

Effects of Cadmium on Peptide Profiles and Biotyper Score Value of *Escherichia coli* O157:H7 Identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF/MS)

Kornkanok Wongprasert¹ Supitcha Pannengpetch² Tuangrat Kumar³
Pennapaporn Songthong³ Nitaya Indrawattana⁴ and
Patcharee Isarankura-Na-Ayudhya^{*1, 3}

¹Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Campus, Pathum Thani Province Thailand

²Center for Research and Innovation, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Campus, Pathum Thani Province Thailand

⁴Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University,
Bangkok, Thailand

Abstract

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF/MS) based biotyping is a high-throughput technique for microbial identification. It has been used to replace existing cultivation techniques in clinical diagnosis laboratory in many hospitals of Thailand. On another aspect, contamination of foods by various kinds of heavy metals is a major inevitable situation in Thailand. However, there has been no report on the effects of heavy metals such as cadmium ions on expression pattern of peptides and biotyper score value upon identification of bacterial genus and species by MALDI-TOF MS. Herein, we studied the Maldi-TOF peptide profiles and biotyper score value of the important pathogenic bacteria *Escherichia coli* O157:H7 culturing in various concentrations of CdCl₂ ranging from 0.0016 mM to 1 mM, which was previously shown to cover all the concentrations under and over of heavy metal tolerant ability. Under the cadmium stress condition, MALDI-TOF MS can

*Corresponding author E-mail address: pujonoy@hotmail.com

specify the type of *E. coli* O157:H7 and provide a reliable score. The score values were trendy decreasing with the increasing CdCl_2 concentrations ($p < 0.005$). In conclusion, the results showed a drastic effect of cadmium ions on the peptide pattern identified by MALDI-TOF MS while exerting no significant effect on the score values used for the genus, species or strain identification. This study provides information and confidence for laboratory personnel who work with the MALDI-TOF/MS in identifying the pathogenic bacteria isolated from the areas that are suspected to be contaminated with heavy metals.

Keywords: MALDI-TOF MS, Cadmium, *E. coli* O157:H7, MALDI Biotyper, Biotyper score

ผลกระทบของแคดเมียมต่อรูปแบบการแสดงออกของเปปไทด์ และค่าคะแนน biotyper ในการวิเคราะห์หาชนิดเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ด้วยเครื่อง Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS)

กรกนก วงศ์ประเสริฐ¹ สุพิชญ์ ปั่นแห่งเพชร² ดวงรัตน์ กุมาร³ เพ็ญภาพร ทรงทอง³
นิตยา อินทราวัฒนา⁴ และพัชรี อิศรางกูร ณ อยุธยา^{*1, 3}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรม คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

⁴ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

เครื่อง Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) เป็น high-throughput techniques ที่สามารถนำมาใช้ระบุชนิดของแบคทีเรียได้ ในประเทศไทยได้เริ่มมีการนำมาใช้แทนเทคนิคดั้งเดิมแล้ว และโดยที่ปัจจุบันยังพบการปนเปื้อนโลหะหนักต่าง ๆ รวมทั้งแคดเมียมในอาหารและน้ำดื่มในประเทศไทย แต่ยังไม่มีการรายงานผลกระทบของแคดเมียมต่อรูปแบบเปปไทด์ที่แสดงออก รวมถึงผลกระทบต่อค่า biotyper score ที่ใช้ในการระบุจีโนสและสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแคดเมียมที่มีต่อรูปแบบมวลเปปไทด์ และค่า biotyper score ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่เจริญในอาหารผสมแคดเมียมที่ความเข้มข้นมากกว่าและน้อยกว่าค่า metal tolerance test ได้แก่ช่วง 0.0016 - 1 มิลลิโมลาร์ แคดเมียม-คลอไรด์ (CdCl_2) โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF MS จากการวิเคราะห์พบว่าแคดเมียมมีผลต่อรูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 โดยค่า biotyper score มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของแคดเมียมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.005$) แต่ยังสามารถวิเคราะห์หาจีโนสและสปีชีส์ได้อย่างถูกต้อง ความรู้จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้เข้าใจผลของแคดเมียมต่อการวิเคราะห์ระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้มาจากพื้นที่ที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อน

คำสำคัญ: MALDI-TOF MS, Cadmium, *E. coli* O157:H7, MALDI Biotyper, Biotyper score

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: pujonoy@hotmail.com

รับบทความ: 20 มิถุนายน 2562

แก้ไขบทความ: 24 พฤศจิกายน 2562

รับตีพิมพ์บทความ: 24 กุมภาพันธ์ 2563

1. บทนำ

Escherichia coli O157:H7 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง จัดเป็นกลุ่มย่อยของ *Escherichia coli* ที่สามารถก่อโรค จัดเป็นกลุ่ม Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) และจัดเป็น Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) เนื่องจากสามารถสร้างสารพิษชิกา (Shiga toxin) ที่ทำลายเซลล์ผนังลำไส้ได้ ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารอย่างรุนแรง ทำให้มีไข้ อาเจียน ท้องร่วงอย่างรุนแรง และมีอาการแทรกซ้อนทางโลหิตวิทยาที่สำคัญคือ hemolytic uremic syndrome (HUS) อันเป็นสาเหตุของไตล้มเหลว (renal failure) ในเด็ก⁽¹⁾ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดภาวะ thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) คือเม็ดเลือดแดงแตกและไตวาย (hemolytic uremic syndrome) ซึ่งถือเป็นภาวะอันตรายและเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตโดยเฉพาะในกลุ่มเด็กเล็กและผู้สูงอายุ⁽²⁾ จากการศึกษาพบว่าผู้เสียชีวิตเป็นแหล่งสะสมของเชื้อ *E. coli* O157:H7 มากที่สุดและสามารถแพร่เชื้อสู่คนผ่านการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนอุจจาระของสัตว์หรือคนที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ เช่น เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์จากนม ผลไม้ พืชผักสด และอาหารที่มีการปนเปื้อนน้ำจากบ่อน้ำหรือแหล่งน้ำสาธารณะ สำหรับการระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2559 มีรายงานผลตรวจการปนเปื้อน *E. coli* O157:H7 ในเนื้อวัวเก็บจากตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร 17 แห่ง และปริมาณ 11 แห่ง จำนวน 58 ตัวอย่าง พบเชื้อ *E. coli* O157:H7 ร้อยละ 15.5⁽³⁾ การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อระบุชนิดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ประกอบด้วยขั้นตอนการเพาะเชื้อ การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี การทดสอบหาสารพิษ (toxin) และการยืนยันด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น real time-PCR ซึ่งมีหลายขั้นตอนและใช้เวลานาน ปัจจุบันมีการนำเครื่อง Matrix-Assisted Laser

Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) มาใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เนื่องจากสามารถระบุชนิดเชื้อถึงระดับจีโนม สปีชีส์ ได้รวดเร็ว มีความไวและมีความแม่นยำสูง^(4, 5) ทำให้เกิดความรวดเร็วในการวินิจฉัยโรค MALDI-TOF MS แยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียออกจากกันได้โดยอาศัยรูปแบบมวลเปปไทด์สายสั้น (peptide mass fingerprint หรือ peptide barcode) โดยส่วนใหญ่พบว่าเปปไทด์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบของ housekeeping proteins, ribosomal protein หรือ โปรตีนอื่นๆ ที่มีขนาดเล็กประมาณ 2,000-15,000 ดาลตัน (Da) และมีจำนวนมากภายในเซลล์ ซึ่งจะถูกแยกจากกันโดยค่ามวลต่อประจุ (mass/charge; M/Z) ที่ต่างกันภายใต้ระบบสุญญากาศ⁽⁶⁾ ทั้งนี้เนื่องจากเครื่องมีความไวสูง ดังเห็นได้จากผลงานวิจัยที่พบว่าเครื่อง MALDI-TOF MS สามารถแยก เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ single point mutation ออกจากเชื้อกลุ่มควบคุมได้⁽⁷⁾

แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูงสามารถทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS)^(8, 9) ทำลายดีเอ็นเอ ยับยั้งกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิกและโปรตีนภายในเซลล์ได้^(9, 10) จากการศึกษาจีโนมของเชื้อ *E. coli* ที่เติบโตในภาวะที่มีแคดเมียมด้วยเทคนิค high-density oligonucleotide microarray (affymetrix) พบว่าความเป็นพิษของแคดเมียมยับยั้งการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่ระดับการถอดรหัส เช่น ลดการสร้าง mRNA ของยีน r-protein และ zinc-binding protein⁽¹¹⁾ สำหรับการศึกษาในระดับโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบว่า แคดเมียมส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในแบคทีเรียอย่างชัดเจน แบคทีเรีย *E. coli* ผลิตโปรตีนหลายชนิดเพื่อตอบสนองต่อแคดเมียม โดยเฉพาะโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับความเครียด

อีกชนิดที่พบ ความร้อน ความเย็นหรือแรงดันออสโมติก^(12, 13) นอกจากนี้ยังพบว่า *E. coli* มีกลไกการตอบสนองต่อเคดเมียมโดยการสะสมเคดเมียมที่เชื้อหุ้มเซลล์⁽¹⁴⁾ การศึกษาของ Craig และคณะพบว่า *E. coli* K-12 (MG1655) ตอบสนองต่อเคดเมียมโดยการสร้าง mRNA ของยีน *hdeA* *otsA* และ *yjbJ* หลังจากได้รับเคดเมียมเพียง 5 นาที และยังพบการเพิ่มขึ้นของ mRNA ยีน ATP-driven (*ycfU*) ที่อาจใช้ขนส่งเคดเมียมออกจากเซลล์⁽¹⁵⁾ จึงสันนิษฐานว่าเคดเมียมน่าจะมีผลต่อรูปแบบมวลเปปไทด์ของแบคทีเรียคล้ายกับรายงานวิจัยผลของโลหะหนักสังกะสี แคดเมียม ตะกั่ว ทองแดง และเงิน ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบมวลเปปไทด์ของ *Staphylococcus aureus* เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS⁽¹⁶⁾ เนื่องจากประเทศไทยยังประสบปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักเคดเมียมจากการปล่อยน้ำเสียทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและการทำเหมืองแร่ ส่งผลให้มีเคดเมียมสะสมในสิ่งแวดล้อม โดยมีรายงานพบเคดเมียมเกินมาตรฐานในหอยเชลล์ที่ใช้บริโภค (*Amusium pleuronectes*)⁽¹⁷⁾ ข้าว⁽¹⁸⁾ หมู และไคหมู ผัก⁽¹⁹⁾ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานวิจัยผลกระทบของเคดเมียมที่ปนเปื้อนจากอาหารว่าจะมีผลต่อระดับโปรตีนของเชื้อก่อโรคที่สำคัญเช่น *E. coli* O157:H7 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS หรือไม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเคดเมียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อรูปแบบมวลเปปไทด์และค่า biotyper score ที่ใช้ระบุชนิดของแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะทำให้ทราบผลกระทบของเคดเมียมต่อการระบุชนิดของแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 และรูปแบบมวลเปปไทด์ของแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงตอบสนองต่อเคดเมียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง MALDI-TOF

MS ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ต่อไป

2. วิธีการทดลอง

การทดสอบหาความสามารถการทนต่อโลหะของเชื้อ (heavy metals tolerance test)

นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 โคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหย้าแบบหมุนความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 ซึ่งเท่ากับ 0.5 McFarland นำมาเจือจางในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB ในอัตราส่วน 1:10 หลังจากนั้นหยดตัวอย่างแบคทีเรียปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีและมีส่วนเคดเมียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 มิลลิโมลาร์ ก่อนนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ความเข้มข้นสุดท้ายของเคดเมียมคลอไรด์ ที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ถือเป็นค่า heavy metals tolerance test⁽²⁰⁾

วิธีสกัดโปรตีนแบบ direct transfer, extended direct transfer และ extraction

นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาทดสอบจำแนกชนิดเชื้อด้วย MALDI-TOF MS โดยนำแต่ละโคโลนีมาแยกวิเคราะห์ทั้งหมด 3 โคโลนีในลักษณะ technical replicates โดยเปรียบเทียบวิธีเตรียมตัวอย่าง 3 วิธีดังนี้

การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี direct transfer ใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มเชื้อแบคทีเรียแยกเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ป้ายลงบน MALDI target plate และ

