Simple Sample Preparation with SDS for Direct Identification from Positive Blood Culture Using MALDI-TOF MS.

Nuttiya Srisurat* and Krittika Kamlangharn

Department of Medical Technology, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen Province, Thailand

Abstract

Septicemia is a life-threatening condition. Accurate and rapid pathogen diagnosis is essential for providing appropriate and expedient care to patients, thereby reducing the severity and complications of the disease. The study aimed to evaluate the sample preparation method for direct bacterial identification by the matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) technique. One hundred fifty-seven positive blood culture samples from the BACTEX FX automated culture system were prepared for direct identification by MALDI-TOF MS. The preparation was done by using 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) as a lysis buffer and 70% formic acid and acetonitrile for protein extraction. Then, the samples were determined by MALDI-TOF MS and the results were compared to results from the standard method using colony from solid media. The results showed that by using the direct method, the identification results were correctly identified at species and genus levels at 81.53% (128/157) and 14.01% (22/157), respectively. There were unreliable identification results at 4.46% (7/157). Those that were identified consistently but the score represented lower than 1.70 were 3.82% (6/157) and no peak 0.64% (1/157). There was no misidentification by using the direct identification method. The direct identification results correctly identified at species levels were 75.68% (56/74), 88.24% (60/68) and 80.00% (12/15) for gram negative bacteria, gram positive bacteria and others (yeast and mycobacteria), respectively and at genus levels were 17.58% (13/74), 10.29% (7/68), and 13.33% (2/15), respectively. There was no difference of the spectral score level obtained from the direct identification compared to using colonies with the Wilcoxon Signed Rank test at a confidence level of 95% in the gram-negative bacteria ($p = 0.142$) and the others (yeast and mycobacteria) ($p = 0.530$). However, using the standard method with MALDI-TOF in the gram-positive bacteria yielded higher score compared to using the direct method, which are statistically significant ($p < 0.05$). This study revealed that the preparation of positive blood cultures with 10% SDS for direct identification

***Corresponding author E-mail address:** srisuratnuttiya@gmail.com

Received: 26 July 2023 Revised: 16 September 2023 Accepted: 18 September 2023

#52-3-66 .indd 8772 7/12/2566 BE 12:33

by MALDI-TOF MS showed excellent performance for pathogenic identification and shorter turn-around time by several hours or even days (< 30 minutes to 2 hours). This rapid direct identification allows a much faster optimization of antibiotic therapy in patients with sepsis compared to conventional workflows (only the gram stain result was known), for effective treatment thus reduced mortality and preventing drug resistance.

Keywords: Direct identification, Blood culture, MALDI-TOF MS

#52-3-66 .indd 8773 7/12/2566 BE 12:33

การเตรียมตัวอย่างแบบง่ายด้วย SDS เพื่อวินิจฉัยเชื้อโดยตรงจากตัวอย่างเลือดด้วย MALDI-TOF MS

นัตฏิยา ศรีสุราช* และ กฤติกา กำลังหาญ

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

บทคัดย่อ

การติดเชื้อในกระแสเลือดเป็นภาวะที่เป็นอันตรายถึงชีวิต การวินิจฉัยเชื้อก่อโรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว เป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ผู้ป่วยได้การดูแลรักษาที่ถูกต้องและทันท่วงที ซึ่งช่วยลดความรุนแรงและภาวะแทรกซ้อนของโรคลงได้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดสำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อโดยตรงด้วยเทคนิค matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) โดยเตรียมตัวอย่างเลือดจากตัวอย่างที่พบผลบวกจากเครื่องเพาะเชื้อแบบอัตโนมัติ (the BACTEX FX system) จำนวน 157 ตัวอย่าง เริ่มจากการทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลาย 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) จากนั้นสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 70% formic acid และ acetonitrile ก่อนนำไปจำแนกชนิดของเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เทียบกับวิธีการทดสอบด้วยโคโลนีที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ผลการศึกษาพบว่าการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างโดยตรงให้ผลการทดสอบถูกต้องในระดับ species และ genus คิดเป็นร้อยละ 81.53 (128/157) และร้อยละ 14.01 (22/157) ตามลำดับ ไม่สามารถรายงานผลได้ร้อยละ 4.46 (7/157) โดยร้อยละ 3.82 (6/157) ให้ผลการทดสอบที่มีระดับคะแนน (spectral score) น้อยกว่า 1.70 และร้อยละ 0.64 (1/157) ไม่พบ spectrum ของโปรตีน ผลการศึกษาไม่พบการจำแนกชนิดของเชื้อผิดพลาดจากการใช้ตัวอย่างโดยตรง ผลการทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ แกรมบวก และเชื้อกลุ่มอื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) การทดสอบจากตัวอย่างเลือดโดยตรงเทียบกับการใช้โคโลนีมีความถูกต้องในระดับ species คิดเป็นร้อยละ 75.68 (56/74), 88.24 (60/68) และ 80.00 (12/15) ตามลำดับ และความถูกต้องในระดับ genus คิดเป็นร้อยละ 17.58 (13/74), 10.29 (7/68) และ 13.33 (2/15) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระดับคะแนน (spectral score) ระหว่างสองวิธี ด้วย Wilcoxon Signed Rank test ($p < 0.05$) พบว่าการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรงให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกับการใช้โคโลนีในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ($p = 0.142$) และเชื้ออื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) ($p = 0.530$) ส่วนแบคทีเรียแกรมบวก การใช้โคโลนีในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อด้วย MALDI-TOF MS จะมีระดับคะแนน (score) สูงกว่าการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดโดยตรงด้วย MALDI-TOF MS ให้ผลการทดสอบที่สอดคล้อง

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** srisuratnuttiya@gmail.com

