ว กรมวิทย พ 2568; 67 (1): 1-14

การพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพเทคนิค Real-time PCR เพื่อการตรวจยีนดื้อยา vancomycin และ methicillin ในเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Enterococcus* spp.

วไลลักษณ์ กาญจนะพิน[1] วรรธนี สังข์หิรัญ[1] วัชราภรณ์ คำจุมพล[2] และ วันทนา ปวีณกิตติพร[2]

[1]ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง สงขลา 90100

[2]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE) เป็นเชื้อแบคทีเรียดื้อยากลุ่มแกรมบวกที่ใช้เป็นสัญญาณเตือนการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาระดับประเทศ การตรวจยีนดื้อยาของเชื้อกลุ่มนี้ต้องการเทคนิคที่รวดเร็วและแม่นยำสูง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี Real-time PCR สำหรับตรวจยีนดื้อยาสำคัญชนิด *van* และ *mec* ของกลุ่มแบคทีเรียดื้อยา VRE และ MRSA ตามลำดับ และเฝ้าระวังเชื้อ VRSA ในการทดสอบรอบเดียว เพื่อใช้ติดตามสถานการณ์การดื้อยาและยีนดื้อยาอย่างต่อเนื่อง การประเมินประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาที่ใช้ 3 หลอดปฏิกิริยาในการตรวจ พบว่าสามารถตรวจยีน *vanA* ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.6 CFU/µL และยีน *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 6.0 CFU/µL ค่า PCR efficiency ของการตรวจทั้ง 5 ยีน อยู่ในช่วง 89-103% การเปรียบเทียบความสอดคล้องของวิธีที่พัฒนากับวิธี PCR เมื่อตรวจตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่เป็นเชื้อดื้อยา VRE และ MRSA ที่เก็บรวบรวมที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในระหว่าง พ.ศ. 2564-2566 จำนวน 132 สายพันธุ์ พบความสอดคล้องตรงกันอย่างสมบูรณ์ (kappa = 1.0) ค่าความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 100 วิธีที่พัฒนานี้สามารถรายงานผลได้เร็วขึ้น เนื่องจากสามารถตรวจยีน *van* และ *mec* ได้ในการทดสอบครั้งเดียวกัน และไม่มีขั้นตอนหลังปฏิกิริยา PCR จึงสามารถนำไปใช้ในงานประจำในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่มีตัวอย่างตรวจจำนวนมากได้

คำสำคัญ : เรียลไทม์พีซีอาร์, VRE, VRSA, MRSA

Corresponding author E-mail: walailak.k@dmsc.mail.go.th

Received: 16 March 2024 *Revised: 22 November 2024* *Accepted: 19 December 2024*

บทนำ

แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาของประเทศไทย กำหนดให้ vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกดื้อยาสำคัญที่ใช้เป็นสัญญาณเตือนการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาระดับประเทศ[1,2] ดังนั้น การเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา การศึกษาวิจัยด้านเชื้อดื้อยา และการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ให้รวดเร็ว ทันสมัย จึงมีความสำคัญและควรดำเนินอย่างต่อเนื่อง

MRSA เป็นปัญหาสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและมีรายงานการพบในชุมชนเพิ่มมากขึ้น เชื้อนี้มีกลไกการดื้อยา methicillin ด้วยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ที่ pencillin binding protein (PBP) เป็นชนิด penicillin binding protein2a (PBP2a)โดยการควบคุมของยีน *mecA* ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลให้ยาเข้าสู่เซลล์ได้ลดลง โดยยีนดื้อยานี้มีในโครงสร้างทางพันธุกรรมเคลื่อนที่ชนิด staphylococcal cassette chromosome (SCC) *mec* สามารถส่งต่อยีนดื้อยาจากเชื้อสายพันธุ์หนึ่งสู่อีกสายพันธุ์หนึ่งได้ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว[3-6] ดังนั้น vancomycin จึงเป็นยาที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาการติดเชื้อรุนแรงที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก จากรายงานการศึกษาในประเทศไทย พบอุบัติการณ์ของเชื้อ MRSA ในประเทศไทยมีผลความไวลดลงต่อยา vancomycin เรียกว่า vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) ซึ่งเป็นสัญญาณบ่งชี้ถึงโอกาสที่อาจเกิดการดื้อยา[7-9] แม้ว่าปัจจุบันยังไม่พบ VRSA ในประเทศก็ตาม แต่ควรมีระบบการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยานี้ในโรงพยาบาลที่มีการพบ MRSA สูง เนื่องจากมีรายงานการพบเชื้อดื้อยา VISA และ VRSA เพิ่มขึ้นในหลายประเทศ[10,11] จากการศึกษาพบว่าเชื้อ MRSA ไวต่อยา vancomycin ลดลง และพบยีนชนิด *vanA* มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ VRSA ซึ่งยีนชนิด MRSA ได้รับการถ่ายโอนยีนจาก VRE ที่มักพบการติดเชื้อร่วมกันหรือ co-infection[12] นอกจากนั้น vancomycin ยังใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยติดเชื้อ *Enterococcus* spp. ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อยเช่นกัน และจากการใช้ยานี้ในการรักษาผู้ป่วยทำให้พบเชื้อดื้อยา VRE โดยเฉพาะ *E. faecium* เพิ่มมากขึ้นจากปี พ.ศ. 2555 ร้อยละ 0.7 เป็น ร้อยละ 12.8 ในปี พ.ศ. 2563[13,14] การดื้อยา vancomycin เกิดจากยีนชนิด *van* ได้แก่ *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* และ *vanG* ซึ่งแต่ละยีนควบคุมการดื้อยาและมีระดับการดื้อต่อยา vancomycin ต่างกัน ชนิดของยีนดื้อยาที่พบมากในเชื้อ VRE ได้แก่ *vanA*, *vanB* และ *vanC* ซึ่งอยู่บน mobile genetic element transposon ทำให้มีการถ่ายทอดไปยังเชื้ออื่นได้ง่าย ส่งผลให้เกิดการแพร่เชื้อดื้อยา vancomycin อย่างรวดเร็ว[15,16] ทำให้ Enterococci ที่ดื้อต่อยา vancomycin กลายเป็นข้อกังวลหลักในทางการแพทย์ เนื่องจากความชุกที่เพิ่มขึ้นและความสามารถในการถ่ายโอนการดื้อยา vancomycin ไปยังแบคทีเรียอื่น ๆ รวมถึง *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อ methicillin ทำให้ต้องเฝ้าระวังเชื้อกลุ่มนี้ต่อเนื่อง[12,17] การตรวจยีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงควรใช้เทคนิคที่รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง มีรายงานการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ใช้ในการตรวจยีนดื้อยาชนิด *van* เพื่อเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อ VRE และ VRSA[18-23] รวมทั้งการตรวจยีนดื้อยาชนิด *mecA* ในเชื้อกลุ่ม MRSA[24] ซึ่งชนิดของเชื้อและยีนดื้อยาที่ตรวจวิเคราะห์จะแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อที่เป็นปัญหาของประเทศหรือเชื้อที่พบเป็นปัญหาของโรงพยาบาลนั้น ๆ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถใช้ไพรเมอร์ (primer) และโพรบ (probe) ที่จำเพาะในการตรวจยีนที่หลากหลาย ไม่มีขั้นตอน post amplification detection สามารถลดขั้นตอนและลดระยะเวลาได้[18] ปัจจุบันประเทศไทยใช้วิธี PCR ในการตรวจยีนดื้อยา ซึ่งมีขั้นตอนยุ่งยาก อีกทั้งการตรวจยีนดื้อยายังจำกัดอยู่เฉพาะในห้องปฏิบัติการผู้เชี่ยวชาญเฉพาะหรือห้องปฏิบัติการอ้างอิง แต่หากมีการพัฒนาวิธีที่รวดเร็ว ลดขั้นตอนการทำงาน และมีความถูกต้อง แม่นยำสูง จะช่วยให้การตรวจยีนดื้อยาทำได้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงพยาบาลต่าง ๆ ได้มากขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจยีนดื้อยา vancomycin ชนิด *vanA, vanB, vanC1, vanC2/C3* และยีนดื้อยา methicillin ชนิด *mecA* ในเชื้อกลุ่ม VRE, VRSA และ MRSA ในครั้งเดียวด้วยเทคนิค Real-time PCR สำหรับตรวจวิเคราะห์หายีนดื้อยาในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่เฝ้าระวังการดื้อยาในการทดสอบคราวเดียวกัน โดยประเมินประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาเปรียบเทียบกับวิธี PCR

วัสดุและวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่มียีนดื้อยา สายพันธุ์มาตรฐาน *E. faecalis* DMST 8308 และ DMST 10785 *E. gallinarum* DMST 6979 และ DMST 11914 และ *S. aureus* DMST 22168 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวกของการตรวจยีนดื้อยาชนิด *vanA, vanB, vanC1, vanC2/C3* และ *mecA* ตามลำดับ[25] เพื่อประเมินประสิทธิภาพ ความไวและความจำเพาะของวิธี Real-time PCR ที่พัฒนา เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์มาตรฐานอื่น ๆ จำนวน 23 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* (ATCC 25923, DMST 64483, DMST 59042 และ ATCC 29213), *S. pneumoniae* (ATCC 49619 และ DMST 64428), *S. epidermidis* (DMST 15505), *S. saprophyticus* (DMST 15906), *E. faecium* (DMST 65241), *E. faecalis* (DMST 65233 และ DMST 65234), *B. subtilis* (DMST 23936), *B. cereus* (DMST 24704), *S. saprophyticus* (DMST 15906), *Clostridium sporogenes* (DMST 15282), *C. perfringens* (DMST 16637), *C. bifermentans* (DMST 22355), *C. diphtheriae* (DMST 7471 และ DMST 7472) และ *C. diphtheriae* toxigenic strain ที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 4 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เก็บรวบรวมจากโรงพยาบาลเครือข่าย ในช่วงปี พ.ศ. 2564-2566 ในโครงการการพัฒนาระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพระดับชาติสู่ระดับโลก การพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงส่วนภูมิภาค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 109 สายพันธุ์ ที่มีการตรวจด้วยวิธี PCR[26-28] แบ่งเป็นสายพันธุ์ vancomycin-resistant Enterococci (VRE) จำนวน 52 สายพันธุ์ vancomycin susceptible Enterococci (VSE) จำนวน 12 สายพันธุ์ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) จำนวน 35 สายพันธุ์ Methicillin susceptible *S. aureus* จำนวน 5 สายพันธุ์ *E. faecalis* จำนวน 5 สายพันธุ์ เชื้อทั้งหมดเก็บรักษาในกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 15% ที่ตู้แช่เข็ง อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (Haier, ULT Freezer, Haier Biomedical, China)

การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษามาเพาะเลี้ยงใน tryptic soy agar (Biomedia, Thailand) บ่มที่ตู้เพาะเชื้อ (Memmert, IF450, Memmert, Germany) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีของเชื้อ จำนวน 1 loop ลงในหลอด microcentrifuge ที่มีสารละลาย lysis buffer (0.25% SDS และ 0.05 M NaOH) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดฝาให้สนิทด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (Biosan, Thermo Block TDB-120, Biosan, Latvia) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendorf, C5430, Eppendorf, Germany) ที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาใช้ปิเปต (Biohit, Proline, Sartorious, Finland) ดูดส่วนใสที่มี DNA ของเชื้อลงในหลอด microcentrifuge เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และนำไปสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดน้ำยา nucleic acid extraction kit B-200 (Zybio, B-200, Zybio, China) โดยใช้เครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (Zybio, รุ่น EXM3000, China) ได้ตัวอย่าง DNA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และวัดความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดด้วยเครื่อง Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) จากนั้นเก็บตัวอย่าง DNA ระหว่างรอการตรวจตู้แช่เข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Haier, Deep Freezer, Haier Biomedical, China)

การตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ด้วยวิธี Real-time PCR

การตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ด้วยวิธี Real-time PCR ประยุกต์ใช้ไพรเมอร์ (primer) และโพรบ (probe) ที่จำเพาะกับแต่ละยีนจาก Flipse J และคณะ[20] และ Galia L และคณะ[24] สังเคราะห์โดย Bionics Co. Ltd. (Seoul, South Korea) รายละเอียดของ primer และ probe ดังแสดงในตารางที่ 1 การตรวจแบ่งเป็น 3 หลอด/ปฏิกิริยา โดยหลอดที่ 1 ทำปฏิกิริยาแบบ duplex สำหรับยีน *vanA*, *vanB* หลอดที่ 2 ทำปฏิกิริยาแบบ duplex สำหรับยีน *vanC1*, *vanC2/C3* และหลอดที่ 3 ทำปฏิกิริยาแบบ single สำหรับยีน *mecA*

ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ primer และ probe ที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 และ 800 nM/reaction และทดสอบหาอุณหภูมิเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม CFX96 (Bio-Rad, USA) ประกอบด้วยขั้นตอน initiation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อ denature และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ polymerase จากนั้นเพิ่มจำนวน 42 รอบ โดย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ส่วนขั้นตอน annealing และ extension ทดลองใช้อุณหภูมิเดียวกันที่ระหว่างอุณหภูมิ 56-62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที เลือกความเข้มข้นของ primer, probe และอุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยาโดยพิจารณาจากค่า Ct และ s curve จากกราฟที่เกิดขึ้นเพื่อใช้ในการประเมินวิธี Real-time PCR ต่อไป

เตรียมหลอดปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR master mix (Roche Light Cycler® 480 Probe Master, USA), forward primer, reverse primer และ probe สำหรับแต่ละยีน ปิเปต DNA template ความเข้มข้น 3 ng/µL ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานชนิด *E. faecalis* DMST 8308 และ DMST 10785, *E. gallinarum* DMST 6979 และ DMST 11914, *S. aureus* DMST 22168 เป็นตัวควบคุมผลบวกในการตรวจยีนดื้อยาชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ตามลำดับ และ DNase- RNase free water ใช้เป็นตัวควบคุมแบบไม่มี DNA ต้นแบบ (no template control; NTC) ในการทดสอบ

การประเมินประสิทธิภาพของวิธี Real-time PCR ที่พัฒนา

ประเมินประสิทธิภาพของวิธี Real-time PCR โดยการหาช่วงปริมาณเชื้อ (detection range) และค่าความเข้มข้นของเชื้อปริมาณต่ำสุด (limit of quantification; LOQ) ที่ primer และ probe จำเพาะของแต่ละยีนสามารถตรวจได้ด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น โดยเขี่ยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน จำนวน 5 สายพันธุ์ ดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งเพาะเลี้ยงบน tryptic soy agar ใส่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 MacFarland Standard หรือเท่ากับ 1.5×10^8 CFU/mL นำเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร ไปสกัดได้ DNA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาผลบวก นำ DNA ที่สกัดเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 6 ความเข้มข้น (10 fold serial dilution) เริ่มจากความเข้มข้น 6.0×10^4 - 0.6 CFU/µL จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และสร้าง standard curve คำนวณค่า PCR efficiency, coefficient of correlation (R^2) และ linearity ด้วยโปรแกรม Bio-Rad CFX Manager ของเครื่อง CFX96 Real-Time PCR Detection System โดยค่า PCR efficiency เป็นการประเมินประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย (PCR amplicon) ในการตรวจวิเคราะห์ โดยปฏิกิริยาที่ดีควรมีค่า efficiency อยู่ระหว่าง 90-110% ส่วน R^2 เป็นการประเมินความสัมพันธ์เชิงเส้นของตัวแปรในการทดสอบโดยการเจือจาง DNA ของตัวควบคุมผลบวก ซึ่งค่า R^2 ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.98 และ linearity ของการวัดควรมีช่วงการวัดที่กว้างและสามารถตรวจ DNA ได้ในระดับต่ำ

ตารางที่ 1 Primer และ probe สำหรับการตรวจหายีน *van* และ *mec* โดยวิธี Real-time PCR

Target gene	Primer/probe	Sequence (5' → 3')	Tm* °C	PCR product (bp)
vanA	*vanA*_forward	GCCGGAAAAAGGCTCTGAA	56.03	67
	*vanA*_reverse	TCCTCGCTCCTCTGCTGAA	59.34	
	*vanA*_probe-FAM	ACGCAGTTATAACCGTTCCCGCAGACC		
vanB	*vanB*_forward	CGCAGCTTGCATGGACAA	57.24	58
	*vanB*_reverse	GGCGATGCCCGCATT	54.11	
	*vanB*_probe-HEX	TCACTGGCCTACATTC		
vanC1	*vanC1*_forward	CTTATGTTGGTTGCCATGTCG	55.54	138
	*vanC1*_reverse	CGATTGTGGCAGGATCGTT	55.84	
	*vanC1*_probe-FAM	TGGCTCTTGCATCAACTTGCTGATACCA		
vanC2/C3	*vanC2/3*_forward	GCACTCCAATCATCTCCCTATG	56.72	113
	*vanC2/C3*_reverse	CAYGTGTCTTGTCGGATGTT	54.27	
	*vanC2/C3*_probe-HEX	TAYGACCTCTCTTTGATCGGGATCRCC		
mecA	*mecA*_forward	CAATGCCAAAATCTCAGGTAAAGTG	57.69	107
	*mecA*_reverse	AACCATCGTTACGGATTGCTTC	56.68	
	*mecA*_probe-FAM	ATGAGCTATATGAGAACGG		

หมายเหตุ: *คำนวณ melting temperature (Tm) ด้วยวิธี Nearest Neighbor โดย OligoCalc http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html

การทดสอบความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เชิงวิเคราะห์ของวิธีตรวจ

การตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกด้วยวิธี Real-time PCR โดยการหาปริมาณ DNA ที่ primer และ probe จำเพาะของแต่ละยีน โดยนำ DNA ที่สกัดเพื่อเป็นตัวควบคุมผลบวก เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 6 ความเข้มข้น เริ่มจากความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 6.0×10^{4} - 0.6 CFU/µL จากนั้นวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR และสร้าง standard curve เพื่อใช้สำหรับอ้างอิงการเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของเชื้อที่สามารถตรวจพบได้ ดำเนินการทดสอบ primer, probe และสภาวะของปฏิกิริยาที่เหมาะสม โดยเตรียม DNA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์มาตรฐานอื่นๆ จำนวน 23 ชนิด และ DNA ของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาชนิด VRE, MRSA และแบคทีเรียสายพันธุ์ไม่ดื้อยาที่ได้รับการตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข[26-28] จำนวน 109 สายพันธุ์ มาตรวจด้วยวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาอ่านผล และประเมินผลความไวและความจำเพาะของวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยการคำนวณทางสถิติ

