

นิพนธ์ต้นฉบับ

การจำแนกเชื้อ *Neisseria* spp. โดยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry

ปรีศนา บัวสกุล*, จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย**, ปิยะนุช โนจา***, อังคณา เจริญวัฒนาโชคชัย***, ลิทธิรักษ์ รอยตระกูล**, อีร์กุล อาภรณ์สุวรรณ****

บทคัดย่อ

- บทนำ:** การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อก่อโรคหนองในชนิด *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ในคนได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีอุบัติการณ์การติดเชื้อโรคเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ควรจะมีเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อที่ง่าย รวดเร็วและถูกต้อง ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยี Matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) เพื่อระบุและแยกแยะเชื้อ *N. gonorrhoeae* สายพันธุ์ก่อโรคออกจาก *Neisseria* spp. สายพันธุ์อื่นๆ
- วิธีการศึกษา:** นำ *Neisseria* จำนวน ๗ สายพันธุ์ และเชื้อ *Moraxella catarrhalis* มาเลี้ยงในวุ้นช็อกโกแลต จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS
- ผลการศึกษา:** พบว่า *Neisseria* spp. จำนวน ๗ สายพันธุ์ มีการแสดงออกของแถบเปปไทด์ที่จำเพาะ และแตกต่างจากลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของเชื้อ *M. catarrhalis*
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** ข้อดีของเทคนิค MALDI-TOF MS ได้แก่ มีความจำเพาะและความไวสูงควบคู่กับการตรวจทำได้อย่างรวดเร็ว ทำให้มีการนำวิธีการนี้มาใช้ในการระบุสายพันธุ์ *Neisseria* spp. ทดแทนวิธีมาตรฐานที่ยังคงใช้ในปัจจุบัน
- คำสำคัญ:** *Neisseria*, MALDI-Biotyper, MALDI-TOF, Mass spectrometry

วันที่รับบทความ: ๒๕ พฤศจิกายน ๒๕๕๗

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๑๑ มิถุนายน ๒๕๕๘

* บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ห้องปฏิบัติการวิจัยโปรตีโอมิกส์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

*** กลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ สำนักโรคเอดส์ วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

**** ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทนำ

เชื้อ *Neisseria* เป็นเชื้อแบคทีเรียจัดอยู่ในตระกูล Neisseriaceae เป็นเชื้อที่พบได้ตามธรรมชาติ บางสปีชีส์เป็นเชื้อประจำถิ่นในร่างกายมนุษย์ (normal flora) ส่วนที่เป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ มี ๒ สายพันธุ์ที่สำคัญคือ *Neisseria meningitidis* ก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบหรือที่เรียกกันว่าไขกัปกหลังแอ่น และ *Neisseria gonorrhoeae* ก่อโรคหนองใน สำหรับเชื้อ *Moraxella catarrhalis* เดิมจัดอยู่ในตระกูล Neisseriaceae เนื่องจากมีรูปร่างลักษณะและคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกัน

เชื้อ *Neisseria* และเชื้อ *Moraxella catarrhalis* เป็นเชื้อที่มีรูปร่างกลม มักอยู่กันเป็นคู่ ติดสีแกรมลบ (Gram negative diplococci) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ ๓๕ - ๓๗ องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่ pH ประมาณ ๖.๕ - ๗.๕ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chocolate agar หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติคล้ายกันเพราะเชื้อ *Neisseria* ต้องการอาหารที่มีส่วนประกอบของ inorganic iron และสารเสริมการเจริญเติบโต ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส วิตามินและ cofactor^{๑, ๒}

เชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* เป็นสาเหตุของโรคหนองในที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ และมีอุบัติการณ์การติดเชื้อเพิ่มสูงขึ้นทุกปี จากข้อมูลของ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. ๒๐๑๒ พบอัตราป่วยโรคหนองใน ๑๐๗.๕ ต่อแสนประชากร^๓ จากปี ค.ศ. ๒๐๐๕ ซึ่งอัตราป่วยอยู่ที่ ๙๙.๘ ต่อแสนประชากร^๔ และกลุ่มอายุที่พบการติดเชื้อสูงสุดได้แก่ ๒๐ - ๒๔ ปี (ร้อยละ ๓๔) รองลงมาได้แก่ ๑๕ - ๑๙ ปี (ร้อยละ ๒๔) และ ๒๕ - ๒๙ ปี (ร้อยละ ๑๗)^๕ สำหรับประเทศไทย จากข้อมูลรายงานของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่าโรคหนองในมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. ๒๕๕๐ ที่มีอัตราป่วย ๘.๘๗ ต่อแสนประชากร เป็น ๑๑.๔๔ ต่อแสนประชากร^๖ ในปี พ.ศ. ๒๕๕๖ โดยพบสัดส่วนเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ ๑:๐.๕๒ ส่วนกลุ่มอายุที่พบมากที่สุดเรียงตามลำดับคือ ๑๕ - ๒๔ ปี (ร้อยละ ๕๔.๗๒) ๒๕ - ๓๔ ปี (ร้อยละ ๑๙.๘๗) ๓๕ - ๔๔ ปี (ร้อยละ ๑๐.๔๓)^๖

