นิพนธ์ต้นฉบับ **Original Article**

Comparison of protein extraction methods for Mycobacterium tuberculosis detection by MALDI-TOF Mass Spectrometry

Suparerk Komolsiri[*]
Korawit Juprasertporn[*]
Chollnant Khattiyawech[***]
Krairerk Suthum[**]
Seksun Samosornsuk[***]
Worada Samosornsuk[***]

[*] Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani Province, Thailand

[**] Office of Disease Prevention and Control Region 5 Ratchaburi, Department of Disease Control

[***] Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani Province, Thailand

Received: March 23, 2023 | **Revised**: June 07, 2024 | **Accepted**: February 23, 2024

Abstract

Tuberculosis is a respiratory disease caused by Mycobacterium tuberculosis, which is a major contagious disease and a public health concern. Accurate and rapid diagnosis will help to reduce the spread of tuberculosis infection. Currently, MALDI-TOF MS technique is used to identify bacteria and fungi including *M. tuberculosis* due to its high sensitivity and specificity and low diagnostic cost per case. However, the mycobacterial cell wall is composed of thick lipid that makes it difficult to extract proteins for identification by this technique. Therefore, a new protein extraction method for *M. tuberculosis* is developed by ultrasonic (SM) to speed up cell wall rupture resulting in protein extraction time reduction when comparing with routine methods (RM). Five isolates of *M. tuberculosis* strain H37Ra ATCC 25177 and 32 clinical isolates of *M. tuberculosis* confirmed were cultured on LJ medium for 3 - 4 weeks prior to protein extraction by RM and SM methods followed by identification using MALDI-TOF MS. The result of protein extraction by the RM and the SM of 37 isolates presented the highly probable species identification (log score $\geq$ 2.000) as 72.97% and 75.67%, respectively and probable genus identification (log score 1.700-1.999) as 27.03% and 24.33%, respectively. The ability of the SM and RM methods to identify up to the species level were not significantly different (p = 0.544, 95%CI = -0.112-0.208). In conclusion, the protein extraction of *M. tuberculosis* by SM method can be used instead of RM method. Moreover, the new method also reduces the sample preparation time at least 38 minutes per sample.

Correspondence: Worada Samosornsuk E-mail: sworada@hotmail.com

การเปรียบเทียบวิธีการสกัดโปรตีนเพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry

ศุภฤกษ์ โกมลศิริ*
กรวิชญ์ จูประเสริฐพร*
ชลนันท์ ขัตติยเวช***
ไกรฤกษ์ สุธรรม**
เสกสรรค์ สโมสรสุข***
วรดา สโมสรสุข***
*บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี
**สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี กรมควบคุมโรค
***ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี
วันรับ: 23 มีนาคม 2566 | **วันแก้ไข**: 07 มิถุนายน 2566 | **วันตอบรับ** : 23 กุมภาพันธ์ 2567

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่สำคัญและเป็นปัญหาสาธารณสุข การวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคที่ถูกต้องและรวดเร็ว จะช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรค ปัจจุบันเทคนิค MALDI_TOF MS ถูกนำมาใช้ในการแยกพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรียและรา รวมทั้งเชื้อวัณโรค เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง และค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยต่อรายต่ำ อย่างไรก็ตาม ผนังเซลล์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียประกอบด้วยไขมันที่หนา ทำให้ยากต่อการสกัดโปรตีนเพื่อนำไปแยกพิสูจน์ชนิดของเชื้อด้วยเทคนิคนี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคด้วยการใช้อัลตร้าโซนิคมาช่วยทำให้ผนังเซลล์แตกได้เร็วขึ้น ช่วยลดเวลาการสกัดโปรตีนลงเปรียบเทียบกับวิธีสกัดโปรตีนที่ใช้ในงานประจำ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน H37Ra ATCC 25177 จำนวน 5 ไอโซเลท และเชื้อวัณโรคจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผู้ป่วย ลงบนอาหาร LJ เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ก่อนนำไปสกัดโปรตีนด้วย วิธีที่ใช้ในงานประจำ (RM) และใช้เครื่องอัลตร้าโซนิค (SM) และทำการแยกพิสูจน์เชื้อด้วยเทคนิค MALDI_TOF MS ผลการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคทั้ง 37 ไอโซเลท ด้วยวิธี RM และ SM พบว่าเชื้อสามารถแยกได้ถึงระดับสปีชีส์ (log score $\geq$ 2.000) เท่ากับ ร้อยละ 72.97 และ 75.67 ตามลำดับ และ แยกได้ถึงระดับจีนัส (log score 1.700-1.999) เท่ากับ ร้อยละ 27.03 และ 24.33 ตามลำดับ ความสามารถของวิธี SM และ RM ในการแยกได้ถึงระดับสปีชีส์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ (p = 0.544, 95%CI = -0.112-0.208) สรุปได้ว่าผลการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี SM สามารถใช้แทนวิธี RM ได้ นอกจากนี้วิธีใหม่ยังช่วยลดเวลาในการเตรียมตัวอย่าง เมื่อเทียบกับวิธีใช้ในงานประจำอย่างน้อย 38 นาทีต่อตัวอย่าง

ติดต่อผู้นิพนธ์: วรดา สโมสรสุข อีเมล์: sworada@hotmail.com

Keywords	**คำสำคัญ**
Mycobacterium Tuberculosis	เชื้อวัณโรค
MALDI-TOF MS	มัลดิทอฟ
Protein Extraction	มะเร็ง

