



การศึกษาอนุพันธุศาสตร์และระบาดวิทยาของแบคทีเรียเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS)

ชาญวิทย์ ตริพุทธรัตน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
กรุงเทพมหานคร 10700

Email: chanwit.tri@mahidol.ac.th

คำนำ

บทความนี้ผู้เขียนขอแนะนำประสบการณ์ส่วนตัวมาใช้ในการเรียบเรียง ซึ่งเนื้อหาเป็นการศึกษาที่ผู้เขียนใช้ประสบการณ์ส่วนตัวมาเรียบเรียง เพื่อพยายามอธิบายความเป็นมาของการศึกษาเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทยซึ่งน่าจะมีสาระและเกร็ดความรู้แทรกอย่างง่าย ๆ พอให้เข้าใจถึงความเปลี่ยนแปลงของการศึกษาเชื้อดื้อยาในมุมมองของนักวิจัยที่ศึกษาทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล จึงไม่ได้รวมการศึกษาเรื่องเชื้อดื้อยาจากนักวิจัยท่านอื่นมารวมไว้ด้วย

จุดเริ่มต้น

การศึกษาปัญหาของเชื้อก่อโรคเริ่มต้นจากการศึกษาคุณสมบัติทางคุณสมบัติภายนอก (phenotype) ของเชื้อในการก่อโรค การทดสอบชนิดของเชื้อ ระดับของการดื้อยาต้านจุลชีพ และการประยุกต์ข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการรักษาผู้ป่วย เมื่อนำเทคโนโลยีทางพันธุกรรม (genotype) มาใช้ร่วมด้วย ก็ทำให้เกิดความเข้าใจถึงเหตุและผลของคุณสมบัติของเชื้อและการก่อโรคได้ดี แต่การศึกษาทางพันธุกรรมมีความยากลำบากหลายประเด็นทำให้การนำเทคนิคการศึกษาทางพันธุกรรมมาประยุกต์ใช้ยังมีข้อจำกัดอยู่มากในอดีต แต่ปัจจุบันนี้ การศึกษาผ่านเทคนิคที่เรียกว่า Next generation DNA sequencing (NGS) ทำให้เกิดศาสตร์ใหม่ เช่น Whole genome sequencing (WGS) หรือ Genome Wide Association Studies (GWAS) มาใช้วิเคราะห์โจทย์วิจัยทำให้ความรู้ที่ได้รับในขณะนี้ทำได้อย่างรวดเร็วและได้ข้อมูลมหาศาลหรือได้คำตอบจากการวิจัยที่ไม่สามารถทำได้โดยง่ายแบบนั้นมาก่อน ความรู้ในขณะนี้จึงเปรียบเสมือนมีจิ๊กซอว์ (Jigsaw) ขนาดเล็กครบจำนวนและสามารถนำมาประกอบภาพใหญ่ได้สมบูรณ์แล้ว อยู่ที่ใครมีโอกาส เวลา และงบประมาณที่จะเป็นผู้ที่อาสาจะนำเสนอผลการศึกษาแบบครบสมบูรณ์โดยการใช้ผลการศึกษาทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS)

เชื้อดื้อยาหลายขนานมีคุณสมบัติและความสามารถในการดื้อยาแต่ละชนิดในยากลุ่มเดียวกันได้ไม่เท่ากัน

ในช่วงปี พ.ศ. 2533-2534 ผู้เขียนเป็นนักศึกษาแพทย์ปีที่ 3 ในคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล พบปัญหาการเลือกยาต้านจุลชีพในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีสายสวนปัสสาวะแล้วมีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เชื้อที่พบบ่อยคือเชื้อ *Escherichia coli* และเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae (หรือ Enteric bacteria) โดยมีผลรายงานการเพาะเชื้อจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาภาควิชาจุลชีววิทยาของคณะแพทย์ศิริราช ว่าเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน เป็นต้นว่าคือ Cefazolin, Ceftotaxime แต่ไม่คือ ceftazidime และเชื้อคือ aminoglycoside เช่น Gentamicin แต่ไม่คือ Amikacin แต่ดื้อยาพื้นฐานอื่นๆ อีกหลายตัว รุ่นพี่ที่นำทีมรักษาผู้ป่วยก็จะเลือกใช้ยาที่เหลือในใบรายงานว่าตัวใดเชื้อยังไวอยู่ก็จะใช้ยานั้นๆ ในการรักษา ในใจผมมักจะถามตัวเองเสมอว่าทำไมเชื้อดื้อยาไม่เท่ากัน แม้ยาเหล่านั้นจะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

