffer ทำการตรวจสอบสีที่แถบ DNA จับกับ DNA probe ด้วยการบ่ม spoligo membrane ในสารละลาย TMB จนแถบ DNA ของ spoligo pattern ปรากฏสีขึ้นชัดเจนแล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำ

### การอ่านผลและแปลผล spoligotype

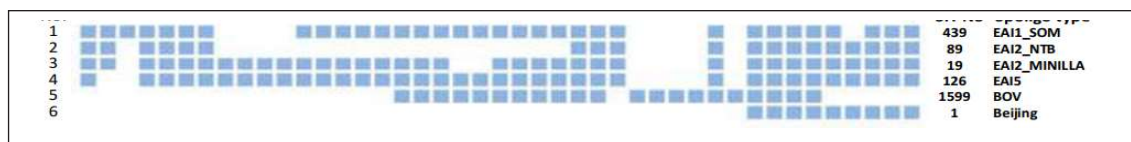
อ่านผลบน spoligo membrane ซึ่งมี DNA probe จุดเล็ก ๆ จำนวน 43 จุด หลังทำปฏิกิริยา hybridization แล้วจะปรากฏจุดขึ้นบน spoligo membrane ซึ่งคือ direct repeat spacer (DR spacer) ที่มีแตกต่างกันตามแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรค ทำให้สามารถแยกสายพันธุ์ของวัณโรคได้ การอ่านจุดที่พบบน spoligo membrane ใช้โปรแกรม 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 ฐานข้อมูล SpolDB4 มีการรวบรวม spoligo pattern ของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั่วโลกไว้ พร้อมกับเลขประจำสายพันธุ์ (spoligotype international type number ; SIT No) spoligo pattern ที่ต่างกัน จะมี SIT No ต่างกัน และ SIT No เดียวกัน เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน ดังภาพที่ 1 ฐานข้อมูลดังกล่าวยังคงมีการเพิ่มเติมข้อมูล สายพันธุ์ที่มีการค้นพบใหม่อยู่เป็นระยะ ๆ โดยสถาบันพาสเจอร์ (Pasteur Institute of Guadeloupe)<sup>(12)</sup> ในการแยกสายพันธุ์ด้วยวิธี spoligotyping นี้ หากวิเคราะห์แล้วไม่พบว่า มีสายพันธุ์ในฐานข้อมูล ให้แปลผลว่า เป็นสายพันธุ์ใหม่ (New/Orphan)

## ผลการศึกษา

จากการศึกษาสายพันธุ์เชื้อวัณโรคจากผู้ป่วยในพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12

จังหวัดสงขลา ใน 7 จังหวัดภาคใต้ตอนล่าง ได้แก่ จังหวัดยะลา จังหวัดปัตตานี จังหวัดนราธิวาส จังหวัดตรัง จังหวัดสงขลา จังหวัดสตูล และจังหวัดพัทลุง ที่เพาะเลี้ยงเชื้อได้จากเสมหะผู้ป่วยวัณโรคปอด ทั้งหมด 494 ราย ในปีงบประมาณ 2558 และได้เก็บรักษาไว้เพื่อนำมาศึกษาสายพันธุ์ได้ จำนวน 150 ราย นำผลการแยกสายพันธุ์ที่ได้ไปเทียบกับ spoligo pattern ในฐานข้อมูลสากล SpolDB4 ได้เพียง 138 ราย อีก 12 ราย ไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากผลไม่ชัดเจน พบเชื้อวัณโรคมีความหลากหลายของสายพันธุ์ โดยมีรูปแบบของ spoligo pattern ที่ต่างกันถึง 53 รูปแบบ ดังภาพที่ 1 ซึ่ง spoligo pattern ที่ต่างกันจะมี SIT No ต่างกัน และ SIT No เดียวกัน เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกันในการศึกษานี้ เชื้อทั้งหมดสามารถจัดกลุ่มได้ 15 กลุ่มสายพันธุ์ ดังตารางที่ 1 นอกจากนี้พบเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ใหม่ 35 สายพันธุ์ และมีรูปแบบของ spoligo pattern ที่แตกต่างกันถึง 32 รูปแบบ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 1 ตัวอย่าง spoligo pattern ของ DR spacers จำนวน 43 ตำแหน่ง แสดง spoligo pattern ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่าง ๆ และ spoligo pattern ของเชื้อ *M. bovis*

