

การเปรียบเทียบ Whole Genome Sequencing และ PCR-based methods ในการระบุกลุ่มก่อนการระบาดของวัณโรคดื้อยาหลายขนาน

ณัฐกรกัญจน์ ทิพย์เครือ วท.ม.*

สรียา ยังฟัง วท.ม.

วรรณรัตน์ อุฬารวิริยากุล วท.บ.

ผกาพร พุ่มพวง วท.บ.

ธัญธรณ์ วีระเมธาพันธ์ วท.บ.

กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 กรมควบคุมโรค

บทคัดย่อ

การระบุกลุ่มก่อนการระบาด (Outbreak Clusters) ของวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) เป็นความท้าทายสำคัญในการควบคุมโรค เนื่องจากวิธีการตรวจแบบ PCR-based ซึ่งใช้กันอย่างกว้างขวางยังมีข้อจำกัดด้านความละเอียดในการจำแนกสายพันธุ์ ทำให้ยากต่อการยืนยันการแพร่กระจายเชื้อแบบสายพันธุ์เดียว (clonal spread) และการระบุพื้นที่ระบาดหนาแน่น (hotspots) ได้อย่างแม่นยำ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคนิค Whole Genome Sequencing (WGS) มาใช้เปรียบเทียบกับวิธี PCR-based ในการวิเคราะห์เชื้อจากผู้ป่วย MDR-TB จำนวน 188 รายในอำเภอท่ามะกา ซึ่งเป็นพื้นที่เสี่ยงสูง เพื่อทำความเข้าใจพลวัตการแพร่เชื้อทั้งในระดับพันธุกรรมและระดับระบาดวิทยา

ผลการศึกษาพบว่า วิธี PCR-based สามารถจัดกลุ่มผู้ป่วยได้ตามนิยามองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้แก่ MDR-TB จำนวน 167 ราย (88.8%), pre-XDR-TB จำนวน 8 ราย (4.3%) และ XDR-TB จำนวน 13 ราย (6.9%) ขณะที่การวิเคราะห์ด้วย WGS สามารถจำแนกเชื้อได้ละเอียดกว่าเป็น 10 กลุ่มสายพันธุ์ย่อย แสดงให้เห็นว่า WGS มีความแม่นยำและความละเอียดเชิงพันธุกรรมสูงกว่าวิธีแบบเดิมอย่างชัดเจน เชื้อวัณโรคสายพันธุ์ L2.2.M3 (Beijing lineage) พบมากที่สุด (77.7%) และมีความสัมพันธ์กับระดับการดื้อยาที่รุนแรง โดยตรวจพบในผู้ป่วย pre-XDR-TB ทุกตัวอย่าง (100%) สะท้อนบทบาทสำคัญของสายพันธุ์นี้ในความรุนแรงและการแพร่กระจายของวัณโรคดื้อยา นอกจากนี้ การวิเคราะห์เชิงพื้นที่ยังพบการกระจุกตัวอย่างชัดเจนของสายพันธุ์ L2.2.M3 ในเขตอำเภอท่ามะกา ซึ่งบ่งชี้ถึงการแพร่กระจายแบบสายพันธุ์เดียว (clonal spread) การบูรณาการข้อมูลจาก WGS และการวิเคราะห์เชิงพื้นที่ช่วยระบุพื้นที่ระบาดหนาแน่นและสายพันธุ์เสี่ยงสูงได้อย่างแม่นยำ ทำให้สามารถอธิบายรูปแบบการแพร่เชื้อ MDR-TB ในระดับท้องถิ่นได้อย่างถูกต้องและเชื่อถือได้

โดยสรุป การประยุกต์ใช้เทคนิค WGS ควบคู่กับการวิเคราะห์เชิงพื้นที่ช่วยเพิ่มความแม่นยำในการระบุสายพันธุ์และพื้นที่ระบาดหนาแน่นของ MDR-TB ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญต่อการติดตามสถานการณ์โรค การควบคุมการแพร่เชื้อ และการกำหนดมาตรการเชิงรุกในพื้นที่ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดวัณโรคดื้อยา

คำสำคัญ: วัณโรคดื้อยาหลายขนาน, สายพันธุ์ปักกิ่ง, การจัดลำดับจีโนมทั้งจีโนม, การแพร่ระบาดแบบโคลน

Received: 02/011/2568

Revised: 1 7/11/2568

Accepted: 04/11/2568

*ณัฐกรกัญจน์ ทิพย์เครือ ผู้รับผิดชอบบทความ

วารสารสถาบันบำราศนราดูร 2568; 19(3): 173-183

Comparison of Whole Genome Sequencing and PCR-based Methods in Identifying Drug-Resistant Tuberculosis Outbreak Clusters

Natthakan Thipkrua M.Sc.*

Sareeya Youngpheung M.Sc.

Wannarat Aulanwiriyaakoon B.Sc.

Pakaporn Phumphuangs B.Sc.

Thanyathorn Veeramaethaphan B.Sc.

The office of Disease Prevention and Control Region 5, Department of Disease Control

ABSTRACT

Identifying outbreak clusters of Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB) is a significant challenge in disease control. Widely used PCR-based methods have limitations in strain resolution, which makes it difficult to confirm clonal spread and accurately identify disease hotspots. This study aimed to apply Whole Genome Sequencing (WGS) and compare it with the PCR-based method for analyzing *Mycobacterium tuberculosis* isolates from 188 MDR-TB patients in Tha Maka District, a high-risk area, to understand transmission dynamics at both the genetic and epidemiological levels.

