

เครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติในระบบแมสสเปกโตรเมตรีชนิด MALDI-TOF

วิทยา กวณเทียน*

Received: January 21, 2013
Revised & Accepted: May 22, 2013

บทคัดย่อ

การจำแนกแบคทีเรียก่อโรคในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกด้วยวิธีดั้งเดิมที่ใช้การทดสอบด้วยชุดชีวเคมีแบบดั้งเดิมนั้นมีความยุ่งยากและต้องใช้เวลา นับตั้งแต่การนำโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจไปทดสอบนั้นมากกว่าหนึ่งวัน ต่อมาเมื่อมีการพัฒนาเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติในยุคแรกมาช่วยให้การปฏิบัติงานง่ายขึ้น แต่อย่างไรก็ตามระยะที่ใช้เวลานานถึง 3 - 36 ชั่วโมงเนื่องจากหลักการจำแนกแบคทีเรียนั้นยังต้องการเจริญของแบคทีเรีย แต่ในบางระบบของเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติในยุคแรกมีการเปลี่ยนชนิดของซับสเตรท หรือทำการวิเคราะห์รูปแบบกรดไขมันองค์ประกอบของแบคทีเรียทำให้เวลาในการจำแนกเร็วขึ้นเป็นเวลา น้อยกว่า 1 - 4 ชั่วโมง เมื่อมาถึงปัจจุบันเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติในระบบ Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ที่สามารถนำโคโลนีแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจโดยวิธีมาตรฐานมาทำการจำแนกโดยการเติมเพียงเมทริกซ์ และใช้เวลาในการจำแนกแบคทีเรียน้อยกว่าหนึ่งนาที โดยผลการจำแนกนั้นจะได้จากการเปรียบเทียบโปรตีนแมสสเปกตรัมของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้กับโปรตีนแมสสเปกตรัมของแบคทีเรียมาตรฐานในฐานข้อมูลที่ได้รับการปรับปรุงให้ทันสมัยโดยใช้ซอฟต์แวร์ที่มาพร้อมกับชุดเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติ

คำสำคัญ: แมสสเปกโตรเมตรีชนิด MALDI-TOF, เครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติ, โปรตีนแมสสเปกตรัม



The bacteria identification automate in MALDI-TOF mass spectrometry system

Wiyada Kwanhian*

Abstract

The identification of pathogenic bacteria in clinical microbiology laboratory tested by the conventional biochemical method is complicated and time consuming. The process of identification takes longer than one day since bacteria colonies from a specimen culture plate are picked for testing. Later, the establishment of an automated bacteria identification method has a less complicated procedure. However, an identification time takes approximately 3 - 36 hours because the identification procedure depends on bacteria growth. Nevertheless, a new identification method that changes substrate types or analyzes a bacterial fatty acid pattern reduces the identification time to 1 - 4 hours. Recently, the bacteria identification automate in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) system which identifies a bacteria intact colony, from the standard clinical specimen culture method, by adding only the matrix reduces the identification time to lower than 1 minute. The result of identification is analyzed by comparison of the sample protein mass spectrum with the standard bacteria protein mass spectra in an up to date database which complied with the bacteria identification automate set.

Keywords: MALDI-TOF mass spectrometry, Bacteria identification automate, Protein mass spectrum

School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, 222 Thaiburee, Thasala, Nakhon Si Thammarat, Thailand 80160

* Corresponding author: (e-mail: kwiwada@wu.ac.th)

บทนำ

การจำแนกเชื้อชนิดแบคทีเรีย (bacteria identification) เป็นหนึ่งในงานจุลชีววิทยาคลินิกที่ในทุกขั้นตอนของการทำงานต้องอาศัยความรู้และความชำนาญเพื่อให้ได้ผลการจำแนกที่ถูกต้อง การจำแนกแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจด้วยวิธีการดั้งเดิม (conventional method) ที่ทำกันทั่วไปในปัจจุบันและถือเป็นวิธีมาตรฐานในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการคลินิก วิธีการนี้จะถูกนำมาเขียนไว้ในมาตรฐานการปฏิบัติงานหรือ standard operating procedure (SOP) ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการ⁽¹⁾ วิธีการโดยย่อคือ นำสิ่งส่งตรวจมาเพาะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ ทำให้ได้โคโลนีแบคทีเรียซึ่งจะถูกนำไปจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยชุดทดสอบชีวเคมี (biochemical test) ที่เป็นการตรวจวัดกระบวนการเมตาโบไลต์ (metabolic activity) ของแบคทีเรีย ในสถานะที่มีซับสเตรตชนิดต่างๆ โดยเมื่อแบคทีเรียใช้ซับสเตรตจะทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์ในชุดทดสอบชีวเคมี นอกจากนี้ยังมีกรจำแนกโดยการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ หรือความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียในสถานะที่มีสารยับยั้งเป็นต้น⁽¹⁾ ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการจำแนกวิธีนี้จะได้จากการอ่านผลของชุดทดสอบชีวเคมี ซึ่งจะมีหลายชนิดของซับสเตรต การเลือกว่าจะใช้ชุดทดสอบชีวเคมีชนิดใดมาทำการจำแนกเชื้อแบคทีเรียนั้นต้องมีการจำแนกเบื้องต้นตามคุณสมบัติของแบคทีเรีย เช่น การติดสีแกรม รูปร่าง การเรียงตัวของแบคทีเรีย การสร้างเอนไซม์คาตาเลส การมีเอนไซม์ไซโตโครม ซี ออกซิเดส (cytochrome C oxidase) เป็นต้น เพื่อให้สามารถเลือกชุดทดสอบชีวเคมีมาใช้ในการจำแนกชนิดต่อไปได้ ถ้าการจำแนกเบื้องต้นนี้เกิดความผิดพลาดขึ้นจะส่งผลให้เลือกชุดชีวเคมีผิดไป ทำให้ต้องเสียเวลาในการทำทดสอบใหม่เมื่อไม่สามารถจำแนกเชื้อได้ในภายหลัง ขั้นตอนการจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธีดั้งเดิม ซึ่งจัดเป็นกระบวนการในขั้นตอนการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (analytical process) นอกจากจะมีความยุ่งยากแล้ว การควบคุมคุณภาพของชุดการทดสอบชีวเคมีซึ่งเป็นกระบวนการในช่วงขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (pre-analytical process) นั้นก็มีความจำเป็นเพราะเป็นส่วนหนึ่งในระบบประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการ⁽²⁾ ซึ่งจะทำตามแนวทางปฏิบัติของ Clinical and Laboratory Standards