หยดสารละลายกรดแอลฟา-ไฮยาโน-4-ไฮดรอกซี
ซินนามิก (HCCA) ที่ละลายใน อะซิโตนไตรล
เข้มข้น 50%/กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) เข้มข้น
2.5% ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทับลงบนเชื้อที่ป้ายบน
MALDI target plate และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี extended direct
transfer ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแยกเดี่ยวบน
อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ป้ายลงบน MALDI target
plate และหยดสารละลายฟอร์มิคเข้มข้น 70%
ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทับลงบนเชื้อที่ป้ายบน
MALDI target plate ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
หลังจากนั้นหยดสารละลาย HCCA ใน อะซิโตนไตรล
เข้มข้น 50% / TFA เข้มข้น 2.5% ปริมาตร 1
ไมโครลิตร ทับลงบนเชื้อที่ป้ายบน MALDI target
plate และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง การเตรียม
ตัวอย่างด้วยวิธี extraction ปาดเชื้อแบคทีเรียแยก
เดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งให้ได้ปริมาณ 5-10
มิลลิกรัม ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิตร
ที่มีน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทำให้
เชื้อกระจายตัวดีด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
เติมเอธานอล 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป
ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีนาน
2 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือไว้แต่ส่วนที่เป็น
ตะกอน และเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ให้เอธานอลระเห
ยจนหมด ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายกรด
ฟอร์มิคเข้มข้น 70% ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสม
ให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร และเติมอะซิโตนไตรล
เข้มข้น 100% ลงไป 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 2 นาที หลังจาก
นั้นดูดสารละลายส่วนใส 1 ไมโครลิตร หยดลงบน
MALDI target plate ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
และหยดสารละลาย HCCA ที่ละลายในอะซิโตนไตรล
เข้มข้น 50% / TFA เข้มข้น 2.5% ปริมาตร 1
ไมโครลิตร ทับลงไป และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

หลังจากนั้นนำตัวอย่างเปปไทด์ที่เตรียมจาก
เซลล์แบคทีเรียทั้ง 3 วิธีไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง
MALDI-TOF MS รุ่น Maldi Biotyper (Bruker,
Germany) โดยปรับเทียบความถูกต้องของเครื่องด้วย
เปปไทด์มาตรฐานของ *Escherichia coli* สายพันธุ์
DH5 α ที่มีอัตราส่วนมวลต่อประจุของเปปไทด์
เท่ากับ 5098, 5381, 6255, 7274, 10300, 13683
และ 16952 ก่อนทุกครั้ง การเก็บข้อมูลเปปไทด์ใน
โหมด sum เป็นการรวมข้อมูลรูปแบบน้ำหนักโมเลกุล
เปปไทด์ของตัวอย่างแบคทีเรียจาก 3 หลุมบน MALDI
target plate และนำไปเปรียบเทียบกับรูปแบบ
มวลเปปไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล (Bruker
database version 3.0) ความน่าเชื่อถือของผลการ
ทดสอบรายงานเป็น biotyper score โดยถ้ามากกว่า
หรือเท่ากับ 2.0 ขึ้นไปมีความน่าเชื่อถือระดับสปีชีส์
สำหรับ biotyper score ตั้งแต่ 1.7 ขึ้นไปแต่น้อยกว่า
2.0 มีความน่าเชื่อถือระดับจิ้นัส แต่ถ้าน้อยกว่า 1.7
ไม่สามารถรายงานผลได้⁽²¹⁾

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลวผสม
แคดเมียมสำหรับวิเคราะห์รูปแบบมวลเปปไทด์
ด้วยเทคนิค Matrix-Assisted Laser Desorption
Ionization-Time of Flight (หรือ MALDI
Biotyper)

นำเชื้อ *E. coli* O157:H7 มาเลี้ยงบน LB
agar ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นเขี่ยเชื้อจำนวน
3 โคโลนีจากคนละจานเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นการควบคุม
ผลการทดลองในลักษณะ technical replicates
นำไปเลี้ยงใน LB broth แยกกันแต่ละหลอด บ่มเพาะ
ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการดูด
กลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับ
ความเข้มข้นเชื้อให้ได้ประมาณ 1×10^9 ซีเอฟยูต่อ
มิลลิตร (CFU/mL) หลังจากนั้นเติมสารละลาย
แคดเมียมคลอไรด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความ
เข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.0016, 0.008, 0.04, 0.2, 0.5

และ 1 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส เจาะที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บเชื้อที่เวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง โดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บส่วนตะกอนเซลล์ส่วนหนึ่งไว้ศึกษารูปแบบมวลเปปไทด์ และทดสอบการอยู่รอดของเชื้อโดยการหยดเชื้อปริมาตร 4 ไมโครลิตรบน LB agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเพื่อสังเกตการอยู่รอดของเชื้อหลังได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่ไม่ได้รับแคดเมียม

เตรียมตัวอย่างเปปไทด์จากตะกอนเซลล์ ด้วยวิธี extraction โดยเติมสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรลงในตะกอนเซลล์ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติมสารละลายกรดฟอร์มิกเข้มข้น 70% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนโดยใช้ไปเปิดดูดขึ้นลง หลังจากนั้นเติมอะซิโตนในทริลเข้มข้น 100% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนใสมาหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง nanodrop ปรับความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่างให้ได้เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นก่อนผสมกับสารละลาย HCCA ที่ละลายในอะซิโตนในทริลเข้มข้น 50% /กรดไตรฟลูออโรอะซิติกเข้มข้น 2.5% ด้วยอัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นหยดตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงบน MALDI target plate แต่ละตัวอย่างจะหยดซ้ำ 5 หยด ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ultraflex III TOF/TOF mass spectrometer (Bruker, Germany) ใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เป็นเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบค่า biotyper score ของเชื้อแบคทีเรียในภาวะที่ไม่ได้รับแคดเมียม (กลุ่มควบคุม) กับภาวะที่มีแคดเมียม อิงตามสถิติ ANOVA โดยใช้ GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., la jolla, CA, USA) วิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบมวลเปปไทด์ด้วยโปรแกรม Bruker FlexAnalysis 3.0 วิเคราะห์ค่าความเหมือนระหว่างรูปแบบมวลเปปไทด์ของตัวอย่างกับรูปแบบมวลเปปไทด์ในฐานข้อมูล version 3.3.1.0 (4,613 entries) ด้วยโปรแกรม Bruker Biotyper 3.0 แล้ววิเคราะห์ principal component analysis (PCA) และ cluster analysis ด้วยโปรแกรม Bruker ClinProTools version 2.2 อิงตามสถิติ Wilcoxon/Kruskal-Wallis, Anderson-Darling (AD), t-test/ANOVA (TTA) โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p - value น้อยกว่า 0.05