Results from the PCR-based method categorized patients according to WHO definitions as MDR-TB (167 cases, 88.8%), pre-XDR-TB (8 cases, 4.3%), and XDR-TB (13 cases, 6.9%). In contrast, WGS analysis achieved a much finer differentiation, distinguishing the isolates into 10 distinct sub-lineage clusters, clearly demonstrating its superior accuracy and genetic resolution over conventional methods. The L2.2.M3 strain (Beijing lineage) was the most prevalent (77.7%) and was strongly associated with high levels of drug resistance, being detected in 100% of pre-XDR-TB samples. This highlights the critical role of this lineage in the severity and spread of drug-resistant tuberculosis. Furthermore, geospatial analysis revealed a clear clustering of the L2.2.M3 strain in the Tha Maka districts, strongly indicating clonal spread. Integrating data from WGS and geospatial analysis precisely identified hotspots and high-risk strains, enabling an accurate and reliable explanation of local MDR-TB transmission patterns.

In conclusion, WGS combined with geospatial analysis is a vital tool for monitoring, controlling, and implementing proactive measures in areas highly susceptible to drug-resistant tuberculosis.

Key words: MDR TB, Beijing lineage, WGS (Whole Genome Sequencing), Clonal Spread

*Corresponding Author: Natthakan Thipkrua

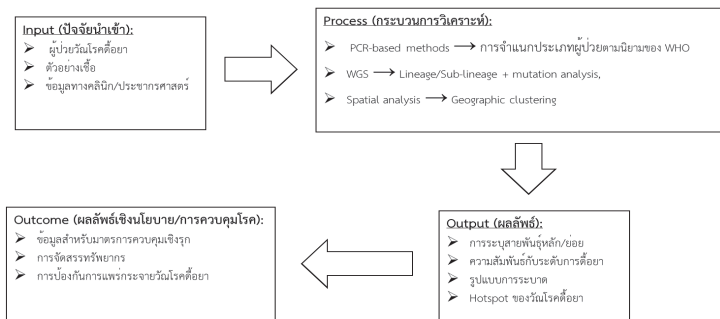
บทนำ

วัณโรค (TB) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ MTBC อาศัยเทคนิค molecular typing ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบจีโนมของเชื้อ โดยใช้ข้อมูลจาก single nucleotide polymorphisms (SNPs) และการมีหรือไม่มีของ deletion regions เพื่อจำแนกเชื้อออกเป็น lineage และ sub-lineage ต่าง ๆ¹⁻³

การดื้อยาของเชื้อวัณโรคเป็นปัญหาสำคัญ โดยมีสาเหตุหลักจากการกลายพันธุ์ทางพันธุกรรม และการรับยีนดื้อยาจากเชื้อสายพันธุ์อื่น การใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสมก่อให้เกิดแรงกดดันคัดเลือก (selective pressure) ทำให้สายพันธุ์ดื้อยาเพิ่มจำนวนขึ้น^{4,5} การระบาดของวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) ซึ่งดื้อต่อยา isoniazid (INH) และ rifampicin (RIF) ส่งผลให้อัตราการเสียชีวิตสูงขึ้น⁵ การรักษาซับซ้อนและมีค่าใช้จ่ายสูงกว่า⁶

ในอดีต การสอบสวนการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยาอาศัยการสอบสวนผู้สัมผัส (contact investigation) และการวิเคราะห์ทางระบาดวิทยาแบบดั้งเดิม^{7,8} อย่างไรก็ตาม การระบุความเชื่อมโยงของการแพร่เชื้อที่ชัดเจนยังคงเป็นข้อจำกัด Whole Genome Sequencing (WGS) จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญ เนื่องจากให้ข้อมูลเชิงลึกระดับจีโนม ทำให้สามารถระบุความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetically-linked cases) และสร้างเครือข่ายการแพร่เชื้อ (phylogenetic network) ได้อย่างแม่นยำ^{9,10}

กรอบแนวคิดในการศึกษา



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิด

ในประเทศไทย มีรายงานการระบาดของ MDR-TB แบบ clonal outbreak ที่โรงพยาบาลมะเร็งรักษ์ จังหวัดกาญจนบุรี ในปี 2552 ซึ่งอัตราการพบผู้ป่วย MDR-TB รายใหม่ในพื้นที่นั้นเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอด 10 ปีที่ผ่านมา¹¹⁻¹⁴ แม้จะมีการสอบสวนทางระบาดวิทยาและใช้ social network analysis ร่วมกับการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ Beijing ที่มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสูง แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปสาเหตุการระบาดได้อย่างชัดเจน¹⁵

ข้อจำกัดของการสอบสวนในขณะนั้นคือการขาดระบบ contact investigation ที่เป็นมาตรฐาน และยังไม่มีการบูรณาการข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อเข้ากับข้อมูลทางระบาดวิทยาอย่างครบถ้วน นอกจากนี้ เทคนิคการตรวจยืนยันการดื้อยาในห้องปฏิบัติการที่ใช้ในอดีต เช่น PCR-based methods (Line Probe Assay: LPA, Xpert MTB/RIF, Real-time PCR) แม้จะรวดเร็ว แต่ก็ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์เพื่อระบุความเชื่อมโยงทางระบาดได้