การคำนวณทางสถิติ

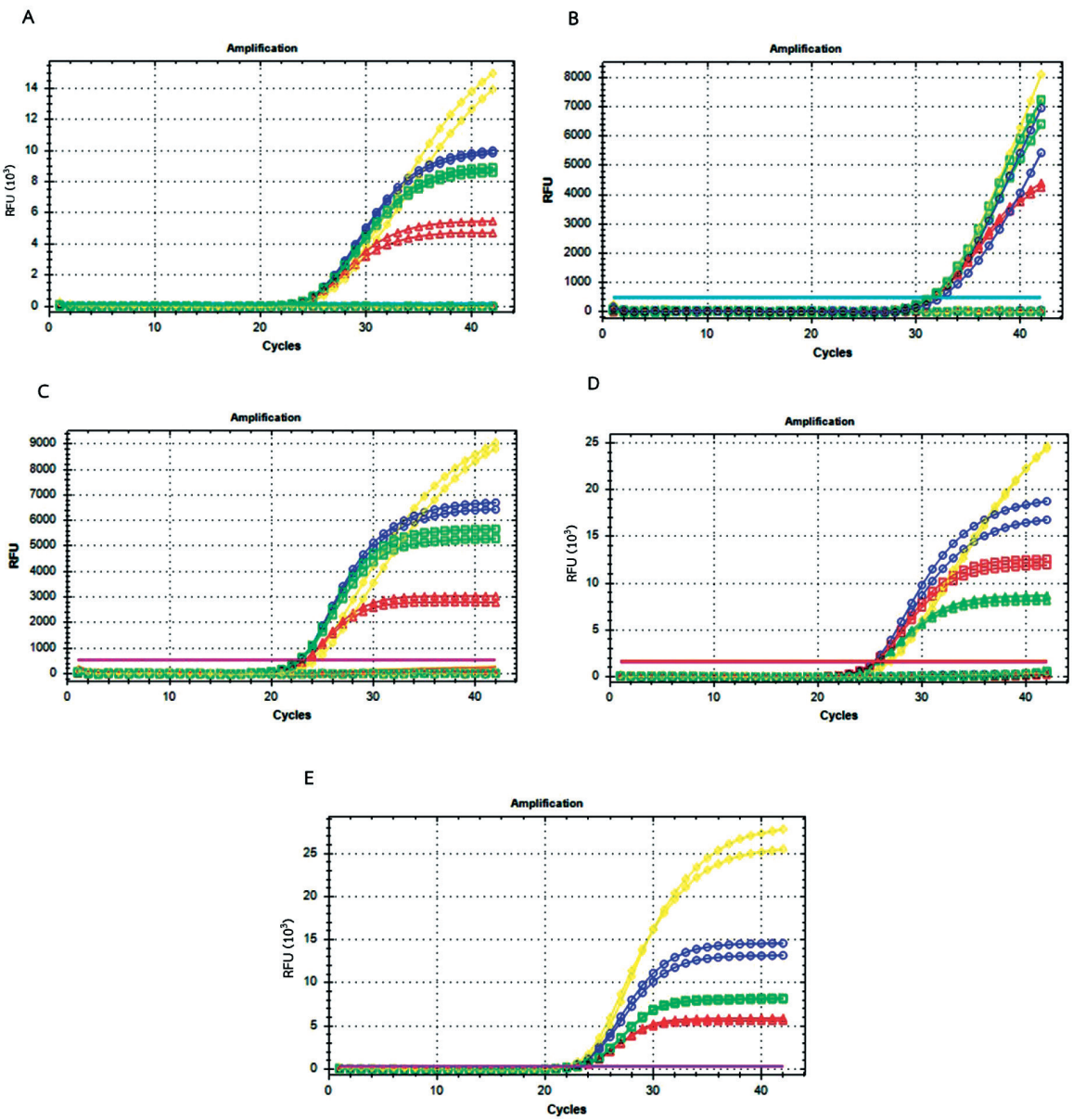
ประเมินความสอดคล้องของวิธี Real-time PCR กับวิธี PCR ด้วยสถิติ kappa analysis และประเมินค่า sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value และ negative predictive value โดยคำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป MedCalc-version 22.026

จริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข รหัสเอกสารรับรองหมายเลข DMSc-EC027 อนุมัติวันที่ 25 ตุลาคม พ.ศ. 2567

ผล

วิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่ม VRSA, VRE และ MRSA โดยทดสอบกับแบคทีเรียดื้อยาสายพันธุ์มาตรฐาน *E. faecalis* DMST 8308 และ DMST 10785, *E. gallinarum* DMST 6979 และ DMST 11914 และ *S. aureus* DMST 22168 ที่มียีนดื้อยา *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ตามลำดับ เป็นตัวควบคุมผลบวก ด้วยชุด primer และ probe ของแต่ละยีนในการทดสอบเพียงครั้งเดียว ดำเนินการทดสอบความเข้มข้นของ primer และ probe ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเป็น 400 nM forward primer, 400 nM reverse primer, 200 nM probe สำหรับทุกยีน ดังแสดงในภาพที่ 1 มีสภาวะของปฏิกิริยา Real-time PCR ที่เหมาะสมในการทดสอบยีนทั้ง 5 ชนิด คือ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 รอบ และ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 42 รอบ ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 2



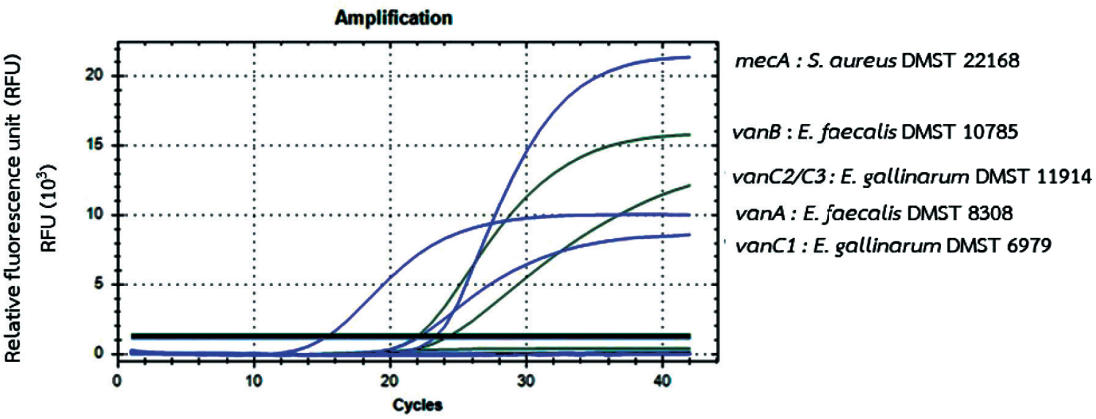
ภาพที่ 1 Amplification curve จากปฏิกิริยา Real-time PCR ของการตรวจยีนชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ดังภาพ A-E ตามลำดับ โดยเจือจางความเข้มข้นของ primer ที่ 100, 200, 400 และ 800 nM ต่อปฏิกิริยา ซึ่งแสดงด้วยกราฟสีแดง, สีเขียว, สีน้ำเงิน และสีเหลือง ตามลำดับ

และกราฟแสดงลักษณะเป็น s-curve และไม่พบสัญญาณรบกวน (noise band) ในการทดสอบทุกยีน อีกทั้งพบผลการทดสอบถูกต้องเมื่อทดสอบกับ DNA ของตัวควบคุมผลบวกและตัวควบคุมผลลบ ร้อยละ 100 ดังแสดงในภาพที่ 2 เมื่อตรวจผลผลิต PCR ของยีน *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* มีขนาด 67, 58, 138, 113 และ 107 bp ตามลำดับ โดยการเปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA ladder (New England Biolabs Inc., USA) ใน 2% agarose ภายหลังการทำ electrophosis ดังแสดงในภาพที่ 3