เชื้อสปิซิสเดียวกันที่เป็นสาเหตุการติดเชื้อในผู้ป่วยหลายรายในหอผู้ป่วยเดียวกันเป็นเชื้อตัวเดียวกัน (สายพันธุ์เดียวกัน) หรือไม่

ผู้ป่วยหลายๆ เคียงที่ติดเชื้อ *E. coli* ดื้อยาหลายขนาน ซึ่งในบางช่วงเวลามีผู้ป่วยมากกว่าสองสามรายในหอผู้ป่วยเดียวกัน เป็นไปได้หรือไม่ที่ผู้ป่วยทุกรายเกิดการติดเชื้อจากเชื้อตัวเดียวกัน (สายพันธุ์เดียวกัน) ในตอนนั้นไม่มีคำตอบชัดเจนใดๆ จากพี่ๆ หรือถ้ามีใครจะให้ข้อสันนิษฐานบ้าง ก็อาจจะบอกว่าน่าจะเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน แต่เราไม่สามารถพิสูจน์ได้

เชื้อหลายสปิซิสดื้อยาหลายขนานในช่วงเวลาเดียวกัน

ในตอนนั้นมีเชื้อหลายสปิซิส เช่น *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ดื้อยาหลายขนานในช่วงเวลาเดียวกัน ในตอนนั้นไม่ค่อยสงสัยเท่าใดนักว่าทำไมเชื้อดื้อยามากนัก เพราะคิดแต่ว่าโรงพยาบาลศิริราชรับผู้ป่วยหนักที่รักษาที่อื่นไม่หายเพราะติดเชื้อดื้อยา จึงถูกส่งต่อ (transfer) มารักษาที่ศิริราช ก็ต้องเหลือแต่เชื้อดื้อๆ ทั้งนั้น แต่ต่อมาถึงทราบว่ามีกระบวนการของยีนดื้อยาในโรงพยาบาลด้วย พบว่าเชื้อส่งต่อยีนดื้อยาด้านจุลชีพข้าม genus หรือข้าม species ได้ โดย Horizontal gene transfer สามวิธีการหลัก ได้แก่ Transformation, Conjugation และ Transduction

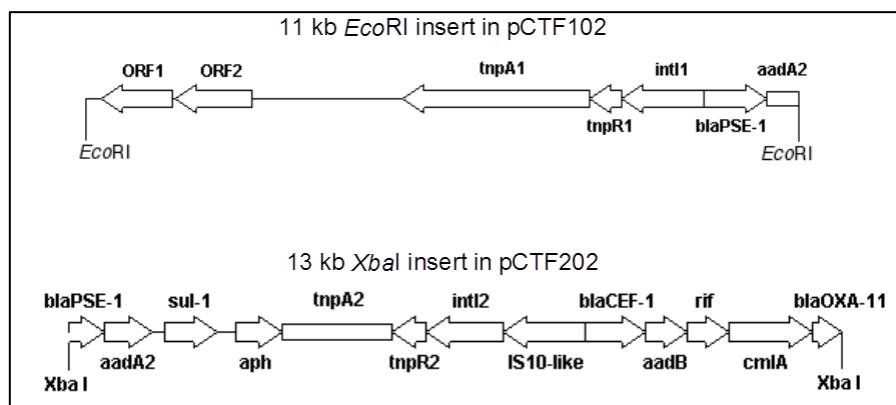
เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) มาที่ศิริราชแล้วในราวปี พ.ศ. 2534