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคนิค Whole Genome Sequencing (WGS) มาใช้เป็นครั้งแรกในการเปรียบเทียบกับ PCR-based methods (ได้แก่ LPA, Xpert MTB/RIF และ Real-time PCR) เพื่อระบุกลุ่มก่อนการระบาดของวัณโรคดื้อยาในอำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี ผลการศึกษาที่ได้จะช่วยทำความเข้าใจพฤติกรรมการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยาในพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์สูง และเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการพัฒนาระบบการสอบสวนโรค และการกำหนดมาตรการควบคุมวัณโรคดื้อยาในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ Whole Genome Sequencing (WGS) กับ PCR-based methods ที่ใช้ในการวินิจฉัยหรือระบุการดื้อยา ในการจัดกลุ่มและยืนยันกลุ่มก่อนการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB)

2. เพื่อระบุลักษณะทางระบาดวิทยา (เช่น อายุ, เพศ, ที่อยู่) ของผู้ป่วย MDR-TB ที่จัดอยู่ในกลุ่มก่อนการระบาดโดย WGS

วิธีการศึกษา

รูปแบบการศึกษา

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (cross-sectional study) โดยใช้ข้อมูลจากตัวอย่างเชื้อวัณโรคที่ได้จากผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานซึ่งยังคงมารับการรักษาที่โรงพยาบาลมะเร็งรักษ์ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรศึกษา (Study population) คือ ผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานในจังหวัดกาญจนบุรี

กลุ่มตัวอย่าง (Study samples) คือ ตัวอย่างเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานที่ขึ้นทะเบียนรักษาที่โรงพยาบาลมะเร็งรักษ์ ระหว่างปี พ.ศ. 2557–2562

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่

- การตรวจด้วย PCR-based methods ได้แก่ ผลการตรวจดื้อยา Rifampicin จาก Xpert MTB/RIF และผลการตรวจดื้อยา Isoniazid จาก Line Probe Assay (LPA) และ Real-time PCR (RT-PCR) ที่เคยดำเนินการตรวจมาก่อนหน้านี้จากบันทึกการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

- การหาลำดับพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค (Whole Genome Sequencing) ใช้เทคนิค Next-Generation Sequencing (NGS) ด้วยเครื่อง Ion Personal Genome Machine® (PGM™) system เพื่อหาลำดับพันธุกรรมของสาย DNA จากเชื้อวัณโรคที่ผ่านการสกัด DNA แล้ว

- ตัวอย่างส่งตรวจ คือ DNA จีโนมที่สกัดได้จากเชื้อวัณโรคที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สถานที่ส่งตรวจ คือ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มาจากทะเบียนการตรวจทางห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลมะเร็งรักษ์ จังหวัดกาญจนบุรี และฐานข้อมูลของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี

ข้อมูลที่เก็บรวบรวมประกอบด้วย

1. ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ ที่อยู่ วันที่เก็บตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ และวันที่ขึ้นทะเบียนรักษา

2. ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ

- ผลการตรวจการดื้อยาจากวิธี PCR-based methods ได้แก่ Xpert MTB/RIF, Line Probe Assay (LPA) และ Real-time PCR (RT-PCR)

- ผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมด้วยเทคนิค Whole Genome Sequencing (WGS)

ตัวอย่างเชื้อที่นำมาศึกษาเป็นเชื้อวัณโรคที่ได้จากการเพาะเชื้อและได้รับการตรวจยืนยันการดื้อยาด้วยวิธี PCR-based methods แล้ว และยังคงได้รับการเก็บรักษาไว้ในคลังเชื้อของห้องปฏิบัติการ

การพิทักษ์สิทธิของกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้อยู่ภายใต้ โครงการวิจัยซึ่งได้รับการตรวจสอบและอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (HREC) ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (รหัส REC.61-208-18-1)

การวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive Statistics) ดังนี้

- ข้อมูลประชากร เป็นการสรุปข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ (จำนวนและร้อยละ), อายุ (ค่าเฉลี่ย, กลุ่มช่วงอายุ), ที่อยู่ (สรุปการกระจายตัวตามตำบล)

- ข้อมูลทางคลินิก คือ สถานะการรักษา (ผู้ป่วยใหม่/ผู้ป่วยเคยรักษามาก่อน)

- ช่วงเวลาการวินิจฉัย/การเก็บตัวอย่าง จาก
การสรุปการกระจายตัวของตัวอย่างตามปี และเดือน
เพื่อดูแนวโน้มเบื้องต้นของการเกิด MDR-TB ในแต่ละ
ช่วงเวลา

- เปรียบเทียบความสามารถในการระบุกลุ่มก่อน
และการแพร่กระจาย

ผลการศึกษา

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย
ที่รักษาสำเร็จแล้วแต่อยู่ระหว่างการติดตามการรักษา ผู้ป่วย
ที่กำลังรักษาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน และผู้ป่วยที่ขึ้น
ทะเบียนรักษาในช่วงปี 2557-2562 โดยสามารถเก็บ
ตัวอย่างเพื่อนำไปเพาะเชื้อและวิเคราะห์ข้อมูลได้ รวม
ทั้งหมด 188 ราย