3. ผลการทดลอง

การทดสอบวิธีสกัดเปปไทด์จากเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้วิเคราะห์รูปแบบมวลเปปไทด์ด้วย MALDI-TOF MS

ทดสอบหาวิธีสกัดเปปไทด์ที่เหมาะสมโดยใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 แล้ววิเคราะห์รูปแบบมวลเปปไทด์ด้วยเครื่อง MALDI Biotyper (Bruker, Germany) โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง 3 วิธี direct transfer, extended direct transfer และ extraction โดยใช้โปรแกรม Bruker Biotyper 3.0 software และ library version 3.3.1.0 (4,613 entries) พบว่าวิธีที่ให้จำนวนเปปไทด์มากที่สุดคือ วิธี extraction ที่พบสัญญาณเปปไทด์จำนวน 102 เปปไทด์ และสามารถระบุชนิดของเชื้อเป็น *E. coli* ATCC 25922 ที่ score เท่ากับ 2.077 วิธีที่ให้จำนวนสัญญาณ

เปปไทด์รองลงมาคือ วิธี extended direct transfer ที่ตรวจพบสัญญาณเปปไทด์จำนวน 93 เปปไทด์ สามารถระบุชนิดของเชื้อเป็น *E. coli* ATCC 25922 ที่ biotyper score เท่ากับ 2.148 ส่วนวิธี direct transfer ตรวจพบสัญญาณเปปไทด์เพียง 87 เปปไทด์ ระบุชนิดของเชื้อเป็น *E. coli* ATCC 25922 ที่ biotyper score เท่ากับ 2.196 จึงสรุปได้ว่าวิธีสกัด

เปปไทด์จากเซลล์เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่ให้ผลดีที่สุด คือ วิธี extraction เนื่องจากสกัดได้เปปไทด์จำนวนมากที่สุด และยังคงสามารถระบุชนิดของเชื้อเป็น *E. coli* ATCC 25922 ด้วยค่า biotyper score ที่น่าเชื่อถือ ผลรูปแบบมวลเปปไทด์ของทั้ง 3 วิธีแสดงใน Fig. 1

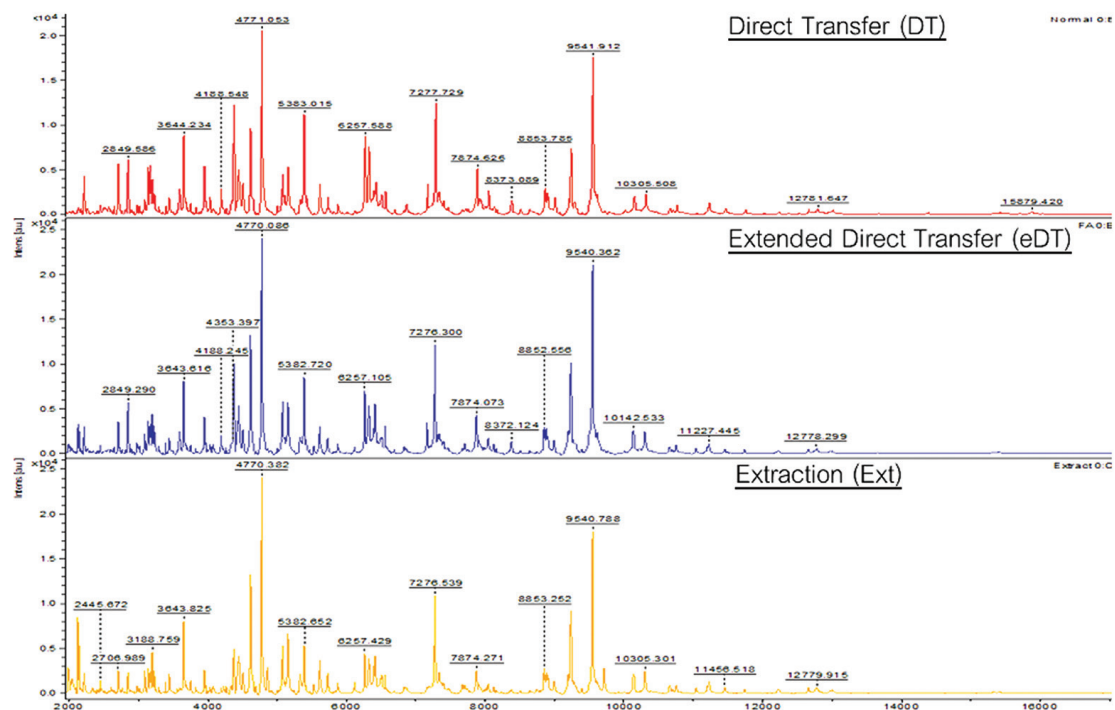


Fig. 1 MALDI-TOF mass spectra of whole-cell extracts of *E. coli* ATCC 25922 obtained from three different peptide: extraction methods: Direct Transfer Procedure, Extended Direct Transfer Procedure and Extraction Procedure. Absolute intensities of the ions are represented in y-axis and the masses (m/z) of the ions are shown on the x-axis

การวิเคราะห์รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการทดสอบหาค่า heavy metals tolerance test ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 พบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของแคดเมียมคลอไรด์ ที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้คือ 0.2 มิลลิโมลาร์ เพื่อศึกษาผลของแคดเมียมต่อรูปแบบมวลเปปไทด์จึงได้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนได้จำนวนเชื้อประมาณ 1×10^9 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายแคดเมียมให้มีความเข้มข้นครอบคลุมค่า heavy metals tolerance test โดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli*

O157:H7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 0.0016, 0.008, 0.04, 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ผลการทดสอบการอยู่รอดของเชื้อพบว่าหลังจากที่เชื้อเจริญในอาหารที่มีสารละลายแคดเมียมทั้ง 6 ความเข้มข้นเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เชื้อทั้งหมดยังคงสามารถเจริญเติบโตต่อใน LB agar ได้

จากผลการทดลอง Table 1 แสดงผลการวิเคราะห์หารูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่เจริญภายใต้ความกดดันจากพิษของแคดเมียมเข้มข้น 0.0016-1.0 มิลลิโมลาร์ ด้วยเครื่อง MALDI-TOF โดยเปรียบเทียบรูปแบบมวลเปปไทด์ช่วง 2,000-18,000 (m/z) และมี signal-to-noise ratio มากกว่า 5 พบว่า แคดเมียมคลอไรด์ ทุกความ

Table 1 Mean biotyper score values of *E. coli* O157:H7 after exposure to various concentrations of CdCl_2