บทนำ

วัณโรคเป็นโรคระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นปัญหาของสาธารณสุขในประเทศไทย องค์การอนามัยโลกได้จัดให้ประเทศไทยเป็น 1 ใน 30 ประเทศของโลกที่มีปัญหาผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรคและวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี[1] จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อถือเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) โดยการเพาะเชื้อสามารถเพาะเชื้อบนอาหารแข็งเช่น Ogawa และ Lowenstein-Jensen (LJ) media ใช้เวลานาน 4-8 สัปดาห์ หรือการเพาะเชื้อในอาหารเหลว modified Middlebrook 7H9 broth เช่น BACTEC™ MGIT™ 960 System ใช้เวลาประมาณ 2-6 สัปดาห์ ซึ่งวิธีนี้ใช้เวลานาน ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคที่รุนแรงออกสู่ชุมชน จึงนำวิธีทางอณูชีววิทยามาใช้ในงานประจำ เพื่อลดเวลาตรวจหาเชื้อวัณโรคทางห้องปฏิบัติการแพทย์ ให้ทราบผลการตรวจวิเคราะห์ได้เร็วขึ้น และเลือกวิธีรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดโอกาสการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานไปสู่ชุมชน อย่างไรก็ตามเทคนิคทางอณูชีววิทยา มีค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยต่อรายสูง ต้องใช้บุคลากรที่ผ่านการฝึกอบรมมาเฉพาะในการตรวจวิเคราะห์และแปลผล เกิดขยะจากอุปกรณ์มาก ปัจจุบันได้นำเทคนิค MALDI-TOF MS มาตรวจวินิจฉัยเชื้อจุลชีพในงานประจำทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์กันอย่างกว้างขวาง ทำให้ตรวจวินิจฉัยเชื้อจุลชีพได้ถูกต้อง รวดเร็ว โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา[2,7] ราคาค่าตรวจไม่แพง แม้ว่าราคาในตอนแรกที่วางเครื่องและอุปกรณ์ต่าง ๆ จะมีราคาสูง แต่ราคาการตรวจวินิจฉัยเชื้อต่อรายต่ำกว่าวิธีทางอณูชีววิทยาอื่น ๆ[3] เช่น การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction; PCR) หรือการหาลำดับเบส ประโยชน์ของเทคนิค Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS) คือใช้ปริมาณเซลล์น้อย แค่ใช้บางส่วนของโคโลนีมาเสมียร์บนเพลท เตรียมสารละลายเมทริกซ์ทิ้งไว้ให้แห้ง และใส่เข้าเครื่อง mass spectrometer วัดมวลต่อประจุของโปรตีนหรือไขมันของเชื้อที่ต้องการ เทคนิคนี้วิเคราะห์ไอออนที่มีประจุทีละอัน เมื่อวัดมวลต่อประจุแล้วจะถูกนำไปเทียบกับฐานข้อมูลมวลต่อประจุที่ทราบแล้วในโปรแกรม ดังนั้นจุลชีพที่ไม่รู้จักจะถูกจำแนกได้ในระดับแฟมมิลี่ จีนัสและสปีชีส์ แต่สำหรับการตรวจหาเชื้อวัณโรคหรือเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย ต้องผ่านขบวนการสกัดโปรตีนซึ่งเป็นความยุ่งยากและอุปสรรคที่สำคัญก่อนตรวจด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS[4] เนื่องจากเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียมีผนังเซลล์ส่วนใหญ่เป็นไขมัน ต้องทำลายผนังเซลล์ของเชื้อเพื่อนำโปรตีนในไซโตพลาสซึมของเชื้อออกมาตรวจ การสกัดโปรตีนของเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียมีหลายวิธี เช่นการสกัดโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐานที่นิยมใช้ในการงานประจำเรียกว่าวิธี Routine method (RM)[4-6] หรือการศึกษาของ Pastrone L. และคณะในปี พ.ศ.2566 เรียกว่าวิธี MycoEX[7] ซึ่งการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อไม่ดีส่งผลให้ประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ลดลง[4] หรือการศึกษาของ Melendhran Pillay และ

