ประสิทธิผลในการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม ด้วยวิธี MALDI-TOF MS

ปริชาติ บุญรอด ทพ.ม.
โรงพยาบาลเลิดสิน ถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร 10500

Abstract : Effective of MALDI-TOF MS for Gram Positive Cocci Bacteria Identification

Boonrod P
Lerdsin Hospital, Silom Rd., Khet Bang Rak, Bangkok, 10500
(E-mail: parichat.br@gmail.com)

The identification of the bacteria in the clinical diagnostic laboratory is important for patient management and antimicrobial therapy. Currently, conventional methods of bacterial identification rely on culture and biochemical methods. Although, this method is quite sensitive and inexpensive, there are some limitation including many steps of workflow and time-consuming process. Moreover, the conventional method requires skill and experience, as the accuracy depends on the specialty of staffs. Therefore, the development of rapid and reliable bacteria identification method is crucial to saving the lives of patients. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) device has revolutionized the routine identification of microorganisms in clinical microbiology laboratories by introducing an easy, rapid, high-throughput, low-cost, and efficient identification technique. The aim of this study prospectively analyzes MALDI-TOF MS technique compared with conventional method. Two hundred and twenty isolates of Gram-positive cocci bacteria colonies were isolated from clinical specimens and further analyzed. In this study, accuracy, time consuming and cost of identification were recorded and found that 90-100% correctly identification at the species level of Gram-positive cocci bacteria strain by MALDI-TOF MS technique which used only 2-3 minutes per sample. The results reveal that mass spectrometry technique is the accurate identification of clinical gram-positive cocci bacteria. Moreover, other advantages are reduced cost about 16 times, waste, and labor consuming. MALDI-TOF MS technique has the potential to be optimized and to replace conventional method with routine bacterial analysis.

Keywords: Gram positive cocci bacteria identification, Mass spectrometry

บทคัดย่อ

การจำแนกชนิดแบคทีเรียมีความสำคัญช่วยให้แพทย์ทราบชนิดของเชื้อก่อโรค สามารถใช้ยาได้ตรงกับชนิดเชื้อ ทำให้การรักษามีประสิทธิภาพ ป้องกันเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพและลดอัตราการตาย ปัจจุบันวิธีการจำแนกชนิดแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน แต่มีข้อจำกัดคือต้องปฏิบัติงานหลายขั้นตอนและใช้เวลานาน ความน่าเชื่อถือขึ้นอยู่กับทักษะและประสบการณ์ของผู้ทดสอบ การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ทันสมัย น่าเชื่อถือ ใช้เวลาในการทดสอบน้อย จึงสามารถทราบชนิดของเชื้อได้อย่างรวดเร็ว เหมาะที่จะนำมาใช้ทดแทนวิธีการแบบเดิม แต่มีข้อจำกัดคือเครื่องมือราคาสูง งานศึกษานี้ต้องการหาประสิทธิผลของการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี MALDI-TOF MS ในกลุ่มแบคทีเรียที่ติดสี แกรมบวกรูปร่างกลม จำนวนเชื้อ 220 รายควบคู่ไปกับการทดสอบด้วยวิธีเดิม พบว่าเครื่อง MALDI-TOF MS มีความถูกต้องในการรายงานผลการวิเคราะห์จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมร้อยละ 90-100 และมีประสิทธิภาพดีกว่าการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี ใช้เวลาน้อยเพียง 2 - 3 นาทีต่อตัวอย่าง ลดภาระงานและลดค่าใช้จ่ายน้ำยาและสารเคมีลงถึง 16 เท่า จึงเป็นเทคโนโลยีที่เหมาะจะนำมาใช้วินิจฉัยชนิดเชื้อแบคทีเรียในงานประจำวันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์ให้ถูกต้อง แม่นยำและลดระยะเวลาการรอคอยผล