Institute (CLSI) ที่ระบุไว้ในเอกสาร M22-A3⁽³⁾ ว่าด้วยการควบคุมคุณภาพของอาหารสำเร็จรูปที่เตรียมสำหรับงานจุลชีววิทยาคลินิก ซึ่งขั้นตอนนี้ก็มีความยุ่งยากเช่นกันเพราะชุดทดสอบชีวเคมีทั้งหมดที่ใช้นั้นมีจำนวนมาก และเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่จะนำมาทดสอบนั้น CLSI กำหนดว่าต้องเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน American Type Culture Collection (ATCC)⁽³⁾ ส่วนขั้นตอนหลังการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (post-analytical process) ซึ่งจำเป็นเนื่องจากต้องทำความสะอาดภาชนะที่ต้องการนำกลับมาใช้ใหม่ เช่นหลอดแก้วบรรจุชุดชีวเคมีที่ทำการทดสอบแล้วต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้นภายใต้ความดัน (autoclave) แล้วจึงจะสามารถนำมาล้างทำความสะอาดก่อนนำมาบรรจุชุดชีวเคมีใหม่ นอกจากนี้การกำจัดของเสียติดเชื้อ (biohazard waste) ยังเป็นขั้นตอนที่สำคัญอีกขั้นตอนเพื่อควบคุมไม่ให้เกิดการแพร่กระจายโรคติดเชื้อออกสู่ภายนอก กระบวนการทั้งหมดที่กล่าวมาของวิธีการดั้งเดิมต้องใช้ทั้งบุคลากรและเสียเวลามาก

ในช่วงคริสต์ทศวรรษ ที่ 1960 ถึง 1970 นั้นได้มีการพัฒนาชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูปพร้อมใช้ (bacteria identification kit)⁽⁴⁻⁸⁾ และเริ่มมีรายงานการนำมาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดจำแนกสำเร็จรูปนี้กับวิธีการแบบดั้งเดิมในหลายการศึกษา⁽⁴⁻⁷⁾ ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูปจะมีลักษณะบรรจุภัณฑ์ขนาดเล็ก ในหนึ่งชุดจะมีหลายการทดสอบชีวเคมี ดังนั้นข้อดีของชุดสำเร็จรูปนี้คือสามารถลดพื้นที่ในการบ่มเพาะ ลดจำนวนบุคลากรในขั้นตอนการเตรียม การควบคุมคุณภาพ การทำความสะอาดภาชนะ และการกำจัดของเสียติดเชื้อของการจำแนกแบคทีเรียแบบดั้งเดิมลงได้ นอกจากนี้ยังทำให้ง่ายและสะดวกในการใช้งาน ตัวอย่างของชุดทดสอบที่มีการผลิตและมีการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก ได้แก่ ชุดทดสอบ API (บริษัท BioMérieux) ชุดทดสอบ BBL Crystal (บริษัท Becton Dickinson) ชุดทดสอบ RapiID (บริษัท Ramel) เป็นต้น การอ่านผลการทดสอบจะคล้ายคลึงกับการอ่านผลโดยวิธีดั้งเดิมและยังคงต้องใช้บุคคลในการอ่านผลการทดสอบ ซึ่งหลักการส่วนใหญ่จะคล้ายคลึงกับการอ่านผลของวิธีดั้งเดิม เช่นอ่านจากสีของอินดิเคเตอร์ที่เปลี่ยนแปลงไปซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากการใช้น้ำตาลต่างๆ หรือจากการเกิดจากการวัดการทำงานของเอนไซม์โดยการสังเกตการเกิดสีของสารตั้งต้น chromogen^(8, 9) เป็นต้น

เครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติยุคแรก

การพัฒนาเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติเกิดขึ้นตั้งแต่ช่วงกลางคริสต์ทศวรรษ 1960⁽¹⁰⁾ ในยุคแรกนี้รูปแบบของภาษาที่ใช้บรรจุชุดทดสอบชีวเคมีนั้นจะเล็กลงมากเมื่อเทียบกับแบบดั้งเดิมและแบบชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป โดยจะอยู่ในรูปแบบแผ่นการ์ดหรือจานหลุมขนาดเล็ก ซึ่งบรรจุชุดเทรทหลายชนิด ทำให้สามารถทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีจำนวนมากชนิดกว่าที่ใช้ในวิธีการจำแนกแบบดั้งเดิม⁽⁹⁾ ระบบของการวิเคราะห์ที่ใช้ในเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติยุคแรกนั้นแบ่ง 4 ระบบ โดยหนึ่งเครื่องนั้นอาจใช้เพียงระบบเดียวหรือรวมกันมากกว่าหนึ่งระบบ ได้แก่ ระบบที่ 1) วัด pH เปลี่ยนแปลงไปโดยวัดสีของอินดิเคเตอร์ที่เปลี่ยนแปลงการเมื่อมีการใช้คาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีน ระบบที่ 2) วัดการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon source utilization) ในกระบวนการเมตาโบไลต์ที่มีสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) มี tetrazolium เป็นตัวติดตามปฏิกิริยาโดยจะถูกเปลี่ยนเป็นตะกอนสีม่วงที่ตรวจวัดได้ ระบบที่ 3) วัดการสร้างเอ็นไซม์โดยเอ็นไซม์ที่แบคทีเรียสร้างที่มีคุณสมบัติเป็น hydrolase enzyme ในสถานะที่มีสารตั้งต้นของ chromogen หรือ fluorescence ในระบบจะทำให้เกิดสีหรือสารเรืองแสงที่สามารถตรวจวัดได้ และระบบที่ 4) การตรวจวัดรูปแบบกรดไขมันของแบคทีเรียชนิด volatile หรือ nonvolatile⁽⁸⁻¹¹⁾ ทั้ง 4 ระบบของเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติยุคแรกสรุปเปรียบเทียบ