ในช่วงที่ผู้เขียนเป็นนักศึกษาแพทย์ปีที่ 5 พบว่ามีผู้ป่วย 2 ราย ที่ติดเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ซึ่งถูกแยกโรคให้อยู่ในห้องแยกพิเศษของแผนกศัลยกรรมศาสตร์ ขณะนั้นมียาเพียงชนิดเดียวที่ใช้รักษาผู้ป่วยสองรายนี้ได้คือ Vancomycin ซึ่งมีราคาแพงกว่าทองคำเมื่อเทียบกับน้ำหนักกรัมต่อกรัม ใครติดเชื้อ MRSA นอกจากจะมีอัตราตายสูงแล้ว ยังต้องจ่ายค่ารักษาพยาบาลในราคาที่สูงมากด้วย ตอนนั้นไม่ได้เข้าไปตรวจผู้ป่วยเนื่องจากกลัวว่าจะติดเชื้อ แม้จะมีการป้องกันอย่างดีจากทีมควบคุมโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ใครต้องไปทำหัตถการกับผู้ป่วยสองรายนี้ ต้องสวมหน้ากาก สวมถุงมือ สวมเสื้อกาวน์ และเปลี่ยนรองเท้า เมื่อสัมผัสกับผู้ป่วยแล้วต้องถอดชุดทั้งหมดลงในตะกร้าพิเศษ แล้วล้างมือเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อที่อาจเกิดขึ้นได้

การไปศึกษาต่อที่ต่างประเทศทางด้านเชื้อดื้อยาที่ Rosalind Franklin University ประเทศสหรัฐอเมริกา

ในช่วงปีพ.ศ. 2538 หลังจากผู้เขียนเรียน coursework จบ ซึ่งใช้เวลา 2 ปี แต่ก็ได้เริ่มศึกษาเชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อยา ciprofloxacin ไปด้วย โดยเก็บเชื้อจากโรงพยาบาลทหารผ่านศึก (VA Medical Center, Illinois) มาศึกษาอยู่ประมาณ 1 ปีเต็ม ไม่สามารถติดต่อสารพันธุกรรมจากเชื้อดื้อยาไปใส่ในเชื้อ *E. coli* ที่เป็น laboratory strain ให้กลายเป็นเชื้อดื้อยาได้ เนื่องจากเชื้อที่นั่นไม่ค่อยดื้อยาด้านจุลชีพมากนัก จึงกลับมาเก็บเชื้อจากศิริราชไป 5 สายพันธุ์ ที่ดื้อยาหลายขนานในระดับสูง มาลองติดต่อสาย DNA ของเชื้อแล้วนำไปใส่ใน *E. coli* อีกครั้ง ในตอนนั้นพยายามหาไกลโคการดิอ ceftazidime ของเชื้อ *P. aeruginosa* เนื่องจากยา ceftazidime เป็นยาที่ถูกเรียกว่า Anti-pseudomonas drug แต่ทำไมเชื้อที่ศิริราชดื้อยาแล้ว ทำการติดต่อและย้ายสาย DNA จาก *Pseudomonas* ไป *E. coli* อยู่อีก 1 ปี จึงเริ่มพบว่ามียีนที่อยู่บน DNA ของ *Pseudomonas* ที่ทำให้เชื้อดื้อยา Ceftazidime ได้ แต่ในตอนนั้นต้องทำ DNA sequencing ด้วยเทคนิค dideoxy-dye-terminator และ Sanger sequencing technique ความจริงผู้เขียนเป็นนักศึกษาคนแรกของ Rosalind Franklin University ที่ศึกษา DNA sequence โดยไม่ได้ใช้ polyacrylamide gel ขนาดใหญ่ แต่ผู้เขียนส่ง plasmid DNA ไปที่ DNA sequencing facility ของ University of Illinois at Chicago โดยจ้างให้

ทำงานในราคา reaction ละ 40 US dollars ซึ่งต้องอธิบายให้ Major Advisor เชื่อกันว่ามีหน่วยงานที่รับทำ DNA sequencing จริงๆ ในราคาที่ถูกลงกว่าทำเอง ผู้เขียนใช้เวลาอีกประมาณ 1 ปี จึงทราบรหัสพันธุกรรมของ ยีนดื้อยา ceftazidime แต่ที่น่าประหลาดใจคือ ผู้เขียนพบว่ามียีนดื้อยาอีกหลายชนิดมาเรียงต่อกันจำนวนมาก โดยมี nucleotide sequence ที่คั่นระหว่าง open reading frame ของยีนดื้อยาต่างๆ ที่สั้นมาก ราวๆ 100-200 base pairs (bp) เท่านั้น ในช่วงของสาย DNA ที่ยาวรวม 23 kilobases (kb) มียีนดื้อยาอย่างน้อย 9 ชนิด บางชนิดมีมากกว่า 1 copy และพบว่าเชื้อ *Pseudomonas* 5 สายพันธุ์ที่นำไปศึกษาได้มีการใช้ยีนดื้อยาชนิดเดียวกัน ถึงแม้ว่าจะไม่ตรงกันทั้งหมด (รูปที่ 1) (Tribuddharat C และ Fennewald, 2002)



รูปที่ 1 Genetic map ของยีนดื้อยาที่พบในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ของรพ.ศิริราช ส่วนที่แสดงในภาพเป็น DNA sequence map ของ DNA inserts ที่ใส่เข้าไปใน cloning vector ได้เป็นพลาสมิด pCTF102 และ pCTF202 (cloned recombinant plasmids).