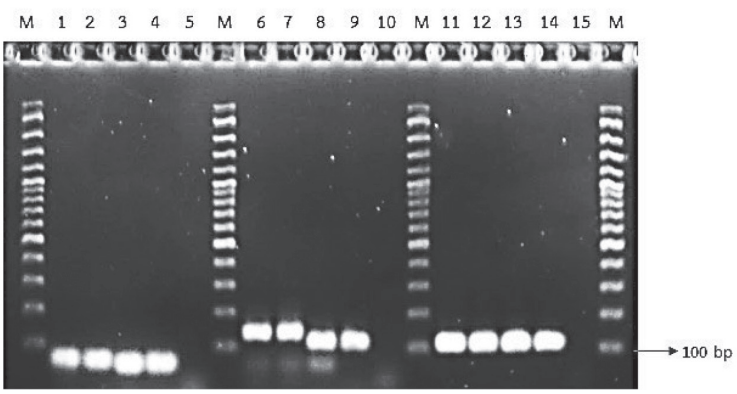
ตารางที่ 2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมนำมาใช้ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยา Real-time PCR ที่สามารถตรวจทุกยีนได้ในครั้งเดียว

ยีนเป้าหมาย	Annealing temperature/Mean-Cq value					
	62.0°C	61.0°C	60.0°C	57.8°C	57°C	56°C
vanA	27.72	27.56	27.62	27.78	27.72	23.48
vanB	28.80	27.07	25.84	24.64	24.71	ND
vanC1	26.13	25.50	25.28	25.32	25.37	ND
vanC2/C3	25.91	25.85	25.98	26.82	26.03	ND
mecA	30.91	31.09	31.20	32.38	ND	ND

หมายเหตุ: ND = not detected



ภาพที่ 2 Amplification curve ของการตรวจยีนชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่เป็นตัวควบคุมผลบวกของแต่ละยีนด้วยวิธี Real-time PCR



ภาพที่ 3 Gel electrophoresis ผลการตรวจยีนด้วยวิธี Real-time PCR แสดงผลผลิต PCR ชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* มีขนาด 67, 58, 138, 113 และ 107 bp ตามลำดับ Lane M: DNA Ladder, Lane 1,2: *vanA*, Lane 3,4: *vanB*, Lane 6,7: *vanC1*, Lane 8,9: *vanC2/C3* Lane 11-14: *mecA* และ Lane 5,10,15: Negative control

การทดสอบความไว (sensitivity)

ความไวในการตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อยา vancomycin และ methicillin ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจยีนชนิด *vanA* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.6 CFU/µl และยีนชนิด *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 6.0 CFU/µl ดังแสดงในตารางที่ 3

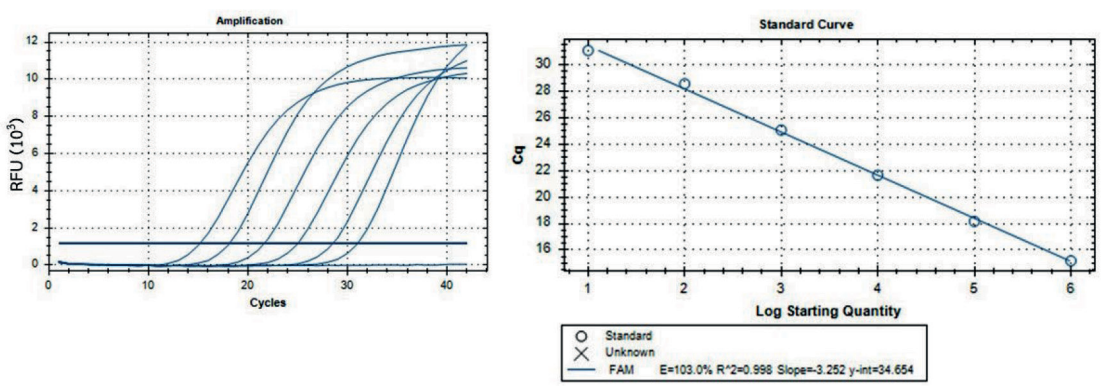
ผลการประเมินประสิทธิภาพของวิธี Real-time PCR

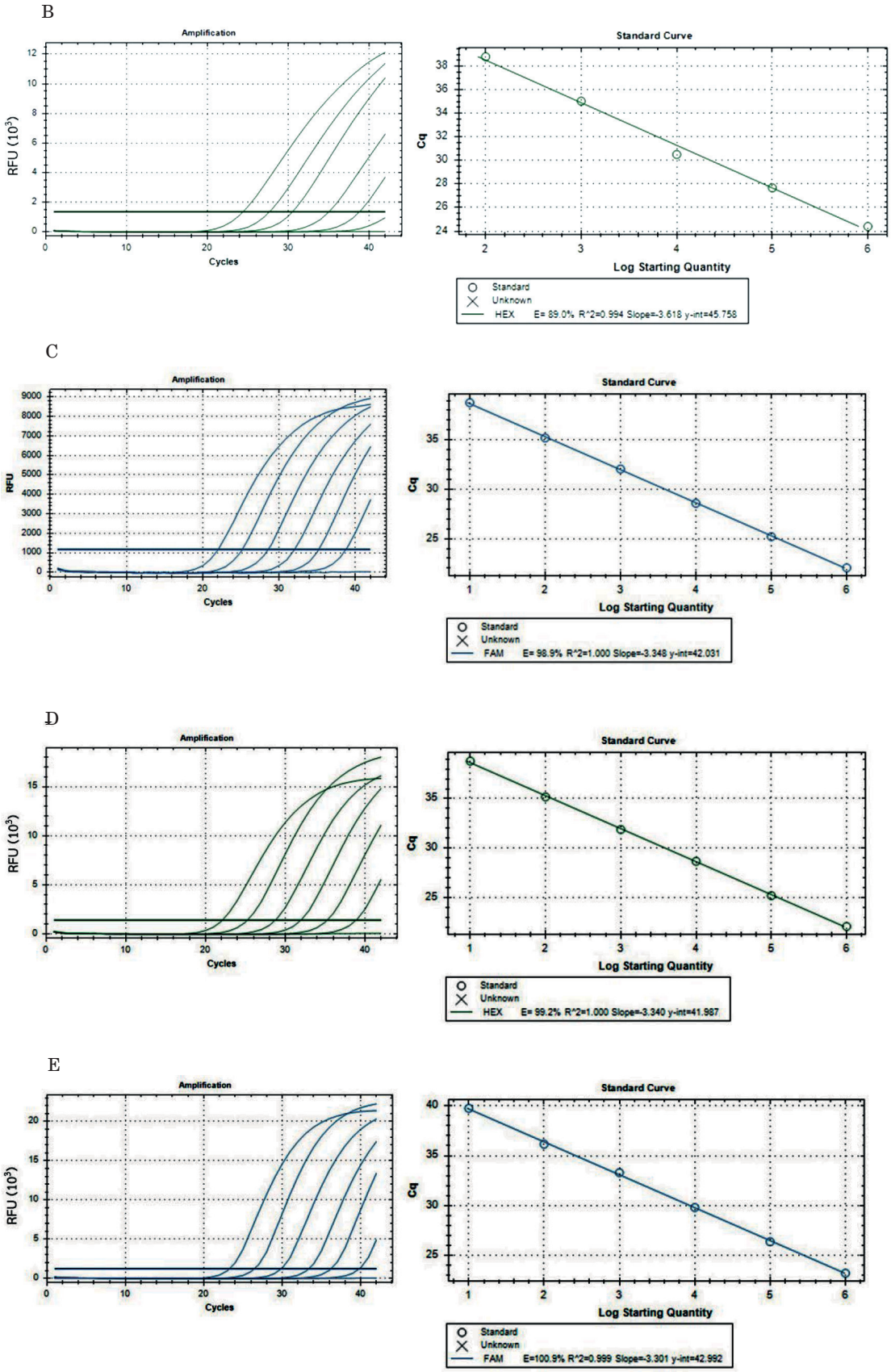
การประเมินประสิทธิภาพของวิธี Real-time PCR ที่พัฒนา โดยพิจารณาจากค่า PCR efficiency, coefficient of correlation (R^2) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ซึ่งสามารถคำนวณได้จาก standard curve ของการตรวจ DNA ของตัวควบคุมผลบวกที่ 6 ความเข้มข้น ในช่วง 6.0×10^4 - 0.6 CFU/µl พบว่า PCR efficiency ของการตรวจยีนชนิดต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Real-time PCR อยู่ในช่วง 89%-103% และค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.994 - 1.000 โดยมีค่า slope อยู่ในช่วง -3.252 ถึง -3.618 ดังแสดงในตารางที่ 3 และ linearity อยู่ในช่วงความเข้มข้นของเชื้อ 6.0×10^4 - 0.6 CFU/µl amplification curve, standard curve, ค่า efficiency, R^2 และ linearity ของการตรวจยีนชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ด้วยเทคนิค Real-time PCR ดังแสดงในภาพที่ 4

