

รูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วย ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ด้วยวิธี MIRU-VNTR typing

ศรวิทย์ กุญชร^{1,2}, พรทิพย์ ปันละอ^{2,3}, พิพัฒน์ ศรีบุญจักษ์^{2,3}, อรุณีย์ สิงกา^{2,3*}

Received: April 9, 2015

Revised & Accepted: May 11, 2015

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อสำคัญทางสาธารณสุขที่พบได้ทั่วโลกและยังคงมีการแพร่ระบาดอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบภูมิภาคเอเชีย และแอฟริกา ประเทศไทยจัดอยู่ในลำดับที่ 18 ของกลุ่มประเทศที่มีความชุกสูง 22 ลำดับแรกของโลก การศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* โดยอาศัยเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาได้ถูกพัฒนาขึ้นมาหลายวิธีและนำมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อเป็นข้อมูลด้านการควบคุมการแพร่กระจาย ติดตามการรักษา และศึกษาความสัมพันธ์กับการดื้อต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้วิธี Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing จำนวน 24 loci ในเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 27 ตัวอย่างที่แยกได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2544 ผลการศึกษาสามารถแยกรูปแบบได้ทั้งหมด 24 รูปแบบ โดยจัดกลุ่มเชื้อได้ทั้งหมด 2 สายพันธุ์ ได้แก่ East African Indians (EAI) จำนวน 14 ตัวอย่าง (51.85%) 11 รูปแบบ และ Beijing จำนวน 3 ตัวอย่าง (11.11%) 3 รูปแบบ นอกจากนี้ยังพบตัวอย่างที่มีรูปแบบเดียวที่ไม่พบในฐานข้อมูลออนไลน์จำนวน 10 ตัวอย่าง (37.04%) เมื่อคำนวณค่าอำนาจการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ Hunter Gaston Discriminatory Index (HGDI) พบว่า primer ที่ให้ค่า HGDI สูง ได้แก่ Mtub04 (0.6), MIRU04 (0.855), MIRU16 (0.613), Q2163b (0.693), ETRA (0.673), ETRB (0.777), Mtub39 (0.780) และ QUB26 (0.704) จึงมีความเป็นไปได้ว่า primer ทั้ง 8 ชุดดังกล่าวอาจมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ระบาดในแถบภูมิภาคนี้ต่อไป

คำสำคัญ : *Mycobacterium tuberculosis*, MIRU-VNTR typing

¹นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการ Pan-Asian Biomedical Sciences Conference ที่ School of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, the Chinese University of Hong Kong วันที่ 11-12 ธันวาคม 2557

Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in Srinagarind Hospital: Analysis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) typing

Sonvane Tanuchit^{1,2}, Porntip Pinlaor^{2,3}, Pipat Sribenjalux^{2,3}, Arunnee Sangka^{2,3*}

Abstract

Tuberculosis is one of the important infectious diseases which has been distributed around the world. The incidence of tuberculosis still presents in the Asia and Africa. Thailand is ranking in 18 of 22 high burden countries in 2014 reported by WHO. The epidemiological study of *Mycobacterium tuberculosis* based on molecular methods have been developed and widely used to investigate the genetic diversity, control the disease transmission and evaluate drug resistance. In this study, 27 *M. tuberculosis* isolates from Srinagarind hospital, Khon Kaen in 2001, were analyzed using 24 loci primers based on mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) typing. Genotyping revealed a total of 24 MIRU-VNTR profiles comprising of 2 lineages: 14 East-African Indian (EAI) isolates (51.85%) with 11 profiles and 3 Beijing isolates (11.11%) with 3 profiles. The other 10 unique profiles (37.04%) were not identical to any profile in MIRU-VNTRplus database. In addition, the discriminatory index for each loci was calculated using Hunter Gaston Discriminatory Index (HGDI). Mtub04 (0.6), MIRU04 (0.855), MIRU16 (0.613), Q2163b (0.693), ETRA (0.673), ETRB (0.777), Mtub39 (0.780) and QUB26 (0.704) showed high HGDI. These 8 MIRU primers may be appropriate for epidemiology investigation in this region.

