**นิพนธ์ต้นฉบับ** **Original Article**

# การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมและการประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยา In-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ณ ศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

# VALIDATION THE OPTIMAL CONDITION AND EVALUATION EFFICIENCY OF IN-HOUSE REAL TIME PCR FOR *NEISSERIA GONORRHOEAE* DETECTION AT BANGRAK STIS CENTER

ศิวิมล ภูมินิยม
พงศธร แสงประเสริฐ
ณัฐนรี เกิดเทพ
รุ่งนภา เหลืองประสิทธิ์
บุศรา บำรุงศักดิ์
นภารัตน์ ภัทรประยูร
รสพร กิตติเยาวมาลย์
*กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์*
*กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์*
*กรมควบคุมโรค*

Siwimol Phoomniyom
Pongsathorn Sangprasert
Natnaree Girdthep
Rungnapa Luenprasit
Busara Bamrungsak
Naparat Pattarapayoon
Rossaphorn Kittiyaowamarn
*Bangrak STIs Center,*
*Division of AIDS and STIs,*
*Department of Disease Control*

Received: 29/11/2021
Revised: 15/12/2021
Accepted: 11/01/2022

## บทคัดย่อ

*Neisseria gonorrhoeae* เป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่พบมากที่สุด การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพเป็นสิ่งสำคัญในการตรวจวินิจฉัย วิธีเพาะเชื้อยังคงเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ขณะที่ในปัจจุบันวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นวิธีที่มีความสำคัญมากขึ้น การศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมและประเมินประสิทธิภาพร่วมกับการประเมินต้นทุนของชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ

ตัวอย่างทดสอบในการศึกษานี้ ได้แก่ ตัวอย่างจากท่อปัสสาวะ ตัวอย่างจากปากมดลูก ตัวอย่างจากทวารหนักและตัวอย่างจากช่องคอจากผู้มารับบริการ ณ ศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ตัวอย่างทดสอบ 60 ตัวอย่างถูกนำมาใช้สำหรับการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ขณะที่ 240 ตัวอย่างถูกนำมาใช้สำหรับการศึกษาเพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา ตัวอย่างทั้งหมด 300 ตัวอย่างถูกทดสอบด้วยน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นโดยมีการพัฒนาไพรเมอร์และโพรบซึ่งจำเพาะต่อยีน PorA สำหรับเชื้อ *N. gonorrhoeae* และจำเพาะต่อยีน human-beta globin สำหรับตัวควบคุมภายใน จากนั้นวิเคราะห์ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ การศึกษานี้ใช้น้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection ในกรณีที่ผลการทดสอบระหว่างสองวิธีให้ผลไม่สอดคล้องกัน

ผลการทดสอบพบว่า สภาวะความเข้มข้นปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* คือ ความเข้มข้น 200 nM และความเข้มข้น 200 nM สำหรับตัวควบคุมภายในเช่นเดียวกัน น้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และตัวควบคุมภายในได้ภายในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน ให้ค่าการประเมินประสิทธิภาพทุกค่าการทดสอบคิดเป็นร้อยละ 100 ในตัวอย่างส่งตรวจจากอวัยวะสืบพันธุ์ ขณะที่มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบคิดเป็น 100, 86.67, 88.24, 100 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างจากทวารหนัก และร้อยละ 100, 96.67, 96.77, 100 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างจากช่องคอ การศึกษานี้พบผลที่ไม่สอดคล้องกันในตัวอย่างทดสอบ 5 ราย โดยเป็นตัวอย่างจากช่องทางอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งหมดซึ่งให้ผลไม่พบเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพาะเชื้อแต่พบเชื้อในการตรวจด้วยน้ำยา in-house real time PCR และน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้หลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม น้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีต้นทุน 165 บาทต่อการทดสอบ ขณะที่วิธีเพาะเชื้อมีต้นทุน 76 บาทต่อการทดสอบ และแม้ว่าน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นจะมีราคาสูงกว่าวิธีเพาะเชื้อ แต่ในแง่ของการตรวจวินิจฉัยน้ำยาที่พัฒนาขึ้นนี้มีความคุ้มทุนที่มากกว่าด้วยความไวและความจำเพาะในการตรวจพบเชื้อโดยเฉพาะในตัวอย่างช่องทางอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์

ข้อมูลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะในตัวอย่างทดสอบที่หลากหลายด้วยผลการทดสอบที่มีความถูกต้อง สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน ดังนั้นชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยในงานประจำวันได้

## Abstract

*Neisseria gonorrhoeae* is one of the most common sexually transmitted pathogens. Fast and effective laboratory diagnostics are very important. The gold standard for *N. gonorrhoeae* diagnostic is culture method. Meanwhile nucleic acid amplification tests (NAATs) are critical new tools to diagnose *N. gonorrhoeae* infections. The aim of this study is to validate and assess the efficiency together with assessing the cost of the validated in-house real time PCR as compare to culture method.