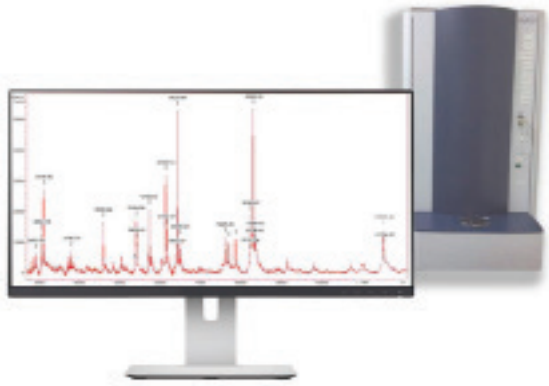
คำสำคัญ : การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม แมสสเปกโตรเมตรี

บทนำ

ปัจจุบันสถานการณ์โรคติดเชื้อมีความรุนแรง อัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิตจากการติดเชื้อสูง โดยเฉพาะเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพที่เป็นปัญหาสำคัญของสาธารณสุขทั่วโลก ผลการวินิจฉัยชนิดเชื้อที่ถูกต้องรวดเร็วจะช่วยให้แพทย์เลือกใช้ยาได้เหมาะสมกับเชื้อ ทำให้การรักษามีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาส่วนใหญ่ของโรงพยาบาลในประเทศไทยใช้วิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยลักษณะทาง phenotype เช่น ลักษณะรูปร่าง ขนาดของโคโลนี ความสามารถของการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การติดสีและลักษณะรูปร่าง การเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี ซึ่งมีความยุ่งยาก ความถูกต้องขึ้นอยู่กับทักษะและประสบการณ์ของผู้ทดสอบ[1] ปัจจุบันจึงมีการนำเทคโนโลยีและเครื่องมือสมัยใหม่มาใช้ทดแทนวิธีเดิม เพื่อได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น ลดความยุ่งยากในการปฏิบัติงาน ระยะเวลาในการทดสอบ ทำให้แพทย์สามารถนำผลไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยได้เร็วขึ้น

เครื่อง Mass Spectrometer มีใช้ครั้งแรกในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม เมื่อปี 1940 และพัฒนานำมาใช้อย่างกว้างขวางในงานอื่นๆ ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ[2] และนำมาใช้ประโยชน์หลากหลายในงานจุลชีววิทยา เช่น การตรวจวินิจฉัยทางคลินิก ตรวจเชื้อแบคทีเรียจากน้ำและอาหาร และเชื้อจากสิ่งแวดล้อม และพัฒนาจนปัจจุบันสามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้ [3-4] และเมื่อปี 2013 MALDI Biotyper CA System (Bruker) ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration : FDA) ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจจากมนุษย์[3]

เครื่อง Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS) ใช้การตรวจชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน ตัวอย่างเชื้อจะผสมหรือเคลือบด้วยสารประกอบออร์แกนิก “เมตทริกซ์ (matrix)” ที่ช่วยดูดซับพลังงานเมื่อถูกยิงด้วยเลเซอร์จะแตกตัวเป็นโปรตอน เคลื่อนที่ในท่อสุญญากาศ ความเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับขนาด มวลต่อประจุ (m/z) โดย m คือ มวลของสารและ z คือประจุบวกของไอออน โดยที่มวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่ามวลโมเลกุลใหญ่ ระยะเวลาที่ไอออนเดินทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงตำแหน่งตรวจจับ เรียกว่า time of flight จะถูกคำนวณเป็นน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละเปปไทด์ (m/z) เครื่องจะนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ และรูปแบบของ m/z peak ที่เรียงตัวกันเป็น peptide mass fingerprint (PMF) (รูปที่ 1) การจำแนกชนิดเชื้อจะใช้ลักษณะ PMF เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล[3-4]



รูปที่ 1 ลักษณะกราฟมวลต่อประจุ (m/z) ของเชื้อ staphylococcus aureus เมื่อยิงเลเซอร์แล้วเกิดการแตกตัวของโปรตีน