ตารางที่ 3 ค่า sensitivity, PCR efficiency, coefficient of correlation (R^2) และ slope ของการตรวจยีนชนิดต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Real-time PCR

ชนิดของยีน	Sensitivity (ความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบยีน)	% PCR efficiency	R^2	Slope
vanA	0.6 CFU/µL	103.0	0.998	-3.252
vanB	6.0 CFU/µL	89.0	0.994	-3.618
vanC1	6.0 CFU/µL	98.9	1.000	-3.348
vanC2/C3	6.0 CFU/µL	99.2	1.000	-3.340
mecA	6.0 CFU/µL	100.9	0.999	-3.301

A





ภาพที่ 4 Amplification curve, standard curve, ค่า efficiency, R^2 และ linearity ของการตรวจยีนชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ดังภาพ A-E ตามลำดับ ความเข้มข้น 6.0×10^4 - 0.6 CFU/µL ด้วยเทคนิค Real-time PCR (ค่า relative fluorescence unit (RFU) คือ ค่าสารเรืองแสงสัมพัทธ์ และค่า quantification cycle (Cq) คือ จำนวนรอบที่สัญญาณแสงของตัวอย่างตัดกับเส้น threshold)

การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

การทดสอบความจำเพาะของ primer, probe และสภาวะของปฏิกิริยาที่เหมาะสมของวิธีนี้กับ DNA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์มาตรฐาน ดำเนินการทดสอบความจำเพาะของวิธีด้วยเชื้อแบคทีเรียดื้อยาชนิด VRE, MRSA และแบคทีเรียสายพันธุ์ไม่ดื้อยาที่ได้รับการตรวจยืนยันด้วยวิธี conventional PCR จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จำนวน 132 สายพันธุ์[26] พบว่าให้ผลสอดคล้องร้อยละ 100

วิจารณ์

วิธี Real-time PCR เป็นวิธีที่พัฒนาเพื่อการตรวจยีนดื้อยาชนิด *van* cluster และ *mecA* ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *VRSA*, *VRE* และ *MRSA* ที่ใช้เป็นสัญญาณเตือนการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา จากเดิมเป็นเทคนิค PCR และมีสภาวะการทำปฏิกิริยาของแต่ละยีนต่างกัน ซึ่งมีความยุ่งยากที่ต้องทำการตรวจทีละยีนเป้าหมาย ทำให้ใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ การศึกษานี้จึงพัฒนาเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ primer และ probe ที่จำเพาะกับยีน 5 ยีน ได้แก่ *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ใน 3 หลอดปฏิกิริยาที่ใช้สภาวะเดียวกันในการเพิ่มปริมาณ โดยสามารถตรวจตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 CFU/μL สำหรับการตรวจยีนชนิด *vanA* และ 6.0 CFU/μL สำหรับการตรวจยีนชนิด *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ซึ่งจากการศึกษาของ Dehbashi S และคณะ[22], Cha CH และคณะ[30] และ Babady NE และคณะ[31] รายงานค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเทคนิค Real-time PCR ที่สามารถตรวจพบเชื้อ VRE เท่ากับ 0.01, 0.1 และ 0.1 CFU/μL ตามลำดับ และการศึกษาของ Galia L และคณะ[24] พบค่า detection limit ของการตรวจยีน *mecA* เท่ากับ 0.514 CFU/μL ซึ่งค่า detection limit ของเทคนิค Real-time PCR จะแตกต่างกันตามขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างทดสอบ แต่จากรายงานทั้งหมดที่กล่าวมา แสดงว่าวิธีนี้มีความไวเพียงพอหากใช้เป็นวิธีตรวจเชื้อแบคทีเรียดื้อยาชนิด VRSA MRSA และ VRE ที่แยกจากตัวอย่างผู้ป่วย ข้อจำกัดของการศึกษานี้คือ ค่าความเข้มข้นของแบคทีเรียจากการศึกษาเป็นค่าโดยประมาณจากการใช้เชื้อเริ่มต้น 0.5 MacFarland standard หรือเท่ากับ $1.\times10^{8}$ CFU/mL นำมาสกัดและทดสอบด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น จึงควรนำเทคนิคนี้ทดสอบกับตัวอย่าง DNA ที่ทราบค่าความเข้มข้นจะสามารถทำให้ระบุค่า detection limit ของปฏิกิริยาได้แม่นยำยิ่งขึ้น วิธีการนี้พัฒนาขึ้นเพื่อให้ตรวจเชิงคุณภาพ จึงอาจไม่จำเป็นต้องทราบปริมาณเชื้อที่ชัดเจน นอกจากนี้ค่า PCR efficiency ของวิธีอยู่ในช่วง 89% - 103% ซึ่งเป็นค่าประสิทธิภาพในการสร้าง PCR amplicon แบบ 2n ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา ที่ประเมินภาพรวมประสิทธิภาพของ primer probe น้ำยา และสภาวะที่ใช้ว่าจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย โดยปฏิกิริยาที่ดีจะมีค่า efficiency ระหว่าง 90%–110%[29] การศึกษานี้พบการตรวจยีน *vanB* มีค่า PCR efficiency ที่ 89% ซึ่งอาจมีสาเหตุจากความจำเพาะของ primer และ probe ต่อยีน *vanB* หรือสภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ต้องมีการปรับให้เหมาะสมมากยิ่งขึ้น จากการตรวจ *vanB* ด้วยวิธีที่พัฒนานี้ให้ผลถูกต้องร้อยละ 100 เมื่อทดสอบซ้ำกับตัวอย่างควบคุมผลบวกและไม่พบสัญญาณรบกวน (noise band) ในการทดสอบ การประเมินความสัมพันธ์เชิงเส้นของตัวแปรในการทดสอบหรือค่า coefficient of correlation (R^2) โดยทำการเจือจาง DNA control ซึ่งค่า R^2 ควรมีมากกว่าหรือเท่ากับ 0.98 ซึ่งเทคนิค Real-time PCR นี้มีค่าอยู่ในช่วง 0.994–1.000 ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่สามารถยอมรับได้ จากผลดังกล่าวข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการตรวจยีนดื้อยาและมีความสอดคล้องของผลการตรวจของวิธีที่พัฒนากับวิธี PCR สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Flipse J และคณะ[20] และ Galia L และคณะ[24] ที่ได้นำเทคนิค Real-time PCR มาใช้ในการตรวจเชื้อดื้อยากลุ่ม VRE และ MRSA ซึ่งให้ผลการตรวจสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน ค่าความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 เช่นกัน