ในผู้ชายจะปรากฏอาการของโรคหนองในได้ง่ายกว่าผู้หญิง โดยมักเกิดการติดเชื้อครั้งแรกที่ท่อปัสสาวะ เมื่อเป็นมากขึ้นจะมีหนองขุ่นสีเหลืองจำนวนมาก ภายในหนองมีเชื้ออยู่เป็นจำนวนมาก และเชื้อจะลุกลามเข้าต่อมลูกหมาก (prostate gland) ท่ออสุจิ (seminal vesicle) และท่ออัณฑะ (epididymis)

ทำให้เกิดอาการอักเสบ เมื่อทิ้งไว้เรื้อรังหนองจะค่อยๆ หายไป แต่จะเกิดพังผืดหรือแผลเป็น (fibrosis) และทำให้ท่อปัสสาวะตีบตันและเป็นหมันได้ ส่วนในผู้หญิงที่เป็นโรคนี้จะไม่ปรากฏอาการได้ถึงร้อยละ ๗๐ - ๘๐ โดยการติดเชื้อจะลุกลามจากท่อปัสสาวะ และช่องปากมดลูกและลุกลามต่อไปยังท่อนำไข่ (oviduct) ทำให้เกิดการอักเสบของอุ้งเชิงกราน (pelvic inflammatory disease, PID) ซึ่งจะปวดท้องน้อยด้านที่ติดเชื้อ อาจมีเยื่อหุ้มช่องท้องส่วนล่างอักเสบและมีน้ำเหลืองออกทางช่องคลอด โรคอาจลุกลามไปที่กระเพาะปัสสาวะและทวารหนัก และการติดเชื้อเรื้อรังจะทำให้เกิดพังผืดซึ่งเป็นสาเหตุใหญ่ ทำให้เป็นหมันหรือมีบุตรยาก หรือเพราะท่อนำไข่อุดตัน ทำให้เกิดการตั้งครรภ์นอกมดลูก (ectopic pregnancy) ได้ ถ้ารักษาไม่หายจะเป็นเรื้อรังและเป็นพาหะนำโรคได้ เพราะในผู้หญิงมักไม่ปรากฏอาการ ดังนั้นการวินิจฉัยในผู้หญิงจึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นหลัก^{๗, ๘} ซึ่งมักเป็นการตรวจทาง microscopic examination โดยการย้อมสีแกรม (Gram stain) และการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จากนั้นทำการทดสอบเพิ่มเติมด้วยชุดทดสอบชีวเคมีเพื่อทดสอบ oxidase test ทดสอบ superoxol (30% hydrogen peroxide) และทดสอบ carbohydrate utilization test^{๙, ๑๐}

Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time-of-flight mass spectrometer (หรือ MALDI-TOF MS) เป็นเครื่องมือวัดมวลของสารที่มีความไวสูงถึงระดับอัตโตโมล ทำงานได้รวดเร็ว มีความแม่นยำสูง เครื่องมือประกอบด้วย ๒ ส่วนคือ MALDI และ TOF โดย MALDI เป็นเทคนิคทำให้สารเกิดไอออนในเซ็น หรือแตกตัวเป็นไอออนก่อนที่จะเข้าสู่เครื่องวัดมวลโมเลกุล (Time-of-flight mass spectrometer: TOF MS) โดยผลสมการตัวอย่างกับสารแมทริกซ์ (matrix) เช่น Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) สำหรับวิเคราะห์เปปไทด์, Sinapinic acid (SA) สำหรับวิเคราะห์โปรตีน เป็นต้น สารดังกล่าวจะละลายในตัวทำละลายที่มีส่วนประกอบของกรดหรือด่างเมื่อผสมกับตัวอย่างจึงทำให้สารตัวอย่างมีประจุ จากนั้นสารผสมจะถูกนำไปหยดลงบนแผ่นโลหะ (MALDI plate) ส่วนที่เป็นตัวทำละลายจะถูกระเหยออกไป จะคงเหลือไว้เฉพาะผลึก (crystallized matrix) และเมื่อแมทริกซ์ถูกกระตุ้นด้วยเลเซอร์ (UV lasers) เช่น nitrogen lasers ที่ความยาวคลื่น ๓๓๗ นาโนเมตร แมทริกซ์จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายทอดพลังงานจากแสงเลเซอร์ส่งไปยังโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีประจุและแตกตัวเป็นไอออน ทำให้โปรตีนหรือเปปไทด์

สามารถเคลื่อนที่ได้และวิเคราะห์มวลสารด้วย mass analyzer ชนิด time of flight (TOF) ซึ่งโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีมวลสารน้อยจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีมวลสารมาก จึงเดินทางไปยังตัวรับ (detector) ได้เร็วกว่า ทำให้สามารถคำนวณระยะเวลาที่ตัวอย่างเคลื่อนที่และบอกขนาดของมวลสารได้^{๑๑} เทคนิคนี้มีขั้นตอนที่สะดวกและรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค LC-MS แต่ถูกจำกัดด้วยปริมาณของตัวอย่างในการศึกษา นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่อยู่ในสภาวะของแข็งได้ไม่ว่าจะเป็นโคโลนีของเชื้อหรือชิ้นเนื้อ จึงสามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์ได้หลากหลาย ทั้งตรวจจำแนกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราแยกจากผู้ป่วย^{๑๒, ๑๓, ๑๔} หรือแม้กระทั่งเชื้อแบคทีเรียดื้อยาเช่น multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*^{๑๕} และ multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*^{๑๖}

