

การระบุหา BIOMARKERS ในเชื้อแบคทีเรีย *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* โดยใช้ WHOLE-CELL MALDI-TOF MS IDENTIFICATION OF BIOMARKERS IN *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* USING WHOLE-CELL MALDI-TOF MS

สุทามาศ นิยมพานิช 5338034 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: สุมาลี ตั้งประดับกุล, Ph.D., วิไล หนูนภักดี, Ph.D., จามร สมณะ, Ph.D., ธเนศ กังสักรสิทธิ์, Ph.D.

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรค melioidosis ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อร้ายแรงที่ก่ออัตราการตายสูงในมนุษย์ การระบุสปีชีส์และจำแนกเชื้อ *B. pseudomallei* จากแหล่งต่าง ๆ ได้อย่างรวดเร็ว นั้น จึงมีประโยชน์ในการช่วยติดตามการแพร่ระบาดของโรค รวมถึงช่วยป้องกันและรักษาผู้ป่วยติดเชื้อได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นจึงได้นำเทคนิค whole-cell MALDI-TOF MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่พัฒนาใหม่ทาง proteomics มาใช้ทดสอบ เพื่อจะสามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ในการศึกษาครั้งนี้ เชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 11 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากสิ่งแวดล้อม 5 สายพันธุ์และคัดแยกจากผู้ป่วย 6 สายพันธุ์ถูกใช้ทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี whole-cell MALDI-TOF MS ซึ่งพบว่าแบคทีเรียส่วนมากมีลักษณะโคโลนีแบบ morphotype I คือ มีสีม่วง ผิวโคโลนีแห้งและขรุขระ และจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี whole-cell MALDI-TOF MS พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดถูกระบุเป็นสปีชีส์ *B. pseudomallei* ได้อย่างถูกต้องด้วยการตรวจหา 5 biomarkers ที่จำเพาะต่อสปีชีส์ *B. pseudomallei* (taxon-specific biomarkers) และค่าคะแนนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioTyper ส่วนผลวิเคราะห์การจับกลุ่มของเชื้อดังกล่าวซึ่งคัดแยกจากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วย พบว่ามีเชื้อจำนวนทั้งหมด 6 สายพันธุ์ที่สามารถถูกจัดกลุ่มได้ตรงตามแหล่งคัดแยก และผลจากโปรแกรม ClinProTools พบว่ามีทั้งหมด 10 biomarkers ที่จำเพาะต่อแหล่งคัดแยก (source-specific biomarkers) แบ่งเป็น 6 biomarkers ได้แก่ m/z 4056, 4214, 5814, 7545, 7895 และ 8112 Da ที่จำเพาะต่อกลุ่มเชื้อที่คัดแยกจากสิ่งแวดล้อม และ 4 biomarkers ที่จำเพาะต่อกลุ่มที่คัดแยกจากผู้ป่วย (m/z 3658, 6322, 7035 และ 7984 Da) นอกจากนี้ยังพบ biomarkers ที่จำเพาะต่อเชื้อที่คัดแยกมาจากผู้ป่วย (clinical isolate-specific biomarkers) ในเชื้อสายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ สายพันธุ์ *rpoS*, *ppk* และ *bpsI* ซึ่งเชื้อเหล่านี้เริ่มต้นมาจากสายพันธุ์ปกติที่คัดแยกมาจากผู้ป่วยและถูกดัดแปลงพันธุกรรมให้กลายเป็นตำแหน่งยีนดังกล่าว จึงเป็นการยืนยันแหล่งที่มาของเชื้อสายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดนี้ ผลการจัดกลุ่มระหว่างเชื้อสายพันธุ์ปกติ PP844 และเชื้อสายพันธุ์ *rpoS*, *ppk* และ *bpsI* พบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์มีการกระจายตัวแยกออกจากกัน ดังนั้นเทคนิค whole-cell MALDI-TOF MS นี้สามารถจำแนกเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มาจากแหล่งสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยได้ รวมทั้งจำแนกเชื้อที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมออกจากเชื้อสายพันธุ์ปกติได้ และได้ตรวจพบ 12 biomarkers ที่จำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ทั้ง 3 ดังนี้ biomarkers ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ *rpoS* ได้แก่ m/z 2721 และ 2748 Da ส่วน biomarkers ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ *ppk* ได้แก่ 3150, 3378 และ 7994 Da สำหรับสายพันธุ์ *bpsI* พบทั้งหมด 7 biomarkers ได้แก่ m/z 3420, 3520, 3587, 3688, 4623, 4708 และ 5450 Da การศึกษานี้จึงเป็นครั้งแรกที่นำเทคนิค whole-cell MALDI-TOF MS มาระบุหา biomarkers ที่จำเพาะต่อแหล่งคัดแยก รวมถึงหา biomarkers ที่จำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการระบุสปีชีส์และจำแนกเชื้อ *B. pseudomallei* นอกจากนี้ยังแสดงถึงความสามารถของการใช้เทคนิคนี้มาเป็นเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ เพื่อระบุและจำแนกคลังเชื้อแบคทีเรียที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้น