คณะ ในปีพ.ศ. 2565[8] ได้ใช้ chloroform และ methanol ในการกำจัดไขมัน และแยกโปรตีนของเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียออกมา ก่อนตรวจด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS นอกจากนั้นการเตรียมตัวอย่างเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียวิธีนี้ทำให้เสียเวลา และเปลืองแรงงานมาก[5] โดยการสกัดโปรตีนมีหลายขั้นตอน[6] เริ่มจากต้มโคโลนีของเชื้อในน้ำปราศจากเชื้อในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตก นำมาตำด้วย plastic micropestle เติม 70% เอทานอล ปั่นล้าง ดูด 70% เอทานอลออก เปิดฝาหลอดและรอเอทานอลระเหย เป็นเวลา 15 นาที ต่อมาเติมเม็ดแก้ว และ 70% formic acid นำไปปั่นผสม (vortex) นาน 10 นาที เติม 100% acetonitrile นำไป vortex นาน 10 นาที ซึ่ง 1 รายจะใช้เวลาในการสกัดโปรตีนประมาณ 2 ชั่วโมง จึงมีการศึกษาหลายการศึกษาที่จะลดเวลาการสกัดโปรตีนของเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย ซึ่งวิธีที่นิยมใช้คือนำโคโลนีของเชื้อใส่ในหลอด microTUBES™ ที่บรรจุเม็ดแก้วขนาด 0.5 มิลลิเมตรและสารเคมี 70% formic acid และ 100% acetonitrile ร่วมกับเครื่องอัลตร้าโซนิคที่เรียกว่า Adaptive Focused Acoustics™ (AFA) ซึ่งใช้คลื่นความถี่สูงเพื่อทำลายผนังเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว[4,5,8] แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือการนำเชื้อมาทดสอบโดยที่ยังไม่ได้ฆ่าเชื้อด้วยการต้มก่อน อาจจะไม่เหมาะที่จะใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติทางการแพทย์ ที่เป็นห้องปฏิบัติการทางชีวภาพระดับ 2 และเครื่องอัลตร้าโซนิคชนิด AFA มีราคาสูง จากการศึกษาของสุวัชรีพร โรจน์ชีวพันธ์ และคณะในปี พ.ศ.2562[6] พบว่าการเติมสารเคมี 70% formic acid และ 100% acetonitrile ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นาน 5 นาที สามารถฆ่าเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียได้ โดยไม่ต้องฆ่าเชื้อด้วยการต้ม ในงานวิจัยของ Lisa Pastrone และคณะในปี พ.ศ.2566[7] ได้นำเอาวิธีสกัดโปรตีนโดยใช้ชุดตรวจ MBT Mycobacteria Kit ที่ใช้สารเคมีแทนเครื่องอัลตร้าโซนิค บ่มเชื้อในชุดตรวจนี้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที และเติม 70% formic acid และ 100% acetonitrile ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที นำไปหยดลง MALDI plate ใช้เวลาสกัดโปรตีนนาน 40 นาที งานวิจัยที่กล่าวมามีการพัฒนาวิธีการสกัดโปรตีนของเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย เพื่อลดระยะเวลาการสกัดให้เหมาะสมกับงานประจำมากขึ้น การศึกษาของ David Rodriguez-Temporal และคณะ ปีพ.ศ.2565[9] ได้ส่งเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียให้กับ 15 ห้องปฏิบัติการใน 9 ประเทศแถบยุโรป เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียด้วยวิธี MALDI-TOF MS ซึ่งผลที่ออกมาคือสามารถวินิจฉัยเชื้อได้ในระดับจีนัสและสปีชีส์จำนวน 8 ห้องปฏิบัติการและวินิจฉัยเชื้อได้ระดับจีนัสจำนวน 4 ห้องปฏิบัติการได้ครบทุกตัวอย่าง โดยข้อแตกต่างของแต่ละห้องปฏิบัติการอยู่ที่วิธีการสกัดโปรตีน มีทั้งห้องปฏิบัติการที่เลือกใช้วิธีการสกัดโปรตีนที่ใช้ในงานประจำ (RM) และเลือกใช้การสกัดโปรตีนด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิคชนิด AFA รวมทั้งยังขึ้นกับทักษะของเจ้าหน้าที่ที่สกัดโปรตีน และการปรับปรุงฐานข้อมูลมวลโปรตีนต่อประจุของเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียในโปรแกรมตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นการศึกษานี้จะเลือกจุดเด่นของวิธีสกัดโปรตีนที่ปลอดภัย เร็ว ประหยัดแรงงาน โดยยังคงขั้นตอนการฆ่าเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยความร้อนไว้ และลดขั้นตอนการสกัดโปรตีนด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิคที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการที่ใช้ probe จุ่มลงในหลอดตัวอย่าง ราคาเครื่องอัลตร้าโซนิคไม่สูงมาก แทนการปั่นผสมด้วยเม็ดแก้วขนาด 0.5 มิลลิเมตร และสารเคมี 70% formic acid และ 100% acetonitrile ที่ใช้เวลานาน ขอเรียกว่าวิธี Sonication method (SM) โดยสามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อ

กลุ่มมัยโคแบคทีเรียได้ในระดับจีนัสและ/หรือสปีชีส์ ได้ ซึ่งดูได้จากการนำมวลโปรตีนต่อประจุที่ตรวจในแต่ละวิธีเทียบกับข้อมูลมวลต่อประจุที่ทราบจากฐานข้อมูลของโปรแกรมแปลผล หาความเข้ากันได้มากที่สุด แปลผลออกมาเป็นค่า logarithmic (log) score โดยค่า log scores ≥ 2.000 แปลว่าสามารถตรวจวินิจฉัยได้ในระดับจีนัสและสปีชีส์ ถ้า log scores อยู่ระหว่าง 1.700 ถึง 1.999 ตรวจวินิจฉัยได้ในระดับจีนัสและค่า scores <1.700 การตรวจวินิจฉัยไม่น่าเชื่อถือ[10] ดังนั้นการศึกษานี้เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดโปรตีนจากเชื้อวัณโรคสำหรับการตรวจพิสูจน์และแยกชนิดชองเชื้อวัณโรคด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ที่สามารถลดเวลาในการสกัดโปรตีน และยังคงให้ประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคที่ไม่แตกต่างกับวิธีสกัดโปรตีนจากเชื้อวัณโรคที่ใช้ในงานประจำ

วัสดุและวิธีการศึกษา

การวิจัยเชิงทดลองทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory research) โดยศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดโปรตีน 2 วิธีด้วยตัวอย่างเดียวกัน เป็นตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจยืนยันเชื้อ วัณโรคด้วยวิธี real-time PCR และเก็บในตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2562 ถึง เดือนกันยายน 2563 โดยการสุ่มเลือกตัวอย่างแบบไม่ซ้ำจำนวน 32 ตัวอย่าง ที่ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี ซึ่งได้ขออนุญาตใช้ตัวอย่างที่เหลือจากผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี รวมทั้งจดแจ้งการครอบครองเชื้อกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และขอจริยธรรมวิจัยกับมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ในการศึกษานี้ ซึ่งไม่ได้ขอเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยเพิ่มเติม ร่วมกับตัวอย่างเชื้อ วัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน H37Ra ATCC 25177 ที่ subculture จากสายพันธุ์นี้จำนวน 5 หลอดทดลองจากห้องปฏิบัติการของคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รวมทั้งสิ้นจำนวน 37 ตัวอย่าง โดยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและฆ่าเชื้อวัณโรคจะทำในห้องปฏิบัติการความดันลบที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย เพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน H37Ra ATCC 25177 จำนวน 5 ตัวอย่าง และเชื้อวัณโรคที่เพาะแยกจากสิ่งส่งตรวจที่เหลือจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เป็นงานประจำ จำนวน 32 ตัวอย่าง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ Medium เป็นเวลา 3- 4 สัปดาห์ นำโคโลนีของเชื้อวัณโรคที่เพาะเลี้ยงได้มาสกัดโปรตีนด้วยวิธีที่ใช้ในงานประจำ (Routine Method, RM) และวิธีใช้เครื่องอัลตร้าโซนิค (Sonication Method, SM) โดยวิธีการสกัดของทั้ง 2 วิธีมีรายละเอียดดังนี้