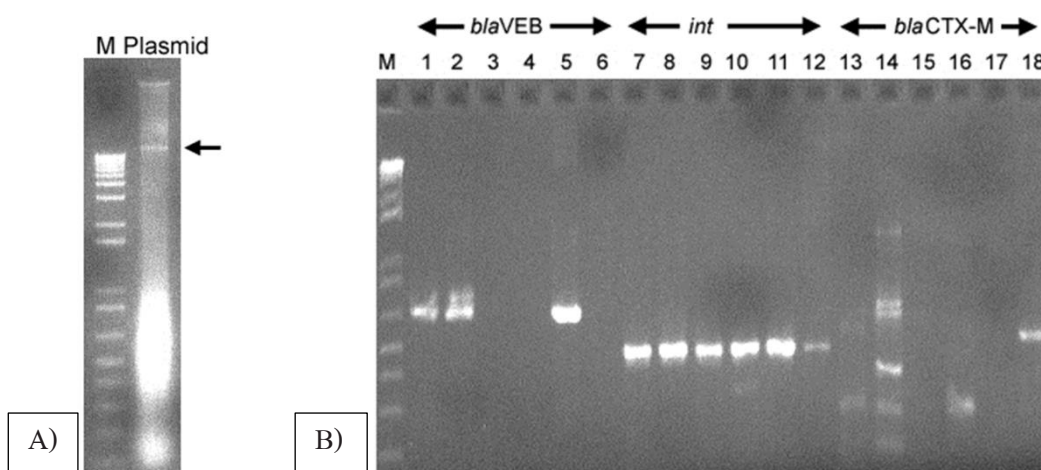
การถ่ายทอดยีนดื้อยาระหว่างเชื้อต่างสายพันธุ์ด้วยกระบวนการที่เรียกว่า Horizontal gene transfer

มีการทดลองที่สามารถถ่ายทอดคุณสมบัติการดื้อยาจากเชื้อสายพันธุ์หนึ่งไปสู่เชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ได้ ในตอนนั้นผู้เขียนได้ทำการทดลอง conjugation พบว่าเชื้อคนละ genus ก็ใช้ยีนดื้อยาสายพันธุ์เดียวกันได้ เชื้อสามารถแสดงออกของคุณสมบัติการดื้อยาได้โดยการเปลี่ยนแปลง Promoter ที่ควบคุม Transcription ให้เหมาะสมต่อการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ได้ ทำให้การรักษาผู้ป่วยไม่ได้ผลหรือให้ผลการรักษาที่ไม่แน่นอนได้ นอกจากนี้ผู้เขียนยังมียีนดื้อยาที่พบเชื้อก่อโรค *Vibrio cholerae* non-O1, non-139 ที่ผู้ป่วยได้รับจากการรับประทานอาหารที่จำหน่ายริมทางเดิน เมื่อเข้าไปอยู่ในร่างกายของผู้ป่วย เชื้อ *Vibrio* มีการรับ resistance gene element มาจากเชื้อชนิด *Aeromonas sobria* กลายเป็นเชื้อ *Vibrio* ที่คุณสมบัติดื้อยาด้านจุลชีพหลายขนานโดยพบยีน bla_{VEB-1} และ integron element ถูกถ่ายทอดจาก *Aeromonas sobria* ไปยัง *V. cholerae* ได้ภายในช่วงเวลาข้ามคืน จากกระบวนการ Conjugation (รูปที่ 2A และ 2B, unpublished data)

เมื่อเชื้อ MRSA เพิ่มจำนวนการติดเชื้อในโรงพยาบาลของผู้ป่วยจากผู้ป่วย 2 รายในปีพ.ศ. 2534 ไปเป็นมากกว่า 100 รายในปีพ.ศ. 2544