จากการศึกษาของ Seng และคณะ (ปี ค.ศ. ๒๐๐๘) ที่ใช้เทคนิค MALDI-TOF MS มาตรวจจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจจำนวน ๑,๖๖๐ ราย พบว่า การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้มีความถูกต้องเท่ากับร้อยละ ๙๕.๔ โดยสามารถจำแนกเชื้อได้ถึงระดับสปีชีส์เท่ากับร้อยละ ๘๙.๑ และระบุได้ระดับ genus เท่ากับร้อยละ ๑๑.๓ เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อเชื้อเท่ากับ ๖ นาที และค่าใช้จ่ายเฉลี่ยประมาณร้อยละ ๒๒ - ๓๒ ของค่าใช้จ่ายที่ตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน^{๑๗} ในขณะที่ Ilina และคณะ (ปี ค.ศ. ๒๐๐๘) ได้ใช้ MALDI-TOF MS จำแนกเชื้อ *Neisseria* ทั้งสิ้น ๕๙ สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์ก่อโรค ๒ สปีชีส์ ได้แก่ *Neisseria meningitidis* ๒๙ สายพันธุ์ และ *Neisseria gonorrhoeae* ๑๓ สายพันธุ์ กับเชื้อ *Neisseria* ที่ไม่ก่อโรคจำนวน ๑๕ สายพันธุ์ ผลการวิจัยพบว่า ลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของเชื้อ *Neisseria* จาก MALDI-TOF MS มีความแตกต่างกันระหว่างสปีชีส์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสับสปีชีส์หรือซีโรไทป์^{๑๘} งานวิจัยนี้มุ่งเน้นใช้เทคนิค MALDI-TOF MS จำแนกเชื้อ *Neisseria* spp. เปรียบเทียบกับการจำแนกเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน ด้วยการย้อมสีแกรมและการเพาะเลี้ยงเชื้อตามด้วยการทดสอบทางชีวเคมี

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง

เชื้อ *Neisseria* spp. จำนวน ๗ สายพันธุ์และ *Moraxella catarrhalis* ๑ สายพันธุ์

เชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ATCC49226 และ *Neisseria meningitidis* จากสำนักโรคเอดส์ วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

เชื้อ *Neisseria* spp. ๕ สายพันธุ์ ได้จากองค์การอนามัยโลก ประเทศออสเตรเลีย (WHO) ได้แก่ *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria polysaccharea* (Morley), *Neisseria subflava* (Warby), *Neisseria sicca* และ *Moraxella catarrhalis* NCTC11020

การวินิจฉัยการติดเชื้อ *Neisseria* ทางห้องปฏิบัติการ

๑. การย้อมสีแกรม (Gram stain)

การตรวจสอบรูปร่างลักษณะการติดสีแกรม และการเรียงตัวของเชื้อ โดยการป้ายโคโลนีบนสไลด์จากนั้นทำให้แห้งโดยการอังสไลด์เหนือเปลวไฟ นำไปย้อมด้วยสีแกรม ปล่อยให้แห้งหรือซับให้แห้ง ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000x (oil field)

๒. การเพาะเลี้ยงเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง ๘ สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Chocolate agar ที่เติมสารช่วยในการเจริญเติบโต (Bangrak enrichment solution) ที่อุณหภูมิประมาณ ๓๕ องศาเซลเซียส ที่มีความชื้นและมีก๊าซ CO₂ 5% เป็นเวลา ๑๘ - ๒๔ ชั่วโมง

๓. การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ทำการทดสอบด้วยชุดทดสอบชีวเคมี เพื่อยืนยันและพิสูจน์คุณสมบัติของเชื้อตามวิธีดังนี้ ทดสอบ oxidase test เพื่อหาการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome C oxidase ทำได้โดยป้ายเชื้อไปขีดบนกระดาษกรองที่หยดไว้ด้วยน้ำยา 1% oxidase เชื้อจะเปลี่ยนสีจากสีชมพูแดง เป็นสีม่วงเข้ม ภายในเวลา ๑๐ วินาที จากนั้นตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์ catalase ของเชื้อโดยป้ายเชื้อลงบนสไลด์ที่สะอาดแล้วหยดน้ำยา 30% H₂O₂ ลงไปสังเกตปฏิกิริยาจะพบที่เกิดฟองอากาศจากนั้นทดสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อ โดยวิธี carbohydrate utilization test โดยใช้น้ำตาล ๓ ชนิด ได้แก่ กลูโคส มอลโตส และซูโครส ถ้าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลชนิดใดได้จะทำให้เกิดกรด และเปลี่ยนสี phenol red ซึ่งเป็น indicator จากสีแดงเป็นสีเหลือง

การจำแนกเชื้อ *Neisseria* spp. ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

นำเชื้อมาตรฐาน จำนวน ๘ สายพันธุ์ มาทำการทดสอบหาลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ด้วยเครื่อง UltraFlex MALDI-TOF/TOF MS (Bruker Dalton, Germany) โดยนำเชื้อมาละลายใน 70% ethanol จากนั้นปั่นตกตะกอน แล้วดูดส่วนตะกอนประมาณ ๒๐ ไมโครลิตร ผสมกับสารแมทริกซ์ (๑๐ มิลลิกรัมของ Sinapinic acid ละลายใน 50% acetonitrile ที่มี 2.5% trifluoroacetic acid ปริมาตร ๑ มิลลิลิตร) แล้วนำไปหยดบน MALDI plate ทิ้งไว้ให้แห้ง

ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UltraFlex MALDI-TOF MS จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เช่น โปรแกรม Flex analysis โปรแกรม ClinPro tool (Bruker Dalton, Germany) เพื่อจำแนกเชื้อ *Neisseria* spp. สายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