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis*, MIRU-VNTR typing

¹Postgraduate Student in Medical Science, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

²Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

³Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

* Corresponding author: (e-mail: arusan@kku.ac.th)

บทนำ

การติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ก่อให้เกิดวัณโรคซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขของทุกประเทศทั่วโลก จากรายงานประจำปีขององค์การอนามัยโลก ในปี ค.ศ. 2014 พบว่ามีผู้ป่วยวัณโรคประมาณ 11 ล้านคน โดยเป็นผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 9 ล้านคน และมีผู้ป่วยตายไปประมาณ 2 ล้านคน จากการจัดอันดับประเทศที่มีภาวะวิกฤตเกี่ยวกับวัณโรคมากที่สุด 22 ประเทศ ซึ่งประเทศไทยอยู่ในอันดับที่ 18 ของโลก⁽¹⁾ การศึกษาระบาดวิทยาของวัณโรคจะช่วยให้สามารถอธิบายลักษณะรูปแบบการระบาด จำแนกกลุ่มเสี่ยง ความถี่และจำนวนสายพันธุ์ที่มีการระบาด คาดหมายแนวโน้มของการระบาด การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะนำไปสู่การกำหนด แนวทางการป้องกันและควบคุมวัณโรคได้ดียิ่งขึ้น

ปัญหาสำคัญอีกด้านของการติดเชื้อในปัจจุบันคือ ภาวะการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อที่เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะการดื้อต่อยาหลายชนิด การแพร่กระจายของเชื้อส่งผลให้การควบคุมโรคและการรักษาที่มีประสิทธิภาพทำได้ยากยิ่งขึ้น จากการศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อกับการดื้อยาพบว่า กลุ่มของเชื้อบางสายพันธุ์ เช่น Beijing type มีความสัมพันธ์กับการดื้อต่อยาต้านจุลชีพบางชนิดที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน⁽²⁻¹¹⁾ ดังนั้นหากทราบ genotype ของเชื้อก็จะสามารถเลือกการรักษา เฝ้าระวัง ติดตามการแพร่ระบาด และวางแผนการควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

การศึกษา genotyping ของเชื้อ *Mycobacterium* มีการใช้เทคนิคต่างๆมากมาย วิธีมาตรฐานที่ใช้แต่เดิมคือ IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) หลังจากมีการระบาดของเชื้อที่มากขึ้น วิธี RFLP ไม่สามารถใช้แยกกลุ่มรูปแบบของเชื้อที่มีจำนวนชุดของ IS6110 น้อยได้⁽¹²⁻¹⁸⁾ ในปี ค.ศ. 2006 Supply และคณะ ได้พัฒนาวิธี Variable numbers of tandem repeats (VNTR) มาใช้ในการศึกษา genotyping ซึ่งสามารถแยกรูปแบบยีนของเชื้อที่มากขึ้น วิธีการทำง่ายกว่า และระยะเวลาในการทำน้อยกว่าวิธี RFLP โดยใช้ mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) จำนวน 12-24 loci มาใช้ในการแยกรูปแบบยีนของเชื้อ⁽¹⁹⁾ ในปี ค.ศ. 2010 Thong-On และคณะ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อมัคโคแบคทีเรียที่มีจำนวน copy ของ IS6110 ที่น้อย (1-6 copy) พบว่าการใช้ MIRU-VNTR

typing สามารถแยกรูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อได้ถึง 151 รูปแบบ ในขณะที่การใช้เทคนิค IS6110-RFLP และ spoligotyping สามารถแยกรูปแบบได้เพียง 65 และ 54 รูปแบบ ตามลำดับ ดังนั้นวิธี MIRU-VNTR typing จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อมัคโคแบคทีเรียได้ดีในปัจจุบัน

ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือยังมีรายงานการศึกษาทางระบาดวิทยาของวัณโรค โดยการใช้เทคนิคด้านโมเลกุลอื่นๆที่ยังไม่หลากหลายที่จะนำไปสู่การวิเคราะห์เปรียบเทียบ ผลการศึกษาทางระบาดวิทยาที่ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์การวิจัยเพื่อศึกษา รูปแบบทางพันธุกรรมและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ผลจากการศึกษาจะนำไปสู่ความรู้ ความเข้าใจทางด้านระบาดวิทยาของเชื้อวัณโรคที่เคาะระบาดในภูมิภาคนี้ และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานอันจะเป็นประโยชน์ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษา ควบคุม และเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคในภูมิภาคนี้ได้

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. กลุ่มตัวอย่าง

เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2544 จำนวน 27 ตัวอย่าง แยกพิสูจนส์ปรีซีส์ด้วยวิธี PCR-REA (Polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis) และเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv เป็นเชื้อควบคุมการทดสอบ