จากตารางที่ 1 พบว่า จังหวัดที่มีผลตรวจมากที่สุดคือ จังหวัดพัทลุง 48 สายพันธุ์ รองลงมาคือ จังหวัดปัตตานี 28 สายพันธุ์ จังหวัดยะลา 24 สายพันธุ์ และทุกจังหวัดพบเชื้อวัณโรค กลุ่มสายพันธุ์ EAI มากกว่ากลุ่มอื่นๆ รองลงมาเป็นกลุ่ม Beijing ยกเว้นจังหวัดสตูล

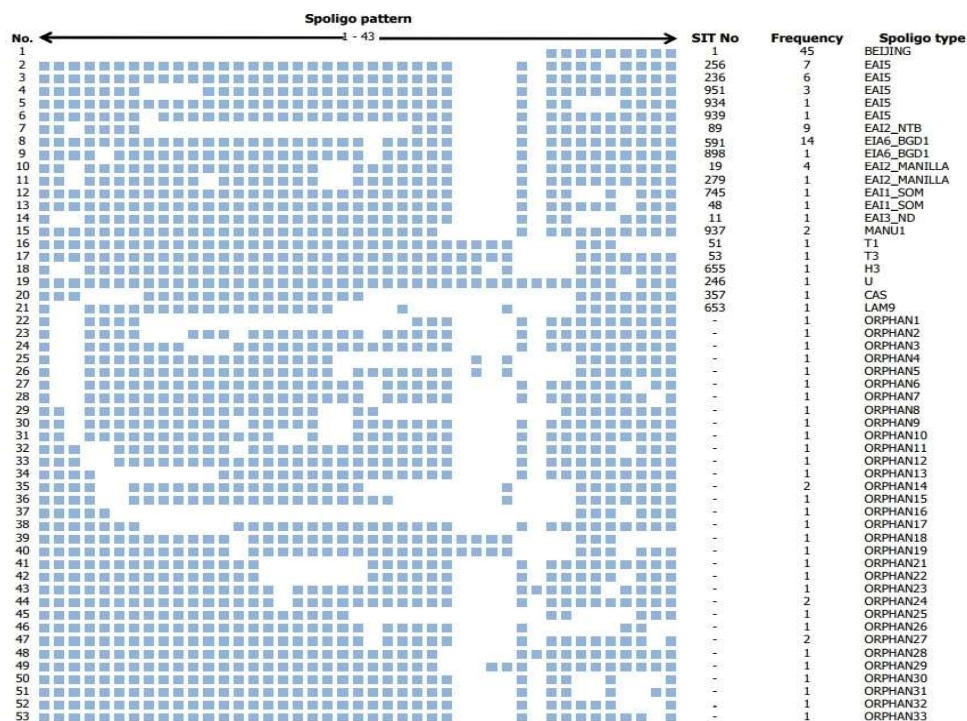
ที่ไม่พบกลุ่มเชื้อนี้ อาจจะมีสาเหตุจากจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจน้อยมาก เพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้น จังหวัดพัทลุงพบสายพันธุ์ใหม่มากที่สุดคือ 14 สายพันธุ์ รองลงมาคือ จังหวัดปัตตานีและจังหวัดนราธิวาส ตามลำดับ