ผลการศึกษา

การจำแนกเชื้อ *Neisseria* spp. ทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีมาตรฐาน

การย้อมสีแกรม (Gram stain)

การตรวจสอบรูปร่างลักษณะการติดสีแกรม และการเรียงตัวของเชื้อทั้ง ๘ สายพันธุ์ มีลักษณะเหมือนกันคือเป็นเชื้อที่มีลักษณะติดสีแกรมลบ (ตัวเชื้อติดสีแดง) รูปร่างกลม อยู่กันเป็นคู่ๆ (Gram negative diplococci) ซึ่งจะเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อในกลุ่มของ *Neisseria* spp. (ตารางที่ ๑)

การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ

วิธีการทดสอบ oxidase test เป็นการตรวจสอบหาการทำงานของเอนไซม์ cytochrome C oxidase วิธีนี้เป็นการแยกเชื้อ *Neisseria* spp. ออกจากเชื้อแบคทีเรียอื่นเบื้องต้นเนื่องจากเชื้อ *Neisseria* spp. จะให้ผลบวก oxidase test ทุกเชื้อ (ตารางที่ ๑)

วิธีการทดสอบ superoxol test (30% H_2O_2) เป็นการตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์ catalase ซึ่งเชื้อสร้างขึ้นมาเพื่อย่อยสลาย H_2O_2 ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยเชื้อ *Neisseria* แต่ละสายพันธุ์ให้ความแรงและขนาดของฟองอากาศแตกต่างกันไป จากผลการทดสอบพบว่า *N. gonorrhoeae* ให้ระดับความแรงมากที่สุด (4+) ฟองมีความละเอียดและมีความคงตัวอยู่ได้นาน ส่วนเชื้อ *Neisseria* spp. อื่นๆ ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเชื้อ *N. flavescens*, *N. subflava* (Warby) และ *N. sicca* ให้ความแรงของปฏิกิริยาอยู่ที่ 2+ สำหรับ *N. lactamica*, *N. polysaccharea* (Morley) และ *M. catarrhalis* ให้ความแรงอยู่ระหว่าง 1+ ถึง 3+ ส่วน *N. meningitidis* ให้ความแรงอยู่ระหว่าง 1+ ถึง 4+

วิธีการทดสอบ carbohydrate utilization test เป็นการตรวจสอบการย่อยน้ำตาล กลูโคส มอลโตส ซูโครส ของเชื้อ *Neisseria* spp. ผลการทดสอบพบว่า *N. gonorrhoeae* จะให้ผลบวกกับน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว ส่วนเชื้ออีก ๔ สายพันธุ์ที่สามารถย่อยน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส ได้แก่ *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. polysaccharea* และ *N. subflava* ส่วนเชื้อที่ย่อยน้ำตาล ๓ ชนิดทั้งน้ำตาลกลูโคส มอลโตส ซูโครส มีเพียงสายพันธุ์เดียว ได้แก่ *N. sicca* ส่วนเชื้อ *N. flavescens* และ *M. catarrhalis* นั้นให้ผลลบกับน้ำตาลทั้งสามชนิด (ตารางที่ ๑)

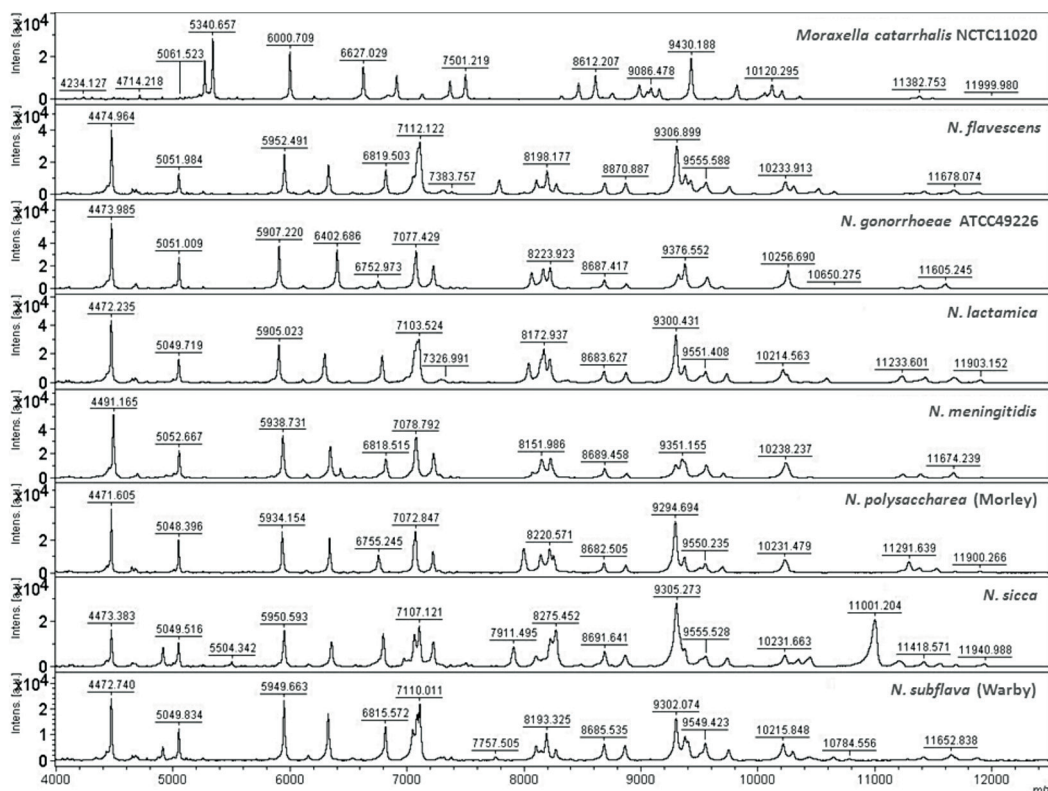
ตารางที่ ๑ ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Neisseria* spp. จำนวน ๗ ชนิดและ *Moraxella catarrhalis* NCTC11020