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อและสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Lowenstein-Jensen medium (BBL; Becton Dickinson) นำโคโลนิบริสุทธ์ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี enzymatic ตามวิธีของ van Soolingen และคณะ ดังขั้นตอนต่อไปนี้ ใช้ loop เขี่ยเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ medium มา 1 loop ใส่ลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร ที่มี 1X TE (Tris-EDTA buffer) 400 ไมโครลิตร นำไปต้มเพื่อฆ่าเชื้อที่ 80 °C นาน 20 นาที เติมน้ำ 50 ไมโครลิตรของ lysozyme ที่มีความเข้มข้น 10 mg/ml เพื่อทำให้ผนังเซลล์แตก เขย่าให้ผสมกันดีแล้วนำไปอุ่นที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืน เติมน้ำ 10% SDS จำนวน 75 ไมโครลิตร และ proteinase K ที่มีความเข้มข้น 10 mg/ml จำนวน 5

ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าอย่างรวดเร็ว เติม 5 M NaCl 100 ไมโครลิตร เติม CTAB/NaCl ที่อุณหภูมิ 65 °C 100 ไมโครลิตร เขย่าจนเป็นสีขาวขุ่น เติม chloroform/isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24 : 1) 750 ไมโครลิตร เขย่าจนเข้ากันดี นำไปปั่นที่ 12,000 g นาน 5 นาที ดูดส่วนใสข้างบน ใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ ตกตะกอน DNA โดยการเติม isopropanol 450 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ 20 °C นาน 1 ชั่วโมง หรือ -70 °C 30 นาที นำไปปั่นที่ 12,000 g นาน 15 นาที เทส่วนใสข้างบนทิ้งไป วางทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้งดีที่อุณหภูมิห้อง เติม 1X TE buffer 200 ไมโครลิตร เติม Rnase 2 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที เก็บตะกอน DNA ไว้ที่ -20 °C หรือ -70 °C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3. การศึกษารูปแบบทางพันธุกรรม (MIRU-VNTR typing)

ศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ ด้วยวิธี polymerase chain reaction โดยใช้ไพรเมอร์ของ interspersed repetitive-unit (MIRU) loci จำนวน 24 ชุด ได้แก่ MIRU02, Mtub04, ETRC, MIRU 04, MIRU 40, MIRU 10, MIRU 16, Mtub21, MIRU 20, QUB2163b, ETRA, Mtub29, Mtub30, ETRB, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 26, MIRU27, Mtub34, MIRU 31, Mtub39, QUB26, QUB4156 และ MIRU 39 ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 1 ทำการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอ ของตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ MIRU จำนวน 24 ชุด ต่อตัวอย่าง หาขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis เปรียบเทียบขนาดของชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้กับ ดีเอ็นเอ มาตรฐาน 1 kb plus

ตารางที่ 1 Primer sequences สำหรับ 24 loci MIRU-VNTR typing

Primer	Primer sequence (5' to 3')	MIRU-VNTR length (bp)
MIRU 2	F: TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT R: TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT	53
Mtub04	F: CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT R: GGCAGCAGAGCCCCGGGATTCTTC	51
ETR C	F: CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT R: AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA	58
MIRU 4*	F: GCGCGAGAGCCCGAACTGC R: GCGCAGCAGAAACGCCAGC	77
MIRU 40	F : GGGTTGCTGGATGACAACGTGT R : GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	54
MIRU 10	F : GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC R : GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	53
MIRU 16	F: TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA R: CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC	53
Mtub21	F: AGATCCCAGTTGTCTGTCGTC R: CAACATCGCCTGGTTCTGTA	57
MIRU 20	F: TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG R: GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA	77

ตารางที่ 1 Primer sequences สำหรับ 24 loci MIRU-VNTR typing (ต่อ)

Primer	Primer sequence (5' to 3')	MIRU-VNTR length (bp)
QUB-11b	F: CGTAAGGGGGATGCGGGAATAGG R: CGAAGTGAATGGTGGCAT	69
ETR A	F: AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT R: CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	75
Mtub29	F: GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT R: AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC	57
Mtub30	F: CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT R: ACTTGAACCCCCACGCCCATTAGTA	58
ETR B	F: ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT R: CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC	57
MIRU 23	F: CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG R: AGCTCAACGGGTTCGCCCTTTTGTC	53
MIRU 24	F: CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT R: GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA	54
MIRU 26	F: TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC R: CATAGGCGACCAGGCGAATAG	51
MIRU 27*	F: TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA R: GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA	53
Mtub34	F: GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA R: GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC	54
MIRU 31*	F: ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA R: GTGCCGACGTGGTCTTGAT	53
Mtub 39	F: CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC R: TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	58
QUB-26	F: AACGCTCAGCTGTCGGAT R: CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT	111
QUB-4156	F: TGACCACGGATTGCTCTAGT R: GCCGGCGTCCATGTT	59
MIRU 39	F: CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC R: CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT	53