วิธีที่พัฒนานี้สามารถรายงานผลได้เร็วขึ้นและลดขั้นตอนการทำ gel electrophoresis หลังการทำ PCR เหมาะกับการนำมาใช้ตรวจการระบาดของเชื้อดื้อยาแกรมบวกที่เป็นปัญหาพบบ่อย และสามารถนำไปใช้

ในงานประจำในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเพื่อเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง จากรายงานการศึกษาเชื้อดื้อยากลุ่ม VRE จากตัวอย่างที่ส่งตรวจยืนยันที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2564-2566 ตรวจไม่พบยีนชนิด *vanB, vanC1* และ *vanC2/C3* จากเชื้อแบคทีเรียที่ส่งตรวจยืนยัน แต่พบยีนดื้อยาชนิด *vanA* ทั้งหมด ร้อยละ 100[26-28] จึงเป็นข้อจำกัดของการศึกษานี้ที่ทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาเพื่อตรวจยีนทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เชื้อควบคุมผลบวกในการทดสอบเท่านั้น การเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการ เพื่อให้สามารถตรวจยีนดื้อยาทั้ง 3 ชนิดได้ แม้ว่ายังไม่พบการแพร่ของยีนเหล่านี้ในประเทศไทย แต่มีความจำเป็นอย่างมากต่อระบบการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของประเทศไทยและเพื่อสนับสนุนให้ระบบการเตือนภัยทางห้องปฏิบัติการ (lab alert) ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เทคนิคนี้จึงสามารถนำไปใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงพยาบาล เพื่อช่วยสนับสนุนกลยุทธ์การเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาและ lab alert ให้ทันต่อการควบคุมการระบาดของเชื้อดื้อยา

สรุป

วิธี Real-time PCR เพื่อตรวจหายีนดื้อยาสำคัญ vancomycin และ methicillin ของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก โดยใช้การทดสอบ 3 หลอดปฏิกิริยาในรอบเดียวที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถตรวจตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 CFU/µL สำหรับการตรวจยีนชนิด *vanA* และ 6.0 CFU/µL สำหรับการตรวจยีนชนิด *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ค่า PCR efficiency อยู่ในช่วง 89% - 103% มีความไวและความจำเพาะของวิธี ร้อยละ 100 จึงสามารถรายงานผลได้เร็วขึ้นและช่วยลดขั้นตอนภายหลังปฏิกิริยา PCR

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากโครงการการพัฒนาระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพระดับชาติสู่ระดับโลก การพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงในภูมิภาค (Modified Enhancing Incorporation of Global and National Antimicrobial Resistance Surveillance; Tier Lab Network) ศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุข (Thailand MOPH-U.S.CDC Collaboration; TUC) และโครงการการเสริมความเข้มแข็งเครือข่ายระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย และขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา เจ้าหน้าที่กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก และเจ้าหน้าที่ฝ่ายแบคทีเรียทั่วไป สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. คณะกรรมการประสานและบูรณาการงานดื้อยาต้านจุลชีพ. แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560-2564. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข; 2558.
2. นิธิมา สุ่มประดิษฐ์, ศิริตรี สุทธจิตต์, สิตานันท์ พูนผลทรัพย์, รุ่งทิพย์ ชวนชื่น, ภูษิต ประคองสาย. ภูมิทัศน์ของสถานการณ์และการจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข; 2558.
3. อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์, ธิดารัตน์ ดำนา, อรุณวดี ชนะวงศ์, พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์, นิชา เจริญศรี, เสกสิทธิ์ สังคีรี และคณะ. การติดตามสถานการณ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่ไวต่อ vancomycin และ chlorhexidine ลดลงในโรงพยาบาลศรีนครินทร์. ว เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2555; 24(1): 22-8.
4. ธันวา วงษ์สุก, ดารณี นุตาลัย. การทดสอบความไวสารต้านจุลชีพ vancomycin, daptomycin และ linezolid ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. ว การแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ 2558; 22(3): 25-33.
5. Santimaleeworagun W, Preechachuawong P, Samret W, Jitwasinkul T. The first report of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate harboring type IV SCCmec in Thailand. Pathogens 2021; 10(4): 430. (8 pages).