ตารางที่ 1 จำนวนสายพันธุ์เชื้อวัณโรคที่แยกด้วยวิธี spoligotyping ในเซตรับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดราชบุรี

| กลุ่มสายพันธุ์ | ยะลา | ปัตตานี | นราธิวาส | ตรัง | สงขลา | สตูล | พัทลุง | รวม |
|----------------|------|---------|----------|------|-------|------|--------|-----|
| BEIJING        | 14   | 9       | 3        | 2    | 6     | 0    | 11     | 45  |
| EAI groups     | 6    | 7       | 5        | 2    | 6     | 2    | 22     | 50  |
| - EAI6_BGD1    | 1    | 1       | 0        | 0    | 1     | 1    | 11     | 15  |
| - EAI5         | 4    | 4       | 1        | 0    | 3     | 0    | 6      | 18  |
| - EAI3_ND      | 1    | 0       | 0        | 0    | 0     | 0    | 0      | 1   |
| - AI2_MANILLA  | 0    | 2       | 0        | 0    | 0     | 0    | 3      | 5   |
| - EAI2_NTB     | 0    | 0       | 3        | 2    | 1     | 1    | 2      | 9   |
| - EAI1_SOM     | 0    | 0       | 1        | 0    | 1     | 0    | 0      | 2   |
| T1             | 1    | 0       | 0        | 0    | 0     | 0    | 0      | 1   |
| T3             | 0    | 0       | 0        | 1    | 0     | 0    | 0      | 1   |
| CAS            | 0    | 1       | 0        | 0    | 0     | 0    | 0      | 1   |
| LAM9           | 0    | 0       | 0        | 0    | 1     | 0    | 0      | 1   |
| MANU1          | 0    | 2       | 0        | 0    | 0     | 0    | 0      | 2   |
| U              | 0    | 0       | 0        | 0    | 0     | 0    | 1      | 1   |
| H3             | 0    | 1       | 0        | 0    | 0     | 0    | 0      | 1   |
| ORPHAN         | 3    | 8       | 6        | 1    | 3     | 0    | 14     | 35  |
| จำนวนรวม       | 24   | 28      | 14       | 6    | 16    | 2    | 48     | 138 |

จากภาพที่ 2 จะเห็นว่า มีเชื้อวัณโรคถูกแยกสายพันธุ์ด้วยวิธี spoligo typing จำนวน 138 ราย พบรูปแบบสายพันธุ์แตกต่างกันถึง 53 รูปแบบ (pattern) พบสายพันธุ์ใหม่ที่ไม่เคยพบมาก่อน (Orphan) จำนวน 35 สายพันธุ์ มี spoligo pattern ที่แตกต่างกัน 32 รูปแบบ



ภาพที่ 2 ผลการแยกสายพันธุ์ด้วยวิธี spoligotyping ที่พบทั้งหมดในการศึกษา

เมื่อวิเคราะห์สัดส่วนของกลุ่มสายพันธุ์สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ East African-Indian (EAI) รองลงมาคือ Beijing กลุ่มสายพันธุ์ที่พบมาก ได้แก่ EAI และ Beijing ร้อยละ 36.23 (50/138) และ 32.61 (45/138) ตามลำดับ ในกลุ่มสายพันธุ์ EAI สายพันธุ์ที่พบมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ EAI5, EAI6\_Bangladesh (BGD1) และ EAI2\_Nonthaburi (NTB) ร้อยละ 36.00 (18/50), 30.00 (15/50) และ 18.00 (9/50) ตามลำดับ และสายพันธุ์อื่น ได้แก่ MANU1, U, H3, T1, T3, Central Asian (CAS), Latin American-Mediterranean (LAM9) พบน้อย (1-2 สายพันธุ์) จากตัวอย่างเชื้อที่ศึกษาได้ว่า เชื้อวัณโรคสายพันธุ์ EAI และ Beijing เป็นสายพันธุ์ที่มีความชุกสูงในภาคใต้ตอนล่าง 7 จังหวัด ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