รับบทความ: 26 กรกฎาคม 2566 แก้ไขบทความ: 16 กันยายน 2566 รับตีพิมพ์บทความ: 18 กันยายน 2566

#52-3-66 .indd 8774 7/12/2566 BE 12:33

กับวิธีอ้างอิง สามารถรายงานผลชนิดของเชื้อได้เร็วไม่เกิน 30 นาที - 2 ชั่วโมง ระยะเวลาไม่ต่างจากการย้อมสีแกรม และยังให้ผลดีกว่าเนื่องจากทราบชนิดของเชื้อก่อโรค ช่วยให้แพทย์สามารถพิจารณาใช้ยาได้ตรงกับชนิดเชื้อ ทำให้การรักษามีประสิทธิภาพ ลดอัตราการเสียชีวิต รวมถึงป้องกันการเกิดการดื้อยาในอนาคต

คำสำคัญ: การวินิจฉัยเชื้อโดยตรง, การเพาะเชื้อจากเลือด, MALDI-TOF MS

บทนำ

การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) เกิดจากการที่ผู้ป่วยติดเชื้อที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย จากนั้นเชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือด เมื่อผู้ป่วยมีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด การให้ยาปฏิชีวนะที่ช้าไปทุก ๆ 1 ชั่วโมง จะเพิ่มโอกาสการเสียชีวิตขึ้นร้อยละ 7.6[1] หากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและทันเวลา การอักเสบอาจเกิดขึ้นทั่วร่างกาย ทำให้เกิดลิ่มเลือดและการอุดตันของหลอดเลือด ซึ่งมีผลต่อการลำเลียงออกซิเจนไปยังอวัยวะที่สำคัญของร่างกาย เมื่อไม่ได้รับออกซิเจนไปหล่อเลี้ยงอย่างเพียงพอ การทำงานของอวัยวะส่วนนั้นจึงล้มเหลว นำไปสู่ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดแบบรุนแรง (severe sepsis) ภาวะช็อกจากการติดเชื้อ (septic shock)[2,3]

ปัจจุบันภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดเป็นหนึ่งปัญหาสำคัญของระบบสาธารณสุขไทย และถือเป็นประเด็นปัญหาสุขภาพในแผนการพัฒนาระบบบริการสุขภาพ (service plan) ของกระทรวงสาธารณสุข[4] นอกจากจะส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยแล้ว ยังรวมถึงผลกระทบทั้งในด้านอุบัติการณ์ของการเกิดโรค อุบัติการณ์การเกิดเชื้อดื้อยา และค่าใช้จ่ายในการรักษาที่เพิ่มขึ้น การรักษาภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดซึ่งถือว่าเป็นภาวะวิกฤตของชีวิต ซึ่งต้องอาศัยการทำงานเป็นทีมสหสาขาวิชาชีพ เพื่อมีความรวดเร็วในการประเมินผู้ป่วย[5,6] รวมถึงมีความรวดเร็วในการรักษาที่เหมาะสม จึงจะทำให้ผู้ป่วยมีผลลัพธ์ของการรักษาที่ดี และมีภาวะแทรกซ้อนลดลง[7,8] ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดยังมีความจำเป็นต้องอาศัยผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การเพาะเชื้อจากเลือด แต่การเพาะเชื้อในเลือดใช้เวลาในการรายงานผลไม่น้อยกว่า 48 ชั่วโมง หลังจากพบการเจริญของเชื้อในขวดเพาะเชื้อ (positive blood culture)[9] ดังนั้นการตัดสินใจในการรักษาผู้ป่วยเบื้องต้น หลังตรวจพบเชื้อในกระแสเลือด จึงต้องอาศัยผลการย้อมสีแกรมจากขวดเพาะเชื้อที่พบผลบวก ซึ่งใช้เวลาในการรายงานผลเพียง 1-2 ชั่วโมง การตัดสินใจในการรักษาเบื้องต้นนี้ (empirical treatment) เป็นการคาดการณ์ตามผลการย้อมสีแกรมว่าน่าจะเป็นเชื้อชนิดไหน ร่วมกับการอาศัยข้อมูลด้านระบาดวิทยาของพื้นที่หรือโรงพยาบาล[6] และแพทย์จะปรับเปลี่ยนการรักษาให้เหมาะสมเมื่อทราบผลจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ ตามวิธีมาตรฐาน ซึ่งต้องใช้เวลาโดยรวมไม่น้อยกว่า 72 ชั่วโมง หรือ 3 วัน การศึกษาหลายงานมีความพยายามในการพัฒนาวิธีการรายงานผลเพาะเชื้อในกระแสเลือดให้ถูกต้องและรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลทำให้การรักษาภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดได้เหมาะสม ทันเวลา สามารถลดอัตราการตายเนื่องจาก severe sepsis และ septic shock[7,10-13] เช่น การนำโคโลนีของเชื้อที่ได้จากการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจด้วยวิธีมาตรฐานมาทำการจำแนกด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ซึ่งใช้เวลาตรวจเพียง 1-2 นาทีเท่านั้น[10,14] แต่วิธีนี้ก็ยังคงต้องใช้เวลาในการเพาะเชื้อเพื่อให้ได้โคโลนีก่อน ซึ่งใช้เวลานานถึง 18-24 ชั่วโมง ดังนั้นการใช้โคโลนีในการทดสอบจึงทำให้สามารถรายงานผลจำแนกชนิดของเชื้อโดยรวมได้เร็วขึ้นประมาณ 1 วัน[14-16] ต่อมาได้มีความพยายามในการรายงานผลชนิดของเชื้อให้เร็วยิ่งขึ้นด้วยการลดขั้นตอนการเพาะเชื้อ และจำแนกชนิดของเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ด้วยการใช้ตัวอย่างโดยตรงแทนการใช้โคโลนี เช่น ตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ และน้ำไขสันหลัง[4,16-18] สำหรับตัวอย่างเลือดได้มีการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่าง[12,18,19] ที่มีใช้อย่างแพร่หลาย เช่น The Sepsityper® Kit (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) ชุดตรวจสำเร็จรูปนี้ถูกผลิตมาเพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่างเลือดหลังพบผลบวกด้วย

เครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติ ก่อนนำไปทดสอบต่อเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อด้วย MALDI-TOF MS เป็นวิธีการง่าย และใช้เวลาประมาณ 10 นาทีในการเตรียมตัวอย่าง การใช้ The Sepsityper® Kit ร่วมกับการจำแนกชนิดของเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS จึงเป็นการลดขั้นตอนการเพาะเชื้อเนื่องจากไม่ต้องใช้โคโลนี ร่วมกับการใช้เทคโนโลยีใหม่ที่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อที่รวดเร็ว ทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้ภายในเวลา 20-30 นาที หลังจากพบผลบวกจากขวดเพาะเชื้อ[10,12,18,20,21] แต่มีข้อเสียคือ ชุดตรวจสำเร็จรูป หรือ The Sepsityper® Kit มีราคาแพง

คณะผู้วิจัยจึงได้มีการศึกษา และพัฒนาแนวทางการตรวจเพาะเชื้อในเลือดทางห้องปฏิบัติการ โดยได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดหลังพบการเจริญของเชื้อในขวดเพาะเชื้อ โดยใช้ 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate) เป็นสารที่ทำให้เซลล์แตก (Lysis buffer)[22] แทนการใช้ The Sepsityper® Kit ล้างและปั่นเซลล์ให้ตกตะกอน นำตัวอย่างเลือดที่เตรียมได้ไปจำแนกชนิดของเชื้อต่อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถรายงานผลชนิดของเชื้อได้ภายในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง หลังพบการเจริญของเชื้อบนขวดเพาะเชื้ออัตโนมัติ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างตรวจ

ตัวอย่างเลือดที่ส่งเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น และให้ผลบวก โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (The BD BACTEC 9240 system) ระหว่างเดือนพฤษภาคม - ธันวาคม 2564 จำนวน 157 ตัวอย่าง ประกอบด้วย gram positive bacteria 68 สายพันธุ์ และ gram negative bacteria 74 สายพันธุ์ และเชื้อกลุ่มอื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) 15 สายพันธุ์ โดยเกณฑ์การคัดเข้า (inclusion criteria) คือ ตัวอย่างเลือด ที่พบผลบวกด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ และเกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) ได้แก่ ตัวอย่างเลือดที่ให้ผลลบด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ตัวอย่างชนิดอื่นที่ไม่ใช่เลือด และพบผลบวกด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ และตัวอย่างเลือดที่พบผลบวกที่พบเชื้อก่อโรคมากกว่า 1 ชนิด (polymicrobial growth) โดยการศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลขอนแก่น รหัสโครงการวิจัย: KEXP64003

การเพาะเชื้อจากตัวอย่างเลือดที่พบผลบวกจากเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติ

ขวดตัวอย่างเลือดที่พบผลบวกด้วยเครื่องตรวจเพาะเชื้ออัตโนมัติ (The BD BACTEC 9240 system (Aerobic/F, Anaerobic/F and Myco/F-lytic bottles); Becton Dickinson) ถูกนำมาเจาะด้วยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technic) ภายใน 2 ชั่วโมง หลังพบสัญญาณผลบวกด้วยเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (blood agar, MacConkey agar, chocolate agar) ตามวิธีมาตรฐาน นำเชื้อไปย้อมสีแกรมและจำแนกชนิดเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยตรงจากตัวอย่างเลือด

การเตรียมตัวอย่างเลือดในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้พัฒนาปรับวิธีการจากแนวทางของชุดตรวจสำเร็จรูป (Sepsityper Kit)[12] โดยดูดตัวอย่างเลือด

จากขวดเพาะเชื้อที่พบผลบวกใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 g นาน 2 นาที แล้วเทส่วนบนทิ้ง ตะกอนที่เหลือเติม MALDI grade water 1 มิลลิลิตร แล้วกระจายตะกอนโดยการใช้ไปเปตดูดขึ้น-ลง จากนั้นเติม 10% SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ไปเปตดูดขึ้น-ลง 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 g นาน 2 นาที เทส่วนบนทิ้ง แล้วเติม MALDI grade water 1 มิลลิลิตร และกระจายตะกอนโดยการใช้ไปเปต นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 g นาน 2 นาที เทส่วนบนทิ้ง เติม MALDI grade water ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และกระจายตะกอนโดยการใช้ไปเปต จากนั้นเติม 100% ethanol ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการดูดขึ้น-ลง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 g นาน 2 นาที เทส่วนบนทิ้ง ตะกอนที่ได้ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย 70% formic acid และกระจายตะกอนโดยการใช้ไปเปต จากนั้นเติม acetonitrile ปริมาณเท่ากับสารละลาย 70% formic acid ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการดูดขึ้น-ลง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 g นาน 2 นาที ส่วนใสที่ได้ นำไปจำแนกชนิดของเชื้อโดยเทคนิค MALDI-TOF MS อัตราส่วนการเติมสารละลาย 70% formic acid / acetonitrile พิจารณาจากขนาดของตะกอนที่ได้ ได้แก่ ตะกอนเล็กมาก (มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า) เติมสารละลาย 70% formic acid ปริมาตร 5 ไมโครลิตร / acetonitrile ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตะกอนขนาดกลาง (เส้นผ่าศูนย์กลาง <1 มิลลิเมตร หรือ ขนาดเท่าหัวไม้ขีด) เติมสารละลาย 70% formic acid ปริมาตร 20 ไมโครลิตร / acetonitrile ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และตะกอนขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลาง >1 มิลลิเมตร) เติมสารละลาย 70% formic acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร / acetonitrile ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