Species	Gram stain	Oxidase test	Superoxol test	Carbohydrate utilization test		
				G	M	S
<i>N. gonorrhoeae</i>	Gram negative diplococci	+	4++	+	-	-
<i>N. meningitidis</i>	Gram negative diplococci	+	1+ to 4+	+	+	-
<i>N. flavescens</i>	Gram negative diplococci	+	2+	-	-	-
<i>N. lactamica</i>	Gram negative diplococci	+	1+ to 3+	+	+	-
<i>N. polysaccharea</i> (Morley)	Gram negative diplococci	+	1+ to 3+	+	+	-
<i>N. subflava</i> (Warby)	Gram negative diplococci	+	2+	+	+	-
<i>N. sicca</i>	Gram negative diplococci	+	2+	+	+	+
<i>Moraxella catarrhalis</i> NCTC11020	Gram negative diplococci	+	1+ to 3+	-	-	-

การจำแนกเชื้อ *Neisseria* spp. ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

การจำแนกเชื้อมาตรฐาน จำนวน ๘ สายพันธุ์ โดยการหาลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS นั้น พบว่าลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของเชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันโดยเชื้อ *Neisseria* spp. จำนวน ๗ สายพันธุ์ มีการแสดงออกของแถบเปปไทด์ขนาด ๔,๔๗๐, ๕,๐๕๐ และ

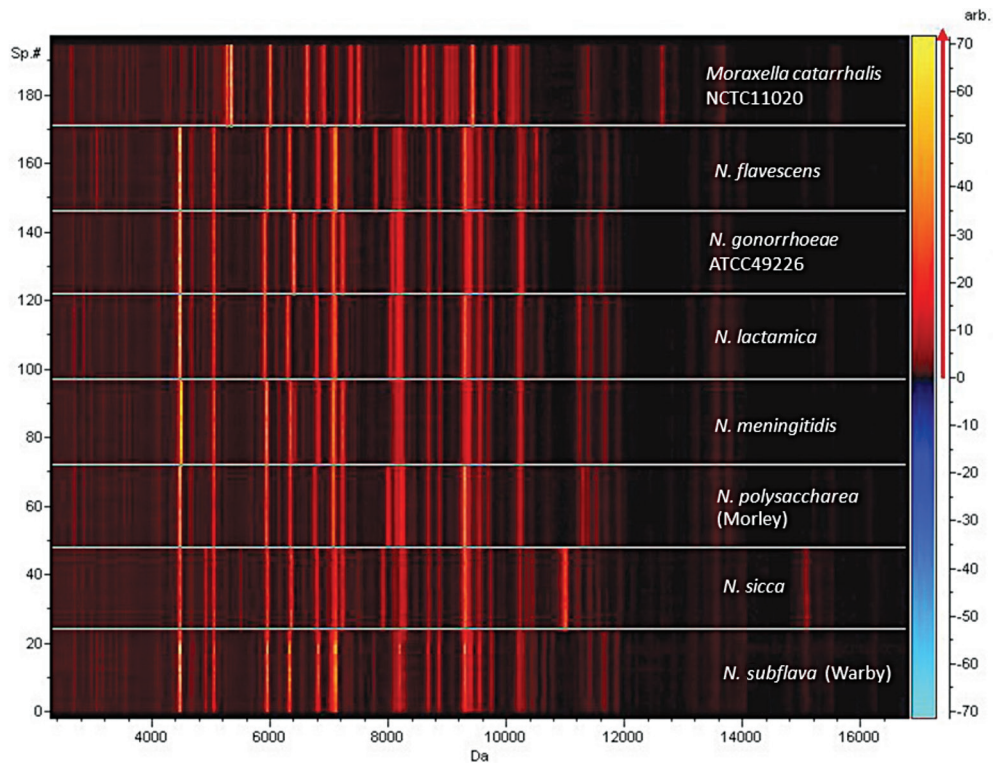
๘,๒๐๐ ดาลตัน (Da) ในขณะที่ *M. catarrhalis* ไม่พบการแสดงออกของแถบเปปไทด์ดังกล่าว ส่วนเชื้อ *M. catarrhalis* พบว่ามีแถบเปปไทด์จำเพาะขนาดประมาณ ๕,๓๔๐, ๗,๕๐๐, ๙,๔๓๐ และ ๑๒,๖๕๐ ดาลตัน ที่ไม่พบใน *Neisseria* spp. ทำให้สามารถแยกเชื้อ *M. catarrhalis* ออกจาก *Neisseria* spp. อื่นๆ ได้อย่างชัดเจน (รูปที่ ๑)