## วิจารณ์

จากผลการศึกษานี้ถือว่า เป็นการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคครั้งแรกในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง ซึ่งสามารถแยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคได้ผลคล้ายกับการศึกษาก่อนหน้านี้<sup>(6)</sup> แต่แตกต่างกับการศึกษาในประเทศแทนซาเนีย ซึ่งพบสายพันธุ์ CAS สูงสุด<sup>(15)</sup> ข้อมูลสายพันธุ์ ทำการจัดเก็บรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูล spoligotype SIT No ต่างๆ ในการศึกษา เนื่องจากตัวอย่างเชื้อที่ศึกษา เป็นตัวอย่างที่ได้จากคลังเก็บรักษาเชื้อ คัดเลือกตัวอย่างจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ และเนื่องจากไม่มีการสุ่มเลือกจากทุกพื้นที่ของเขตรับผิดชอบของ สคร. 12 สงขลา จึงเป็นเพียงการศึกษาเชิงระบาดวิทยาชีวโมเลกุล เพื่อวิเคราะห์แยกสายพันธุ์เชื้อวัณโรค ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาในลักษณะนี้มาก่อน

จากการวิเคราะห์ข้อมูลสายพันธุ์ในการศึกษานี้ ทำให้ทราบสายพันธุ์เชื้อวัณโรคในผู้ป่วยแต่ละราย สายพันธุ์เชื้อที่มีในท้องถิ่นชุมชน สายพันธุ์ที่มีการแพร่ติดต่อจำนวนมาก และพบเชื้อวัณโรคมีความหลากหลายของสายพันธุ์ ขณะเดียวกันก็มีการพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ไม่เคยพบที่ไหนมาก่อน จำนวนมากถึง 35 สายพันธุ์ใน 32 patterns ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์กลุ่มใหญ่ที่

พบมากที่สุด ได้แก่ EAI และกลุ่ม Beijing สายพันธุ์ Beijing มีรายงานเป็นสายพันธุ์เชื้อวัณโรคที่พบมากทั่วโลก และมักพบในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อน<sup>(8, 16-17)</sup> และสายพันธุ์ Beijing ส่วนใหญ่มักติดต่อยาหลัก (INH, RMP)<sup>(18-21)</sup> สามารถแยกเป็นสายพันธุ์ย่อย (subtype) ด้วยวิธีการนี้ร่วมกับวิธีอื่นได้ สิ่งที่น่าสนใจในการศึกษารังนี้คือการหนึ่ง ได้แก่ การตรวจพบเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ใหม่ (Orphan/New) จำนวนมากถึง 35 สายพันธุ์ แต่ไม่ได้ส่งข้อมูลให้สถาบันพาสเตอร์เพื่อรวบรวมข้อมูลสายพันธุ์ที่พบใหม่แต่อย่างใด หากทำการวิเคราะห์สายพันธุ์ต่อไปอย่างต่อเนื่อง อาจพบมีการแพร่เชื้อของสายพันธุ์ใหม่มากขึ้น และควรมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องอย่างเป็นระบบต่อไป เพื่อเป็นข้อมูลการกระจายตัวของสายพันธุ์ต่างๆ และสามารถเป็นตัวแทนเชื้อในแต่ละพื้นที่ได้ เนื่องจาก การศึกษารังนี้ไม่ได้มีการกำหนดจำนวนตัวอย่างไว้ตั้งแต่ต้น จึงเป็นข้อจำกัดของการศึกษารังนี้ด้วย เพื่อเป็นข้อมูลในการป้องกันควบคุมโรคที่ได้ผลมากยิ่งขึ้นต่อไป และควรมีการศึกษาถึงความเชื่อมโยงของ DNA pattern กับการดื้อยาต่อไป เพื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่อื่นๆ ต่อไป

## สรุป

วิธี spoligotyping สามารถแยกสายพันธุ์ของวัณโรคได้ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก เหมาะสม สามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ฐานข้อมูลสายพันธุ์สากล SpolDB4 ทำให้ทราบสายพันธุ์เชื้อที่ก่อโรค การกระจายของสายพันธุ์ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาระบาดวิทยาของวัณโรค (การแพร่ติดต่อ) ความหลากหลายของสายพันธุ์ การค้นพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ๆ ข้อมูลสายพันธุ์เชื้อสนับสนุนการดำเนินงานควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เนื่องจากราคาต่อทดสอบค่อนข้างสูง (ประมาณ 3,000 บาท) จึงยังไม่สามารถนำมาใช้อย่างแพร่หลายได้สำหรับประเทศไทย ในขณะนี้