The urethral, cervical, rectal and pharyngeal specimens from patients attended at Bangrak STIs Center, Thailand were used in this study. Sixty samples were used for validation experiment, while two hundred and forty samples were used in the comparison. All three hundred samples were tested by in-house real time PCR in which primers and probes were designed to specify at PorA pseudogene of *N. gonorrhoeae* and human-beta globin gene as an internal control. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were analyzed. Anyplex™ CT/NG Real-time Detection, commercial NAAT kit, was used to analyze the discrepancy result.

The suitable condition of PCR reaction for *N. gonorrhoeae* detection was at concentration 200 nM and also 200 nM for internal control. Validated duplex in-house real time PCR showed 100% correlation with culture method for genital specimens, while sensitivity, specificity, PPV and NPV were 100%, 86.67%, 88.24%, 100%, respectively for rectal swab and 100%, 96.67%, 96.77%, 100%, respectively for

pharyngeal swab specimens. All five discrepancy results were negative by culture, but positive by in-house real time PCR and the commercial NAAT kit. The cost of the duplex in-house real time PCR was 165 Baht/test, while culture was 76 Baht/test. Although in-house real time PCR assay is more expensive than culture, but in term of diagnosis it is more cost-effective. The in-house real time PCR can detect *N. gonorrhoeae* with high sensitivity and specificity, especially in extra-genital specimen.

Based on our finding, in-house real time PCR is a rapid, sensitivity and specificity on various types of specimen with high accuracy similar to culture method. Our validated duplex in-house real-time PCR for *N. gonorrhoeae* detection can be used in routine service.

| คำสำคัญ | Keywords |
|---|---|
| *เชื้อหนองใน, อิน เฮ้าส์ เรียลไทม์ พีซีอาร์, วิธีเพาะเชื้อ* | *Neisseria gonorrhoeae, In-house real time PCR, Culture* |

## บทนำ

*N. gonorrhoeae* แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคหนองในซึ่งเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่มีความสำคัญมากที่สุด ข้อมูลสถานการณ์โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ 5 โรคหลัก ได้แก่ โรคซิฟิลิส โรคหนองใน โรคหนองในเทียม โรคแผลริมอ่อน กามโรคของท่อและต่อมน้ำเหลืองในภาพรวมของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยพบอัตราป่วยบ่อยที่สุดในโรคหนองใน ซึ่งมีอัตราป่วย 12.5, 14.3, 15.8, 14.6, 14.8 และ 11.9 ต่อประชากรแสนคนในปี พ.ศ. 2558-2563 ตามลำดับ[1] การพบอัตราการติดเชื้อหนองในที่เพิ่มขึ้น อาจเกิดจากลักษณะของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่มีแนวโน้มดื้อยาได้ง่าย ลักษณะของโรคมักไม่มีอาการแสดงทำให้ผู้ป่วยสามารถแพร่เชื้อไปยังผู้อื่นได้ง่ายและไม่ได้รับการรักษา การตรวจวินิจฉัยที่มีขั้นตอนยุ่งยาก ราคาแพง การไม่ติดตามผลการรักษาอย่างเหมาะสม และยา cephalosporin ซึ่งเป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาโรคหนองในพบรายงานเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น[2]

งานห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ให้บริการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยวิธีการเพาะเชื้อและวิธีการย้อมสีแกรมในงานประจำวัน วิธีเพาะเชื้อถือเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อชนิดนี้ มีความจำเพาะสูง แต่มีข้อเสียคือ ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน เจ้าหน้าที่ต้องมีทักษะความชำนาญและเป็นวิธีที่มีความไวต่ำในตัวอย่างส่งตรวจอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์[3] วิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อหรือ Nucleic acid amplification testing (NAAT) เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่นิยมในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงในตัวอย่างส่งตรวจที่หลากหลายไม่ว่าจะเป็นตัวอย่างจากอวัยวะสืบพันธุ์ ตัวอย่างส่งตรวจอื่นนอกเหนือจากอวัยวะอวัยวะสืบพันธุ์ ได้แก่ ตัวอย่างจากทวารหนักและตัวอย่างจากช่องคอ[4-5] ชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมมีหลากหลายชนิดและมีน้ำยาที่พัฒนาขึ้นเองหรือที่เรียกว่าน้ำยา in-house real time PCR การตรวจหาเชื้อด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปมักมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เป็นอุปสรรคต่อการเข้าถึงบริการของผู้ป่วย ดังนั้นงานห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ จึงได้ทำการพัฒนาชุดน้ำยาเพื่อตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* พร้อมทั้งประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (วิธีเพาะเชื้อ) ก่อนนำมาใช้ในงานประจำวัน จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นโดย MJ Hopkins และคณะ ซึ่งได้ทำการประเมินความไวและความจำเพาะของน้ำยาที่พัฒนาขึ้นจากตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 1,028 ตัวอย่างเปรียบเทียบ