*MIRU 4, 27 and 31 are also known as ETR-D, QUB-5 and E, respectively

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

จำแนกรูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อโดยใช้ฐานข้อมูลออนไลน์ <http://www.miru-vntrplus.org> หาค่าอำนาจในการจำแนกสายพันธุ์ของ primer โดยใช้การคำนวณค่าจาก Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI) หาคความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆตามสายวิวัฒนาการโดยใช้ Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA- Tree)

การศึกษานี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE561418

ผลการศึกษา

1. รูปแบบ MIRU-VNTR

สามารถแยกรูปแบบ (MIRU-VNTR profiles) ได้เป็น 24 รูปแบบ โดยมี MIRU-VNTR profile ที่สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 1 กลุ่ม มีจำนวนสมาชิก 4 ตัวอย่าง คือรูปแบบ 214524352143236223342513 ส่วนที่เหลือ 23 ตัวอย่าง ให้รูปแบบที่แตกต่างกันเป็นรูปแบบเดี่ยวทั้ง 23 ตัวอย่าง ดังแสดงใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 MIRU-VNTR Profile สายพันธุ์และการกระจายตัวของเชื้อ *M. tuberculosis*

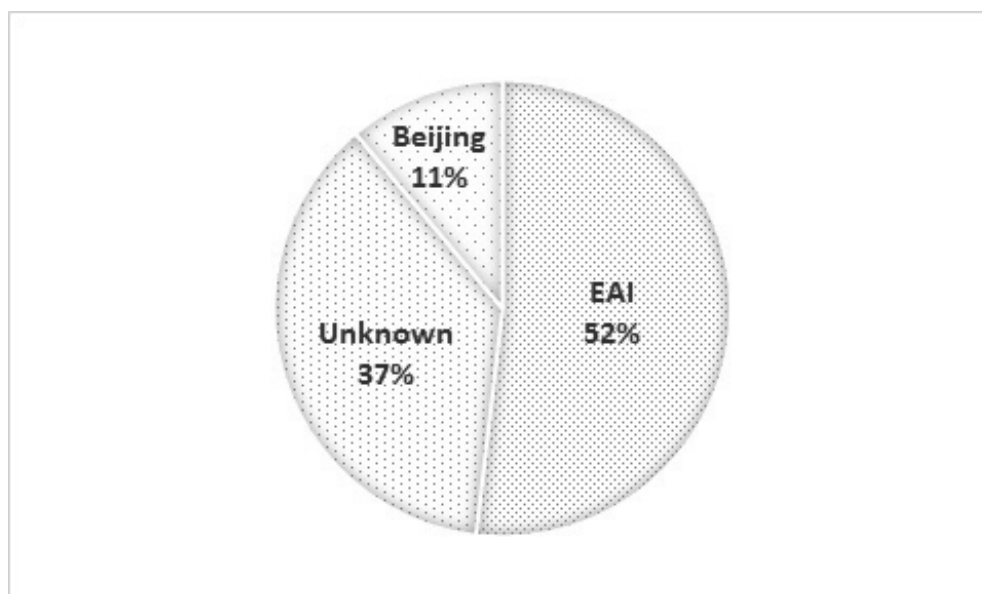
Pattern	MIRU-VNTR profile	No. of isolates (Sample No.)	Lineage
1	214524352143236223342513	4 (1,11,18,22)	EAI
2	224534252233245223155613	1 (2)	EAI
3	214524312143246223342712	1 (3)	EAI
4	214232252243235173343523	1 (4)	Unknown
5	224634252263245223353513	1 (5)	EAI
6	224654322243245223343513	1 (6)	Unknown
7	214433322283231223235422	1 (7)	Unknown
8	214944142263235223446423	1 (8)	Unknown
9	214733252263235123245622	1 (9)	Unknown
10	214733192153245123342422	1 (10)	Unknown
11	2145243A2143266223342523	1 (12)	EAI
12	224734252243255223344313	1 (13)	EAI
13	224533252243215223354313	1 (14)	Unknown
14	224834252373225223344513	1 (15)	EAI
15	224734252373225223354513	1 (16)	EAI
16	224634252253245223354513	1 (17)	EAI
17	224734252253245223354513	1 (19)	EAI
18	244233352644425173353723	1 (20)	Beijing
19	214333252643225173353522	1 (21)	Unknown
20	224634292243255223352513	1 (23)	EAI
21	214A24252263225223555222	1 (24)	Unknown
22	244233352644425173353623	1 (25)	Beijing
23	214A24152623245223353423	1 (26)	Unknown
24	244233352344425173333722	1 (27)	Beijing