Cd concentration				
(mM Cd)	Score value (mean)	SD	Number of spots	P value
Control	2.58	0.036	15	--
0.0016	2.54	0.024	13	0.0022
0.008	2.55	0.044	13	0.0578
0.04	2.54	0.003	13	0.0039
0.2	2.54	0.003	13	0.0039
0.5	2.52	0.003	13	0.0001
1	2.46	0.003	13	0.0175

เข้มข้นไม่มีผลต่อการวิเคราะห์จีโนมและสปีชีส์ ของ *E. coli* O157:H7 โดยยังคงมีค่า biotyper score ตั้งแต่ 2.00 ขึ้นไป อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมค่า biotyper score มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ค่า biotyper score

ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุมมากที่สุด ($p \leq 0.05$) รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อเมื่อได้รับพิษของแคดเมียมจะมีการเปลี่ยนแปลงของเปปไทด์ช่วง 2000-3000, 4000-5000, 7000-8000 m/z ดังแสดงใน Fig. 2 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย principal component analysis และ dendrogram พบว่าที่ความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์ ช่วง 0.0016-

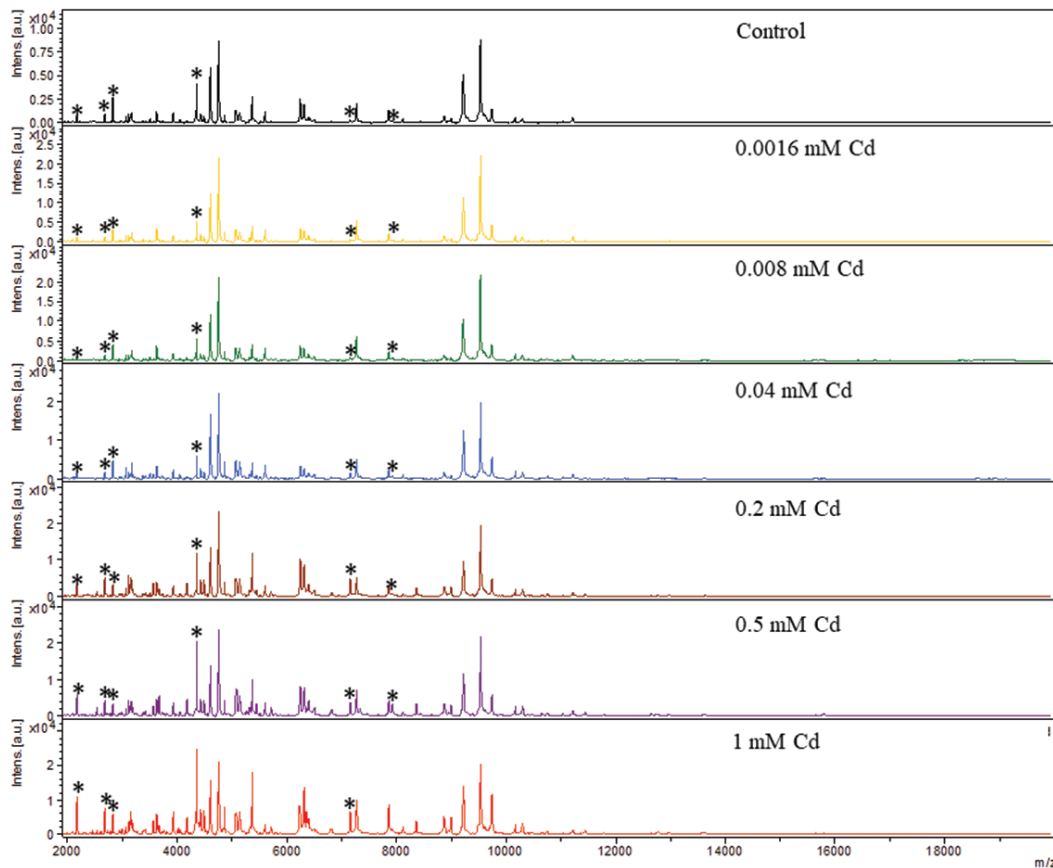


Fig. 2 Mass-to-charge ratio (m/z) spectra in the m/z range of 2–18 KDa of *E. coli* O157:H7 identified by MALDI-TOF Bruker Biotyper after exposure to various concentrations of CdCl_2 for 18 hours. Asterisks represent difference of spectra peaks among control and cadmium treatments

0.04 มิลลิโมลาร์ รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อจะไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และสามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบมวลเปปไทด์เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีแคดเมียมคลอไรด์ เข้มข้นมากกว่า 0.2 มิลลิโมลาร์ ออกจากกลุ่มควบคุมได้อย่างชัดเจน (Fig. 3A, 3B) แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เครื่อง MALDI-TOF MS วิเคราะห์รูปแบบมวลเปปไทด์ของแบคทีเรียเพื่อศึกษาการตอบสนองต่อความเครียดจากพิษโลหะหนักแคดเมียมได้

4. วิจัยนผลการศึกษา

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการประเมินผลของโลหะหนักแคดเมียมต่อการระบุชนิดของ *Escherichia coli* O157:H7 ด้วยเครื่อง matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ปัจจุบันมีการนำเครื่อง MALDI-TOF MS มาใช้ในห้องปฏิบัติการทางเทคนิคการแพทย์มากขึ้น เนื่องจากมีความไวและความแม่นยำสูง ออกผลการระบุชนิดของแบคทีเรียได้รวดเร็ว และมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก อย่างไรก็ตามสิ่งที่ต้องระวังที่เป็น