รูปที่ ๑ แสดงลายพิมพ์แถบเปปไทด์ (PMF) ของ *Moraxella catarrhalis* NCTC11020, *Neisseria flavescens*, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC49226, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria polysacchara* (Morley), *Neisseria sicca* และ *Neisseria subflava* (Warby) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS และโปรแกรม ClinPro tool โดยแกน y แสดงปริมาณของประจุ (หน่วยเป็น AU) แกน x แสดงค่ามวลต่อประจุ (ดาลตัน) โดยทั่วไปแล้วไอออนมักมีประจุ +1 ($Z = 1$) ดังนั้นค่า m/z จึงมีค่าเท่ากับมวลของเปปไทด์ไอออนโดยตรง

สำหรับในกลุ่มของ *Neisseria* นั้น พบว่าลายพิมพ์แถบเปปไทด์มีความใกล้เคียงกันมาก มีโปรตีนหลายขนาดที่เชื้อกลุ่มนี้มีเหมือนกัน เช่น โปรตีนขนาดประมาณ ๘,๖๘๐ และ ๘,๘๗๐ ดาลตัน ซึ่งพบในเชื้อ *Neisseria* ทุกสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถแยก *N. sicca* ออกจากเชื้อ *Neisseria* อื่นในสปีชีส์เดียวกันด้วย เนื่องจาก *N. sicca* มีการแสดงออกของแถบ

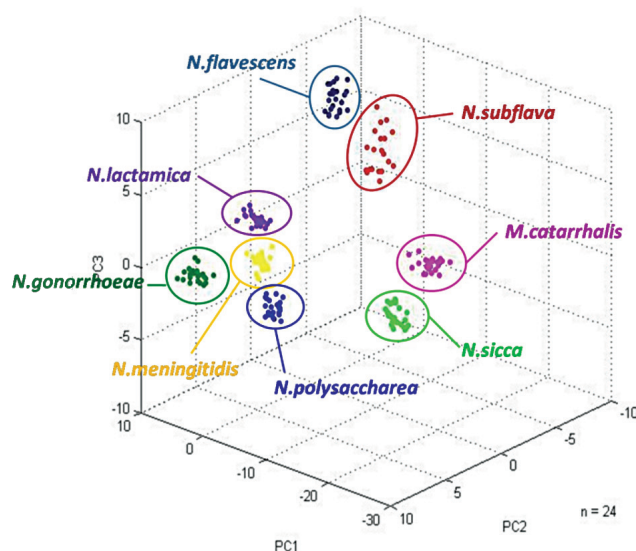
เปปไทด์ขนาด ๑๑,๐๐๑ ดาลตัน ซึ่งจะไม่พบการแสดงออกของแถบเปปไทด์นี้ในเชื้อ *Neisseria* spp. อื่นๆ ได้ โปรแกรม ClinPro tool สามารถแสดงผลลายพิมพ์แถบเปปไทด์ (PMF) ของกลุ่มเชื้อ *Neisseria* ให้อยู่ในรูปของ pseudo-gel (รูปที่ ๒) เพื่อแสดงให้เห็นความแตกต่างของลายพิมพ์แถบเปปไทด์ให้ชัดเจนขึ้น



รูปที่ ๒ Pseudo-gel ของลายพิมพ์แถบเปปไทด์ (PMF) จาก *Moraxella catarrhalis* NCTC11020, *Neisseria flavescens*, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC49226, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria polysaccharea* (Morley), *Neisseria sicca* และ *Neisseria subflava* (Warby) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS และโปรแกรม ClinPro tool

จากรูปที่ ๒ ลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของแต่ละเชื้อสามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนมากขึ้นเมื่อปรับการแสดงผลเป็น pseudo-gel พบว่า *M. catarrhalis* เป็นเชื้อที่มีการแสดงออกของแถบเปปไทด์ที่มีความแตกต่างแยกออกจากเชื้อ *Neisseria* spp. อื่นๆ ได้ชัดเจนมากขึ้น เช่น ไม่พบแถบเปปไทด์จำเพาะขนาดประมาณ ๔,๔๐๐ และ ๕,๐๐๐ ดาลตัน ที่สามารถพบได้ในเชื้อ *Neisseria* spp. จำนวน

๗ สายพันธุ์ สำหรับลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของเชื้อ *Neisseria* spp. ทั้ง ๗ สายพันธุ์ ได้แก่ *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. flavescens*, *N. polysaccharea* (Morley), *N. subflava* (Warby) และ *N. sicca* รวมถึง *N. lactamica* นั้นมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วย PCA (Principal component analysis) (รูปที่ ๓)



รูปที่ ๓ แสดงรูป Principal component analysis (PCA) ๓ มิติจากการวิเคราะห์ซ้ำด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS และโปรแกรม ClinPro tool ของ *Moraxella catarrhalis* NCTC11020, *Neisseria flavescens*, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC49226, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria polysacchara* (Morley), *Neisseria sicca* และ *Neisseria subflava* (Warby) แต่ละจุดแทนผลการวิเคราะห์แต่ละครั้ง

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาการติดเชื้อโรคหนองใน ทำได้โดยการตรวจทาง microscopic examination โดยการย้อมสีแกรม จะพบเชื้อติดสีแกรมลบลักษณะกลม อยู่กันเป็นคู่ในเซลล์เม็ดเลือดแต่วิธีนี้มีความไวต่ำเพียงร้อยละ ๓๙ - ๖๒ เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ การเพาะเชื้อหนองในจากสิ่งส่งตรวจทำได้โดยใช้ Modified Thayer-Martin agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อก่อโรคหนองในมากเพราะมีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่อาจรบกวนการเจริญของเชื้อ *N. gonorrhoeae* จากนั้นทำการ subculture เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์และทำการทดสอบเพิ่มเติมด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมีโดยการตรวจสอบด้วย oxidase test และการทดสอบ superoxol (30% H_2O_2) วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีมาตรฐานที่ต้องใช้เวลานานในการจำแนกเชื้อ *N. gonorrhoeae* ออกจาก *Neisseria* spp. สายพันธุ์อื่นๆ