การสกัดโปรตีนด้วยวิธี RM ดัดแปลงจากวิธีของสุวัชรีพร โรจน์ชีวพันธ์ และคณะ[6] ใช้ zirconia/silica beads ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร แทนวิธีดั้งเดิม โดยเขี่ยโคโลนีเชื้อวัณโรค 1 loop ขนาด 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที ปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสที่เหลือออก เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำการฆ่าเชื้อใช้ plastic micropestle ตำเชื้อภายในหลอดให้เข้ากัน ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที ปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดของเหลวทิ้งให้หมด เติม 70% เอทานอล ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 1 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000

rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสที่เหลือออกให้หมด เปิดฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติมเม็ดแก้วขนาด 0.5 มิลลิเมตร ลงไปประมาณ 6-10 เม็ด เติม 70% Formic acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 1 นาที พัก 1 นาที นับเป็น 1 รอบทำซ้ำอีก 9 รอบ เพื่อป้องกันการเกิดความร้อนสูง ที่สามารถทำลายโปรตีนที่ได้จากการสกัด จากนั้นเติม 100% acetonitrile ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 1 นาที พัก 1 นาที นับเป็น 1 รอบทำซ้ำอีก 9 รอบ ปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

การสกัดโปรตีนด้วยวิธี SM เริ่มจากใช้ loop ขนาด 10 ไมโครลิตร เขี่ยโคโลนีมาเต็ม 1 loop ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที ปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสที่เหลือออก เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำการฆ่าเชื้อใช้ plastic micropestle ตำเชื้อภายในหลอดให้เข้ากัน ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที ปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดของเหลวทิ้งให้หมด เติม 70% เอทานอล ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 1 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสที่เหลือออกให้หมด เปิดฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 15 นาที เติม 70% Formic Acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 1 นาที นำไปทำ Ultrasonication โดยวางหลอดทดลองบนน้ำแข็งในขณะที่ใช้เครื่อง Ultrasonic เป็นเวลา 1 นาที เติม 100% acetonitrile ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 1 นาที

นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธีหยดลงบน MALDI plate หลุมละ 1 ไมโครลิตร จำนวน 4 หลุม ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติม α-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid (HCCA) matrix ลงบน MALDI plate หลุมละ 1 ไมโครลิตร เมื่อตัวอย่างแห้ง นำ MALDI plate เข้าเครื่อง MALDI-TOF instrument (Autoflex II, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) และหยดตัวควบคุม Bruker bacterial test standard (BTS) (Bruker Daltonics, Germany) มีมวลโปรตีนในช่วง 3.6 ถึง 17 กิโลดาลตัน หลุมละ 1 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลุม เพื่อใช้ calibration ก่อนการทดสอบทุกครั้ง เปิดโปรแกรม FlexControl™ ในการยิงเลเซอร์ ตั้งค่า positive linear mode เก็บค่ามวลต่อประจุ mass/charge (m/z) ratio ในช่วง 2000-20,000 ดาลตัน และ เร่งโวลต์ที่ 20 กิโลโวลต์ จะได้มวลโปรตีนต่อประจุของตัวอย่างทดสอบและถูกนำไปเทียบกับข้อมูลมวลโปรตีนต่อประจุที่รู้แล้ว เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียได้ในระดับจีนัสและสปีชีส์

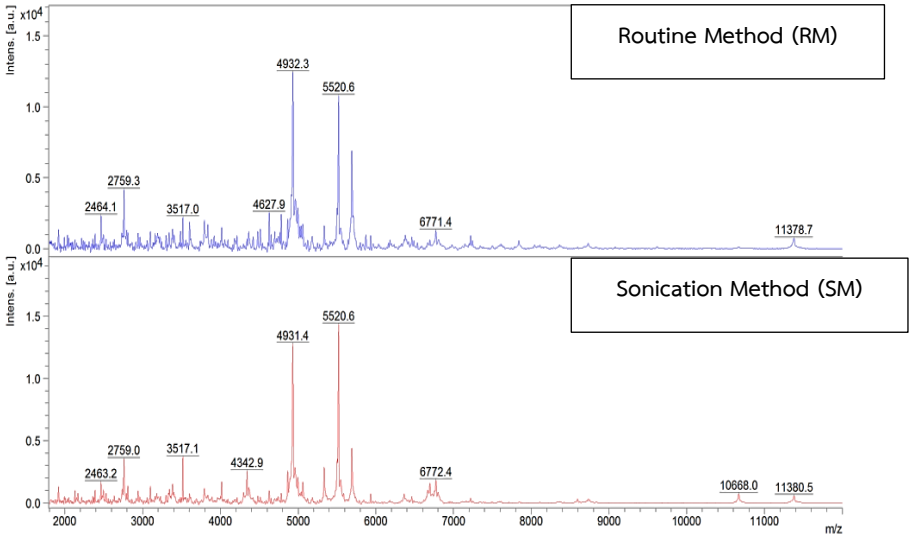
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) แต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 4 ครั้งและนำค่ามวลโปตีนต่อประจุที่ตรวจวัดได้แต่ละค่า มาเทียบกับฐานข้อมูลมวลโปรตีนต่อประจุที่ทราบแล้ว รายงานออกมาเป็นเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียในระดับจีนัสและ สปีชีส์ ร่วมกับค่า log score ด้วยโปรแกรม MBT compass library version 10 (2020) มีฐานข้อมูลมวลต่อประจุของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 9,607 ค่า นำมวลโปรตีนต่อประจุที่ตรวจในแต่ละวิธีเทียบกับข้อมูลมวลต่อประจุที่ทราบจากฐานข้อมูลของโปรแกรมแปลผล หาความเข้ากันได้มากที่สุดแปลผลออกมาเป็นค่า logarithmic (log) score โดยค่า log scores $\geq$ 2.000 แปลว่าสามารถตรวจวินิจฉัยได้ในระดับจีนัสและ สปีชีส์ ถ้า log scores อยู่ระหว่าง 1.700 ถึง 1.999 ตรวจ