*A = 10 allele

2. การจำแนกสายพันธุ์

สามารถจำแนกเชื้อได้ทั้งหมด 2 สายพันธุ์ ได้แก่ East African Indians (EAI) 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ 51.85) 11 รูปแบบ และ Beijing 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.11) 3

รูปแบบ และพบตัวอย่างที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ในฐานข้อมูลออนไลน์ ซึ่งจัดเป็น unknown จำนวน 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.04) 10 รูปแบบ ดังแสดงใน **รูปที่ 1**



รูปที่ 1 การกระจายตัวของสายพันธุ์ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* พบรูปแบบ East African Indians (EAI) จำนวน 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ 51.85) Beijing จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.11) รูปแบบ unknown 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.04)

3. การวิเคราะห์ค่าอำนาจการจัดจำแนกสายพันธุ์ของ Primers

วิเคราะห์โดยใช้การคำนวณค่าจาก Hunter-Gaston index (HGDI) โดยใช้เกณฑ์ดังนี้ highly discriminant ($h > 0.6$), moderately discriminant ($0.3 < h < 0.6$), poorly discriminant ($h < 0.3$) พบค่าอำนาจในการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยไพรเมอร์รวมทั้งหมดเท่ากับ (HGDI) 0.983 โดย Primer Mtub04, MIRU04, MIRU16,

Q2163b, ETRA, ETRB, Mtub39 และ QUB26 มีอำนาจในการจัดจำแนกสูง Primer MIRU 40, MIRU 10, Mtub21, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 26, MIRU 31, QUB4156 และ MIRU 39 มีอำนาจในการจัดจำแนกปานกลาง ส่วน Primer MIRU 02, ETRC, MIRU 20, Mtub29, Mtub30, MIRU 27 และ Mtub34 มีอำนาจในการจัดจำแนกต่ำ ดังแสดงใน **ตารางที่ 3**

ตารางที่ 3 ค่าอำนาจการจัดจำแนกสายพันธุ์ (Hunter – Gaston Discriminatory Index; HGDI)

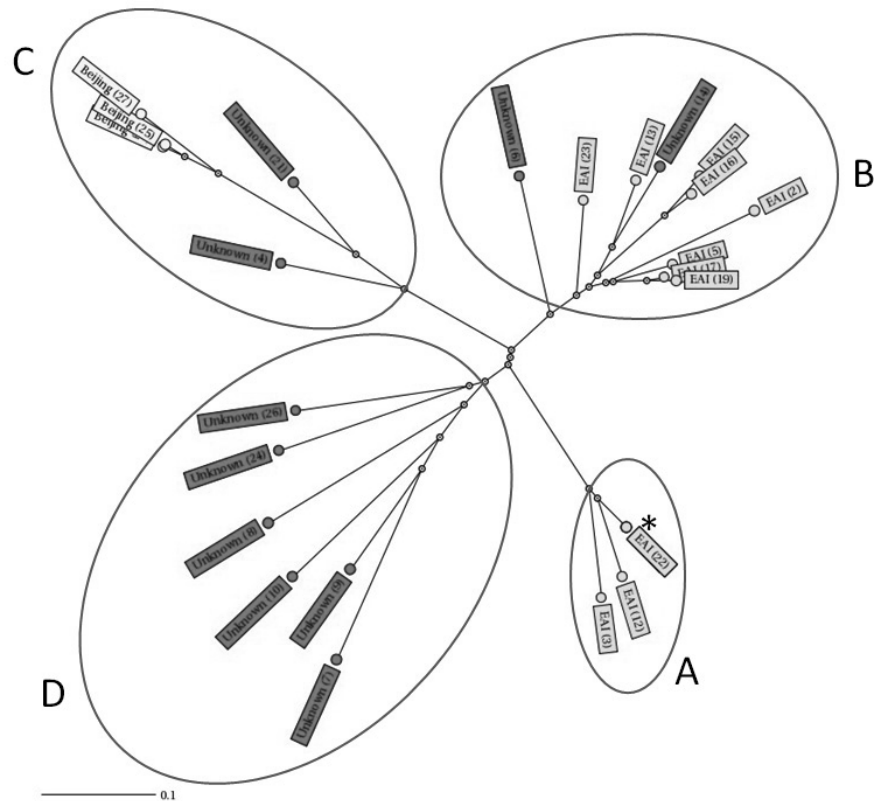
MIRU-VNTR loci	Number of copies of repetitive unit											ค่า HGDI (h)	ค่าอำนาจ จำแนก
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
MIRU02	-	-	27	-	-	-	-	-	-	-	-	0.000	ต่ำ
Mtub04	-	14	10	-	3	-	-	-	-	-	-	0.600	สูง
ETRC	-	-	-	-	27	-	-	-	-	-	-	0.000	ต่ำ
MIRU04	-	-	4	1	1	8	4	5	1	1	2	0.855	สูง
MIRU40	-	-	8	17	1	1	-	-	-	-	-	0.532	ปานกลาง
MIRU10	-	-	1	8	18	-	-	-	-	-	-	0.484	ปานกลาง
MIRU16	-	3	13	11	-	-	-	-	-	-	-	0.613	สูง
Mtub21	-	1	2	-	1	20	-	-	-	2	1	0.453	ปานกลาง
MIRU20	-	-	27	-	-	-	-	-	-	-	-	0.000	ต่ำ
QUB2163b	-	7	13	3	-	-	4	-	-	-	-	0.693	สูง
ETRA	-	-	1	1	15	3	4	2	1	-	-	0.673	สูง
Mtub29	-	-	-	24	3	-	-	-	-	-	-	0.205	ต่ำ
Mtub30	-	-	24	-	3	-	-	-	-	-	-	0.205	ต่ำ
ETRB	-	1	7	8	8	2	1	-	-	-	-	0.777	สูง
MIRU23	-	1	-	-	-	20	6	-	-	-	-	0.416	ปานกลาง
MIRU24	-	6	21	-	-	-	-	-	-	-	-	0.356	ปานกลาง
MIRU26	-	-	22	-	-	-	-	5	-	-	-	0.313	ปานกลาง
MIRU27	-	-	-	27	-	-	-	-	-	-	-	0.000	ต่ำ
Mtub34	-	1	2	22	1	1	-	-	-	-	-	0.34	ปานกลาง
MIRU31	-	-	-	2	13	12	-	-	-	-	-	0.587	ปานกลาง
Mtub39	-	-	8	8	6	4	1	-	-	-	-	0.780	สูง
QUB26	-	-	1	2	4	14	3	3	-	-	-	0.704	สูง
QUB4156	-	16	11	-	-	-	-	-	-	-	-	0.500	ปานกลาง
MIRU39	-	-	7	20	-	-	-	-	-	-	-	0.399	ปานกลาง