**1. ข้อมูลประชากรและลักษณะทางคลินิกของ
ผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา** จากการวิเคราะห์ข้อมูลผู้ป่วยวัณโรค
ดื้อยาจำนวน 188 ราย พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเพศชาย
(55.3%) และมีสัดส่วนของผู้สูงอายุในระดับสูง โดยกลุ่ม
อายุมากกว่า 64 ปีเป็นร้อยละ 26.1 และเมื่อรวมกับกลุ่ม
อายุ 45 ปีขึ้นไปพบว่า มีสัดส่วนรวมประมาณร้อยละ 70
สะท้อนให้เห็นว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มวัยกลางคนและ
ผู้สูงอายุ ด้านสถานะการรักษาพบว่าร้อยละ 83.5 เป็นผู้ป่วย
รายใหม่ที่ไม่เคยได้รับการรักษาวัณโรคมาก่อน ขณะที่
การจำแนกประเภทการดื้อยาด้วยวิธี PCR-based methods
พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มวัณโรคดื้อยาหลายขนาน
(MDR-TB) ร้อยละ 88.8 ส่วนกลุ่มที่มีการดื้อยารุนแรง
มากขึ้น ได้แก่ Pre-XDR-TB และ XDR-TB มีสัดส่วน
รวมร้อยละ 11.2 รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลประชากรและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา

	ข้อมูลตัวแปร	จำนวน (ร้อยละ)
จำนวน		188
เพศ	หญิง	84 (44.7)
	ชาย	104 (55.3)
กลุ่มอายุ (ปี)	18-24	13 (6.9)
	25-34	14 (7.4)
	35-44	30 (16)
	45-54	40 (21.3)
	55-64	42 (22.3)
	> 64	49 (26.1)
ประเภทการขึ้นทะเบียนรักษาวัณโรค	New case	157 (83.5)
	Previously treated case	31 (16.5)
การแบ่งกลุ่มการดื้อยา ด้วย PCR-based methods	MDR-TB	167 (88.8)
	Pre XDR-TB (นิยามเก่า)	8 (4.3)
	XDR-TB (นิยามเก่า)	13 (6.9)

2. การวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อวัณโรค ดื้อยาหลายขนานจากการตรวจ Whole Genome Sequencing (WGS)

ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคจากผู้ป่วย MDR-TB จำนวน 188 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกเชื้อวัณโรคออกได้เป็น 3 กลุ่มสายพันธุ์หลัก ได้แก่ Lineage 1 (Indo-Oceanic lineage), Lineage 2 (East Asian lineage; Beijing family) และ Lineage 4 (Euro-American lineage) โดยพบว่าเชื้อส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ในกลุ่ม Lineage 2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความชุกสูงที่สุด แบ่งออกเป็น 5 สายพันธุ์ย่อย ได้แก่ L2.2.M3 จำนวน 146 ตัวอย่าง (77.7%), L2.2.M2 จำนวน 10 ตัวอย่าง (5.3%), L2.2.M1 จำนวน 7 ตัวอย่าง (3.7%) และ L2.1 จำนวน 6 ตัวอย่าง (3.2%) ส่วนสายพันธุ์ในกลุ่ม Lineage 1 (Indo-Oceanic lineage) พบรวมทั้งหมด 11 ตัวอย่าง (5.8%) จำแนกเป็น 4 สายพันธุ์ย่อย ได้แก่ L1.1.1 จำนวน 4 ตัวอย่าง (2.1%), L1.1.2 จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.5%), L1.1.3 จำนวน 4 ตัวอย่าง (2.1%) และ L1.2.2 จำนวน 2 ตัวอย่าง (1.1%) ขณะที่สายพันธุ์ในกลุ่ม Lineage 4 พบเพียง 4 ตัวอย่าง (2.1%) ซึ่งทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ย่อย L4.5 รายละเอียดแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อยาจากการตรวจด้วย Whole Genome Sequencing (WGS)

สายพันธุ์หลัก	สายพันธุ์ย่อย	จำนวน (ร้อยละ)
Lineage 1 (Indo-Oceanic lineage)	L1.1.1	4 (2.1)
	L1.1.2	1 (0.5)
	L1.1.3	4 (2.1)
	L1.2.2	2 (1.1)
Lineage 2 (East Asian lineage; Beijing family)	L2.1	6 (3.2)
	L2.2.AA3	4 (2.1)
	L2.2.M1	7 (3.7)
	L2.2.M2	10 (5.3)
	L2.2.M3	146 (77.7)
Lineage 4 (Euro-American lineage)	L4.5	4 (2.1)