การจำแนกชนิดของเชื้อก่อโรคจากตัวอย่างโดยตรงและจากโคโลนีด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

การจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างโดยตรง ทำโดยดูดส่วนใส 1 ไมโครลิตร ซึ่งได้จากการเตรียมตัวอย่างเลือดตามวิธีที่พัฒนา หยดลงบน target plate (หลอดละ 1 หลุม) แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อจากโคโลนี ทำโดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวที่ได้จากการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง ป้ายลงบน MALDI target plate 1 ตัวอย่าง ต่อ 1 หลุม[14,23] สำหรับการควบคุมคุณภาพและทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องในการจำแนกชนิดของเชื้อกระทำทุกครั้งที่มีการทดสอบ โดยดูดสารละลาย IVD BTS (Bacterial Test Standard, Bruker Daltonics, Germany) ซึ่งเป็นเชื้อ *Escherichia coli* (DH5-alpha) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบน target plate 1 หลุม แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง[24] หยดสารละลาย IVD HCCA (α-cyano-hydroxycinnamic acid; Bruker Daltonics, Germany) ลงบนแต่ละหลุม ๆ ละ 1 ไมโครลิตร ปล่อยให้ทุกหลุมแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใส่ target plate ลงในเครื่อง MALDI-TOF MS เพื่อทดสอบการจำแนกชนิดของเชื้อ การแปลผลการทดสอบเป็นไปตามแนวทางกำหนดของเครื่องมือ โดยเครื่องจะนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์และรูปแบบของ m/z peak ที่เรียงตัวกันเป็น peptide mass fingerprint (PMF) เปรียบเทียบแมสสเปกตรัมกับฐานข้อมูล (Bruker database version 4.1.90) ความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบจะรายงานเป็นคะแนน (score) โดยค่า score $\geq$ 2.00 หมายถึง

ผลการจำแนกชนิดของเชื้อถูกต้องที่ระดับ species ค่า score 1.70-1.99 หมายถึงผลการจำแนกชนิดของเชื้อถูกต้องที่ระดับ genus และ ค่า score น้อยกว่า 1.70 หมายถึง ไม่สามารถรายงานผลได้ หรือผลการจำแนกชนิดของเชื้อไม่น่าเชื่อถือ[25]

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวกโดยตรงด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS กับการทดสอบด้วยโคโลนี ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิง โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับคะแนน (score) ระหว่างของผลการจำแนกชนิดเชื้อจากตัวอย่างโดยตรง และการใช้โคโลนี ตามวิธีที่แนะนำโดยผู้ผลิตเครื่องมือ ใช้การวิเคราะห์ด้วย Wilcoxon Signed Rank test โดยทดสอบการกระจายของข้อมูลก่อนด้วย Kolmogorov-Smirnov test ขั้นตอน และวิธีการศึกษาดังแสดงรายละเอียดตาม Fig. 1

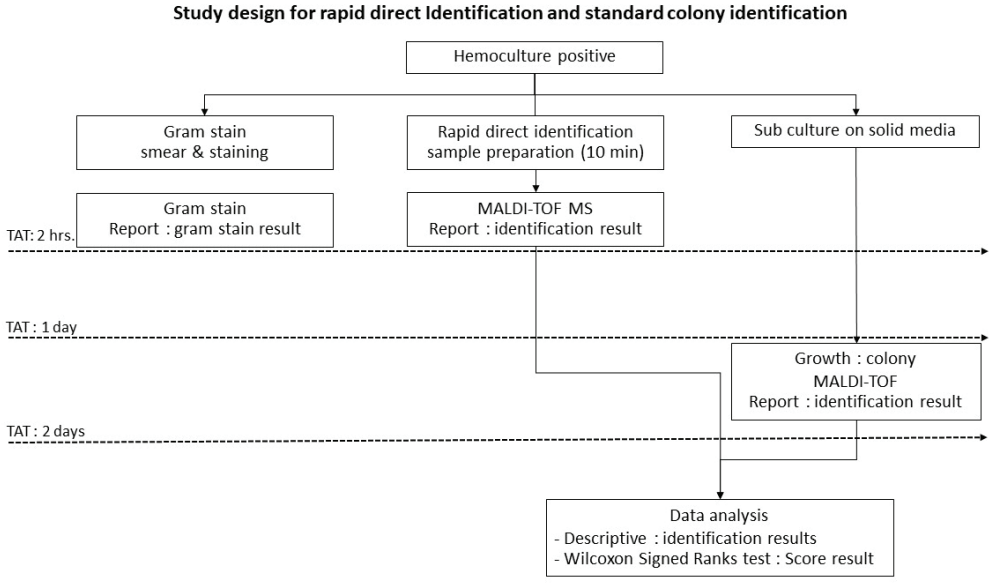

Fig. 1 Flowchart of the study design for direct Identification and standard colony identification. MALDI-TOF MS; Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight mass spectrometry, TAT; turn-around time.