งานศึกษาในต่างประเทศมีการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่อง MALDI-TOF MS ทั้งในกลุ่มแบคทีเรียติดสีแกรมบวก แกรมลบและยีสต์ แต่ในประเทศไทย เนื่องจากเครื่องยังมีใช้ไม่แพร่หลาย จึงยังไม่มีงานวิจัยมากนัก อีกทั้งข้อมูลจากงานวิจัยในต่างประเทศอาจเป็นเชื้อคนละสายพันธุ์กับที่ก่อโรคในไทย งานวิจัยนี้จึงทดสอบหาประสิทธิผลของเครื่องโดยใช้เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลเพื่อเป็นข้อมูลที่ใช้งานจริงในประเทศ ทดสอบเปรียบเทียบผล ระยะเวลา และค่าใช้จ่ายเปรียบเทียบกับวิธีการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

วัตถุและวิธีการ

เชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ย้อมติดสีแกรมบวกรูปร่างกลมที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในงานประจำวัน จำนวน 220 ราย นำมา subculture บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 5% sheep blood agar (Columbia agar base: oxiod) อบที่อุณหภูมิ 35-37°C 18-24 ชั่วโมง ทดสอบจำแนกชนิดเชื้อด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS และทดสอบทางชีวเคมีพร้อมกัน เก็บข้อมูลผลการวิเคราะห์จำแนกชนิดเชื้อ ค่าใช้จ่ายและระยะเวลาการทดสอบ เปรียบเทียบ 2 วิธี กรณีที่ผลการวิเคราะห์ไม่ตรงกันจะตรวจซ้ำด้วยวิธีอื่นคือเครื่อง Vitex2

การทดสอบด้วยวิธี Conventional

ลักษณะโคโลนีที่สนใจจะถูกย้อมสีแกรม เลือกโคโลนีที่มีผลการย้อมแกรมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม ทดสอบต่อด้วยน้ำยา catalase และชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี สำหรับเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. และกลุ่ม *Enterococcus* spp.[5] น้ำยา และชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี สำหรับกลุ่ม *Staphylococcus* spp. Coagulase, Urease, Nitrate, Ornithine Dehydrogenase, Trehalose, Mannitol, แผ่นยา Novobiocin, แผ่นยา Polymyxin B, ชุดทดสอบ PYR น้ำยา และชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี สำหรับกลุ่ม *Streptococcus* spp. ชุดทดสอบ PYR, Hippurate hydrolysis, น้ำยา VP, Trehalose, Sorbitol, Esculin, Arginine Dihydrolase, Mannitol, เชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 สำหรับการทดสอบ CAMP test น้ำยา และชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี สำหรับกลุ่ม *Enterococcus* spp. Mannitol, Sorbose, Arginine Dihydrolase, Arabinose, Sorbitol, Raffinose, Sucrose, 0.04% tellulite, Motile medium

การทดสอบด้วยวิธี MALDI-TOF Mass Spectrometry

เขี่ยเชื้อป้ายลงบนถาด MALDI target plate หยดน้ำยา α-cyano-4-hydroxycinnamic acid ใน 50% acetonitrile/2.5% trifluoro-acetic acid (HCCA) 1 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งอีกครั้ง ปรับเทียบความถูกต้องของเครื่อง Microflex LT (Bruker) ด้วยสารมาตรฐาน *Escherichia coli* strain DH5alpha ที่ ribosomal proteins มีมวลโปรตีนของ RNAs และ myoglobin ที่ตำแหน่ง 5098 *m/z*, 5381 *m/z*, 6255 *m/z*, 7274 *m/z*, 10300 *m/z*, 13683 *m/z* และ 16952 *m/z*. ควบคุมคุณภาพการทดสอบโดยใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 และ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 เครื่องจะนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ และรูปแบบของ m/z peak ที่เรียงตัวกันเป็น peptide mass fingerprint (PMF) เปรียบเทียบแมสสเปกตรัมกับฐานข้อมูล (Bruker database version 3.0) ความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบจะรายงานเป็นคะแนน โดยคะแนนมากกว่าหรือเท่ากับ 2.0 ขึ้นไป มีความน่าเชื่อถือระดับสปีชีส์ คะแนนตั้งแต่ 1.7 ขึ้นไปแต่น้อยกว่า 2.0 มีความน่าเชื่อถือระดับจีนัส แต่ถ้าน้อยกว่า 1.7 ไม่สามารถรายงานผลได้