จากผลการทดสอบคุณสมบัติเชื้อ *Neisseria* spp. (ตารางที่ ๑) จำเป็นต้องใช้การทดสอบหลายหลักการร่วมกันจึงจะสามารถแยกเชื้อแต่ละสปีชีส์ออกจากกันได้ ผลการทดสอบคุณสมบัติพบว่าสามารถแยกเชื้อ *N. gonorrhoeae* ออกจากเชื้อ *N. meningitidis* และ *Neisseria* spp. อื่นๆ

ได้ แต่ไม่สามารถแยกเชื้อ *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. polysacchara* และ *N. subflava* ออกจากกันได้ชัดเจน เพราะให้ผล Carbohydrate utilization test เหมือนกัน คือ ให้ผลบวกกับน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส ผลลบกับน้ำตาลซูโครส (G+M+S-) ผลของการตรวจ superoxol test ก็ให้ผลอยู่ระหว่าง 1+ ถึง 4+ และไม่สามารถแยก *N. flavescens* ออกจาก *M. catarrhalis* เนื่องจากให้ผลเป็นลบต่อน้ำตาลทุกตัวนอกจากวิธีดังกล่าวที่จะสามารถแยกเชื้อ *M. catarrhalis* ออกจาก *Neisseria* spp. คือการทดสอบเอนไซม์ DNase (Deoxyribonuclease) โดยเชื้อ *M. catarrhalis* จะให้ผลบวก แต่ *Neisseria* spp. จะให้ผลเป็นลบ

การจำแนกเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เป็นการจำแนกเชื้อจากการทดสอบหลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของเชื้อแล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Flex analysis และ ClinPro tool (รูปที่ ๑) จากลักษณะลายพิมพ์แถบเปปไทด์ในรูปที่ ๑ พบว่าลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของเชื้อ *M. catarrhalis* แตกต่างจากเชื้อ *Neisseria* spp. อันชัดเจนสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า เช่น *M. catarrhalis* ไม่มีแถบของเปปไทด์ขนาด ๔,๔๓๓ ดาลตัน ในขณะที่พบในเชื้อ *Neisseria* spp. อื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถแยก *N. sicca* ออกจากเชื้อ *Neisseria* spp. อื่นได้ เนื่องจาก *N. sicca* มีการแสดงออกของโปรตีน

ขนาด ๑๑,๐๐๑ ดาลตัน ซึ่งไม่พบในเชื้อ *Neisseria* spp. อันเมื่อแสดงลายพิมพ์แถบเปปไทด์เป็น pseudo-gel (รูปที่ ๒) พบว่าลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของ *N. lactamica* มีความแตกต่างจากเชื้อ *Neisseria* spp. ชัดเจน

เมื่อทำการวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนเชิงสถิติโดยการจัดกลุ่มแบบ Principle component analysis (PCA) สามารถแยกความแตกต่างลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของเชื้อ *Neisseria* spp. ได้ชัดเจนมากขึ้น ลายพิมพ์แถบเปปไทด์ของเชื้อ *Neisseria* spp. จำนวน ๗ สายพันธุ์มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน สามารถจำแนกเชื้อทั้งหมดออกจากกันได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Elena N. Ilna และคณะ (ปี ค.ศ. ๒๐๐๘)^{๑๗} ในการทดสอบแยกเชื้อ *N. meningitidis* และ *N. gonorrhoeae* กับเชื้อ *Neisseria* ที่ไม่ก่อโรค (nonpathogenic *Neisseria*) ด้วยวิธี Direct bacterial profiling (DBP) โดยใช้ MALDI-TOF MS และเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Golparian D และคณะ (ปี ค.ศ. ๒๐๑๓)^{๑๘} ที่ศึกษาประเมินการแยกชนิดของเชื้อ *Neisseria* ด้วยวิธี MALDI-TOF MS เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานโดยทำการตรวจเชื้อก่อโรค *N. meningitidis* และ *N. gonorrhoeae* จำนวน ๑๒๕ รายที่เป็นเชื้อแยกจากคนไข้ และ ๖๕ รายเป็นเชื้อทั่วไป พบว่า สามารถจำแนกเชื้อ *N. meningitidis* และ *N. gonorrhoeae* ออกจากกันได้ แต่รายงานผลเชื้อ *N. kochii* ว่าอาจจะเป็นเชื้อ *N. meningitidis*

ข้อมูลจากการศึกษานี้เป็นการยืนยันการจำแนกเชื้อ *Neisseria* spp. ต่างๆ ออกจากกันได้ด้วยวิธี MALDI-TOF MS ซึ่งต้องนำไปประยุกต์และศึกษาต่อไป โดยใช้สิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยในประเทศไทยจำนวนมากขึ้น เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค MALDI-TOF MS ในการจำแนกเชื้อ *Neisseria* spp. ที่ก่อโรค ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่ดีขึ้น การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการได้ข้อมูลและสามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ตัวอย่างคนไข้ต่อไป เพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์โดยตรง และมุ่งหวังในการนำไปใช้ได้จริงในโรงพยาบาลต่อไปได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์จากทุนงบประมาณแผ่นดิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๔ - ๒๕๕๕ คณะวิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรคติดต่อ