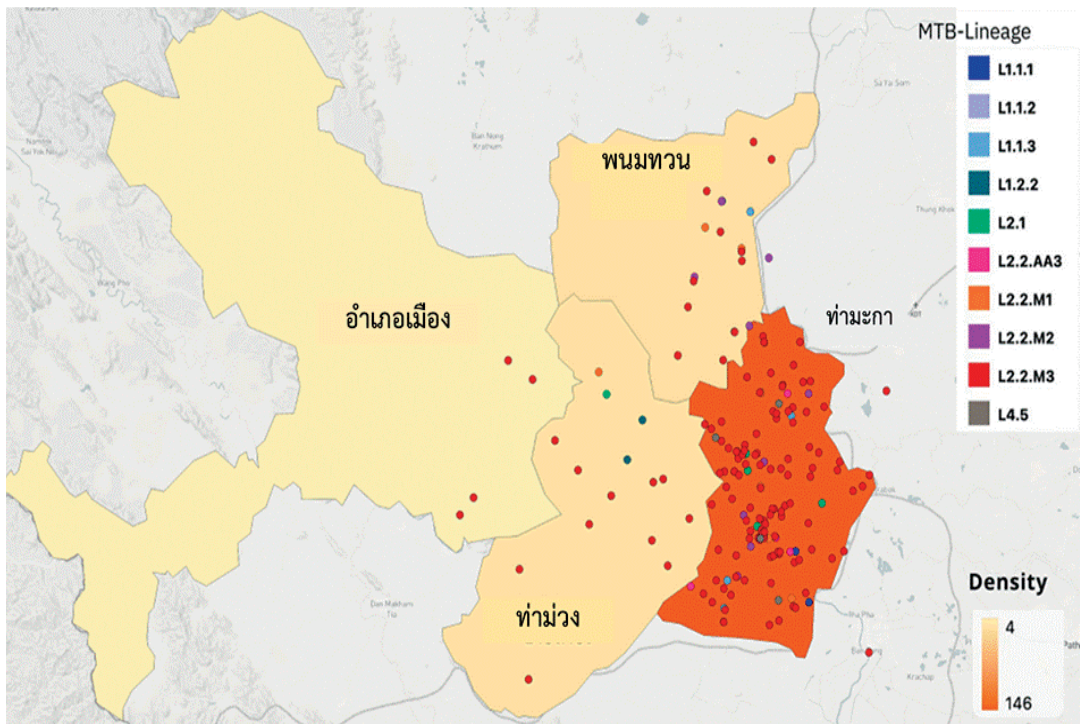
3. การจำแนกผู้ป่วยด้วยวิธี PCR-based methods

กับการตรวจ Whole Genome Sequencing การศึกษาตัวอย่างผู้ป่วยวัณโรคจำนวน 188 ตัวอย่าง พบว่าวิธี PCR-based methods สามารถจำแนกผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาออกเป็น 3 กลุ่มหลักตามนิยามขององค์การอนามัยโลก ได้แก่ MDR-TB, Pre-XDR-TB, และ XDR-TB ขณะที่การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Whole Genome Sequencing (WGS) สามารถให้การจำแนกเชื้อที่ละเอียดกว่า โดยแบ่งเป็น 3 สายพันธุ์หลักและ 10 สายพันธุ์ย่อย รายละเอียดแสดงในตารางที่ 3

การเปรียบเทียบผลการจัดจำแนกผู้ป่วยด้วยเทคนิค WGS และวิธี PCR-based methods พบมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.001$) ระหว่างกลุ่มสายพันธุ์เชื้อ (WGS Lineage) กับระดับการดื้อยา (PCR-based methods) สำหรับผู้ป่วยที่จัดเป็น MDR-TB ทั้งหมด 167 ตัวอย่าง การวิเคราะห์โดยเทคนิค WGS จำแนกเชื้อวัณโรคได้เป็น 9 สายพันธุ์ย่อย โดยสายพันธุ์ย่อย L2.2.M3 มีจำนวนมากที่สุดถึง 132 ตัวอย่าง (ร้อยละ 79) ในทางกลับกัน ผู้ป่วยที่จัดเป็น Pre-XDR-TB ทั้ง 8 ตัวอย่าง เป็นสายพันธุ์ย่อย L2.2.M3 ทั้งหมด (ร้อยละ 100) ส่วนกลุ่มผู้ป่วย XDR-TB (13 ตัวอย่าง) จำแนกได้เป็น 3 สายพันธุ์ย่อย ได้แก่ L1.1.1, L2.1 และ L2.2.M3 โดยส่วนใหญ่อยู่ในสายพันธุ์ L2.1 และ L2.2.M3 ในสัดส่วนที่เท่ากัน มีจำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 46.2 ต่อสายพันธุ์

ตารางที่ 3 การจำแนกกลุ่มผู้ป่วย ด้วยวิธี PCR-based methods ตามการดื้อยา และการจำแนกด้วยวิธี Whole Genome Sequencing

การจำแนกด้วยวิธี Whole Genome Sequencing	การจำแนกตามการดื้อยาด้วยวิธี			Test stat./ Fisher's exact test
	MDR-TB	Pre-XDR-TB	XDR-TB	
L1.1.1	3 (1.8)	0 (0)	1 (7.7)	<i>p</i> - value= 0.001
L1.1.2	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	
L1.1.3	4 (2.4)	0 (0)	0 (0)	
L1.2.2	2 (1.2)	0 (0)	0 (0)	
L2.1	0 (0)	0 (0)	6 (46.2)	
L2.2.AA3	4 (2.4)	0 (0)	0 (0)	
L2.2.M1	7 (4.2)	0 (0)	0 (0)	
L2.2.M2	10 (6)	0 (0)	0 (0)	
L2.2.M3	132 (79)	8 (100)	6 (46.2)	
L4.5	4 (2.4)	0 (0)	0 (0)	
รวม	167	8	13	



ภาพที่ 2 แสดงการกระจายทางภูมิศาสตร์และสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคจำนวน 188 ตัวอย่าง ในอำเภอท่าเมกาและอำเภอใกล้เคียง โดยจุดแต่ละจุดบนแผนที่แทนผู้ป่วยแต่ละราย โดยสีของจุดแสดงถึงสายพันธุ์ของเชื้อ MTB ส่วนการไล่ระดับสีบนแผนที่แสดงความหนาแน่นของผู้ป่วย โดยบริเวณที่มีสีเข้มกว่าหมายถึงพื้นที่ที่มีจำนวนผู้ป่วยสูงกว่า