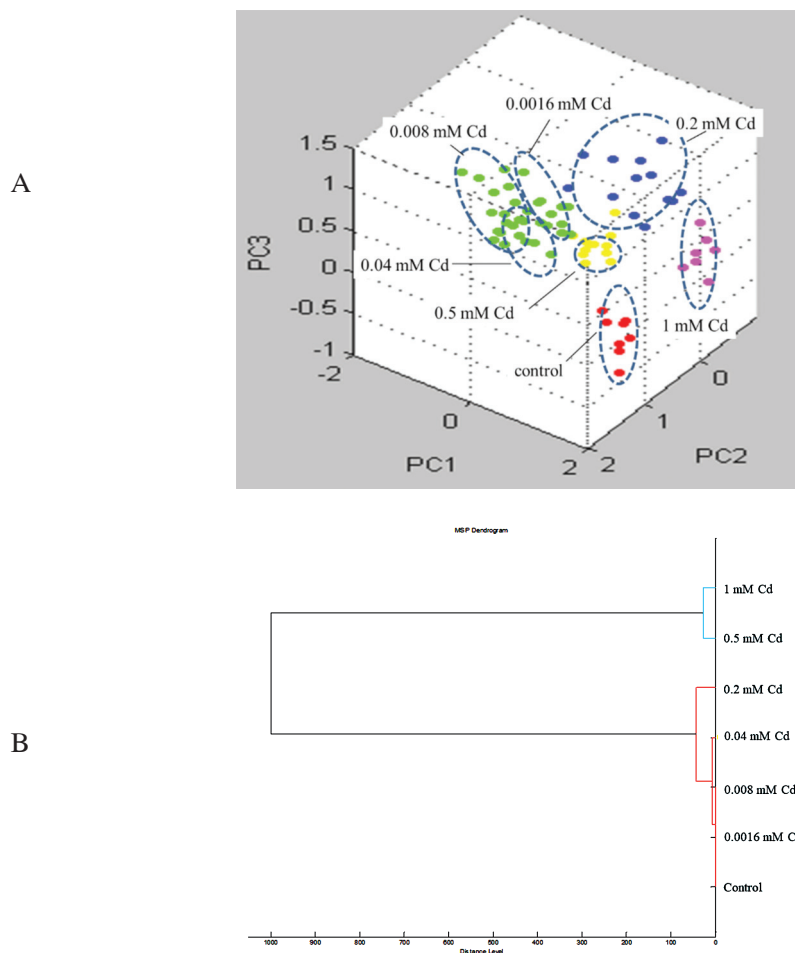


Fig. 3 Principal component analysis (PCA) and cluster analysis of *E. coli* O157:H7 after exposure to various concentrations of CdCl_2 for 18 hours. A) total mass spectra analyzed by PCA analysis showed intermixture (0.016 mM, 0.008 mM and 0.04 mM CdCl_2) and separated groups among the control, 0.2 mM, 0.5 mM and 1 mM. The contributions of PC1, PC2 and PC3 were around 58%, 14% and 9%, correspondingly. B) Cluster analysis constructed from the scores of PCA shows two cluster groups according to cadmium concentrations at higher and lower ranges of the metal tolerance ability. Numbers shown in x-axis revealed the distance level of tested treatment conditions

อุจจาระมักมีโอกาสนปนเปื้อนด้วยโลหะหนักต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูงอย่าง แคดเมียม การประเมินผลกระทบของสิ่งปนเปื้อน เช่น โลหะหนักแคดเมียม ต่อกระบวนการวิเคราะห์

ระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ยังมีการศึกษาไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับ เชื้อ *E. coli* O157: H7 ที่มีความรุนแรงและนำไปสู่ การเสียชีวิตของผู้ป่วย มีการระบาดทั้งในและนอก

ประเทศ จึงต้องมีการเฝ้าระวังการระบาดอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับ *E. coli* O157:H7 ซึ่งได้แก่ การทดสอบทางชีวเคมี ร่วมกับวิธีทาง immunology เพื่อหา toxin ของเชื้อด้วยแอนติบอดีและการยืนยันด้วยการวิเคราะห์จีโนม (genome analysis)⁽³⁾ มีหลายขั้นตอนและใช้เวลา

มาก
ปรีชาติ⁽²²⁾ ได้รายงานไว้ว่า MALDI-TOF มีความสามารถในการวิเคราะห์ชนิดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกรูปร่างกลมได้แม่นยำกว่าการเพาะเลี้ยงแบบวิธีดั้งเดิม เช่น การระบุชนิดเชื้อ *Enterococcus* spp. มีความถูกต้องร้อยละ 100 ในขณะที่วิธีการเพาะเลี้ยงถูกต้องร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการทดสอบ MALDI-TOF MS ใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 8 นาที ในขณะที่วิธีดั้งเดิมใช้เวลาเฉลี่ย 24-48 ชั่วโมง ค่าใช้จ่ายในการทดสอบด้วย MALDI-TOF MS ถูกกว่าวิธีดั้งเดิม 16 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ในต่างประเทศ^(23, 24) อย่างไรก็ตามเนื่องจากเครื่อง MALDI-TOF มีความไวสูง และมีหลักการประมวลผลโดยใช้รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อ ซึ่งมีความจำเพาะสำหรับแบคทีเรียแต่ละชนิด ทำให้สามารถจำแนกชนิดได้จนถึงระดับสปีชีส์ และเนื่องจากแบคทีเรียมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงโปรตีนหรือเปปไทด์เพื่อตอบสนองต่อสภาวะต่างๆ จึงมีการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเปปไทด์และประยุกต์ใช้รูปแบบมวลเปปไทด์เพื่อศึกษาการตอบสนองของแบคทีเรียต่อความเครียด⁽²⁵⁻²⁷⁾ จากการประเมินวิธีสกัดเปปไทด์จากเซลล์แบคทีเรียมาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922 พบว่า วิธีสกัดเปปไทด์ทั้ง 3 วิธีคือ direct transfer, extended direct transfer และ extraction สามารถระบุจิ้นส์และสปีชีส์ได้ถูกต้องไม่แตกต่างกัน ให้ผล biotyper score ความเชื่อมั่นอยู่ในช่วงเดียวกันคือมากกว่า 2.00 สำหรับการใช้งานทางเทคนิคการแพทย์เพื่อจำแนกหรือระบุชนิด

ของแบคทีเรียสามารถเลือกใช้วิธีใดก็ได้ แต่วิธี extended direct transfer มีขั้นตอนการสกัดเปปไทด์จากตัวอย่างน้อยกว่าและใช้เวลาน้อยกว่า