ไว้ใน ตารางที่ 1 เห็นได้ว่าในระบบที่ 1 และ 2 นั้นยังคงต้องใช้เวลาในการจำแนกเชื้อยาวนานหลายชั่วโมงเพราะยังเป็นการวัดปฏิกิริยาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย หรือเรียกว่า growth dependent method ระยะเวลาในการแบ่งตัวของแบคทีเรีย (generation time) ประมาณ 30 นาทีหรือนานกว่า แต่อย่างไรก็ตามมีการพัฒนาเพื่อให้สามารถตรวจวัดได้รวดเร็วขึ้นคือการเปลี่ยนชุดเทรทใหม่เพื่อวัดการสร้างเอ็นไซม์ในระบบที่ 3 ทำให้สามารถจำแนกแบคทีเรียได้รวดเร็วขึ้นภายใน 2 - 4 ชั่วโมง⁽⁹⁾ สำหรับการจำแนกแบคทีเรียในระบบที่ 4 การตรวจวัดรูปแบบของกรดไขมันของแบคทีเรียชนิดประกอบของแบคทีเรียชนิดนั้นสามารถจำแนกแบคทีเรียได้รวดเร็วมากขึ้นโดยใช้เวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามระบบนี้ต้องมีกระบวนการเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียที่ค่อนข้างยุ่งยาก โดยเมื่อได้โคโลนีแบคทีเรียบริสุทธิ์มาแล้วต้องมีการ saponification และ methylation ก่อนนำไปสกัดกรดไขมันแล้วจึงนำเข้าตรวจวิเคราะห์ด้วย gas chromatography (GC)

อีกขั้นตอนหนึ่งของวิธีการจำแนกแบคทีเรียด้วยเครื่องอัตโนมัติในยุคแรกที่แตกต่างจากวิธีดั้งเดิมคือการอ่านปฏิกิริยา โดยเครื่องจำแนกอัตโนมัติจะมีเครื่องอ่านผลอัตโนมัติในเวลาที่เหมาะสมของแต่ละระบบและนำผลปฏิกิริยานั้นไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของผู้ผลิตจัดทำขึ้นโดยใช้ซอฟต์แวร์ที่พัฒนาโดยบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือ ซอฟต์แวร์จะประมวลผลและรายงานผลการจำแนกแบคทีเรียแบบอัตโนมัติ

ตารางที่ 1 ตารางเปรียบเทียบระบบของเครื่องจำแนกชนิดแบคทีเรียอัตโนมัติในยุคแรก⁽³⁾

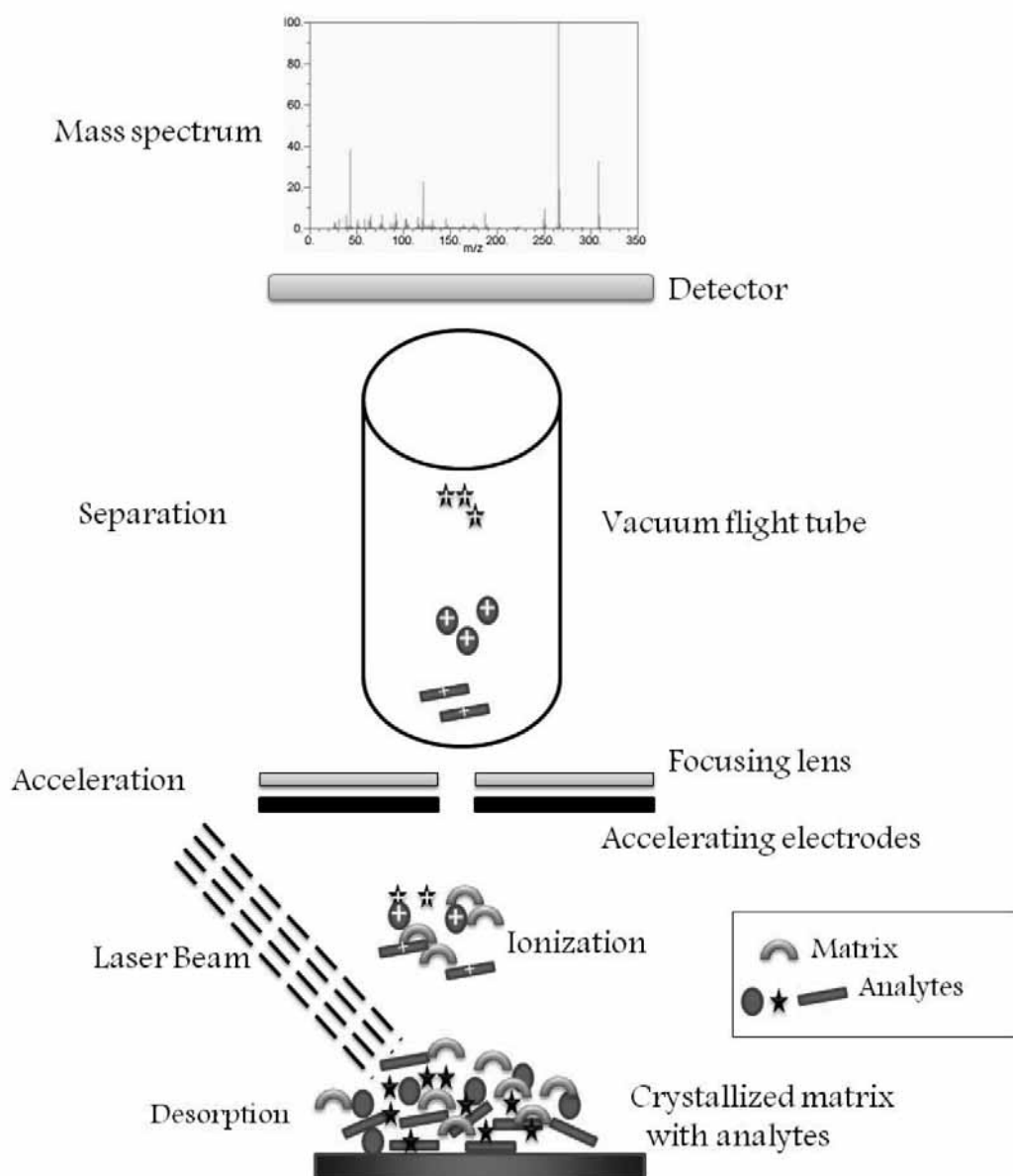
ระบบของการวิเคราะห์	สารที่วิเคราะห์	หลักการตรวจวัด	เวลาที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย	ตัวอย่างเครื่องจำแนกชนิดแบคทีเรียอัตโนมัติในยุคแรก
ความเป็นกรดต่ำ (pH-based reaction)	การใช้คาร์โบไฮเดรต/โปรตีน (carbohydrate/protein utilization)	สีของอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อ pH เปลี่ยนแปลง - แบคทีเรียใช้คาร์โบไฮเดรต จะมีการสร้างกรด (acid) - แบคทีเรียใช้โปรตีนหรือมีการปล่อยสารประกอบไนโตรเจนออกมา จะมีความเป็นด่าง (alkaline)	15-24 ชั่วโมง	- Vitek (BioMérieux) - MicroScan (SIEMEN) - Phoenix (BD) - Sensititre (TREK)
การสร้างเอ็นไซม์	เอ็นไซม์ (enzyme profile)	เมื่อสารประกอบ chromogen หรือ fluorogen ที่ปกติไม่มีสี แต่เมื่อถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ (hydrolyzed) จะเกิดเป็นสารสีที่สามารถตรวจวัดได้	2-4 ชั่วโมง	- MicroScan (SIEMEN) - Vitek (BioMérieux) - Phoenix (BD) - Sensititre (TREK)
ความต้องการสารประกอบคาร์บอน (carbon source utilization)	สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds)	เมื่อแบคทีเรียสามารถใช้สารประกอบคาร์บอนในกระบวนการเจริญเติบโตนั้นจะมีการส่งถ่ายอิเล็กตรอน (electron transferring) ไปให้สาร tetrazolium ที่ติดฉลากที่สารประกอบคาร์บอน และเปลี่ยนเป็นสารประกอบสีม่วงที่ตรวจวัดได้	3-36 ชั่วโมง	Biolog (Biolog)
ตรวจวัดกรดไขมันชนิด volatile หรือ non volatile	กรดไขมันของแบคทีเรีย (bacterial fatty acid)	ใช้แก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) ในการวิเคราะห์ไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการ saponification /methylation โดยรูปแบบของกรดไขมันที่วิเคราะห์ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแบคทีเรียมาตรฐานที่ทราบชนิดด้วยซอฟต์แวร์และรายงานผลจากจำแนกชนิดแบคทีเรียออกมา	< 1 ชั่วโมง	MIDI (MIDI Inc.)

เครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติหลักการแมสสเปกโตรเมตรี (Mass spectrometry)

การศึกษาแรกที่ใช้แมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry; MS) มาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1975⁽¹²⁾ โดยเป็นการทำให้สารชีวเคมีของแบคทีเรียแตกตัวกลายเป็นไอออนในสุญญากาศแก๊สอย่างรวดเร็วโดยใช้เทคนิค atom bombardment และในการศึกษาครั้งนั้นเป็นการใช้ GC ร่วมกับ MS จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า GC-MS แต่จากการศึกษานี้ก็จะมีปัญหาเรื่องเทคนิคการทำให้เกิดไอออน (ionization) ที่ใช้นั้นมีพลังงานสูงทำให้โปรตีนของแบคทีเรียความเสียหาย ในการศึกษานี้จะวิเคราะห์ทั้งเมมเบรนโปรตีนและไรโบโซมโปรตีน ต่อมาในปี ค.ศ. 1996 มีรายงานการศึกษาที่นำ matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS (MALDI-TOF MS) มาใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย ในการศึกษาเป็นครั้งแรกที่ประสบความสำเร็จในการใช้โคโลนีของแบคทีเรีย (intact colony) โดยตรงมาศึกษาโปรตีนแมสสเปกตรัม^(13, 14) สิ่งที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของการนำ MALDI-TOF MS มาใช้ครั้งนี้คือเทคนิคการทำให้เกิดไอออนเป็นแบบ soft ionization ซึ่งจะไม่ทำให้ความเสียหายกับสารอินทรีย์ขนาดโมเลกุลใหญ่ (large organic molecules) ซึ่งมักเปราะบางแต่จะถูกทำลายโครงสร้างไปถ้าใช้เทคนิค ionization แบบเดิม⁽¹⁵⁾ การพัฒนาอย่างต่อเนื่องของเครื่องมือนี้ทำให้สามารถเพิ่มความถูกต้อง (accuracy) ของการวิเคราะห์และสามารถใช้วิเคราะห์โปรตีนได้หลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามยังเป็นการจำแนกแบคทีเรียในงานวิจัยเท่านั้น⁽¹³⁾ ในเวลาต่อมามีการพัฒนาเพื่อให้สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ในระดับสปีชีส์โดยการเปลี่ยนเมตริกซ์ (matrix) ที่ช่วยให้เกิดการ ionization ของโปรตีนไรโบโซมเป็นส่วนใหญ่ โปรตีนไรโบโซมนี้เองที่สามารถใช้จำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ได้ดีกว่าการใช้เมมเบรนโปรตีน⁽¹⁶⁾ จากการศึกษาจึงนำไปสู่การนำ MS มาใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียในงานประจำด้านจุลชีววิทยาคลินิกมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) คือหลักการของการรวมตัวกันเป็นผลึก (co-crystallization) ของสารตัวอย่างกับเมตริกซ์ และเมื่อ

มีการกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ความยาวคลื่นช่วงยูวีซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่เมตริกซ์สามารถดูดกลืนแสงได้ดี จะทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออนในสุญญากาศแก๊ส ไอออนจะถูกเร่งความเร็ว (accelerated) และถูกส่งเข้าไปในท่อสุญญากาศ (vacuum flight tube) ซึ่งในท่อนี้ไอออนจะถูกแยก (separated) ตามความเร็วในการเคลื่อนที่ของไอออนโดยความเร็วของการเคลื่อนที่ขึ้นกับอัตราส่วนของมวลต่อประจุ (mass/charge ratio; m/z) โดย m คือมวลของสารที่กลายเป็นไอออนบวกในหน่วยดาลตัน และ z คือค่าประจุบวกของไอออนนั้นซึ่งเกิดจากการสูญเสียอิเล็กตรอนและรับโปรตอน (H^+) เข้ามาในโมเลกุลเรียกว่ากระบวนการ protonation ดังนั้น m/z จึงบ่งบอกมวลของสารได้ ในกรณีที่ z เท่ากัน ไอออนที่มีค่า m/z สูงคือมีมวลมากจะเคลื่อนที่ช้ากว่าไอออนที่มี m/z ต่ำคือมีมวลน้อยกว่า ส่วนในกรณีที่มวลเท่ากัน แต่ z ไม่เท่ากันก็จะทำให้ค่าอัตราส่วน m/z แตกต่างไป โดยไอออนที่มี z มากกว่าทำให้ค่า m/z ต่ำจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าไอออนที่มี z น้อยกว่า^(17, 18) วิธีการนี้จะใช้จำแนกโปรตีนซึ่งก็คือสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนเรียงตัวกัน โปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนต่างกันก็จะมีน้ำหนักของสายเปปไทด์ (peptide masses) ที่ต่างกันด้วย ซึ่งก็จะถูกตรวจวัดด้วย detector ผลการตรวจวัดจะแสดงออกมาในรูปแมสสเปกตรัมที่สามารถจำแนกน้ำหนักของโปรตีนและจะถูกนำไปใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียโปรตีนที่ใช้สำหรับการจำแนกแบคทีเรียนั้นเป็นโปรตีนไรโบโซมเนื่องจากมีความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรียสูง⁽¹⁹⁾ ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วย MALDI-TOF MS สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียนั้นจะสามารถใช้โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงได้ (รูปที่ 1) แต่ในกรณีที่แบคทีเรียนั้นมีแคปซูลหรือกรณีที่มันสารปนเปื้อนจะนำโคโลนีไปสกัดก่อนแล้วจึงนำไปวิเคราะห์จะสามารถเพิ่มความถูกต้องของการจำแนกได้ดีขึ้น^(16, 17, 20) โปรตีนสเปกตรัมที่วิเคราะห์ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีโปรตีนสเปกตรัมของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานโดยใช้ซอฟต์แวร์



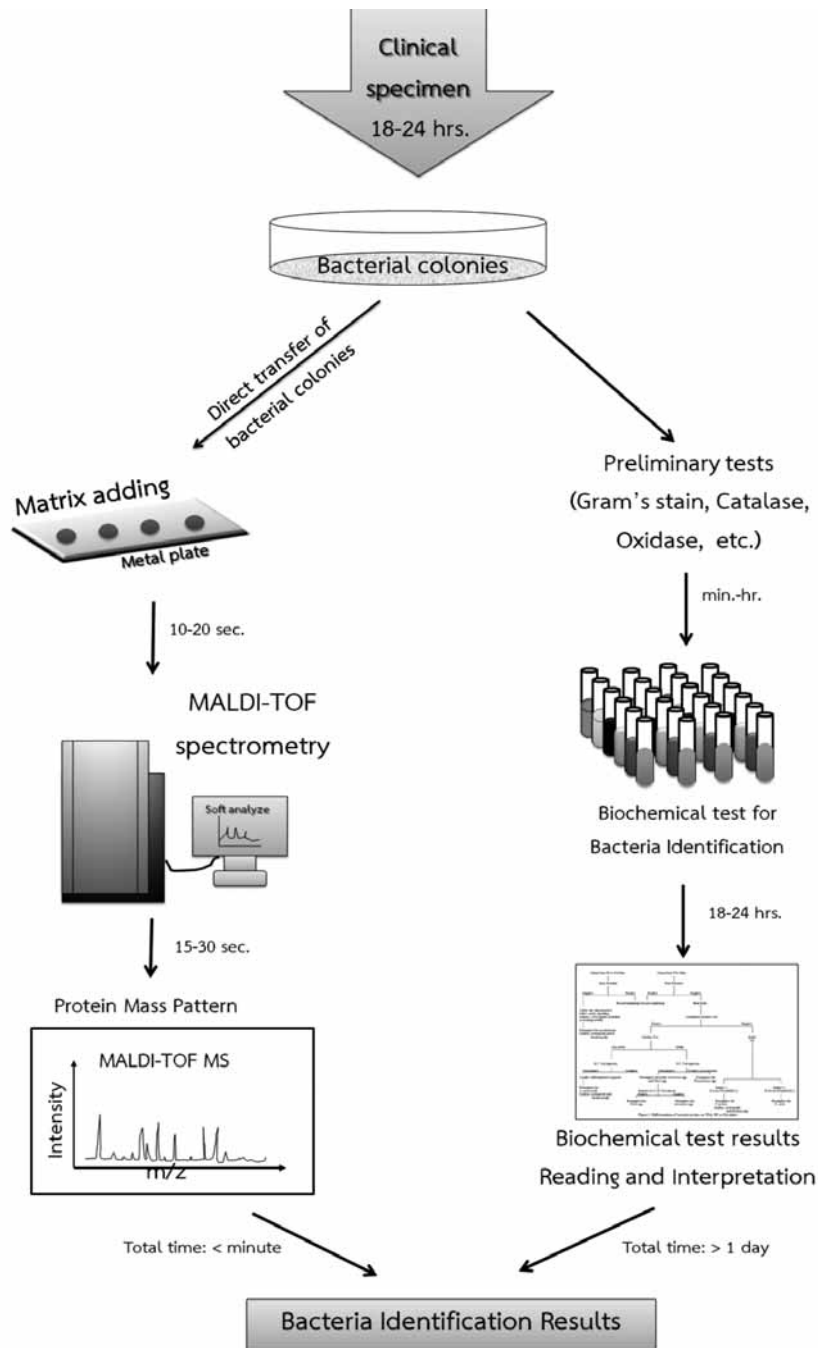
รูปที่ 1 หลักการวิเคราะห์โปรตีนด้วย MALDI-TOF MS บนแผ่นโลหะที่มีส่วนผสมของเมทริกซ์และโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ เมื่อมีการกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์จะทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออนในสุญญากาศ ไอออนจะถูกเร่งความเร็วและถูกส่งเข้าไปในท่อสุญญากาศ (vacuum flight tube) ซึ่งไอออนจะถูกแยกตามความเร็วในการเคลื่อนที่ของไอออน โดยความเร็วของการเคลื่อนที่ขึ้นกับมวลต่อประจุ (mass/charge ratio; m/z) ไอออนที่มีค่า m/z สูงคือมีมวลมากจะเคลื่อนที่ช้ากว่าไอออนที่มี m/z ต่ำกว่าคือมีมวลต่ำกว่า ซึ่งก็就会被ตรวจวัดด้วย detector ทำให้ได้สเปกตรัมที่สามารถจำแนกชนิดของโปรตีนจำเพาะได้⁽²¹⁾