เมื่อผู้เขียนกลับมาปฏิบัติราชการในภาควิชาจุลชีววิทยาอีกครั้งในปี พ.ศ. 2544 พบว่าคณะวิจัยของภาควิชา นำโดยหัวหน้าภาควิชาในสมัยนั้น (รศ.นพ. เชิดศักดิ์ ธีระบุตร) ได้รับการสนับสนุนจาก China Medical Board ให้งบประมาณมาศึกษาเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิคการตรวจ Chromosome ของเชื้อ MRSA ที่เรียก Macro-restriction analysis with pulsed-field gel electrophoresis ที่นิยมเรียกย่อๆว่า การตรวจ

PFGE ก็มีข้อมูลที่เป็น genetic evidence ว่าเชื้อก่อโรค MRSA เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันและในผู้ป่วยบางรายเป็นเชื้อตัวเดียวกัน แต่ในขณะนั้นไม่ค่อยมีบุคลากรทางการแพทย์เข้าใจการแปลผลของ Genotyping เท่าใดนัก การออกนโยบายแยกผู้ป่วยเพื่อป้องกันปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรค ที่ดื้อยาหลายขนานจึงไม่ได้รับการยอมรับเท่าที่ควร เพราะไม่มีหลักฐานที่แน่นหนา และเป็นเรื่องยากต่อการทำความเข้าใจในหมู่บุคลากรที่ให้การรักษาผู้ป่วย รวมทั้งภาระงานที่มากเกินไป ความไม่พร้อมของสถานรักษาพยาบาลที่ต้องแยกผู้ป่วยไปอยู่ในห้องแยกโรคพิเศษ ซึ่งปัญหานี้เกิดกับสถานพยาบาลทุกแห่ง ดังเช่นการศึกษาการระบาดของเชื้อ MRSA ที่โรงพยาบาลในสังกัดกรุงเทพมหานครแห่งหนึ่ง (Jariyasethpong *et al.*, 2010)



รูปที่ 2 A) Plasmid extraction จากเชื้อ *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, ลูกศรแสดงตำแหน่งของ plasmid ที่พบในเชื้อตัวนี้ B) ผลการตรวจ PCR โดยการใช้ specific primers ต่อยีน *bla*_{VEB-1} (lane 1-6), integrase gene (*int*) (lane 7-12), และ *bla*_{CTX-M} (lane 13-18). Lane 1-2 และ 7-8 และ 13-14: *Aeromonas sobria*, lane 3-4 และ 9-10 และ 15-16: *Klebsiella pneumoniae*, lane 5: *bla*_{VEB-1} positive control, lane 6: negative control, lane 11: *int* positive control, lane 12: *int* negative control, lane 18: *bla*_{CTX-M} positive control.

สาเหตุหลักสองอย่างที่ทำให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาแพร่กระจายเกิดจากธรรมชาติของการส่งต่อยีนดื้อยาที่อาจจะสรุปง่ายๆ ได้ดังนี้ 1) เชื้อกลุ่ม Gram-negative bacteria เช่น *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., หรือ *Acinetobacter* spp. ที่เชื้อดื้อยาหลายขนานได้พร้อมๆ กันจากการ “Share” สารพันธุกรรมที่ทำให้เชื้อดื้อยา ผ่านทางกระบวนการ Horizontal gene transfer (ที่รวมการแพร่ระบาดของ mobile genetic elements เช่น Transposons (Tn), insertion sequence element (IS) และการแพร่ระบาดของ multi-drug resistance element ที่เรียกว่า Class 1 integron element รวมด้วย) หรือ 2) เชื้อกลุ่ม Gram-positive bacteria เช่น MRSA, เชื้อ MDR-TB และ Vancomycin resistant enterococci (VRE) ที่เชื้อดื้อยาที่แพร่กระจายในผู้ป่วยหลายรายเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน (Clonal expansion) และเป็นการแพร่กระจายยีนดื้อยาแบบ Vertical gene transfer