วิธีสกัดแบบ extraction สามารถสกัดเปปไทด์จากเซลล์แบคทีเรียมาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922 ได้จำนวนมากที่สุดคือ 102 เปปไทด์ ในขณะที่วิธี direct transfer (DT) และ extended direct transfer (eDT) สกัดเปปไทด์ได้จำนวน 87 และ 97 เปปไทด์ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Schulthess *et al.*⁽²⁸⁾ การที่วิธี extraction และ extended direct transfer สกัดได้จำนวนเปปไทด์มากกว่าอาจเป็นผลจากการเติมกรดฟอร์มิก ที่ช่วยลดการรบกวนจากสารที่ไม่ใช่เปปไทด์ จึงสามารถเพิ่มอัตราความสำเร็จในการระบุจำแนกชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราได้ถึงร้อยละ 85 และ ร้อยละ 60 ตามลำดับ^(28, 29) ดังนั้นคณะวิจัยจึงเลือกใช้วิธี extraction มาพัฒนาให้ดีขึ้นโดยเพิ่มขั้นตอนวัดปริมาณเปปไทด์ด้วยเครื่อง nanodrop แล้วปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ก่อนผสมกับสารละลายกรดแอลฟา-ไซยานอ-4-ไฮดรอกซีซินนามิก เพื่อลดความผิดพลาดจากการใช้ปริมาณเปปไทด์ไม่เท่ากันในแต่ละตัวอย่าง ทำให้สามารถคำนวณเปรียบเทียบเชิงปริมาณได้ถูกต้องยิ่งขึ้น รวมถึงเป็น gold standard สำหรับสร้างฐานข้อมูลรูปแบบมวลเปปไทด์ของจุลินทรีย์ชนิดใหม่

จากการศึกษาผลของแคดเมียมช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.0016 - 1 มิลลิโมลาร์ ต่อค่า biotyper score ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 พบว่า แคดเมียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.0016 มิลลิโมลาร์ และ 0.008 มิลลิโมลาร์ ซึ่งน้อยกว่าหรือใกล้เคียงกับค่าความปลอดภัยที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (0.0071 มิลลิโมลาร์ ต่อวัน)⁽³⁰⁾ ส่งผลให้รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 เปลี่ยนไปจนแตกต่าง

จากกลุ่มควบคุม (0 มิลลิโมลาร์) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์ เป็น 0.04 มิลลิโมลาร์ รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อยังคงไม่แตกต่างจากที่ความเข้มข้น 0.0016 มิลลิโมลาร์ และ 0.008 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงใน Fig. 4 คาดว่าความเป็นพิษของแคดเมียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.0016 - 0.04 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เชื้อต้องปรับตัวด้วยกลไกการตอบสนองทางชีวโมเลกุลระดับเปปไทด์คล้ายคลึงกัน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์เป็น 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อจะไม่คล้ายกับเมื่อได้รับแคดเมียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำอีกต่อไป แต่จะมีลักษณะเปลี่ยนแปลงจนแตกต่างอย่างจำเพาะ แสดงว่าเมื่อสัมผัสกับแคดเมียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.04 มิลลิโมลาร์ เชื้อ *E. coli* O157:H7 จะตอบสนองต่อแคดเมียมแตกต่างไปจากเดิมและมีความจำเพาะขึ้นตามความรุนแรงของพิษแคดเมียมที่ได้รับ

ผลการวิจัยชิ้นนี้พบการเปลี่ยนแปลงของเปปไทด์ขนาด 2000-3000, 4000-5000 และ 7000-8000 m/z เมื่อเชื้อ *E. coli* O157:H7 สัมผัสแคดเมียมคลอไรด์ (Fig. 2) แสดงว่า มีการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของเปปไทด์หรือโปรตีนที่เป็น precursor ของเปปไทด์กลุ่มนี้เพื่อตอบสนองต่อความรุนแรงของพิษแคดเมียม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้หลายชิ้นที่พบว่าเมื่อเชื้อ *E. coli* ได้รับพิษแคดเมียมจะมีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (translation) เช่น elongation factor-Tu และ 30S ribosomal protein S1⁽¹²⁾ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA replication and recombination) การสร้างพลังงาน (energy metabolisms)⁽¹¹⁾ ribosome particles⁽³¹⁾ หรือ ribosomal proteins ของ *E. coli* ที่มีขนาดประมาณ 3,000 - 10,000 m/z^(32, 33) เป็นไปได้ว่า

เปปไทด์ขนาด 4000 - 5000 m/z จะเป็นไรโบโซมส่วน L26, L36, L27 ในขณะที่เปปไทด์ขนาด 7000-8000 m/z จะเป็นไรโบโซมส่วน L29, L31, L35 ซึ่งมักเกิดการดัดแปรโมเลกุล (post-translational modification) ด้วยกระบวนการ N-terminal methionine loss, methylation, thiomethylation และ acetylation ทำให้สามารถพัฒนาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพได้ดี⁽³⁴⁾ และจากผลการศึกษาในเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบว่าแคดเมียมทำให้รูปแบบมวลเปปไทด์แตกต่างจากกลุ่มควบคุม รูปแบบของยีน 16S rRNA ที่ถอดรหัสเป็น ribosomal proteins ก็เปลี่ยนแปลงไปเช่นเดียวกัน⁽¹⁶⁾ คณะวิจัยจึงสันนิษฐานว่าแคดเมียมอาจส่งผลต่อยีนควบคุมการสังเคราะห์ไรโบโซมทำให้ชนิดและปริมาณของเปปไทด์หรือโปรตีนองค์ประกอบของไรโบโซมของเชื้อ *E. coli* O157:H7 เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแปรผันตามความเข้มข้นของแคดเมียมที่มากขึ้น แต่รูปแบบมวลเปปไทด์ของแบคทีเรียยังคงมีค่า biotyper score ที่ใช้ในการระบุชนิดและสปีชีส์มากกว่า 2.00 ซึ่งยังสามารถระบุชนิดของเชื้อได้เหมือนกับกลุ่มเชื้อควบคุม

5. สรุป

การศึกษาวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแคดเมียมซึ่งเป็นโลหะที่มีความเป็นพิษสูงและยังมีการปนเปื้อนในประเทศไทย มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรครุนแรงส่งผลให้รูปแบบมวลเปปไทด์เปลี่ยนแปลงตามความรุนแรงของพิษแคดเมียม biotyper score มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของแคดเมียมสูงขึ้นแต่ไม่มีผลต่อการระบุชนิดแบคทีเรียในระดับจีโนมและสปีชีส์ของเชื้อเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ผลงานวิจัยนี้สะท้อนให้เห็นถึงศักยภาพของ MALDI-TOF MS ในการติดตามการเปลี่ยนแปลง