กระทรวงสาธารณสุข และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัย โปรตีนโอมิคส์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ในการสนับสนุนเครื่องมือวิจัยต่างๆ รวมทั้งคำแนะนำและการทุ่มเทเวลาในการศึกษานี้ จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Gonorrhea laboratory information characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* and related species of human origin. [internet]. 2008 [cited 2014 March 14] Available from: <http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/Ngon.htm>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Biochemical tests for the identification of *N. gonorrhoeae* and related species: Gonorrhea laboratory information identification of *N. gonorrhoeae* and related species. [internet]. 2008 [cited 2014 March 14] Available from: <http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/biochemical.htm>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Reported STDs in the United States: 2012 National Data for Chlamydia, Gonorrhea, and Syphilis (Fact Sheet) [internet]. 2010 [cited 2014 March 14] Available from: <http://www.cdc.gov/nchhstp/newsroom/docs/STD-Trends-508.pdf>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trends in Sexually Transmitted Diseases in the United States: 2009 National Data for Gonorrhea, Chlamydia and Syphilis [internet]. 2010 [cited 2014 March 14] Available from: <http://www.cdc.gov/std/stats09/trends2009.pdf>.
- Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Epidemiological Surveillance Report 506: Gonorrhea 2007 [internet]. 2007 [cited 2014 March 14] Available from: http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/506wk/y50/d38_5250.pdf.
- Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Epidemiological Surveillance Report 506: Gonorrhea 2012 [internet]. 2013 [cited 2014 March 14] Available from: http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/506wk/y56/d38_5356.pdf.

๗. Bangrak STIs Cluster, Bureau of AIDS, TB and STIs, STIs Care and Treatment: Practical manuals of sexually transmitted Infections 2010, September 2010:1-34.
๘. Bangrak STIs Cluster, Bureau of AIDS, TB and STIs, Gonorrhea: Guidelines for treatment of sexually transmitted Infections 2010, September 2010: 13-7.
๙. Knapp JS. Historical perspectives and identification of *Neisseria* and related species. ClinMicrobiol Rev 1988;1:415-31.
๑๐. Ng LK, Martin IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. Can J Infect Dis Med Microbiol 2005;16:15-25.
๑๑. Prongvitaya S, Klinthong W, Janan M, Prongvitaya T. Proteomics tools for medical researches. J Med Tech PhyTher 2012;24:120-7. (in Thai).
๑๒. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, 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.
๑๓. Reich M, Bosshard PP, Stark M, Beyser K, Borgmann S. Species identification of bacteria and fungi from solid and liquid culture media by MALDI-TOF mass spectrometry. J Bacteriol Parasitol 2013;S5-002. doi:10.4172/2155-9597.S5-002B.
๑๔. Chen JHK, Ho P-L, Kwan GSW, She KKK, Siu GKH, Cheng VCC, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures using two commercial MALDI-TOF mass spectrometry systems. J of ClinMicrobiol 2013; doi:10.1128/JCM. 03259-12.
๑๕. Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, et al. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. PloS one 2013;8:e61428.
๑๖. Arpornsuwan T, Buasakul B, Jaresitthikunchai J, Roytrakul S. Potent and rapid antigenococcal activity of the venom peptide BmKn2 and its derivatives against different MALDI biotype of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. Peptides 2014;53:315-20.
๑๗. Ilin EN, Borovskaya AD, Malakhova MM, Vereshchagin VA, Kubanova AA, Kruglov AN, et al. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. J Mol Diagn 2009;11:75-86.
๑๘. Golparian D, Dauphin B, Hellmark B, Claesson B, Unemo M. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for species identification within the *Neisseria* genus-effective alternative to conventional techniques? Sex Transm Infect 2013;89:A102.

Abstract

Identification of *Neisseria* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry

Prisana Buasakul*, Janthima Jaresitthikunchai**, Piyanoot Noja***,

Angkana Charoenwatanachokchai***, Sittiruk Roytrakul**, Teerakul Arpornsuwan****

* Graduate school of Master degree in Medical technology, Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University

** Proteomics Research Laboratory, Genome Institute, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

*** Sexually Transmitted Infection cluster, Bureau of AIDS TB and STIs, Department of Disease Control, Ministry of Public Health

**** Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University

Introduction: There is growing interest in *Neisseria gonorrhoeae*, a strict human pathogen that causes the sexually transmitted disease gonorrhea, because the incidence rate of *N. gonorrhoeae* infection is recently high. Therefore, a simple, fast and accurate diagnosis is essential. The matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) protein profile was used to identify and discriminate the pathogenic *N. gonorrhoeae* from the other *Neisseria* spp.

Method: Seven *Neisseria* spp. and one control specie, *Moraxella catarrhalis*, were grown on chocolate agar and analyzed by MALDI-TOF MS.

Result: Every *Neisseria* spp. yielded reproducible and unique protein mass spectral fingerprints and was different from *M. catarrhalis*.

Discussion and Conclusion: The high specificity and sensitivity coupled with rapidity of the MALDI-TOF MS method provided substantial advantages over the time consuming conventional method currently used for the identification of *Neisseria* spp.

Key words: *Neisseria*, MALDI-Biotyper, MALDI-TOF, Mass spectrometry