($h > 0.6$) = อำนาจจำแนกสูง; ($0.3 < h < 0.6$) = อำนาจจำแนกปานกลาง; $h < 0.3$) = อำนาจจำแนกต่ำ

4. ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ โดยใช้ UPGMA- Tree พบวิวัฒนาการทางพันธุกรรมที่เกิดจากโคลนเดียวกัน แล้วมีการแยกสายออกไปเป็น 4 แขนง คือ

แขนง EAI รูปแบบที่มีสมาชิก 4 ตัวอย่าง แขนง EAI ที่มีสมาชิกเป็นรูปแบบเดี่ยว แขนง Beijing และ แขนง unknown โดยพบสมาชิกของ unknown บางส่วนที่มีแนวโน้มของรูปแบบที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ EAI (2 ตัวอย่าง) และ Beijing (2 ตัวอย่าง) ดังแสดงใน **รูปที่ 2**



รูปที่ 2 Phylogenetic tree สร้างโดย Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA- Tree) พบสายวิวัฒนาการของรูปแบบทางพันธุกรรมตาม MIRU-VNTR 24 loci แยกออกเป็น 4 แขนง โดยพบแขนงของ EAI รูปแบบที่มีสมาชิก 4 ตัวอย่าง* และ EAI รูปแบบเดียว 2 ตัวอย่าง (A) แขนง EAI รูปแบบเดียว 8 ตัวอย่าง และ unknown 2 ตัวอย่าง (B) แขนง Beijing 3 ตัวอย่าง และ unknown 2 ตัวอย่าง (C) แขนง unknown 6 ตัวอย่าง (D)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ในปี พ.ศ. 2544 ด้วยวิธี 24-loci MIRU-VNTR typing เมื่อนำผล MIRU profile จำนวน 24-loci ทั้ง 27 ตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับรูปแบบที่ปรากฏในฐานข้อมูลออนไลน์: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces> เพื่อหาสายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* พบ MIRU profile ทั้งหมด 24 รูปแบบ โดยจัดกลุ่มได้เพียงกลุ่มเดียวที่มีจำนวนสมาชิก 4 ตัวอย่าง คือ MIRU profile 214524352143236223342513 ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับการติดต่อหรือการแพร่กระจายของเชื้อที่มีรูปแบบทางพันธุกรรมเหมือนกันจากผู้ป่วยรายหนึ่งไปสู่อีกราย หรือจากแหล่งระบาดหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่งได้⁽²¹⁾ จึงทำให้พบ MIRU profile ที่สามารถจัดเป็น 1 กลุ่มได้และมีรูปแบบทาง