ใช้สถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมของวิธี MALDI-TOF กับวิธีดั้งเดิม แสดงเปรียบเทียบความถูกต้องในระดับสปีชีส์ ของการรายงานผลเป็นจำนวนร้อยละ ความแตกต่างของความสามารถในการวิเคราะห์ผลของวิธี MALDI-TOF MS กับวิธีดั้งเดิม ใช้สถิติ Fisher’s Exact Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05การศึกษานี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนโรงพยาบาลเลิดสิน

ผล

จากการทดสอบจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกรูปร่างกลมที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจในงาน เช่น เลือด เสมหะ ปัสสาวะ หนอง เป็นต้น จำนวนเชื้อ 220 ราย แบ่งเป็น

Staphyloccus aureus 60 ราย
Staphylococus coagulase negative 80 ราย
Staphyloccus hominis 24 ราย
Staphyloccus haemolyticus 22 ราย
Staphyloccus epidermidis 24 ราย
Staphyloccus lugdunensis 10 ราย
beta hemolysis *Streptococi* 30 ราย
Streptococcus agalactiae 10 ราย
Streptococcus dysgalactiae 5 ราย
Streptococcus anginosus 5 ราย
Streptococcus pyogenes 10 ราย
Viridans *Streptococci* 10 ราย
Streptococcus suis 4 ราย
Streptococcus salivarius 6 ราย
Enterococcus spp. 40 ราย
Enterococcus faecalis 20 ราย
Enterococcus faecium 15 ราย
Enterococcus avium 3 ราย
Enterococcus gallinarum 2 ราย

เปรียบเทียบความสามารถในการจำแนกชนิดเชื้อที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF MS กับวิธีดั้งเดิม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความสามารถของวิธี MALDI-TOF MS และวิธี conventional ในการจำแนกชนิดเชื้อแยกตามชนิด

	MALDI-TOF MS		Conventional method	
	ไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้	**รายงานผลผิด**	**ไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้**	**รายงานผลผิด**
Staphylococcus spp. (n=140 isolates)				
Staphyloccus aureus (n=60)	1	0	0	2
Staphyloccus hominis (n=24)	0	0	1	0
Staphyloccus haemolyticus (n=22)	0	1	0	0
Staphyloccus epidermidis (n=24)	0	0	0	0
Staphyloccus lugdunensis (n=10)	0	0	0	0
Beta hemolytic Streptococci (n=30 isolates)				
Streptococus agalactiae (n=10)	0	2	0	2*
Streptococus dysgalactiae (n=5)	0	0	0	0
Streptococus anginosus (n=5)	0	0	0	0
Streptococus pyogenes (n=10)	0	0	0	0
Viridans Streptococci (n=10 isolates)				
Streptococcus suis (n=4)	0	0	4	0
Streptococus salivarius (n=6)	0	1	6	0
Enterococci spp. (n=40 isolates)				
Enterococcus faecalis (n=20)	0	0	0	0
Enterococcus faecium (n=15)	0	0	0	0
Enterococcus avium (n=3)	0	0	0	0
Enterococcus gallinarum (n=2)	0	0	2	0

หมายเหตุ* การทบสอบ camp test ให้ผลบวกไม่ชัดเจน
ผลการทดสอบด้วย 2 วิธีตรงกันถือว่าถูกต้อง หากไม่ตรงกันจะใช้เครื่อง Vitex 2 ทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันผล

กลุ่ม *Staphyloccus* spp. ทั้งหมด 140 ราย ผลการจำแนกชนิดเชื้อด้วยวิธี MALDI-TOF MS ถูกต้องตรงกับวิธีดั้งเดิมซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน 138 ราย (คิดเป็นร้อยละ 98.6) ไม่สามารถวิเคราะห์ผลเชื้อ *S. aureus* ได้ 1 ราย และวิเคราะห์ชนิดเชื้อ *S. haemolyticus* ผิด 1 ราย โดยแปลผลเป็น *Staphyloccus warneri* ส่วนวิธีดั้งเดิมสามารถแยกชนิดได้และถูกต้อง 137 ราย (คิดเป็นร้อยละ 97.8) มีการแปลผลการทดสอบ coagulase (ดูการแข็งตัวของพลาสม่าในหลอดทดลอง) ของเชื้อ *S. aureus* ผิด 2 ราย เนื่องจากก้อนพลาสม่าที่แข็งตัวละลายก่อนอ่านผล และไม่สามารถวิเคราะห์ชนิดเชื้อ *S. hominis* 1 ราย