ผลการวิจัย

ผลการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดที่พบผลบวกด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติที่ตรวจพบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิน 1 สายพันธุ์ (monomicrobial growth) และหรือ ตรวจพบเชื้อหนึ่งชนิดจากกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 157 ขวด จากผู้ป่วยจำนวน 157 ราย ประกอบด้วย ขวดเพาะเชื้อชนิด Aerobic/F จำนวน 154 ขวด Anaerobic/F จำนวน 1 ขวด และ Myco/F-lytic จำนวน 2 ขวด ผลการศึกษาพบว่าการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างตรวจโดยตรงด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องในระดับ species และ genus คิดเป็นร้อยละ 81.53 (128/157) และร้อยละ 14.01 (22/157) ตามลำดับ การจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างโดยตรงพบว่าไม่สามารถรายงานผลได้คิดเป็นร้อยละ 4.46 (7/157) แบ่งเป็น ผลการทดสอบมีคะแนน หรือ score น้อยกว่า 1.7 ร้อยละ 3.82 (6/157) ไม่พบ spectrum ของโปรตีน หรือ no peak คิดเป็นร้อยละ 0.64 (1/157) และไม่พบการจำแนกชนิดของเชื้อผิดพลาดจากการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรง (Table 1)

Table 1 Direct identification results by MALDI-TOF MS from 157 blood culture samples compared to standard method.

Organism Identification by using colony (n)	Direct Identification by using 10% SDS as lysis buffer, n (%)				
	Correct		No reliable identified	Mis-identified	No-peak
	Identified to species level (score ≥ 2.00)	Identified to genus level (score 1.70-1.99)	(score <1.70)		
Gram negative bacteria (74)	56 (75.68)	13 (17.58)	4 (5.41)	0	1 (1.35)
Gram positive bacteria (68)	60 (88.24)	7 (10.29)	1 (1.47)	0	0
Other organisms (15)	12 (80.00)	2 (13.33)	1 (6.67)	0	0
Total (157)	128 (81.53)	22 (14.01)	6 (3.82)	0	1 (0.64)

SDS; Sodium dodecyl sulfate, n; number of samples tested

ผลการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดที่พบผลบวกโดยตรง พบว่ากลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ 74 สายพันธุ์ มีผลการจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธี MALDI-TOF MS ถูกต้องตรงกับการใช้โคโลนีซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยผลการจำแนกชนิดของเชื้อมีความถูกต้องในระดับ species (score ≥ 2.00) และ genus (score 1.70-1.99) คิดเป็นร้อยละ 75.68 (56/74) และ 17.58 (13/74) ตามลำดับ ผลการทดสอบจากตัวอย่างโดยตรงไม่สามารถรายงานผลได้ 5 ตัวอย่าง เนื่องจาก 4 ตัวอย่าง มีคะแนนความเชื่อมั่นต่ำ (score < 1.7) ประกอบด้วย *Acinetobacter baumannii* (2 ตัวอย่าง) *Aeromonas hydrophila* (1 ตัวอย่าง) และ *Burkholderia pseudomallei* (1 ตัวอย่าง) และไม่พบสเปคตรัมของโปรตีน (no peak) 1 ตัวอย่าง ได้แก่ *Stenotrophomonas maltophilia* (Table 2) ส่วนแบคทีเรียแกรมบวก พบการจำแนกชนิดของเชื้อถูกต้องในระดับ species และ genus คิดเป็นร้อยละ 88.24 (60/68) และ 10.29 (7/68) ไม่สามารถรายงานผลได้ 1 ราย ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* เนื่องจากมีคะแนนความเชื่อมั่นของ score น้อยกว่า 1.7 (Table 3) สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อกลุ่มอื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) พบว่าการใช้ 10% SDS ในการเตรียมตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้อย่างถูกต้องที่ระดับ species และ genus คิดเป็นร้อยละ 80.00 (12/15) และ 13.33 (2/15) ตามลำดับ มี 1 ตัวอย่าง ไม่สามารถรายงานผลได้เนื่องจากมีคะแนน score น้อยกว่า 1.7 คือ *Cryptococcus neoformans* (Table 1 และ 4)

เมื่อวิเคราะห์ระดับคะแนน (spectral score) ที่ได้จากการทดสอบด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ในกลุ่มเชื้อที่สามารถรายงานผลได้ (ระดับคะแนนหรือ score ≥ 1.7) เปรียบเทียบระหว่างการทดสอบด้วยตัวอย่างเลือดโดยตรง กับการใช้โคโลนีจากอาหารแข็งด้วย Wilcoxon Signed Rank Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดโดยตรงกับการใช้โคโลนีที่ได้จากอาหารแข็ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ($p = 0.142$) และเชื้อกลุ่มอื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) ($p = 0.530$) ส่วนแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าการใช้โคโลนีในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อ ด้วย MALDI-TOF MS จะมีระดับคะแนน (score) สูงกว่าการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.003$) (Table 2, 3 และ 4)

Table 2 Direct identification results of gram-negative bacteria by MALDI-TOF MS from positive blood culture samples compared to the standard method.

Organism Identification by using colony (n)	Direct Identification by using 10% SDS as lysis buffer, n (%)				
	Correct		No reliable identified	Mis-identified	No-peak
	Identified to species level (score ≥ 2.00)	Identified to genus level (score 1.70-1.99)	(score <1.70)		
A. baumannii (7)	3 (42.86)	2 (28.57)	2 (28.57)	0	0
B. pseudomallei (11)	2 (18.18)	8 (72.73)	1 (9.09)	0	0
E. cloacae (3)	3 (100)	0	0	0	0
E. coli (20)	20 (100)	0	0	0	0
K. pneumoniae (6)	6 (100)	0	0	0	0
M. morganii (2)	2 (100)	0	0	0	0
P. mirabilis (4)	4 (100)	0	0	0	0
P. aeruginosa (5)	4 (80)	1 (20.00)	0	0	0
Salmonella species (4)	4 (100)	0	0	0	0
V. vulnificus (3)	1 (33.33)	2 (66.67)	0	0	0
Achromobacter xylosoxidans (2)	2 (100)	0	0	0	0
Aeromonas caviae (2)	2 (100)	0	0	0	0
Aeromonas hydrophila (1)	0	0	1 (100)	0	0
Aeromonas veronii (1)	1 (100)	0	0	0	0
B. cepacia (1)	1 (100)	0	0	0	0
B. vietnamiensis (1)	1 (100)	0	0	0	0
S. maltophilia (1)	0	0	0	0	1 (100)
Total gram negative (74)	56 (75.68)	13 (17.58)	4 (5.41)	0	1 (1.35)
Wilcoxon Signed Rank test	p = 0.142				

SDS; Sodium dodecyl sulfate, n; number of samples tested, p; p-value (statistically significant < 0.05)

Table 3 Direct identification results of gram-positive bacteria by MALDI-TOF MS from positive blood culture samples compared to the standard method.