ในปัจจุบันมีการพัฒนาซอฟต์แวร์และฐานข้อมูลเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ข้อมูลการจำแนกแบคทีเรียในงานประจำทางจุลชีววิทยาคลินิกได้แก่ บริษัท Bruker (ประเทศเยอรมัน) พัฒนาทั้งซอฟต์แวร์และฐานข้อมูลเพื่อนำมาใช้งานกับเครื่องมือของบริษัทเองที่มีชื่อว่า MALDI Biotyper บริษัท Shimadzu (ประเทศญี่ปุ่น) ผู้ผลิตเครื่องมืออีกรายหนึ่งได้พัฒนาซอฟต์แวร์ชื่อว่า Launchpad แต่ใช้ฐานข้อมูล SARAMIS ที่พัฒนาโดยบริษัท AnagnosTec GmbH (ประเทศเยอรมัน) บริษัท Shimadzu (ประเทศญี่ปุ่น) ร่วมมือกับบริษัท BioMe'rieux (ประเทศอิตาลี) ทำการพัฒนาและจำหน่ายทั้งเครื่องมือซอฟต์แวร์และฐานข้อมูลโดยใช้ชื่อว่า VITEK MS นอกจากนี้บริษัท Andromas software (ประเทศสหรัฐอเมริกา) ได้พัฒนาซอฟต์แวร์และฐานข้อมูลที่สามารถเข้าได้กับทั้งเครื่องมือของบริษัท Shimadzu และบริษัท Bruker⁽¹⁷⁾ ข้อมูลล่าสุดในปัจจุบันพบว่าในฐานข้อมูลได้รวบรวมโปรตีนสเปกตรัมของทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ ราสาย และ *Mycobacterium* spp. มากกว่า 2,000 สปีชีส์ โดยมีข้อมูลสเปกตรัมมากกว่า 3,000 แบบ^(17, 21, 22)

สำหรับชนิดของเมทริกซ์ที่ถูกนำมาใช้ได้แก่ alpha-4-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA)⁽²³⁾ สามารถดูดกลืนแสงในช่วงยูวีได้ดี และละลายใน acetonitrile และ trifluoroacetic acid แต่อย่างไรก็ตาม HCCA ก็ไม่ได้เหมาะกับเชื้อแบคทีเรียทุกชนิด โดยพบว่า HCCA เหมาะที่จะใช้กับแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนแกรมบวกนั้นจะเหมาะกับ 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole⁽²⁴⁾ นอกจากนี้ยัง⁽²⁴⁾⁽²⁴⁾ มีการศึกษาพบว่า 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid; SA) สามารถใช้ได้ดีกว่ากับโปรตีนที่มีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับ HCCA⁽²⁵⁾ สำหรับเมทริกซ์ที่ใช้ นั้นเป็นสารเคมีที่สามารถซื้อได้จากบริษัทผู้จำหน่ายสารเคมีทั่วไปโดยไม่ต้องผูกขาดกับบริษัทผู้ผลิตเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติ

ข้อดีของการใช้เครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติ MALDI-TOF MS

ระยะเวลาเฉลี่ยการจำแนกแบคทีเรียด้วย MALDI-TOF MS นับตั้งแต่การนำโคโลนีจากจานเพาะเชื้อมาจนได้โปรตีนสเปกตรัมออกมาใช้เวลาประมาณ 10 - 20 วินาที และใช้เวลาอีกเพียง 15 - 30 วินาทีสำหรับการนำโปรตีนสเปกตรัมไปเทียบกับฐานข้อมูลจนกระทั่งได้ชนิดของแบคทีเรียรายงานออกมา รวมเวลาทั้งหมดแล้วน้อยกว่า 1 นาที⁽¹⁷⁾ ซึ่งรวดเร็วมากเมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิมและเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติยุคแรก **รูปที่ 2** แสดงขั้นตอนการจำแนกแบคทีเรียด้วยเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติ MALDI-TOF MS เปรียบเทียบกับขั้นตอนแบบดั้งเดิม นอกจากนี้ยังมีประโยชน์มากในการนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียที่เจริญช้าเช่น *Mycobacterium* spp.⁽²²⁾ และเชื้อที่จำแนกได้ยากเช่น *Leptospira* spp.⁽²⁶⁾ ก็มีรายงานว่าสามารถจำแนกได้โดยเครื่องนี้ สำหรับค่าใช้จ่ายต่อหนึ่งตัวอย่างแบคทีเรียในการใช้ MALDI-TOF MS นั้นถือว่าต่ำมากเพราะใช้เมทริกซ์เพียง 1 - 2 ไมโครลิตรต่อการทดสอบ โดยโคโลนีของแบคทีเรียและเมทริกซ์จะถูกจุด (spot) ลงบนจานโลหะเป้าหมาย (metal target plate) ที่สามารถกลับมาใช้ใหม่ได้ไม่จำกัดจำนวนครั้ง กล่าวได้ว่าเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติ MALDI-TOF MS นั้นเป็นเทคโนโลยี high-throughput เพราะในหนึ่งครั้งของการวิเคราะห์สามารถจุดโคโลนีของแบคทีเรียลงไปในจานโลหะเป้าหมายได้มากถึง 20 - 60 จุด⁽¹⁷⁾ มีรายงานการศึกษาต้นทุนประสิทธิภาพ (cost-effectiveness) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ความคุ้มค่าของการนำเครื่อง MALDI-TOF MS มาใช้งานทางจุลชีววิทยาคลินิกแทนการใช้วิธีแบบดั้งเดิมในห้องปฏิบัติการแห่งหนึ่งในสหรัฐอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 2011 พบว่าสามารถลดค่าใช้จ่ายได้ 177,090 เหรียญสหรัฐต่อปี⁽²⁷⁾