4. ผลการวิเคราะห์เชิงพื้นที่ของการกระจายสายพันธุ์เชื้อวัณโรค

การวิเคราะห์เชิงพื้นที่ที่ร่วมกับพิกัดที่อยู่อาศัยของผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา จำนวน 188 ตัวอย่าง โดยใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (GIS) พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคทั้ง 10 สายพันธุ์ย่อยมีรูปแบบการกระจายที่แตกต่างกันในแต่ละอำเภอ โดยสายพันธุ์ L2.2.M3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด (ร้อยละ 77.7) แสดงการรวมกลุ่มเชิงพื้นที่ (spatial clustering) อย่างเด่นชัดในอำเภอท่ามะกา ซึ่งปรากฏเป็นกลุ่มสีแดงบนแผนที่สะท้อนถึงการแพร่กระจายของเชื้อแบบสายพันธุ์เดี่ยว (clonal spread) ในสองอำเภอนี้

ในทางตรงกันข้าม พื้นที่อื่น เช่น อำเภอท่าม่วง และอำเภอพนมทวน พบความหลากหลายของสายพันธุ์มากกว่า โดยปรากฏเป็นจุดสีหลายสีและมีความหนาแน่นของการรวมกลุ่มต่ำกว่าอย่างชัดเจน ซึ่งบ่งชี้ว่าการแพร่ระบาดในพื้นที่เหล่านี้เป็นแบบหลายสายพันธุ์ และอาจเกี่ยวข้องกับการนำเข้ามาของเชื้อจากหลายแหล่งหรือการแพร่กระจายที่ไม่เป็นกลุ่มก้อน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นการวิเคราะห์เชิงพื้นที่ด้วย GIS ซึ่งสามารถช่วยระบุพื้นที่ที่มีการรวมกลุ่มของสายพันธุ์วัณโรคดื้อยาอย่างชัดเจน และเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการกำหนดมาตรการควบคุมการแพร่ระบาดในพื้นที่เฉพาะได้อย่างตรงจุด ดังรายละเอียดแสดงในรูปที่ 2

อภิปรายผล

การศึกษารุ่นนี้ให้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับการระบาดของวัณโรคดื้อยาในพื้นที่เสี่ยงของประเทศไทย โดยใช้เทคนิค Whole Genome Sequencing (WGS) เพื่อทำความเข้าใจลักษณะทางพันธุกรรมและการกระจายเชิงพื้นที่ของเชื้อวัณโรคดื้อยา ผลการศึกษาชี้ให้เห็นประเด็นสำคัญดังนี้

1. ลักษณะของผู้ป่วยและรูปแบบการดื้อยา ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาส่วนใหญ่เป็นเพศชาย (55.3%) และอยู่ในกลุ่มอายุมากกว่า 45 ปี (ประมาณ 70%) โดย 83.5% เป็นผู้ป่วยรายใหม่ (new case) ที่ได้รับ

การวินิจฉัยว่าเป็น MDR-TB ขณะที่มีเพียง 16.5% เป็นผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษามาก่อน (previously treated case) การพบผู้ป่วย MDR-TB ในกลุ่มรายใหม่ในสัดส่วนสูง บ่งชี้ถึงการแพร่ระบาดแบบปฐมภูมิ (primary transmission) ของเชื้อวัณโรคดื้อยาในชุมชน มากกว่าการเกิดจากการรักษาที่ไม่ครบถ้วน (secondary resistance) ซึ่งปัจจัยที่อาจส่งผล ได้แก่ ภูมิคุ้มกันที่ลดลงในผู้สูงอายุ รวมถึงพฤติกรรมเสี่ยงทางสังคม เช่น การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ และการสัมผัสเชื้อในสถานที่ทำงาน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าในพื้นที่ที่มีภาวะวัณโรคสูง¹⁶⁻¹⁸

2. การแพร่ของสายพันธุ์ L2.2.M3

การวิเคราะห์ WGS พบว่าสายพันธุ์ L2.2.M3 เป็นสายพันธุ์หลักที่พบในผู้ป่วยถึง 77.7% ของทั้งหมด การมีสายพันธุ์เดี่ยวที่ครอบงำในสัดส่วนสูง บ่งชี้ถึงการแพร่ระบาดแบบสายพันธุ์เดี่ยว (clonal spread) ของเชื้อที่มีความสามารถในการอยู่รอดและแพร่กระจายได้ดีในชุมชน โดยเป็นที่ทราบกันดีว่าสายพันธุ์ Beijing มีแนวโน้มดื้อต่อยาหลายชนิด และสามารถแพร่เชื้อได้มีประสิทธิภาพมากกว่าสายพันธุ์อื่น การแพร่ของสายพันธุ์นี้จึงอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ MDR-TB และ pre-XDR-TB ในพื้นที่อย่างต่อเนื่อง งานวิจัยก่อนหน้าในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และจีนก็รายงานลักษณะการแพร่เชื้อแบบสายพันธุ์เดี่ยว (clonal spread) ของสายพันธุ์ Beijing และความสัมพันธ์กับการดื้อยาหลายชนิด^{1, 19}