กลุ่ม beta hemolytic *Streptococci* ทดสอบจำแนกเชื้อ 30 ราย ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF MS ถูกต้อง 28 ราย (คิดเป็นร้อยละ 93.3) โดยรายงาน *S. agalactiae* ผิดเป็น *S. dysgalactiae* 2 ราย ส่วนการทดสอบด้วยวิธีดั้งเดิมที่ใช้ผล CAMP test ในการจำแนกเชื้อ *S. agalactiae* ให้ผลการทดสอบไม่ชัดเจน 2 ราย กลุ่ม *Viridans Streptococci* ทดสอบ 10 ราย วิธี MALDI-TOF MS รายงานผลเชื้อ *S. salivarius* ผิดเป็น *S. vestibular* 1 ราย (คิดเป็นร้อยละ 90) ส่วนการวินิจฉัยเชื้อด้วยชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีสามารถจำแนกชนิดเชื้อได้แค่ระดับ genus คือระบุได้ว่าเป็นเชื้อกลุ่ม *Viridans Streptococci* ไม่สามารถระชนิดเชื้อในระดับสปีชีส์ได้

กลุ่ม *Enterococci* spp. การจำแนกชนิดเชื้อด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ถูกต้องทั้งหมดทั้ง 40 ราย (คิดเป็นร้อยละ 100) ส่วน *Enterococcus gallinarum* ไม่สามารถวิเคราะห์ชนิดได้ด้วยชุดทดสอบที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ (ขาด methyl-α-D-glucopyranoside, MGP)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความถูกต้องในระดับสปีชีส์ของการรายงานผลของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ

ชนิดเชื้อ	ความถูกต้องในการรายงานผลในระดับสปีชีส์ (%)	
	MALDI-TOF MA	conventional
Staphylococcus spp. (n=140)	139 (98.6)	137 (97.8)
Beta hemolysis *Streptococcus* spp. (n=30)	28 (93.3)	28 (93.3)
Viridans *Streptococcus* spp. (n=10)	9 (90)	0 *
Enterococcus spp. (n=20)	20 (100)	38 (95)

* หมายเหตุ ไม่สามารถรายงานผลในระดับสปีชีส์ ได้แต่ความถูกต้องในการวิเคราะห์ผลระดับจีนัส = 100 %

ความถูกต้องในการรายงานผลการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกรูปร่างกลมคิดเป็นร้อยละ เปรียบเทียบ 2 วิธี (ตารางที่ 2) วิธี MALDI-TOF MS มีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดเชื้อสูงถึงร้อยละ 90.0-100.0 ผลทางสถิติด้วย Fisher's Exact Test พบว่าความสามารถในการวิเคราะห์ชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมของทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกัน (p = 0.386)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบระยะเวลา ค่าใช้จ่าย และทักษะเจ้าหน้าที่ที่ต้องใช้ในการทดสอบจำแนกชนิดเชื้อ

Method	ระยะเวลารอผล/ราย	ค่าใช้จ่าย/ราย (บาท)	ความต้องการ ทักษะในการปฏิบัติงาน
Conventional			
Gram stain	5-10 นาที	10	ปานกลาง
Biochem	24-48 ชั่วโมง	120	ปานกลาง-สูง
MALDI-TOF	3 นาที	8*	ปานกลาง