รูปที่ 2 เปรียบเทียบการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วย MALDI-TOF MS กับวิธีแบบดั้งเดิม ในการจำแนกแบคทีเรียด้วย MALDI-TOF MS นั้นโคโลนีแบคทีเรียจะถูกนำป้ายลงบนแผ่นโลหะเป้าหมายแล้วเติมเมทริกซ์ นำไปวิเคราะห์โดยเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติหลักการ MALDI-TOF MS ผลการวิเคราะห์จะอยู่ในรูปแบบสเปกตรัมของโปรตีนในหน่วยมวลต่อประจุ (mass to charge ratio; m/z) ซึ่งมีความจำเพาะต่อชนิดโปรตีน ซึ่งจะนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแมสสเปกตรัมของโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน และแปลผลการจำแนกของแบคทีเรีย โดยขั้นตอนทั้งหมด (ไม่นับรวมเวลาในการเพาะเชื้อบนอาหาร) ใช้เวลาน้อยกว่าหนึ่งนาที่ ส่วนวิธีการจำแนกแบคทีเรียแบบดั้งเดิมโคโลนีแบคทีเรียจะถูกนำมาทดสอบเบื้องต้นด้วยการย้อมแกรม การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์คาตาเลส หรือทดสอบการมีเอ็นไซม์ไฮโดโครม ซี ออกซิเดสเพื่อจะสามารถเลือกชุดทดสอบทางชีวเคมีที่เหมาะสม แล้วจึงทำการทดสอบด้วยชุดชีวเคมี รวมใช้เวลามากกว่าหนึ่งวัน

ข้อจำกัดของการใช้เครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติ MALDI-TOF MS

แบคทีเรียในกลุ่ม *Acinetobacter baumannii* (Ab) ได้แก่ *A. baumannii*, *A. pittii* และ *A. nosocomialis* ไม่สามารถจำแนกเชื้อในกลุ่ม Ab ออกจากกันได้โดยวิธีการจำแนกแบบดั้งเดิม การศึกษาของ Espinal และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 ทำการเปรียบเทียบผลการจำแนก Ab ด้วยวิธีอ้างอิงได้แก่ วิธี ARDRA (amplified rDNA restriction analysis) วิธี rRNA intergenic spacer (ITS) วิธี recA sequencing และการหาอินสูล์ *bla* (OXA-51) กับเครื่องจำแนกอัตโนมัติ MALDI-TOF MS ของบริษัท Bruker ผลการศึกษาพบว่า MALDI-TOF MS สามารถจำแนก *A. pittii* ออกจาก *A. baumannii* ได้ แต่ไม่สามารถแยก *A. nosocomialis* ออกจาก *A. baumannii* สาเหตุเนื่องจากไม่มีข้อมูลโปรตีนสเปกตรัมของ *A. nosocomialis* ในฐานข้อมูลของบริษัท Bruker⁽²⁸⁾ นอกจากนี้ยังไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียได้จากสิ่งส่งตรวจโดยตรงทำให้ยังต้องเพาะเชื้อเพื่อให้ได้โคโลนีแบคทีเรียก่อนแล้วจึงนำมาจำแนกชนิดด้วย MALDI-TOF MS ซึ่งก็จะมีปัญหาสำหรับแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเชื้อได้ (uncultured bacteria) แม้ว่าจะมีการพัฒนาการจำแนกเชื้อด้วย MALDI-TOF MS จากปัสสาวะโดยตรง กล่าวคือนำปัสสาวะปริมาตร 4 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบต่ำเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดขาวแล้วนำส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบสูงเพื่อตกตะกอนแบคทีเรีย จากนั้นจึงตกตะกอนแบคทีเรียไปวิเคราะห์ พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ได้จากปัสสาวะที่มีเชื้อแบคทีเรีย 10^5 CFU/ml โดยมีความไว (sensitivity) มากกว่าร้อยละ 90 โดยจากการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการจำแนกแบบดั้งเดิม^(29,30) ส่วนการศึกษาเพื่อจำแนกแบคทีเรียโดยตรงจากขวดเลือดเพาะเชื้อเลือดที่ให้สัญญาณผลบวกจากเครื่องเพาะแบคทีเรียจากเลือดอัตโนมัติ (hemoculture automation) ซึ่งมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการทำปัสสาวะแต่เพิ่มขั้นตอนการสกัดโปรตีนจากตะกอนแบคทีเรียที่ได้ด้วยกรดฟอร์มิก (formic acid) และ เอทานอล (ethanol) แล้วจึงนำไปโปรตีนที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ การศึกษานี้พบความไวในการจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์มากกว่าร้อยละ 88 โดยการทำเปรียบเทียบกับการจำแนกแบคทีเรียแบบดั้งเดิม โดยเวลาทั้งหมดนับจากนำเลือดจากขวดเพาะเชื้อมาจนได้ผลการจำแนกนั้นน้อยกว่า 30 นาที^(30, 31) ซึ่งที่กล่าวมาก็มีขั้นตอนการทำงานที่

มากขึ้นและยังไม่มีข้อมูลการศึกษาในสิ่งส่งตรวจชนิดอื่นๆอีก การนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกันก็มีผลกระทบต่อผลการจำแนกแบคทีเรียด้วยเทคนิคนี้ เช่น *Staphylococcus* spp. จากอาหาร colistin-nalidixic acid agar มีผลทำให้อัตราการจำแนกเชื้อกลุ่มนี้ได้ไม่ถูกต้องนักเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โคโลนีเชื้อจาก blood agar⁽¹⁶⁾ แต่ข้อมูลจากการศึกษานี้ไม่สามารถระบุข่าวสารชนิดใดที่ปนเปื้อนแล้วจะมีผลต่อการจำแนก เมื่อเพิ่มขั้นตอนการสกัดตัวอย่างก่อนด้วยกรดฟอร์มิกและเอทานอลก่อนจะนำไปโปรตีนที่สกัดได้ไปตรวจวิเคราะห์จะสามารถเพิ่มความถูกต้องของการจำแนกแบคทีเรียได้ โดยขั้นตอนการสกัดใช้เวลาประมาณ 5 นาที⁽¹⁶⁾ ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าสารปนเปื้อนจากการเพาะเชื้อแบคทีเรียนั้นมีผลต่อการจำแนกด้วย MALDI-TOF MS

ในการนำเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติ MALDI-TOF MS มาใช้ในห้องปฏิบัติการคลินิกในประเทศไทยนั้น เรื่องราคาเครื่องมือที่สูงเป็นปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณา นอกจากนี้ข้อมูลของการบำรุงรักษาและค่าใช้จ่ายของการบำรุงรักษาเครื่องนั้นยังไม่แน่ชัด ดังนั้นห้องปฏิบัติการยังคงต้องทำการศึกษาความคุ้มค่าเพิ่มเติมก่อนที่จะนำมาใช้ทดแทนวิธีการปัจจุบัน

สรุป

การนำ MALDI-TOF MS มาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในงานคาดว่าจะมีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆในอนาคต โดยส่วนใหญ่แล้วจะสามารถนำโคโลนีของแบคทีเรียไปวิเคราะห์ได้โดยตรงไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมหรือสกัดใดๆ เมื่อนับเวลาตั้งแต่นำโคโลนีจากจานเพาะเชื้อจนได้ผลการจำแนกแบคทีเรียออกมาแล้วใช้น้อยกว่า 1 นาที สามารถลดค่าใช้จ่ายในห้องปฏิบัติการได้ในระยะยาว ลดการใช้บุคลากรได้ทั้ง pre-analytical process คือลดการเตรียมชุดชีวเคมี การทดสอบคุณภาพชุดชีวเคมี ในช่วง analytical process ลดจำนวนบุคลากรที่ต้องมาทำการทดสอบ การอ่านผลการทดสอบและแปลผลการทดสอบ ในช่วง post-analytical process สามารถลดปริมาณขยะติดเชื้อจากการปฏิบัติการได้ทำให้ลดค่าใช้จ่ายได้อีกทางหนึ่ง และยังลดความเสี่ยงในการแพร่กระจายเชื้อโรคได้ นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจบางชนิดโดยตรงได้แก่ ปัสสาวะ และเลือดจากขวดเพาะเชื้อจากเลือด แต่อย่างไรก็ตามพบปัญหาเรื่องผลการจำแนกไม่ตรงกันในกรณีที่ใช้โคโลนีของแบคทีเรียจากอาหารต่างชนิด

กัน ซึ่งจะสามารถลดความไม่สอดคล้องนี้ได้ด้วยการสกัดโปรตีนจากแบคทีเรียก่อนนำไปวิเคราะห์ การนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกในประเทศไทยยังคงต้องทำการศึกษาความคุ้มค่าเนื่องจากเครื่องมือมีราคาสูง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อาจารย์จันจิรา มหาบุญ สังเกตสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ในการให้คำชี้แนะการเขียนบทคัดย่อภาษาอังกฤษ

เอกสารอ้างอิง

1. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007.
2. วรณิกา มโนรมณ์, นัยนา วัฒนศรี, สมชัย เจิดเสริมอนันต์. มาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ ๒๕๕๑ สำหรับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: สภาเทคนิคการแพทย์; 2551.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media, CLSI document M22-A3. Wayne, Pennsylvania: CLSI; 2004.
4. Matsen JM, Sherris JC. Comparative study of the efficacy of seven paper-reagent strips and conventional biochemical tests in identifying gram-negative organisms. Appl Microbiol 1969; 18: 452-7.
5. Yu P, Birk RJ, Washington JA. Evaluation of a reagent-impregnated strip for detection of nitrate reduction by bacterial isolates. Tech Bull Regist Med Technol 1969; 39: 257-9.
6. Martin WJ, Bartes SF, Ball MM. Evaluation of reagent-impregnated strips for identification of Enterobacteriaceae. Am J Med Technol 1971; 37: 99-101.
7. Washington JA, Yu PK, Martin WJ. Evaluation of accuracy of multitest micromethod system for identification of Enterobacteriaceae. Appl Microbiol 1971; 22: 267-9.
8. O'Hara CM. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 147-62.
9. Petti CA, Bhalley HS, Weinstein MP. Systems for detection and identification of bacteria and yeasts. In: Versalovic J, ed. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington, DC: ASM; 2011; 15-26.
10. Woods GL. Automation in clinical microbiology. Am J Clin Pathol 1992; 98 (Suppl 1): S22-30.
11. Tierno PM, Jr., Hanna BA. Automated and rapid methods in clinical microbiology: past, present and future. Clin Lab Med 1988; 8: 643-51.
12. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem 1975; 47: 219-25.
13. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. Nat Biotechnol 1996; 14: 1584-6.
14. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1996; 10: 1227-32.
15. Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nat Rev Microbiol 2010; 8: 74-82.
16. Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, Parsons LN, Gnancinski S, Ledebor NA. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2012; 50: 1008-13.
17. Lavigne JP, Espinal P, Dunyach-Remy C, Messad N, Pantel A, Sotto A. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology ? Clin Chem Lab Med 2012; 36: 1-14.

18. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem* 2011; 44: 104-9.
19. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One* 2008; 3: e2843.
20. Prod'homme G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1481-3.
21. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1169-75.
22. Wang J, Chen WF, Li QX. Rapid identification and classification of *Mycobacterium* spp. using whole-cell protein barcodes with matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in comparison with multigene phylogenetic analysis. *Anal Chim Acta* 2012; 716: 133-7.
23. Zhou P, Altman E, Perry MB, Li J. Study of matrix additives for sensitive analysis of lipid A by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 3437-43.
24. Evason DJ, Claydon MA, Gordon DB. Exploring the limits of bacterial identification by intact cell-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2001; 12: 49-54.
25. Fagerquist CK, Garbus BR, Williams KE, Bates AH, Harden LA. Covalent attachment and dissociative loss of sinapinic acid to/from cysteine-containing proteins from bacterial cell lysates analyzed by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2010; 21: 819-32.
26. Djelouadji Z, Roux V, Raoult D, Kodjo A, Drancourt M. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms. *Vet Microbiol* 2012; 158: 142-6.
27. Gaillot O, Blondiaux N, Loiez C, Wallet F, Lemaitre N, Herwegh S, et al. 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.
28. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 1097-103.
29. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2110-5.
30. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Munoz-Bellido JL, Gonzalez-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1007-12.
31. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Porras-Guerra I, Garcia-Garcia MI, Garcia-Sanchez JE, Gonzalez-Buitrago JM, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 546-51.