Organism identified by using colony (n)	Direct Identification by using 10% SDS as lysis buffer, n (%)				
	Correctly identified		Unreliable	Mis-identified	No-peak
	at species level (score ≥ 2.00)	at genus level (score 1.70-1.99)	(score <1.70)		
E. faecalis (6)	4 (66.67)	2 (33.33)	0	0	0
E. faecium (8)	8 (100)	0	0	0	0
S. agalactiae (2)	2 (100)	0	0	0	0
S. aureus (18)	18 (100)	0	0	0	0
S. dysgalactiae (5)	5 (100)	0	0	0	0
S. haemolyticus (4)	2 (50)	2 (50.00)	0	0	0
S. pneumoniae (2)	2 (100)	0	0	0	0
S. pyogenes (10)	7 (70)	3 (30.00)	0	0	0
S. suis (6)	6 (100)	0	0	0	0
E. rhusiopathiae (1)	1 (100)	0	0	0	0
Lactococcus lactis (1)	1 (100)	0	0	0	0
S. gallolyticus (1)	1 (00)	0	0	0	0
S. sanguinis (1)	1 (100)	0	0	0	0
S. saprophyticus (1)	1 (100)	0	0	0	0
S. epidermidis (2)	1 (50)	0	1 (50)	0	0
Total gram positive (68)	60 (88.24)	7 (10.29)	1 (1.47)	0	0
Wilcoxon Signed Rank test		p = 0.003			

SDS; Sodium dodecyl sulfate, n; number of samples tested, p; p-value (statistically significant < 0.05)

Table 4 Direct identification results of other organism (Yeast, Mycobacteria) by MALDI-TOF MS from positive blood culture samples compared to the standard method.

Organism identified by using colony (n)	Direct Identification by using 10% SDS as lysis buffer, n (%)				
	Correctly identified		Unreliable	Mis-identified	No-peak
	at species level (score ≥ 2.00)	at genus level (score 1.70-1.99)	(score <1.70)		
Other organisms					
C. albicans (3)	3 (100)	0	0	0	0
C. glabata (1)	1 (100)	0	0	0	0
C. neoformans (5)	4 (80)	0	1 (20.00)	0	0
C. tropicalis (2)	2 (100)	0	0	0	0
M. kansasii (1)	0	1 (100)	0	0	0
M. tuberculosis (1)	0	1 (100)	0	0	0
Rhodococcus hoagii (1)	1 (100)	0	0	0	0
Clostridium perfringens (1)	1 (100)	0	0	0	0
Total other organisms (15)	12 (80.00)	2 (13.33)	1 (6.67)	0	0
Wilcoxon Signed Rank test	$p = 0.530$				

SDS; Sodium dodecyl sulfate, n; number of samples tested, *p*; *p*-value (statistically significant < 0.05)

วิจารณ์

การศึกษาที่ผ่านมามีการพัฒนาวิธีเพื่อให้สามารถรายงานผลจำแนกชนิดของเชื้อให้เร็วขึ้น โดยลดขั้นตอนการเพาะเชื้อด้วยการใช้ตัวอย่างโดยตรงในการจำแนกชนิดของเชื้อแทนการใช้โคโลนี มีการพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อใช้เตรียมตัวอย่างเลือด เช่น The Sepsityper® Kit[18-19,21] เพื่อนำไปทดสอบต่อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้ในเวลาเฉลี่ย 20-30 นาทีต่อราย หลังจากพบผลบวกโดยเครื่องเพาะเชื้อในเลือดอัตโนมัติ[10, 12, 20] และให้ผลการจำแนกชนิดของเชื้อได้ถูกต้องทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์[18-21,26] แต่ข้อเสียคือน้ำยาสำเร็จรูปมีราคาแพง การศึกษานี้ผู้วิจัยได้ลดขั้นตอนการเพาะเชื้อในอาหารแข็ง และพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดหลังพบการเจริญของเชื้อบนขวดเพาะเชื้อแบบอัตโนมัติ โดยปรับวิธีทดสอบจากชุดตรวจสำเร็จรูป (MBT Sepsityper® IVD Kit) ด้วยการลดขั้นตอนการปั่นล้างตะกอนเหลือ 2 รอบ และใช้การเทส่วนบนทิ้งเพื่อให้ง่ายต่อการใช้งาน รวมถึงปรับใช้สารที่ทำให้เซลล์แตก (lysis buffer) ซึ่งสามารถหาได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป คือสารละลาย 10% SDS แทนการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป

อย่างไรก็ตาม การใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรง พบว่าเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการจำแนกชนิดของเชื้อด้วย MALDI-TOF MS การเลือกใช้ lysis buffer รวมถึงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้ได้โปรตีนของเชื้อจึงมีความสำคัญ และส่งผลต่อความถูกต้องของผลการทดสอบ[12,20,27] การศึกษานี้มีการประเมินวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดและใช้สารละลาย 10% SDS เป็น lysis buffer พบว่าสามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้ถูกต้อง ทั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ และกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก รวมถึงเชื้อกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ ยีสต์และเชื้อก่อวัณโรค สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีการเตรียมตัวอย่างด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป (The Sepsityper® Kit)[18,21] รวมถึงการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการที่แต่ละแห่งพัฒนา[12,28,29] ซึ่งพบว่า MALDI-TOF MS สามารถจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดโดยตรงได้ถูกต้อง ในแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก คิดเป็นร้อยละ 90-100 และ 76-100 ตามลำดับ สำหรับยีสต์และเชื้อก่อวัณโรค การใช้ 10% SDS ในการเตรียมตัวอย่างสามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้อย่างถูกต้องร้อยละ 93.33 (14/15) เหนือกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ศึกษาการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (The Sepsityper® Kit) ในการเตรียมตัวอย่าง และให้ผลการทดสอบด้วย MALDI-TOF MS ได้ถูกต้องประมาณร้อยละ 60-62[12,18] เมื่อศึกษาระดับคะแนน (score) ที่ได้จากการทดสอบด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS การศึกษานี้พบว่าการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างโดยตรงส่วนใหญ่มีระดับคะแนน (score) ต่ำกว่าการทดสอบจากโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นในอาหารแข็ง (Table 3) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้[10,12,30] ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดจากการปนเปื้อนของโปรตีนจากเม็ดเลือดแดง และหรือจากเซลล์อื่น ๆ ที่มีในตัวอย่างตรวจจึงทำให้คะแนนความเชื่อมั่นต่ำลง[20] อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ค่าระดับคะแนนที่ได้จากการทดสอบด้วย MALDI-TOF MS เปรียบเทียบระหว่างการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรง กับการใช้โคโลนีตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ด้วย Wilcoxon Signed Rank test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรงให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกับการใช้โคโลนีที่ได้จากอาหารแข็ง ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ($p = 0.142$) และกลุ่มเชื้ออื่น ที่ไม่ใช่แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ($p = 0.530$) แต่มีความแตกต่างในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก โดยพบว่าการใช้

ตัวอย่างเลือดโดยตรงในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อ ด้วย MALDI-TOF MS จะมีระดับคะแนน (score) ต่ำกว่าการใช้โคโลนีในการทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก จึงควรระมัดระวังในการแปลผลการทดสอบโดยเฉพาะในเชื้อที่มีสเปคตรัมของโปรตีนที่ใกล้เคียงกัน

การจำแนกชนิดของเชื้อด้วยตัวอย่างเลือดโดยตรงด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS การศึกษานี้พบว่าร้อยละ 4.46 (7/157) ไม่สามารถรายงานผลได้ เนื่องจากมี score น้อยกว่า 1.7 คิดเป็นร้อยละ 3.82 (6/157) ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* (2 ราย), *Aeromonas hydrophilla* (1 ราย), *Burkholderia pseudomalleii* (1 ราย), *Staphylococcus epidermidis* (1 ราย) และ *Cryptococcus neoformans* (1 ราย) อีกร้อยละ 0.61 (1/157) มีผลการทดสอบเป็น no peak ผลการทดสอบเป็น no peak อาจเกิดจากความผิดพลาดในขั้นตอนหลังการปั่นเพื่อให้เซลล์ตกตะกอนแล้วทิ้งส่วนบน การศึกษานี้ใช้การ “เท” ส่วนบนทิ้ง แทนการใช้ไปเปตค่อย ๆ ดูดทิ้ง เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย และสะดวกสำหรับการปฏิบัติในงานประจำ ผลจากการเทส่วนบนทิ้ง อาจทำให้ตะกอนหรือเซลล์ของแบคทีเรียหลุดไป ดังนั้นกรณีที่ผลการทดสอบเป็น no peak หรือสังเกตว่าไม่มีตะกอนหลังเทส่วนบนทิ้ง ควรมีการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบใหม่ และเปลี่ยนใช้ไปเปตดูดส่วนบนทิ้งด้วยความระมัดระวังแทนตามวิธีของชุดทดสอบสำเร็จรูป และหลายการศึกษาแนะนำ[12,18,21,28,29] นอกจากนี้การทิ้งขวดเพาะเชื้อในเลือดหลังพบผลบวกไว้นานเกินไป อาจมีผลทำให้เชื้อจุลชีพสลายตัวทำให้คุณสมบัติของโปรตีนเสียไป อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีการเตรียมตัวอย่างเลือดภายใน 2 ชั่วโมง หลังจากพบสัญญาณบวกโดยเครื่องเพาะเชื้อในเลือดแบบอัตโนมัติ