ปัญหาเกิดจากการยืนยันผลการศึกษาว่าเชื้อก่อโรคที่ดื้อยาเป็นเชื้อคนละสายพันธุ์แต่มีการแพร่ระบาดของ “ยีน” ดื้อยา ในหมู่แบคทีเรียหลายชนิด หรือเชื้อก่อโรคดื้อยาเป็นเชื้อตัวเดิมที่ก่อโรคติดเชื้อมากขึ้นในผู้ป่วยหลายราย ซึ่งหลักการแก้ไขปัญหานี้ต้องใช้ 1) ลดการใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อลด “selective pressure” จากการควบคุมให้มีการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างสมเหตุผล (Antibiotic stewardship) หรือ 2) การทำ “Infection control program” ให้ดีขึ้น เพื่อแก้ไขปัญหาการแพร่ระบาดของ “ยีนดื้อยา” หรือแก้ปัญหาระบาดของเชื้อตัวเดิมๆ จากความผิดพลาดในการควบคุมการแพร่กระจายของ “เชื้อก่อโรค” ตามลำดับ

การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคติดเชื้อมด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS)

การศึกษารหัสพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง Chromosome ในราวปีพ.ศ. 2542 เช่นการศึกษา “Whole genome sequencing” ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดย Sanger Institute ที่ประเทศอังกฤษ ใช้งบประมาณราว 150 ล้านบาท ใช้เวลาราว 1 ปี ในการทำ sequencing ซึ่งขณะนั้นเริ่มเป็นยุคที่เรียก “Genomics era” แล้ว เพราะ Human Genome Project เสร็จลงแล้ว มีหลายสถาบันหันความสนใจมาทำ “Whole genome sequencing” ในแบคทีเรียแทน การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อในขณะนั้นแม้จะมีราคาแพงมาก แต่ผลการศึกษาที่ได้รับสามารถตอบคำถามวิจัยได้อย่างชัดเจน ทำให้มีความพยายามที่จะพัฒนาการทำ High throughput DNA sequencing ในราคาประหยัดในเวลาต่อมา เกิดเป็นเทคนิคที่เรียก Next generation DNA sequencing (NGS) ซึ่งการทำ DNA sequencing แบบเดิมด้วยเทคนิคที่เรียก Sanger sequencing ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและมีการพัฒนามานานร่วม 30 ปี ดูเหมือนว่าจะหมดยุคของการใช้เทคนิคนี้แล้ว

NGS เริ่มต้นมีการใช้อย่างแพร่หลายในราวปี พ.ศ. 2549 จากสามบริษัทที่เป็นผู้นำได้แก่ Roche Diagnostics (454 technology), Illumina (Solexa), และ Applied Biosystems (SOLiD) และต่อมาอีกหลายเทคโนโลยีจากอีกหลายบริษัทค่อยๆ พัฒนาและนำเครื่องมือออกมาจำหน่าย บางบริษัทถูกซื้อไป บางบริษัทล้มหายไป แต่การใช้เทคโนโลยีใหม่นี้ทำให้การศึกษา DNA sequence ทำได้ยาวมากขึ้น ได้ตั้งแต่ 50 ล้านเบส ไปจนถึง 3,000 ล้านเบสต่อการเดินเครื่อง 1 ครั้ง สามารถสร้างข้อมูลเพื่อตอบคำถามทางชีววิทยาได้มากมาย ครอบคลุม และลึกซึ้งอย่างไม่เคยมีมาก่อน ทำให้การศึกษาเรื่องเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพและการศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อและยีนดื้อยามีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก

การตรวจทางระบาดวิทยาด้วยการใช้ Next generation DNA sequencing

การศึกษาทางระบาดวิทยาในปัจจุบันเริ่มนำเทคนิคการแยกสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคเป็นแบบ DNA sequence-based typing คือนำสาย DNA มาดูลำดับเบสโดยตรง ถ้า sequence เหมือนกัน แสดงว่าเป็นเชื้อตัวเดียวกัน ซึ่งมีวิธีการตรวจหลายแบบ แต่ที่นิยมมากและจัดได้ว่าเป็นมาตรฐานการตรวจแยกสายพันธุ์ได้แก่วิธีที่เรียก Multi-locus sequence typing (MLST) ซึ่งจะตรวจลำดับเบสของ housekeeping gene (เป็น essential gene ด้วย) จำนวน 6-8 ยีน แล้วแต่ว่า standard set ของเชื้อสปีชีสนั้นๆมีจำนวนเท่าใด โดยทั่วไปมักใช้ 7 ยีน ผลการตรวจจะได้เป็น allele type ของยีนแต่ละตัวของ 7 ยีนนั้น ได้เป็น allele number มาเรียงต่อกัน เรียกเป็น allelic profile และมักจะมีกลุ่มนักวิจัยเจ้าของการออกแบบ standard set ของยีน 7 ยีนนั้นทำหน้าที่รวบรวมข้อมูลและแสดงผลการตัดสินใจการแยกเชื้อ ให้เป็น sequence type (ST) หมายเลขอะไร ของเชื้อที่นำมาทดสอบ ยกตัวอย่างเช่น allelic profile ของเชื้อ *Salmonella enterica* ที่แยกได้จากเนื้อไก่สดในตลาดของไทย (Chaisatit et al., 2012) มี allelic profile ของยีน 7 ยีน *thrA-purE-sucA-aroC-hisD-hemD-dnaN* เป็น 141-95-9-417-262-15-4 ซึ่งผู้รับผิดชอบของ database ของ *Salmonella* Homepage/server ตั้งให้เป็น ST1543 และพบว่าเชื้อ ST1543 เคยตรวจพบมาก่อนในผู้ป่วยชาวเวียดนาม โดยที่การตรวจชนิดของ Allele ของ 7 ยีนนั้นจะพบตรงกันโดยบังเอิญ (by chance) นั้นเป็นไปได้ ทำให้เราสามารถสรุปได้ว่าการแพร่ระบาดของเชื้อสายพันธุ์นี้เกิดขึ้นในสองประเทศ น่าจะมีการสืบสวนทางระบาดวิทยาเพิ่มเติมว่าเชื้อสามารถแพร่กระจายไปได้อย่างไร

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการระบาดของเชื้อในชุมชนที่การแพร่กระจายเป็นในลักษณะของการระบาดข้ามประเทศได้ จากลักษณะการติดเชื้อของเชื้อที่ก่อโรค sexually transmitted disease (STD) เช่นการศึกษาการระบาดของเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ในประเทศไทยและพบว่า “Sexual network” ของกลุ่มผู้ป่วยซึ่งติดเชื้อร่วมกัน (Nakayama et al., 2012) การศึกษานี้ใช้งบประมาณของประเทศญี่ปุ่น ซึ่งการศึกษานี้มีค่าใช้จ่ายสูงมากจากการทำ MLST ของเชื้อ 96 สายพันธุ์ การตรวจยีน 7 ยีน มีราคาราว 5,000-10,000 บาทต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ทำให้งานการตรวจ MLST เป็นงานที่มีค่าใช้จ่ายสูงและต้องทำงานหนักมาก

กว่าจะได้ผลการตรวจ การใช้ Next generation DNA sequencing มาใช้ในการตรวจแบบ high throughput จึงทำได้ในปริมาณมากในราคาที่ใช้จ่ายที่ลดลงได้เหลือประมาณ 1 ใน 10 ของวิธีดั้งเดิม ดังนั้น HiMLST ที่ถูกออกแบบมาเพื่อใช้กับเครื่องมือที่ตรวจ DNA sequence แบบ high throughput แบบ next generation DNA Sequencing จึงน่าจะมีบทบาทในการสอบสวนการระบาดมากขึ้นในอนาคต ไม่ว่าเชื้อก่อโรคจะเป็นเชื้อในกลุ่มใด ผลการศึกษาที่ได้จะสามารถทำให้ผู้วิจัยเข้าใจกลไกการเกิดโรคและการแพร่ระบาด ซึ่งน่าจะนำไปสู่การแก้ปัญหาที่ถูกจุดและได้ผล

REFERENCES

- Tribuddharat C, Fennewald M. Resistance genes in multiply resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Siriraj Hospital. Siriraj Hospital Gazette. 2002 June; 54 (6): 319-329.
- Jariyasethpong T, Tribuddharat C, Dejsirilert S, Kerdsin A, Tishyadhigama P, Rahule S, Sawanpanyalert P, Yosapol P, Aswapokee N. MRSA carriage in a tertiary governmental hospital in Thailand: emphasis on prevalence and molecular epidemiology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Aug;29(8):977-85.
- Chaisatit C, Tribuddharat C, Pulsrikarn C, Dejsirilert S. Molecular characterization of antibiotic-resistant bacteria in contaminated chicken meat sold at supermarkets in Bangkok, Thailand. Jpn J Infect Dis. 2012;65(6):527-34.
- Nakayama S, Tribuddharat C, Prombhul S, Shimuta K, Srifuengfung S, Unemo M, Ohnishi M. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. Antimicrob Agents Chemother. 2012, 56(2):916-920.