วินิจฉัยได้ในระดับจีนัส และค่า scores <1.700 การตรวจวินิจฉัยไม่น่าเชื่อถือ และนำค่า log score ที่ได้จากวิธี RM และ SM มาเปรียบเทียบกันด้วยวิธีทางสถิติ independent sample T test

ผลการศึกษา

การเปรียบเทียบวิธีการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคระหว่างวิธีที่ใช้ในงานประจำ (RM) และวิธีใช้เครื่อง อัลตร้าโซนิค (SM) เมื่อนำโปรตีนของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ H37Ra ATCC 25177 ที่สกัดโดยวิธี RM และ SM ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จะพบรูปแบบมวลโปรตีนดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งเป็นตัวอย่างรูปแบบมวลโปรตีนต่อประจุของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ H37Ra ATCC 25177 จำนวน 1 ตัวอย่างจากทั้งหมด 5 ตัวอย่างที่สกัดโปรตีนด้วยวิธี RM เทียบกับวิธี SM เมื่อนำไปหาค่า log score ด้วยโปรแกรม MBT compass library version 10 (2020) ตัวอย่างนี้ให้ค่า log score ด้วยวิธี RM และ SM เท่ากับ 2.450 และ 2.420 ตามลำดับ ผล log score $\geq$ 2.000 แปลผลได้ในระดับจีนัสและสปีชีส์ว่าเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Ra ATCC 25177 ทั้ง 2 วิธี ทดสอบอีก 4 ตัวอย่าง ค่า log score ที่ได้แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งทั้ง 5 ตัวอย่างให้ผล log score $\geq$ 2.000 แปลผลได้ในระดับจีนัสและสปีชีส์ว่าเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Ra ATCC 25177 ทั้ง 2 วิธี

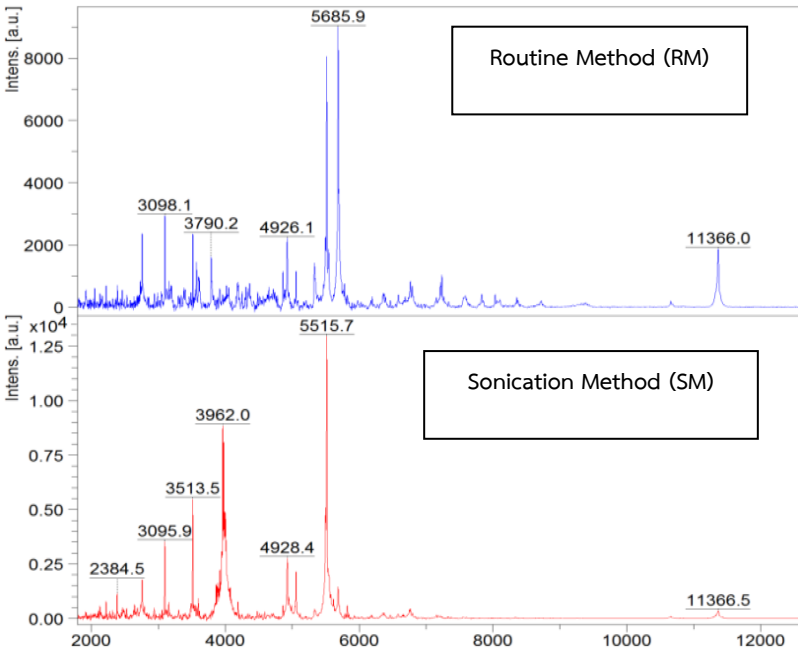
ภาพที่ 1 ตัวอย่างมวลโปรตีนต่อประจุของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน H37Ra ATCC 25177 วิธีที่ใช้ในงานประจำ (RM) และใช้เครื่องอัลตร้าโซนิค (SM)



ตัวอย่างเชื้อวัณโรคที่เหลือจากการส่งตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาที่ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี จำนวน 32 ตัวอย่าง มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ Medium เป็นเวลา 3- 4 สัปดาห์ นำโคโลนีของเชื้อวัณโรคที่เพาะได้มาสกัดโปรตีนด้วยวิธี RM และ SM ตัวอย่างรูปแบบมวลโปรตีนต่อประจุที่ได้แสดงดังภาพที่ 2 รูปแบบมวลโปรตีนต่อประจุของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยวิธี RM เทียบวิธี SM จาก 1 ตัวอย่าง โดยเมื่อนำไปหาค่า log score ด้วยโปรแกรม MBT compass explorer, library version 4.1 (2020)

ให้ค่า log score ด้วยวิธี RM และ SM เท่ากับ 2.170 และ 2.130 ตามลำดับ ให้ผล log score ≥ 2.000 แปลผลได้ในระดับจีนัสและสปีชีส์ว่าเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้ง 2 วิธี เมื่อตรวจตัวอย่างเชื้อวัณโรคเพิ่มอีก 31 ตัวอย่างค่า log score ที่ได้แสดงในตารางที่ 2

ภาพที่ 2 ตัวอย่างมวลโปรตีนต่อประจุของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยวิธี RM เทียบกับวิธี SM



ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย log score ของเชื้อวัณโรคที่ทำซ้ำตัวอย่างละ 4 หลุมทดสอบ จำนวน 37 ตัวอย่าง โดยวิธี RM เทียบกับวิธี SM

ตัวอย่างเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจ	ค่าเฉลี่ย log score	
	วิธี RM	วิธี SM
1	2.450(2.410-2.490)	2.420(2.380-2.470)
2	2.490(2.450-2.550)	2.360(2.280-2.420)
3	2.540(2.490-2.600)	2.420(2.370-2.460)
4	2.440(2.400-2.480)	2.340(2.280-2.400)
5	2.420(2.350-2.510)	2.360(2.250-2.490)
6	2.130(2.090-2.180)	2.070(2.030-2.110)
7	2.230(2.170-2.290)	2.290(2.190-2.320)
8	2.180(2.120-2.250)	2.140(2.370-2.470)
9	2.250(2.180-2.320)	2.250(2.140-2.360)
10	2.330(2.170-2.460)	2.230(2.130-2.330)