พันธุกรรมที่เหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบ MIRU profile เดี่ยว ๆ อีก 23 รูปแบบที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ แสดงถึงเชื้อ *M. tuberculosis* มีความหลากหลายของรูปแบบทางพันธุกรรม อาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของยีนในรูปแบบต่างๆ เช่น deletion, insertion, mutation ในกระบวนการ DNA replication ซึ่งพบได้บนโครโมโซมของเชื้อ *M. tuberculosis* ทำให้สามารถพบจำนวน repeat unit ได้แตกต่างกัน

เชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 27 ตัวอย่าง พบทั้งหมด 2 สายพันธุ์ ได้แก่ East African Indians (EAI) 14 ตัวอย่าง (51.85%) และ Beijing 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.11) นอกจากนี้ยังพบตัวอย่างที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ในฐานข้อมูลออนไลน์จำนวน 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.04) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 27 ตัวอย่างพบเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ EAI มีความชุกมากที่สุด ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ได้มีการศึกษาพบสาย

พันธุ์ Beijing และสายพันธุ์ EAI มีการระบาดสูงเท่าๆกันในแถบ Far East Asia ⁽²²⁾ และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Prodinger และคณะในปี ค.ศ. 1990 – 2000 ที่ได้ศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* ในผู้ป่วยวัณโรค โรงพยาบาลรามารับดี ประเทศไทย ด้วยวิธี Spoligotyping พบเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ Beijing มีความชุกถึงร้อยละ 44.1 ⁽²³⁾ และผลจากการศึกษาของ Kiatichai Faksri และคณะที่ศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยวัณโรคในปี ค.ศ. 1996-2007 พบเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ Beijing และ EAI มีความชุกถึงร้อยละ 56 และ 31 ตามลำดับ ⁽²¹⁾ ซึ่งแตกต่างจากผลศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ที่ได้รับโดยอาจเกิดจากปัจจัยหลาย ๆ ส่วน เช่น ความแตกต่างของช่วงเวลา เทคนิควิธีที่ใช้ในการศึกษา ระหว่างวิธีที่ศึกษาโดยวิธีที่นำมาอ้างอิง คือวิธี Spoligotyping และวิธี IS6110 และการเคลื่อนย้ายของประชากรจึงทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อต่างสายพันธุ์ ⁽²⁴⁾ รวมไปถึงกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนน้อย ข้อมูลที่ได้รับจึงอาจไม่เพียงพอที่จะแสดงถึงการแพร่กระจายของเชื้อทั้งหมด

นอกจากนี้ได้มีการประเมินค่าอำนาจการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อพบว่า Primer Mtub04, MIRU04, MIRU16, Q2163b, ETRA, ETRB, Mtub39 และ QUB26 มีอำนาจในการจัดจำแนกสูง Primer MIRU 40, MIRU 10, Mtub21, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 26, MIRU 31, QUB4156 และ MIRU 39 มีอำนาจในการจัดจำแนกได้ปานกลาง ส่วน Primer MIRU 02, ETRC, MIRU 20, Mtub29, Mtub30, MIRU 27 และ Mtub34 มีอำนาจในการจัดจำแนกต่ำ ข้อมูลส่วนใหญ่สอดคล้องกับการศึกษาของ Liu และคณะ ⁽²⁵⁾ และ Guo และคณะ ⁽²⁶⁾ ดังนั้นสามารถนำ Primer ดังกล่าวมาใช้ในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ในแถบพื้นที่นี้ต่อไปได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิค MIRU-VNTR typing ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้มีค่าอำนาจจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสูง (HGDI = 0.983) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ของ Guo และ คณะ ⁽²⁶⁾ และ Han และคณะ ⁽²⁰⁾

24 -loci MIRU-VNTR genotyping เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว สามารถทำซ้ำๆกัน และได้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง สามารถนำมาใช้ในการติดตามการแพร่