ของรูปแบบมวลเปปไทด์เมื่อแบคทีเรียได้รับความเครียดจากสารพิษแคดเมียม และความเหมาะสมที่จะนำ MALDI-TOF MS มาพัฒนาต่อยอดเพื่อศึกษาเชื้อแบคทีเรียในมิติต่างๆ ซึ่งนอกจากจะมีความถูกต้องแม่นยำสูงแล้วยังสามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วและมีขั้นตอนการวิเคราะห์น้อยลดโอกาสการติดเชื้อของผู้ปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการทางเทคนิคการแพทย์ จึงเหมาะสำหรับการใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียและการวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของระบาดวิทยาของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม หรือการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนมูลนิธิพระบรมราชานุสรณ์พระบาทสมเด็จพระปกเกล้าเจ้าอยู่หัวและสมเด็จพระนางเจ้ารำไพพรรณี สำหรับร้อยโทหญิงกรรณกวงศ์ประเสริฐ และทุนบูรณาการแผนบูรณาการพัฒนาศักยภาพวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี วิจัยและนวัตกรรม สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561-2562 ของ ผศ.ดร. พัชรียิสรรางกูร ณ อยุธยา คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคลากรคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ศูนย์เทคนิคการแพทย์และรังสีเทคนิคนานาชาติและบุคลากร ณ ศูนย์การแพทย์กาญจนาภิเษก มหาวิทยาลัยมหิดล รวมถึง ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนอย่างดียิ่งในทุกๆ ด้านและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Palermo MS, Exeni RA, Fernández GC. Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 697-707. doi: 10.1586/eri.09.49.
2. Rosove M. Thrombotic microangiopathies. *Semin Arthritis and Rheumatism* 2014; 43: 797-805.
3. Suwannarat R, Wongsommart D. Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* and *E. coli* O157:H7 contamination in raw meats from fresh markets in Bangkok and circumferences. *Bulletin of the Department of Medical Sciences* 2016; 58: 197-207. (in Thai)
4. 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. doi:0.3389/fmicb.2015.00791.
5. Steensels D, Verhaegen J, Lagrou K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory. *Acta Clin Belg* 2011; 66: 267-73.
6. Pineda FJ, Antoine MD, Demirev PA, *et al.* Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Anal Chem* 2003; 75: 3817-22.

7. Niyompanich S, Srisanga K, Jaresitthikunchai J, Roytrakul S, Tungpradabkul S. Utilization of whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate *Burkholderia pseudomallei* wild-type and constructed mutants. PloS one 2015; 10: e0144128. doi.org/10.1371/journal.pone.0144128
8. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic Biol Med 1995; 18: 321-36.
9. Mitra RS, Bernstein IA. Single-strand breakage in DNA of *Escherichia coli* exposed to Cd^{2+} . J Bacteriol 1978; 133: 75-80.
10. Mitra RS. Protein synthesis in *Escherichia coli* during recovery from exposure to low levels of Cd^{2+} . Appl Environ Microbiol 1984; 47: 1012-6.
11. Wang A, Crowley DE. Global gene expression responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli*. J Bacteriol 2005; 187: 3259-66.
12. Isarankura-Na-Ayudhya P, Isarankura-Na-Ayudhya C, Treeratanapaiboon L, Kasikun K, Thipkeaw K, Prachayasittikul V. Proteomic profiling of *Escherichia coli* in response to heavy metals stress. Eur J Sci Res 2009; 25: 679-88.
13. Ferianc P, Farewell A, Nyström T. The cadmium-stress stimulation of *Escherichia coli* K-12. J Microbiol 1998; 144: 1045-50.
14. Preveral S, Gayet L, Moldes C, *et al.* A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans. J Biol Chem 2009; 284: 4936-43.
15. Worden CR, Kovac WK, Dorn LA, Sandrin TR. Environmental pH affects transcriptional responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli* K-12(MG1655). FEMS Microbiol Lett 2009; 293: 58-64.
16. Chudobova D, Dostalova S, Ruttkay-Nedecky B, *et al.* The effect of metal ions on *Staphylococcus aureus* revealed by biochemical and mass spectrometric analyses. Microbiol Res 2015; 170: 147-56. doi: 10.1016/j.micres.2014.08.003.
17. Thongra-ar W, Musika C, Wongsudawan W, Munhapon A. Health risk assessment of heavy metals via consumption of seafood from coastal area of Map Ta Phut industrial estate, Rayong province. Institute of Marine Science, Burapha University. 1999; 19: 312-27. (in Thai)
18. Chunhabundit R. Cadmium Exposure and Potential Health Risk from Foods in Contaminated Area, Thailand. Toxicol Res 2016; 32: 65-72.
19. Nookabkaew S, Rangkadilok N, Akib CA, Tuntiwigit N, Sachun J, Satayavivad J. Evaluation of trace elements in selected foods and dietary intake by young children in Thailand. Food Addit Contam Part B Surveill 2013; 6: 55-67.

20. Chuanboon K, Na Nakorn P, Pannengpetch S, *et al.* Proteomics and bioinformatics analysis reveal potential roles of cadmium-binding proteins in cadmium tolerance and accumulation of *Enterobacter cloacae*. *Peer J* 2019; 7: e6904.
21. Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1089-97.
22. Boonrod P. Effective of MALDI-TOF MS for Gram Positive Cocci Bacteria Identification 2017; 42: 124-8.
23. Scott JS, Sterling SA, To H, Seals SR, Jones AE. Diagnostic performance of matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry in blood bacterial infections: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis (Lond)*. 2016; 48: 530-6. doi: 10.3109/23744235. 2016.
24. Davies P, Hollingworth W, Stoddart M, MacGowan A. Systematic reviews of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34: 863-76.
25. Suarez S, Ferroni A, Lotz A, *et al.* Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Microbiol Meth* 2013; 94: 390-6.
26. Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, *et al.* Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology* 2012; 158: 1005-15.
27. Goldstein JE, Zhang L, Borrer CM, Rago JV, Sandrin TR. Culture conditions and sample preparation methods affect spectrum quality and reproducibility during profiling of *Staphylococcus aureus* with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Lett Appl Microbiol* 2013; 57: 144-150.
28. Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1089-97. doi: 10.1128/JCM. 02399-13.

29. Theel ES, Schmitt BH, Hall L, *et al.* Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3093-5. doi:10.1128/JCM.01045-12.
30. Forty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1993; 837: 1-53.
31. Kitahara K, Suzuki T. The ordered transcription of RNA domains is not essential for ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell* 2009; 26; 34: 760-6. doi: 10.1016/j.molcel.2009.05.014.
32. Wilcox SK, Cavey GS, Pearson JD. Single ribosomal protein mutations in antibiotic-resistant bacteria analyzed by mass spectrometry. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3046-55.
33. Dzionara M, Kaltschmidt E, Wittmann HG. Ribosomal proteins. Molecular weights of isolated ribosomal proteins of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970; 67: 1909-13.
34. Arnold RJ, Reilly JP. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999; 10.269: 105-12.