ตัวอย่างเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจ	ค่าเฉลี่ย log score	
	วิธี RM	วิธี RM
11	2.180(2.100-2.300)	2.060(2.000-2.140)
12	2.000(1.850-2.120)	1.850(1.760-1.970)
13	2.270(2.190-2.320)	2.120(2.080-2.160)
14	2.240(2.130-2.410)	1.970(1.840-2.200)
15	1.860(1.750-1.970)	2.080(2.010-2.140)
16	2.120(1.950-2.280)	1.940(1.790-2.120)
17	2.120(1.930-2.320)	2.130(1.850-2.350)
18	2.270(2.090-2.250)	1.960(1.790-2.240)
19	1.830(1.710-1.940)	1.870(1.760-1.970)
20	1.910(1.790-2.070)	2.040(1.890-2.210)
21	2.030(1.940-2.110)	2.340(2.250-2.460)
22	2.170(2.100-2.270)	2.130(1.910-2.390)
23	1.950(1.800-2.110)	2.080(1.890-2.310)
24	2.200(2.120-2.340)	1.720(1.700-1.740)
25	2.020(1.920-2.140)	2.190(1.980-2.370)
26	2.150(1.940-2.310)	2.290(2.130-2.440)
27	1.830(1.750-1.980)	2.010(1.900-2.170)
28	1.980(1.830-2.160)	1.820(1.730-1.950)
29	2.270(2.060-2.430)	2.190(1.960-2.390)
30	2.200(2.010-2.400)	1.840(1.770-1.970)
31	1.790(1.730-1.870)	2.070(1.880-2.310)
32	2.030(1.950-2.170)	2.130(1.920-2.410)
33	2.170(2.060-2.280)	2.020(1.800-2.300)
34	2.040(1.830-2.250)	2.070(1.970-2.150)
35	1.980(1.820-2.160)	1.770(1.710-1.860)
36	1.730(1.700-1.770)	2.030(1.890-2.240)
37	1.920(1.760-2.160)	2.290(2.070-2.450)

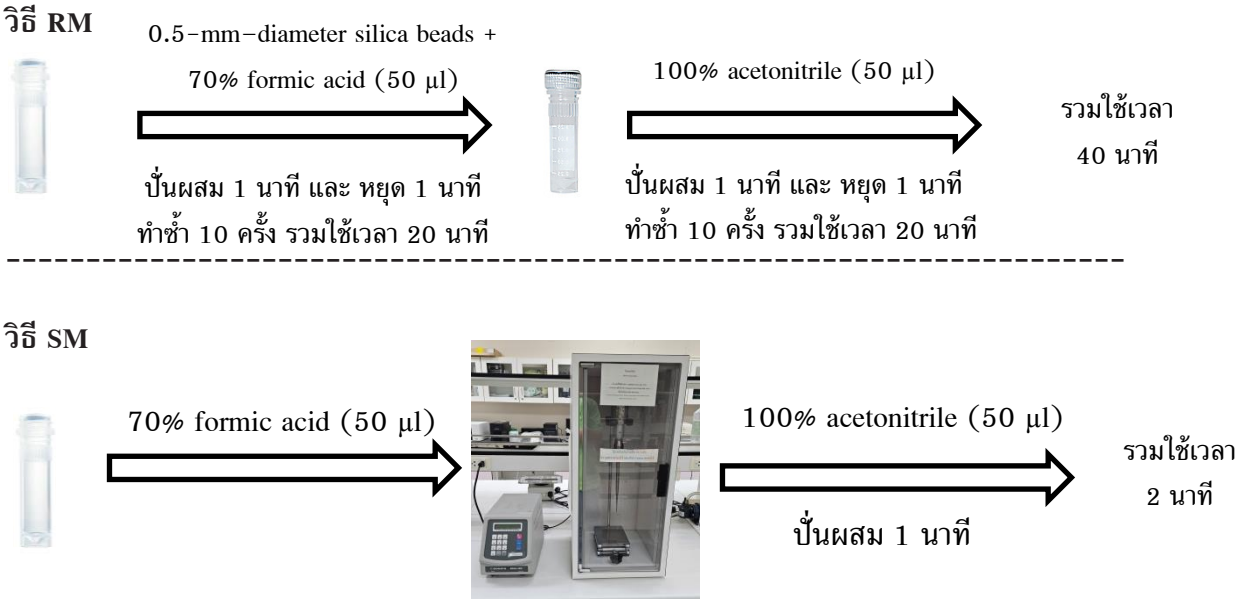
โดยสรุปให้ผล log score $\geq$ 2.000 แปลผลได้ในระดับจีนัสและสปีซีส์ว่าเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยวิธี RM และ SM จำนวน 27 และ 28 ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 72.97 และ 75.67 ตามลำดับ และให้ผล log score ในช่วง 1.700-1.999 แปลผลได้ในระดับจีนัสว่าเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* complex ด้วยวิธี RM และ SM จำนวน 10 และ 9 ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 27.03 และ 24.33 ตามลำดับ โดยค่าเฉลี่ย log score ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคทั้ง 37 ตัวอย่างของวิธี RM และ SM มีค่ามากกว่า 2 คือ

2.130 (SD 1.920-2.330) และ 2.110 (SD 1.920-2.290) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย log score ≥ 2.000 ระหว่างวิธี RM และ SM ด้วยวิธีทางสถิติ independent-sample T test ได้ค่า p value เท่ากับ 0.544 แสดงว่าวิธี SM และ RM ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (-0.112 ถึง 0.208)

การลดระยะเวลาการดำเนินการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี SM

ขั้นตอนที่มีความแตกต่างของวิธี RM และ SM ที่ทำให้ระยะเวลาการดำเนินงานของทั้ง 2 วิธีมีความแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 3