3. การระบาดเชิงพื้นที่ การวิเคราะห์เชิงพื้นที่พบว่าผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา โดยเฉพาะสายพันธุ์ L2.2.M3 มีการกระจุกตัวอย่างชัดเจนในเขตอำเภอท่ามะกา สะท้อนถึงการระบาดในระดับท้องถิ่น (local transmission) ที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง การระบุพื้นที่ที่มีความหนาแน่นของผู้ป่วยสูง (hotspot) มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการวางแผนควบคุมโรค โดยเฉพาะการดำเนินการมาตรการเชิงรุก เช่น การค้นหาผู้ป่วยเชิงรุก (active case finding) และการติดตามผู้สัมผัสโรค (contact tracing) เพื่อหยุดยั้งการแพร่เชื้อในชุมชน ดังที่มีการรายงานโดย Coscolla & Gagneux และ Liang^{19, 20}

การใช้การวิเคราะห์เชิงพื้นที่ (spatial analysis) และการระบุ hotspot เป็นเครื่องมือสำคัญในการวางแผนมาตรการควบคุมวัณโรคดื้อยา โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการแพร่กระจายของสายพันธุ์ Beijing อย่างต่อเนื่อง

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาี้แสดงถึงความสำคัญของการใช้เทคนิค WGS ร่วมกับกรวิเคราะห์เชิงพื้นที่ในการทำความเข้าใจรูปแบบการแพร่เชื้อและสายพันธุ์วัณโรคดื้อยาในระดับพื้นที่ ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการกำหนดมาตรการควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเฉพาะการมุ่งเน้นในพื้นที่เสี่ยงสูงและสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการแพร่กระจายสูง เช่น L2.2.M3

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะเชิงนโยบายและการควบคุมโรค

1. ควรนำเทคนิค Whole Genome Sequencing (WGS) มาใช้เป็นส่วนหนึ่งของระบบเฝ้าระวังวัณโรคดื้อยาในระดับภูมิภาค เพื่อให้สามารถระบุสายพันธุ์และรูปแบบการแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำมากกว่าวิธี PCR-based

2. หน่วยงานสาธารณสุขควรนำข้อมูลจากการวิเคราะห์เชิงพื้นที่ร่วมกับข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อ เพื่อระบุพื้นที่เสี่ยง (hotspot) และดำเนินมาตรการควบคุมโรคเชิงรุก เช่น การติดตามผู้สัมผัส (contact tracing) และการค้นหาผู้ป่วยเชิงรุก (active case finding)

3. ควรจัดสรรทรัพยากรทางสาธารณสุขและงบประมาณไปยังพื้นที่ที่พบการกระจุกตัวของสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการแพร่กระจายสูง เช่น L2.2.M3 เพื่อยับยั้งการแพร่เชื้อและลดการเกิดผู้ป่วยรายใหม่

ข้อเสนอแนะเชิงวิชาการและการวิจัย

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อติดตามวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ L2.2.M3 และสายพันธุ์อื่น ๆ ในระยะยาว เพื่อทำความเข้าใจกลไกการดื้อยาและความสามารถในการแพร่เชื้อในบริบทของประเทศไทย

2. การบูรณาการข้อมูลทางจีโนมิกส์กับข้อมูลทางคลินิกและสังคม (เช่น พฤติกรรมเสี่ยง การเคลื่อนย้ายประชากร) จะช่วยให้สามารถอธิบายรูปแบบการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยาได้ครบถ้วนยิ่งขึ้น

3. ควรส่งเสริมการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการระดับภูมิภาคให้สามารถดำเนินการวิเคราะห์ WGS ได้ รวมทั้งพัฒนาระบบฐานข้อมูลกลาง เพื่อให้สามารถเชื่อมโยงและใช้ประโยชน์ข้อมูลร่วมกันระหว่างหน่วยงาน

ข้อจำกัดของการศึกษา

1. ขอบเขตของข้อมูลตัวอย่างจำกัดในระดับท้องถิ่น การศึกษานี้วิเคราะห์เชื้อจากผู้ป่วย MDR-TB จำนวน 188 รายในอำเภอท่ามะกา พร้อมการเชื่อมโยงเชิงพื้นที่กับอำเภอท่าม่วง ซึ่งทำให้ผลลัพธ์สะท้อนเฉพาะพลวัตการแพร่เชื้อในพื้นที่เสี่ยงสูงระดับท้องถิ่นเท่านั้น จึงยังไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนสำหรับสรุปแนวโน้มการแพร่กระจายของ MDR-TB ในระดับจังหวัดหรือระดับประเทศได้อย่างสมบูรณ์

2. ข้อจำกัดด้านข้อมูลระบาดวิทยาในการยืนยันการแพร่เชื้อ แม้ว่าการศึกษานี้เน้นการเปรียบเทียบเทคนิคจำแนกสายพันธุ์และการวิเคราะห์เชิงพื้นที่แต่การระบุกลุ่มก่อนการระบาด (clusters) ด้วย WGS จำเป็นต้องบูรณาการข้อมูลทางระบาดวิทยา เช่น ประวัติการสัมผัสร่วม สถานที่ที่ผู้ป่วยไป หรือระยะเวลาการวินิจฉัย ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ยังไม่ครบถ้วนในชุดข้อมูลที่ใช้ ทำให้การยืนยันเหตุการณ์แพร่เชื้อจริง (confirmed transmission) สามารถทำได้ในระดับจำกัด เนื่องจากข้อมูลที่เข้ามาจากผลทางห้องปฏิบัติการเป็นหลัก