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำการศึกษาขอขอบพระคุณผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลา หัวหน้าศูนย์วัณโรคที่ 12 จังหวัดยะลา และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกโรงพยาบาลที่ให้ความร่วมมือในการส่งตัวอย่างเชื้อมาเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างถูกต้อง ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชันสูตรโรค ศูนย์วัณโรคที่ 12 จังหวัดยะลา ทุกท่านที่ทำให้กำลังใจและช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

## เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
2. The Office of Disease Prevention and Control region 12 Songkhla. Annual report of Tuberculosis control in the area of The Office of Disease Prevention and Control region 12 Songkhla; 2018.
3. C Sola, S Ferdinand, C Mammina, A Nastasi, N Rastogi. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population-based analysis. *J Clin Microbiol*. 2001 Apr;39(4):1559–65. Doi: 10.1128/JCM.39.4.1559–1565.2001
4. Sukkasem S, Yanai H, Mahasirimongkol S, Yamada N, Rienthong D, Palittapongpim 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.
5. Faksri K, Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Brown T, Prammananan T, Palittapongpim P, et al. Epidemiological trends and clinical comparisons of *Mycobacterium tuberculosis* in Thai TB meningitis. *Tuberculosis*. 2011;91:594–600.
6. 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 Parana in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105:779–85.
7. 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.
8. Phetsuksiri B, Bunchoo S, Rudeeaneksin J, Srisangngam S, Noppornpun K, Khummin R, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* by spoligotyping. *Journal of Health Science*. 2017; 26:447–55.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Guide to the application of genotyping to tuberculosis prevention and control [Internet]. 2012 [cited 2019 Jun 9]. Available from: [http://www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/chap3/3\\_cdclab\\_2description.htm](http://www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/chap3/3_cdclab_2description.htm).
10. Adwoa Asante-Poku, Isaac Darko Otchere, Stephen Osei-Wusu, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium africanum* in Ghana. *BMC Infect Dis*. 2016; 16: 385. Published online 2016 Aug 9. doi: 10.1186/s12879-016-1725-6
11. 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.



12. 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.
13. Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Bunchoo S, Rienthong D, Mukai T, et al. Applicability of inhouse loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex grown on solid media. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66:249–51.
14. A G M van der Zanden, K Kremer, L M Schouls, et al. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol.* . 2002 Dec;40(12):4628–39.  
doi: 10.1128/JCM.40.12.4628–4639.2002.
15. 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.
16. Bifani PJ, Mthema B, Kureth na NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W- Beijing family strains. *Trends Microbiol.* 2002;10:45–52
17. Van Anh Thi Nguyen, Marc Choisy, Duy Hung Nguyen, et al. High prevalence of Beijing and EAI4-VNM genotypes among *M. tuberculosis* isolates in northern Vietnam: sampling effect, rural and urban disparities. *PLoS One.* 2012;7(9):e45553. doi: 10.1371/journal.pone.0045553. Epub 2012 Sep 24.
18. Tran N, van Soolingen BD, Huyen MNT. Increased transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with resistance to streptomycin a population based study. *PLoS One.* 2012;7:e42323.
19. Sujariyakul A, Rudeeaneksin J, Tipkrua N, Phetsuksiri B. Epidemiology and genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* at an outbreak area in Kanchanaburi province. *Disease Control Journal.* 2016;42;337–47.
20. Jurriaan E.M. de Steenwinkel, Marian T. ten Kate, et al. Drug Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype and Association with MDR TB. *Emerg Infect Dis.* 2012 Apr; 18(4): 660–663.
21. M. Keikha and M. Majidzadeh. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is associated with extensively drug-resistant tuberculosis: A global analysis. *New Microbes New Infect.* 2021 Sep; 43: 100921. Published online 2021 Aug 1. doi: 10.1016/j.nmni.2021.100921