ระบาดของเชื้อ *M. tuberculosis* เพื่อประโยชน์ในการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อ อย่างไรก็ตามการศึกษาค้างนี้เป็นเพียงการศึกษานำร่องเท่านั้น การศึกษาต่อไปในอนาคตควรเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างให้มากและมาจากหลาย ๆ พื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อ *M. tuberculosis* เพื่อให้ครอบคลุมกลุ่มสายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่กำลังระบาด อาจนำไปสู่การอธิบายการกระจายตัวของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่างๆได้ รวมไปถึงอาจวิเคราะห์รูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อร่วมกับผลการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ เพื่อบอกว่ารูปแบบทางพันธุกรรมที่แยกได้ มีความสัมพันธ์กับผลการดื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยได้ และควรทำการศึกษาในตัวอย่างเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เป็นปัจจุบันเพื่อสามารถวิเคราะห์ข้อมูลให้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงและสอดคล้องกับการระบาดของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เกิดขึ้นจริงได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนพัฒนานักวิจัยใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2555 ทุนอุดหนุนส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2556 และศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Global tuberculosis report 2014 [online] 2014 [cited 2015 Jan 10]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1
2. 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.
3. Sotgiu G, Centis R, D'Ambrosio L, De Lorenzo S, D'Arcy Richardson M, Lange C, et al. Development of a standardised tool to survey MDR-/XDR-TB case management in Europe. Eur Respir J 2010;36:208-11.

4. Ghebremichael S, Groenheit R, Pennhag A, Koivula T, Andersson E, Bruchfeld J, et al. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing genotype does not spread in Sweden. PLoS One 2010;5:e10893.
5. Perdigao J, Macedo R, Malaquias A, Ferreira A, Brum L, Portugal I. Genetic analysis of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Lisbon, Portugal. J Antimicrob Chemother 2010;65:224-7.
6. Niemann S, Koser CU, Gagneux S, Plinke C, Homolka S, Bignell H, et al. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints. PLoS One 2009;4:e7407.
7. Boonaiam S, Chaiprasert A, Prammananan T, Leechawengwongs M. Genotypic analysis of genes associated with isoniazid and ethionamide resistance in MDR-TB isolates from Thailand. Clin Microbiol Infect 2009;16:396-9.
8. Valcheva V, Mokrousov I, Narvskaya O, Rastogi N, Markova N. Molecular snapshot of drug-resistant and drug susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in Bulgaria. Infect Genet Evol 2008;8:657-63.
9. Drobniewski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, Ruddy M, Kuznetsov S, Zakharova S, et al. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. JAMA 2005;293:2726-31.
10. Tracevska T, Jansone I, Baumanis V, Marga O, Lillebaek T. Prevalence of Beijing genotype in Latvian multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Int J Tuberc Lung Dis 2003;7:1097-103.
11. Agerton TB, Valway SE, Blinkhorn RJ, Shilkret KL, Reves R, Schluter WW, et al. Spread of strain W, a highly drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*, across the United States. Clin Infect Dis 1999;29:85-92.
12. Thorne N, Borrell S, Evans J, Magee J, Garça de Viedma D, Bishop C, et al. IS6110-based global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Genet Evol 2010;11:132-8.
13. Thong-On A, Smittipat N, Juthayothin T, Yanai H, Yamada N, Yorsangsukkamol J, et al. Variable-number tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 in Thailand. Tuberculosis 2010;90:9-15.
14. Gori A, Esposti AD, Bandera A, Mezzetti M, Sola C, Marchetti G, et al. Comparison between spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphisms in molecular genotyping analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains. Mol Cell Probes 2005;19:236-44.
15. Smittipat N, Billamas P, Palittapongarnpim M, Thong-On A, Temu MM, Thanakijcharoen P, et al. Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2005;43:5034-43.
16. Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, Supply P, Kam KM, et al. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. J Clin Microbiol 2005;43:314-20.
17. Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol 2002;40:1592-602.
18. Barlow RE, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH, Dickens A, Qamer S, Hawkey PM. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses

- for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol 2001;39:2453-7.
19. 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.
 20. Han H, Wang F, Xiao Y, Ren Y, Chao Y, Guo A, et al. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Wuhan, China. J Med Microbiol 2007;56:1219-23.
 21. Faksri K, Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Brown T, Prammananan T, Palittapongarnpim P, et al. Epidemiological trends and clinical comparisons of *Mycobacterium tuberculosis* lineages in Thai TB meningitis. Tuberculosis. 2011;9:594-600.
 22. 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;6:23.
 23. Prodinger WM, Bunyaratvej P, Prachaktam R, Pavlic M. *Mycobacterium tuberculosis* isolates of Beijing genotype in Thailand. Emerg Infect Dis 2001;7:483-4.
 24. Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol 2008;46:2692-9.
 25. Liu Q, Yang D, Xu W, Wang J, Lv B, Shao Y, et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates circulating in Jiangsu province, China. BMC Infect Dis 2011;11:288.
 26. Guo LH, Xiang WI, Zhang G, Luo T, Xie N, Yang Z, et al. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Sichuan province in China. Indian J Med Res 2011;134:362-8.