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า 10% SDS สามารถใช้เตรียมตัวอย่างเลือดก่อนจำแนกชนิดของเชื้อด้วย MALDI-TOF MS ได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ รวมถึงเชื้ออื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) การจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างโดยตรงจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนางานประจำ เพื่อให้สามารถรายงานผลชนิดของเชื้ออย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะการตรวจพบเชื้อในเลือดซึ่งถือเป็นค่าวิกฤติ การรายงานผลชนิดของเชื้อที่เร็วขึ้นจากเดิม 24-48 ชั่วโมง เหลือเพียงภายในเวลา 30 นาที -2 ชั่วโมง หลังพบการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยเครื่องเพาะเชื้อจากเลือดอัตโนมัติ จะทำให้ทราบชนิดของเชื้อก่อโรคเร็วขึ้น สามารถนำมาปรับใช้เพื่อรายงานผลเบื้องต้นแทนการรายงานผลการย้อมสีแกรมซึ่งเป็นแนวทางที่ใช้ในปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทยในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอพระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ ที่ให้ทุนสนับสนุนและพัฒนางานวิจัยในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลขอนแก่น หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น ที่อนุญาตให้สามารถทำการศึกษาวิจัยได้ ขอขอบคุณคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลขอนแก่น ที่ได้ช่วยทบทวนโครงร่างงานวิจัยให้ออกมาอย่างสมบูรณ์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลขอนแก่นทุกท่าน ที่รวบรวมและเก็บตัวอย่าง รวมทั้งผู้ป่วยทุกรายที่ได้ให้ตัวอย่างทดสอบเพื่อศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Kumar A, Roberts D, Wood KE, *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med 2006; 34: 1589-96. DOI: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9
2. Anderson FS, Rodrigo C, Schandert L, *et al*. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. J Bras Patol Med Lab 2013; 49: 191-7. doi.org/10.1590/S1676-24442013000300006
3. Yun F, Wang W, Jianfeng Fu. Rapid laboratory diagnosis for respiratory infectious diseases by using MALDI-TOF mass spectrometry. J Thorac Dis 2014; 6: 507-11. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.34
4. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. Clin Chem 2015; 61: 100-11. doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770
5. Shin TG, Jo IJ, Hwang SY, *et al*. Comprehensive interpretation of central venous oxygen saturation and blood lactate levels during resuscitation of patients with severe sepsis and septic shock in the Emergency Department. Shock 2016; 45: 4-9. doi:10.1097/SHK.0000000000000466
6. Dugar S, Choudhary C, Duggal A. Sepsis and septic shock: Guideline-based management. Cleve Clin J Med 2020; 87: 53-64. doi: 10.3949/ccjm.87a.18143
7. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, *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. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03257.x
8. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, *et al*. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. Arch Pathol Lab Med 2013; 137: 1247-54. doi:10.5858/arpa.2012-0651-OA
9. Oviano M, Rodríguez-Sanchez B, Gomara M, *et al*. Direct identification of clinical pathogens from liquid culture media by MALDI-TOF MS analysis. Clin Microbiol and Infect 2018; 24: 624-9. doi:10.1016/j.cmi.2017.09.010
10. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, *et al*. Real time identification of bacteria and yeast in positive blood culture broths by MALDI-TOF-mass spectrometry. J Clin Microbiol 2010; 48: 1542-8.
11. Garnacho-Montero J, Gutierrez-Pizarraya A, Escoresca-Ortega A, *et al*. De-escalation of empirical therapy is associated with lower mortality in patients with severe sepsis and septic shock. Intensive Care Med 2014; 40: 32-40. doi:10.1007/s00134-013-3077-7

12. Ponderand L, Pavese P, Maubon D, *et al*. Evaluation of rapid sepsityper module (Bruker Daltinics) for the rapid diagnosis of bacteremia and fungemia by MALDI-TOF-MS. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2020; 19: 1-15. doi:10.1186/s12941-020-00403-w
13. Wimmer JL, Long SW, Cernoch P, *et al*. Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix System. J Clin Microbiol 2012; 50: 2452-4. doi:10.1128/JCM.00409-12
14. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, *et al*. "Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis 2009; 49: 543-51.
15. Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent advances and ongoing challenges in the diagnosis of microbial infections by MALDI-TOF mass spectrometry. Front Microbiol 2018; 1-9. doi:10.3389/fmicb.2018.01097
16. Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. J Food Drug Anal 2019; 27: 404-14.
17. Han SS, Jeong YS, Choi SK. Current Scenario and Challenges in the Direct Identification of Microorganisms Using MALDI TOF MS. Microorganisms 2021; 9: 1-11. doi:10.3390/microorganisms 9091917
18. Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and metaanalysis of the performance of the sepsityper kit. Int J Microbiol 2015: 1-10.
19. Loonen AJ, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PF, van den Brule AJ. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31: 1575-83.
20. Schubert S, Weinert K, Wagner C, *et al*. "Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry". J Mol Diagn 2011; 13: 701-6.
21. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. PLoS One 2011; 6: 1-7.

22. Wada A, Mari Kono M, Kawauchi S, Takagi Y, Morikawa T, Funakoshi K. Rapid discrimination of gram-positive and gram-negative bacteria in liquid samples by using NaOH-sodium dodecyl sulfate solution and flow cytometry. PLoS One 2012; 7: 1-10.
23. Cayrou C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry for the identification of environmental organisms: the Planctomycetes paradigm. Environ Microbiol Rep 2010; 2: 752-60.
24. Bourassa L. MALDI TOF MS Quality Control in Clinical Microbiology. Clinical Laboratory News. [serial on the Internet]. 2018 Jan [cited 2023 Sep 11]. Available form: https://www.aacc.org/cln/articles/2018/janfeb/maldi-tof-ms-quality-control-in-clinical-microbiology.
25. Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, *et al*. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2012; 50: 2034-9. doi:10.1128/JCM.00330-12
26. Arroyo MA, Denys GA. Parallel Evaluation of the MALDI Sepsityper and Verigene BC-GN Assays for rapid identification of gram-negative bacilli from positive blood cultures. J Clin Microbiol 2017; 55: 2708-18.
27. Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with gram-negative bacteremia: a prospective observational study. Clin Infect Dis 2013; 56: 1101-7.
28. Nomura F, Tsuchida S, Murata S, Satoh M, Matsushita K. Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection. Clin Proteom 2020; 17: 1-11. doi:10.1186/s12014-020-09278-7
29. Lin JF, Ge MC, Liu TP, Chang SC, Lu JJ. A simple method for rapid microbial identification from positive monomicrobial blood culture bottles through matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. J Microbiol Immunol Infect 2018; 51: 659-65.
30. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2010; 48: 444-7.