ภาพที่ 3 ขั้นตอนที่มีความแตกต่างของวิธี RM และ SM ที่ทำให้ระยะเวลาการดำเนินงานของทั้ง 2 วิธีมีความแตกต่างกัน



Ultrasonication นาน 1 นาที บนน้ำแข็ง

ดังนั้นจากภาพที่ 3 แสดงให้เห็นว่าการสกัดโปรตีนด้วยวิธี SM เร็วกว่าวิธี RM 38 นาที นอกจากนี้วิธี SM ยังช่วยลดความเมื่อยล้าของมือผู้ปฏิบัติงานจากการปั่นผสมในวิธี RM

วิจารณ์

จากการเปรียบเทียบการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี RM และ SM เมื่อดูค่า log score ในแต่ละตัวอย่างของทั้ง 2 วิธี เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย log score ≥ 2.000 ระหว่างวิธี RM และ SM พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ซึ่งในการศึกษาของ La'Tonzia L. Adams และคณะในปีพ.ศ.2559[3] เปรียบเทียบการสกัดโปรตีนเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียระหว่างวิธี conventional method กับ AFA method พบว่าการสกัดโปรตีนของเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียด้วยวิธี AFA ได้ค่า log score ≥ 2.000 คิดเป็นร้อยละ 71.40 ซึ่งใกล้เคียงกับการสกัดโปรตีนด้วยวิธี SM ของการศึกษานี้ที่ได้ค่า log score ≥ 2.000

คิดเป็นร้อยละ 75.67 หากใช้ค่า log score ≥ 1.700 วินิจฉัยเชื้อวัณโรคแค่ระดับจีนัส คือแปลผลเป็น *M. tuberculosis* complex จะตรวจวัดได้ร้อยละ 100 ทั้ง 2 วิธี เหมือนการศึกษานี้ซึ่งศึกษาวิจัยอื่น ๆ[3,8,9] ก็พบเช่นกัน วิธีการสกัดโปรตีนที่แตกต่างกันทำให้ได้รูปแบบมวลโปรตีนต่อประจุที่ต่างกัน เมื่อนำไปเทียบกับข้อมูลรูปแบบมวลโปรตีนของเชื้อวัณโรคที่มีในโปรแกรมแปลผล ทำให้ค่า log score แตกต่างกัน ดังนั้นหากมีการปรับปรุงข้อมูลรูปแบบมวลโปรตีนต่อประจุของเชื้อวัณโรค ให้มากขึ้นจะทำให้ค่า log score สูงขึ้นด้วย[8] สรุปผลการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี SM สามารถใช้แทนวิธี RM ได้ และช่วยลดเวลาการเตรียมตัวอย่างให้ลดลงประมาณ 38 นาที แม้ไม่ได้ประหยัดเวลาเท่าการสกัดโปรตีนของเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียด้วยวิธีอัลตร้าโซนิคชนิด AFA ที่ใช้เวลาการสกัดโปรตีนประมาณ 5 นาที[3] และในการศึกษาของ David Rodriguez-Temporal และคณะปี พ.ศ.2565[8] ที่ส่งเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียให้ 14 ห้องปฏิบัติการ การสกัดโปรตีนของเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียด้วยวิธีอัลตร้าโซนิค แต่ไม่ได้ระบุว่าใช้เครื่อง AFA ซึ่ง 14 ห้องปฏิบัติการนี้ได้ใช้เวลาการสกัดใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากยังคงขั้นตอนฆ่าเชื้อด้วยการต้มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แต่ไม่สามารถศึกษาค่า log score ได้ เนื่องจากหากเป็นเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียอื่นที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรค จะวินิจฉัยเชื้อในระดับจีนัสและสปีชีส์ที่ค่า log score ≥ 1.800 ชี้ให้เห็นว่าการสกัดโปรตีนจากเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิค ยังคงขั้นตอนการต้มฆ่าเชื้อไว้แม้จะเพิ่มเวลาการสกัดขึ้นก็ตาม โดยจากการศึกษาของ Katsunao Niitsuma และคณะ ในปีพ.ศ.2561[4] มีการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคที่เลี้ยงบนอาหารแข็งโดยต้มและไม่ต้มเชื้อวัณโรคร่วมกับเครื่องอัลตร้าโซนิค พบว่าสามารถวินิจฉัยเชื้อวัณโรคในระดับจีนัสและสปีชีส์ มีค่า log score ≥ 2.000 ได้ร้อยละ 93.3 และ 90.0 ตามลำดับ ดังนั้นขั้นตอนการต้มช่วยเพิ่มความสามารถในการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการใช้อัลตร้าโซนิคเพียง 1 นาที อาจไม่เพียงพอในการทำลายผนังเซลล์ที่หนาของเชื้อวัณโรคได้ จึงจำเป็นต้องต้มเชื้อวัณโรคเพื่อทำลายผนังเซลล์ได้ดีขึ้นและช่วยลดการติดเชื้อวัณโรคได้ด้วย[4] รวมทั้งการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคด้วยวิธีอัลตร้าโซนิค ช่วยลดความเมื่อยล้าในการเตรียมตัวอย่าง ทำให้วิเคราะห์มวลโปรตีนต่อประจุได้ง่าย จากการที่สกัดโปรตีนได้ดี ส่งผลให้โปรตีนของเชื้อกระจายอย่างสม่ำเสมอ ไม่ว่ายิงเลเซอร์ตำแหน่งใดก็จะพบโปรตีนของเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงอยู่ ผู้วิเคราะห์จึงไม่ต้องยิงเลเซอร์หลายครั้งเพื่อหาตำแหน่งของโปรตีนของเชื้อที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์เอง ทำให้สามารถเลือกโหมดอัตโนมัติให้เครื่องตรวจวิเคราะห์ยิงเลเซอร์แทน ทำให้ลดเวลาและความเมื่อยล้าตอนการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งยืดอายุการใช้งานเลเซอร์ ประหยัดค่าใช้จ่ายในการเปลี่ยนเลเซอร์