3. ข้อจำกัดด้านการยืนยันการแพร่กระจายแบบ Clonal Spread การยืนยันลักษณะการแพร่กระจายแบบสายพันธุ์เดียว (clonal spread) ต้องอาศัยเกณฑ์ความแตกต่างของ SNPs ที่เข้มงวดร่วมกับข้อมูลระบาดวิทยา อย่างไรก็ตาม การตีความลักษณะการกระจุกตัวเชิงพื้นที่โดยไม่เปิดเผยเกณฑ์ SNP cut-off หรือหลักเกณฑ์ที่ใช้ในการจัดกลุ่มสายพันธุ์ อาจทำให้การสรุปการเกิด clonal spread ยังไม่สมบูรณ์เท่าที่ควร

เอกสารอ้างอิง

1. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol* 2014; 26(6): 431–44. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.012.
2. Bespiatykh D, Bespiatykh J, Mokrousov I, Shitikov E. A Comprehensive Map of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Regions of Difference. *mSphere* 2021; 6: 10. doi: 10.1128/msphere.00535–21.
3. Atavliyeva S, Auganova D, Tarlykov P. Genetic diversity, evolution and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 2. *Front Microbiol* 2024; 15: 1384791. doi: 10.3389/fmicb.2024.1384791.
4. Dheda K, Gumbo T, Maartens G, Dooley KE, McNerney R, Murray M, et al. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *Lancet Respir Med* 2017; S2213–2600(17)30079–6. doi: 10.1016/S2213–2600(17)30079–6.
5. Palomino JC, Martin A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics (Basel)* 2014; 3(3): 317–40. doi: 10.3390/antibiotics 3030317.
6. Organization WH. Molecular assays as initial tests for the diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance: Rapid communication. Geneva: WHO; 2020.
7. Fox GJ, Barry SE, Britton WJ, Marks GB. Contact investigation for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2013; 41(1): 140–56. doi: 10.1183/09031936.00070812.
8. Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, et al. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 2011 24; 364(8): 730–9. doi: 10.1056/NEJMoa1003176.
9. Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* 2013; 13(2): 137–46. doi: 10.1016/S1473–3099(12)70277–3.
10. Stucki D, Ballif M, Egger M, Furrer H, Altpeter E, Battegay M, et al. Standard Genotyping Overestimates Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among Immigrants in a Low-Incidence Country. *J Clin Microbiol* 2016; 54(7): 1862–70. doi: 10.1128/JCM.00126–16.
11. Srilohasin P, Prammananan T, Faksri K, Phelan JE, Suriyaphol P, Kamolwat P, et al. Genomic evidence supporting the clonal expansion of extensively drug-resistant tuberculosis bacteria belonging to a rare proto-Beijing genotype. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9: 2632–41. (in Thai)
12. Regmi SM, Chaiprasert A, Kulawonganunchai S, Tongsima S, Coker OO, Prammananan T, et al. Whole genome sequence analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates from an outbreak in Thailand. *Mol Genet Genomics* 2015; 290(5): 1933–41. doi: 10.1007/s00438–015–1048–0.
13. Rudeeaneksin J, Phetsuksiri B, Nakajima C, Bunchoo S, Suthum K, Tipkrua N, et al. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and its genotypes isolated from an outbreak in western Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2021; 115(8): 886–895. doi: 10.1093/trstmh/traa148.
14. Jiraphongsa C, Wangteeraprasert T, Henpraserttae N, Sanguanwongse N, Panya L, Sukkasitvanichkul J,

- et al. Community outbreak of multidrug resistance tuberculosis, Kanchanaburi province, Thailand on 2002– June 2010. *J Prev Med Assoc Thai* 2011; 1: 261–71. (in Thai)
15. Nonghanphithak D, Chaiprasert A, Smithtikarn S, Kamolwat P, Pungrassami P, Chongsuvivatwong V, et al. Clusters of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Detected by Whole-Genome Sequence Analysis of Nationwide Sample, Thailand, 2014–2017. *Emerg Infect Dis* 2021; 27(3): 813–822. doi: 10.3201/eid2703.204364.
16. Wu L, Xia D, Xu S, Lin X, Peng T, Jiang X. Drug resistance patterns, trends, and risk factors for multidrug resistance of tuberculosis in Wenzhou, China: a ten-year retrospective analysis (2014–2023). *Front Med (Lausanne)* 2025; 12: 1611322. doi: 10.3389/fmed.2025.1611322.
17. Li WB, Zhang YQ, Xing J, Ma ZY, Qu YH, Li XX. Factors associated with primary transmission of multidrug-resistant tuberculosis compared with healthy controls in Henan Province, China. *Infect Dis Poverty* 2015; 4: 14. doi: 10.1186/s40249-015-0045-1.
18. Sinha P, Srivastava GN, Gupta A, Anupurba S. Association of Risk Factors and Drug Resistance Pattern in Tuberculosis Patients in North India. *J Glob Infect Dis.* 2017; 9(4): 139–145. doi: 10.4103/jgid.jgid_167_16.
19. Zhan J, Wang W, Luo D, Chen Q, Yu S, Yan L, Chen K. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in Jiangxi, China, and associated risk factors. *Microbiol Spectr* 2024; 12(11): e0355523. doi: 10.1128/spectrum.03555-23.
20. Lin D, Wang J, Cui Z, Ou J, Huang L, Wang Y. A genome epidemiological study of mycobacterium tuberculosis in subpopulations with high and low incidence rate in Guangxi, South China. *BMC Infect Dis* 2021; 21(1): 840. doi: 10.1186/s12879-021-06385-0.