หมายเหตุ * เป็นราคาที่ไม่รวมค่าตัวเครื่องและค่าบำรุงรักษา

ค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์แยกชนิดเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 3) พบว่าวิธีทดสอบโดยเครื่อง MALDI-TOF มีราคาถูกกว่าการทดสอบด้วยวิธีดั้งเดิมมากถึง 16 เท่า แต่ทั้งนี้ราคาที่แสดงเป็นราคาของน้ำยาที่ใช้ในการตรวจเท่านั้น ยังไม่รวมค่าตัวเครื่องและค่าบำรุงรักษาซึ่งมีราคาสูงมาก แต่เนื่องจากราคาดังกล่าวมีความแตกต่างกันตามโปรแกรมการบำรุงรักษาและอะไหล่จึงไม่ได้นำมาคำนวณด้วย

วิจารณ์

MALDI-TOF MS มีประสิทธิผลในการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมสูง สามารถวินิจฉัยเชื้อได้อย่างถูกต้องรวดเร็ว ใช้เวลาน้อย สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ในหลายประเทศ[6] และเมื่อทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีการจำแนกชนิดเชื้อด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมีหรือเทียบกับเครื่องอัตโนมัติที่ใช้หลักการการทดสอบอื่นๆ ต่างรายงานผลว่าเครื่องอัตโนมัติ MALDI-TOF MS มีประสิทธิภาพที่ดีกว่า[7-11] จากงานศึกษานี้ความสามารถในการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียติดสีแกรมบวกรูปร่างกลมมีความถูกต้องร้อยละ 90.0-100.0 โดยเฉพาะกลุ่ม *Staphylococcus* spp. และ *Enterococcus* spp. แสดงถึงประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดเชื้อที่ดีเยี่ยม มีความถูกต้องสูงถึงร้อยละ 97.0-98.0 ในกลุ่ม *Staphylococcus* sp. และร้อยละ 100.0 ในกลุ่ม *Enterococcus* spp. ส่วนในกลุ่ม Beta hemolysis *Streptococci* ทั้ง 2 วิธีมีประสิทธิภาพเท่ากันสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ เช่น Van[12] ที่เปรียบเทียบการจำแนกชนิดเชื้อด้วย MALDI-TOF MS กับวิธี biochemistry test เช่นเดียวกัน พบว่าเชื้อกลุ่มแกรมบวกส่วนใหญ่การทดสอบด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS มีความถูกต้องมากกว่า ยกเว้นเชื้อกลุ่มแกรมบวกที่มีการเรียงตัวแบบเป็นสาย ความผิดพลาดในการวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม beta hemolysis *Streptococci* เกิดจาก *S. agalactiae* และ *S. dysgalactiae* มีความใกล้เคียงกันของโปรตีน ซึ่งเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งของวิธีแมสสเปกโตรเมตรีที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ เช่น

เชื้อ Viridans *Streptocci* บางตัว กับ *S. pneumoniae* ที่ต้องอาศัยการทดสอบอื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อแยกเชื้อ[13] อย่างไรก็ตามความถูกต้องในการวิเคราะห์ผลสามารถเพิ่มขึ้นได้หากเพิ่มขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์โดยสกัดด้วยกรด formic acid หรือ ethanol formic ที่ช่วยเพิ่มความถูกต้องในระดับ species ให้มากขึ้นกว่าการใช้ตัวอย่างจากโคโลนีโดยตรง[7,14] สามารถนำมาเป็นแนวทางในการพัฒนาเพิ่มความถูกต้องในการรายงานผล ซึ่งในอนาคตอาจพิจารณาเพิ่มขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยกรด formic acid เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรายงานผล นอกจากนี้ MALDI-TOF MS ยังลดต้นทุนในการวิเคราะห์ชนิดเชื้อ สอดคล้องกับการศึกษาของ Gaillot[15] ที่รายงานว่าการเปลี่ยนวิธีวิเคราะห์ชนิดเชื้อเป็น MALDI-TOF MS ช่วยลดต้นทุนและปริมาณขยะ