6. Thunyaharn S, Boonsiri T, Visawapoka U, Santimaleeworagun W, Nitchapanit S, Noonai A, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other Staphylococcal nasal carriages among healthcare workers, Pramongkutklao Hospital. J Southeast Asian Med Res 2022; 6: e0122. (10 pages).
7. Trakulsomboon S, Danchaivijitr S, Rongrungruang Y, Dhiraputra C, Susaemgrat W, Ito T, et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 591-5.
8. Lulitanond A, Chanawong A, Sribenjalux P, Kaewkes W, Charoensri N, Leumsai D, et al. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Srinagarind Hospital. J Infect Dis Antimicrob Agents 2005; 22(1): 9-14.
9. Lulitanond A, Engchanil C, Chaimanee P, Vorachit M, Ito T, Hiramatsu K. The first vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Thailand. J Clin Microbiol 2009; 47(7): 2311-6.
10. Ejaz M, Syed MA, Jackson CR, Sharif M, Farya R. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* non-susceptible to vancomycin in South Asia. Antibiotics 2023; 12(6): 972. (14 pages).
11. Kest H, Kaushik A. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: formidable threat or silence before the storm? J Infect Dis Epidemiol 2019; 5(5): 93. (9 pages).
12. Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: a review of case updating and clinical features. J Adv Res 2020; 21:169-76.
13. ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. Antimicrobial resistant 2000-2022. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 31 ม.ค. 2567]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://narst.dmsc.moph.go.th.
14. Hemapanpairoa J, Changpradub D, Thunyaharn S, Santimaleeworagun W. Vancomycin-resistant enterococcal infection in a Thai university hospital: clinical characteristics, treatment outcomes, and synergistic effect. Infect Drug Resist 2019; 12: 2049-57.
15. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology. 2009; 155(6): 1749-57.
16. นิชา เจริญศรี, วรวลัญช์ เลิศธรรม, บัณฑิต พรหมรักษา, ลำไย วงลคร, สุฐิดา เคนพรม, พรทิพย์ ปิ่นลออ และคณะ. สปีชีส์และการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ Enterococci ที่พบในสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ว เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2557; 26(2): 117-28.
17. Zirakzadeh A, Patel R. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. Mayo Clin Proc 2006; 81(4): 529-36.
18. Farivar TN, Najafipour R, Johari P, Aslanimehr M, Peymani A, Hashemi HJ, et al. Development and evaluation of a quadruplex Taq man real-time PCR assay for simultaneous detection of clinical isolates of Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium and their *vanA* and v*anB* genotype. Iran J Microbiol 2014; 6(5): 335-40.
19. Zeyni B, Arabestani MR, Mashuf RY, Tahmasebi H. Evaluation of real-time PCR-based DNA melting method for detection of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in clinical isolates. J Babol Univ Med Sci 2017; 19(2): 26-33.
20. Flipse J, von Wintersdorf CJH, van Niekerk JM, Jamin C, van Tie FH, Hasman H, et al. Appearance of vanD-positive Enterococcus faecium in a tertiary hospital in the Netherlands: prevalence of *vanC* and *vanD* in hospitalized patients. Sci Rep 2019; 9(1): 6949. (9 pages).
21. He YH, Ruan GJ, Hao H, Xue F, Ma YK, Zhu SN, et al. Real-time PCR for the rapid

detection of *vanA, vanB,* and *vanM* genes. J Microbiol Immunol Infect 2020; 53: 746-50.

22. Dehbashi S, Tahmasebi H, Sedighi P, Davarian F, Arabestani MR. Development of high-resolution melting curve analysis in rapid detection of vanA gene, Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium from clinical isolates. Trop Med Health 2020; 48: 8. (12 pages).
23. Zerrouki H, Rebiahi SA, Hadjadj L, Rolain JM, Diene SM. Real-time PCR assay for rapid and simultaneous detection of *vanA* and *vanB* genes in clinical strains. Diagnostics 2021; 11(11): 2081. (7 pages).
24. Galia L, Ligozzi M, Bertoncelli A, Mazzariol A. Real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus,* Panton-Valentine Leucocidin, and Methicillin Resistance directly from clinical samples. AIMS Microbiol 2019; 5(2): 138-46.
25. กระทรวงสาธารณสุข, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. แนวทางการเฝ้าระวังการดื้อยาต้านจุลชีพภายใต้แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียวประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 31 ม.ค. 2567]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.pcd.go.th/publication/33383.
26. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปีโครงการการเสริมความเข้มแข็งเครือข่ายเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย ตั้งแต่ 1 กันยายน 2564 – 28 กุมภาพันธ์ 2565. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2565.
27. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปีโครงการการเสริมความเข้มแข็งเครือข่ายเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย ตั้งแต่ 1 กันยายน 2564 –31 สิงหาคม 2565. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2565.
28. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปีโครงการการเสริมความเข้มแข็งเครือข่ายเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย ตั้งแต่ 1 กันยายน 2565 - 31 สิงหาคม 2566. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2566.
29. Rogers-Broadway KR, Karteris E. Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: current landscape and future perspectives. Exp Ther Med 2015; 10(4): 1261-4.
30. Cha CH, An HK, Kim JU. Detection of vancomycin-resistant enterococci using multiplex real-time PCR assay and melting curve analysis. Korean J Lab Med 2010; 30(2): 138-46.
31. Babady NE, Gilhuley K, Cianciminio-Bordelon D, Tang Y-W. Performance characteristics of the Cepheid Xpert vanA assay for rapid identification of patients at high risk for carriage of vancomycin-resistant Enterococci. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3659-63.

Development and Validation of a Real-time PCR Assay for Vancomycin and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp.

Walailak Ganjanapin[1], Watthanee Sunghirun[1], Watcharaporn Kamjumphol[2], and Wantana Paveenkittiporn[2]

[1] *Regional Medical Science Center 12 Songkhla, Department of Medical Sciences, Muang District, Songkhla 90100, Thailand*

[2] *National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

ABSTRACT Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE) are Gram-positive, drug-resistant bacteria that serve as key indicators in national drug-resistance surveillance. Detecting drug-resistance genes in these bacteria requires rapid and highly accurate techniques. To support continuous drug resistance monitoring, this study aimed to develop a real-time PCR method for detecting the primary resistance genes, *van* and *mecA*, in VRE and MRSA, respectively, and for monitoring VRSA, which can be conducted using a single thermal profile condition. The developed method, which used three reaction tubes, demonstrated a limit of detection (LOD) for the *vanA* gene at 0.6 CFU/μL and the *vanB, vanC1*, *vanC2/C3*, and *mecA* genes at 6.0 CFU/μL. The PCR efficiency ranged from 89% to 103%. Comparative analysis against conventional PCR with 132 strains of VRE and MRSA revealed complete concordance (kappa = 1.0), with 100% sensitivity and specificity. This real-time PCR method allows simultaneous detection of *van* and *mec* genes in a single protocol without a post-PCR step, thereby reducing operational time compared to individual PCR tests and enabling high-throughput sample analysis.

Keywords: Real-time PCR, VRE, VRSA, MRSA