สรุป

จากการเปรียบเทียบการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคระหว่างวิธี RM และ SM ให้ค่า log score ≥ 2.000 ร้อยละ 72.97 และ 75.67 ตามลำดับ และ ให้ค่า log score 1.700-1.999 ร้อยละ 27.03 และ 24.33 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย log score ≥ 2.000 ระหว่างวิธี RM และ SM พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ การสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี SM สามารถทดแทนวิธี RM

ในการเตรียมตัวอย่างเชื้อวัณโรคก่อนเข้าเครื่อง MALDI-TOF MS ได้ และการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี SM ช่วยลดเวลาในการเตรียมตัวอย่างก่อนเข้าเครื่อง MALDI-TOF MS เมื่อเทียบกับวิธี RM อย่างน้อยตัวอย่างละ 38 นาที ข้อดีของวิธี SM ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS สามารถเลือกโหมดอัตโนมัติเพื่อเก็บค่ามวลโปรตีนต่อประจุได้ดีกว่าวิธี RM โดยการเก็บค่า 1 ครั้ง ต้องมีค่า intensity $\geq$ 500 a.u. เก็บค่าทั้งหมด 10 ครั้งใน 1 หลุมตัวอย่าง จึงได้รูปแบบมวลโปรตีนต่อประจุออกมาเป็นที่ยอมรับ วิธี SM สามารถพบมวลโปรตีนที่มีค่า intensity $\geq$ 500 a.u. ในตัวอย่างได้ง่ายกว่าวิธี RM ที่บ่อยครั้งในตัวอย่างมีค่า intensity < 500 a.u. จึงไม่เก็บค่ามวลโปรตีนต่อประจุในหลุมนั้นและข้ามไปหลุมถัดไป ทำให้ต้องพยายามหามวลโปรตีนที่มีค่า intensity $\geq$ 500 a.u. ด้วยตัวเอง ส่งผลให้สิ้นเปลืองเวลาหามวลโปรตีนที่เหมาะสม เลเซอร์ของเครื่องทำงานหนักกว่าปกติ อายุการใช้งานเลเซอร์สั้นลง ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงหากมีการเปลี่ยนเลเซอร์ การศึกษาครั้งนี้สกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LJ medium จึงควรศึกษาการสกัดโปรตีนของเชื้อวัณโรคที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวอื่น เช่น modified Middlebrook 7H9 broth ในMGIT tube ด้วย เนื่องจากหากสามารถทำการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว MGIT tube ได้แล้ว แล้วสามารถนำมาสกัดโปรตีนได้เลย โดยไม่ต้องเสียเวลานำตัวอย่างไปเพาะบนอาหารแข็ง LJ medium ก่อนนำมาสกัดโปรตีน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรม ประเภททุนพัฒนาบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ปี 2565 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะผู้บริหารของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี ที่กรุณาสนับสนุนข้อมูลต่างๆ ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ทุกคนที่สอนเทคนิคการใช้งานเครื่องมือต่าง ๆ และช่วยวิเคราะห์ผลในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Geneva. WHO releases new global lists of high-burden countries for TB, HIV-associated TB, and drug-resistant TB [Internet] 2023 Jan [cited 2023 Mar 17]. 16 p. Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-tuberculosis/who_ globalhbcliststb_2021-2025_ background document.pdf?sfvrsn=f6b854c2_9

2. Huang TS, Lee CC, Tu HZ, Lee SS. Rapid identification of mycobacteria from positive MGIT broths of primary cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. PLoS One. 2018 Feb 2;13(2):e0192291. doi: 10.1371/journal.pone.0192291 PubMed PMID: 29394275; PubMed Central PMCID: 5796708.

3. Association of Public Health Laboratories Washington, D.C. Best Practices for Identification of Mycobacterium Species Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. [Internet]. 2019 Aug [cited 2023 Mar 17]. 16 p. Available from: https://www.aphl.org/aboutAPHL/publications/Documents/ID-2019Aug-MALDI-TOF-TB-Fact-Sheet.pdf

4. Adams LL, Dionne K, Fisher S, Parrish N. A Rapid Standardized Protein Extraction Method Using Adaptive Focused Acoustics for Identification of Mycobacteria by MALDI-ToF MS. Diagn Microbiol Infect Dis 2016; 86(3):284-8.

5. Niitsuma K, Koshiba S, Saitou M, Suzuki T, Chikamatsu K, Takagi A, et al. Use of Ultrasonication as a Rapid Pretreatment Method for MALDI-TOF MS of Mycobacterial Samples. Mycobact Dis 2018;8(2):260-5.

6. Rotcheewaphan S, Lemon JK, Desai UU, Henderson CM, Zelazny AM. Rapid one-step protein extraction method for the identification of mycobacteria using MALDI-TOF MS. Diagn Microbiol Infect Dis 2019; 94(4): 355-60.

7. Pastrone L, Curtoni A, Criscione G, Scaiola F, Bottino P, Guarrasi L, et al. Evaluation of Two Different Preparation Protocols for MALDI-TOF MS Nontuberculous Mycobacteria Identification from Liquid and Solid Media. Microorganisms 2023;11(1):120.

8. Pillay M, Myende S, Naidu Krishna SB, Green E, Govender P. A novel MALDI-TOF mass spectrometry sample preparation strategy for improved proteomic biotyping of clinically significant Mycobacteria. Research Square 2022 Jan 17. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1231563/v1

9. Rodriguez-Temporal D, Alcaide F, Marekovi$\acute{c}$ I, O'Connor JA, Gorton R, van Ingen J, et al. Multicentre study on the reproducibility of MALDI-TOF MS for nontuberculous mycobacteria identification. Sci Rep. 2022;12(1):1237-43.

10. Neuschlova M, Vladarova M, Kompanikova J, Sadlonova V, Novakova E. Identification of Mycobacterium Species by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Adv Exp Med Biol. 2017; 1021: 37-42.