สรุป

การใช้ MALDI-TOF MS วิเคราะห์แยกชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว ไม่สิ้นเปลือง ราคาถูก ใช้เวลาน้อยกว่าวิธีดั้งเดิม รวมถึงความต้องการทักษะในการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ในระดับปานกลาง ทำให้ไม่มีปัญหาเรื่องบุคลากร ดังนั้นการใช้ MALDI-TOF MS ซึ่งเป็นเทคโนโลยีสมัยใหม่มีข้อดีทำให้ห้องปฏิบัติการรายงานผลวิเคราะห์ชนิดเชื้อได้เร็วขึ้น แพทย์ทราบชนิดของเชื้อก่อโรคสามารถใช้ยาได้ตรงกับชนิดเชื้อ ทำให้การรักษามีประสิทธิภาพ ลดอัตราการตาย นอกจากนี้ยังช่วยลดปริมาณขยะติดเชื้อ ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการทำลายขยะได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามในประเทศไทยเครื่องนี้มีใช้ในงานประจำไม่มากนักเนื่องจากราคาแพง การบำรุงรักษาและแก้ไขเวลาเครื่องมีปัญหาต้องเป็นช่างเฉพาะจากบริษัทเท่านั้น เป็นข้อจำกัดที่สำคัญในการพิจารณานำมาใช้ทดแทนวิธีเดิม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณไพบูลย์ รัตนชัยพรพันธ์ หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลเลิดสิน ที่ให้คำปรึกษา แนวคิดและช่วยตรวจแก้ไขในส่วนที่บกพร่องต่างๆ ดร.อมรมาศ จรัสรุ่งทวี สำหรับข้อมูลเครื่อง Microflex (Bruker) คำปรึกษา และช่วยตรวจสอบการเขียน Abstract คุณอภิวัฒน์ พรศิริวัฒนากุล และเจ้าหน้าที่งานจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลเลิดสิน ทุกท่านที่ช่วยสนับสนุนจนการศึกษาสามารถดำเนินการได้จนแล้วเสร็จ

References

1. Sousa AM, Pereira MO. A prospect of current microbial diagnosis methods. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. 2013; 3: 1429-38.
2. มาลัย สถิรพันธุ์. มวลโมเลกุลจากสเปกตรัมมวล. วารสารไทยไภษัชยนิพนธ์ 2556; 8: 66-80.
3. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front Microbiol 2015; 6: 791.
4. Dingle T C, Butler-Wu S M. MALDI-TOF mass spectrometry for micro organism identification. Clin Lab Med 2013; 3: 589-609.
5. พิทักษ์สันตินิรันดร์. Update identification of Medically important Aerobic Gram positive bacteria. Identification of Gram positive bacteria; 27-29 กรกฎาคม 2558; คณะแพทย์ศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี.
6. Seng P, Abat C, Rolain JM, Colson P, Lagier JC, Gouriet F, et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of MALDI-TOF mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2013; 1: 2182-94.
7. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2010; 48: 1549-54.
8. Cherkaoui A, Emonet S, Fernandez J, Schorderet D, Schrenzel J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid identification of beta-hemolytic streptococci. J Clin Microbiol 2011; 49:3004-5.
9. Davies AP, Reid M, Hadfield SJ, Johnston S, Mikhail J, Harris LG, et al. Identification of clinical isolates of α-hemolytic streptococci by 16S rRNA gene sequencing, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry using MALDI Biotyper, and conventional phenotypic methods: a comparison. J Clin Microbiol 2012; 50(12): 4087-90.
10. Bessede E, Angla-Gre M, Delagarde Y, Sep Hieng S, Ménard A, Mégraud F. Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a University hospital. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 533-8.
11. Sogawa K, Watanabe M, Sato K, Segawa S, Ishii C, Miyabe A, Murata S, Saito T, Nomura F. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. Anal Bioanal Chem 2011; 400: 1905-11.
12. van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol 2010; 48: 900-7.
13. Murray PR. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. J Mol Diagn 2012; 14: 419-23.
14. Schulthess B, Brodner K, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. J Clin Microbiol 2013; 51: 1834-40.
15. Gaillot O, Blondiaux N, Loïez C, Wallet F, Lemaître N, Herwegh S, Courcol RJ. Cost-effectiveness of switch to matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine bacterial identification. J Clin Microbiol 2011; 49: 4412.