กับชุดน้ำยาสำเร็จรูป COBAS Amplicor NG assay ในปี ค.ศ . 2010 ผลการศึกษาพบว่า น้ำยาที่พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* คิดเป็น ร้อยละ 100[6] นอกจากนี้ JME Venter และคณะได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยา in-house real time PCR กับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Aptima assay ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* จากตัวอย่างจากปัสสาวะ ตัวอย่างจากทวารหนักและตัวอย่างจากช่องคอในปี ค.ศ. 2019 พบว่า น้ำยา in-house real time PCR มีค่าความไวร้อยละ 82.4 ในตัวอย่างจากทวารหนัก ร้อยละ 83.3 ในตัวอย่างจากช่องคอ และร้อยละ 85.7 ในตัวอย่างจากปัสสาวะ และมีความจำเพาะ ร้อยละ 100 ในตัวอย่างส่งตรวจทุกชนิดที่ทำการทดสอบ[7] การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยา in-house real time PCR กับน้ำยาสำเร็จรูป ซึ่งอาศัหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามวิธีเพาะเชื้อยังถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในตัวอย่างส่งตรวจจากอวัยวะสืบพันธุ์และตัวอย่างอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ ถึงแม้ว่าการศึกษาเปรียบเทียบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมกับวิธีเพาะเชื้อยังมีอยู่น้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธีเพาะเชื้อมักมีความไวต่ำในตัวอย่างส่งตรวจอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์[3] ปัจจุบันงานห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์การแพทย์บางรัก ด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ใช้วิธีเพาะเชื้อเป็นวิธีตรวจยืนยันการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และทดสอบความไวต่อสารดื้อจุลชีพ ในงานประจำวัน แต่ด้วยข้อจำกัด หลาย ๆ อย่างของวิธีเพาะเชื้อที่ต้องใช้ระยะเวลารอคอยผลนาน ใช้ความชำนาญในการทดสอบสูง และมักมีความไวต่ำในตัวอย่างอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ งานห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์การแพทย์บางรัก ด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์จึงได้พัฒนาวิธีที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะสูง และมีความเหมาะสมในการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างส่งตรวจที่หลากหลาย เพื่อใช้ในงานประจำวัน ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นและใช้สภาวะดังกล่าวในการทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ โดยมีน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection (Seegene, เกาหลีใต้) เป็นน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบกรณีผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อให้ผลขัดแย้งกัน

ผู้วิจัยคาดหวังว่าชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในงานประจำวันด้วยราคาและประสิทธิภาพของน้ำยาที่ผู้รับบริการสามารถเข้าถึงบริการและให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง ลดการแพร่เชื้อ นำไปสู่การลดปัญหาเชื้อดื้อยา และสามารถนำความรู้ที่ได้ไปถ่ายทอดให้กับหน่วยงานห้องปฏิบัติการเครือข่ายทั่วประเทศเพื่อ พัฒนาศักยภาพบุคลากรในการเปิดห้องปฏิบัติการ คลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ให้กับประชากรกลุ่มเสี่ยงได้เข้าถึงบริการเพื่อให้สามารถได้รับการตรวจ วินิจฉัย รักษา รวมทั้งในการป้องกันควบคุมการแพร่ระบาดโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

## วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae*

2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อในด้านความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ

3. เพื่อเปรียบเทียบต้นทุนของการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยชุดน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อ

## วิธีการศึกษา

**การคัดเลือกตัวอย่าง**

ตัวอย่างสำหรับการทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และตัวอย่างสำหรับการประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยา in-house real time PCR

เป็นตัวอย่างจากผู้มารับบริการเพศชายและหญิงในทุกช่วงอายุ ณ คลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ในช่วงเดือนมกราคม - ตุลาคม 2563 โดยเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงทางเพศสัมพันธ์และมีการใช้ช่องทางการมีเพศสัมพันธ์ ได้แก่ ท่อปัสสาวะ (Urethral swab) หรือ ปัสสาวะ (Urine) ปากมดลูก (Cervical swab) ทวารหนัก (Rectal swab) หรือ ช่องคอ (Pharyngeal swab) ทั้งแสดงอาการและไม่แสดงอาการทางคลินิก รวม 300 ตัวอย่าง

1. ตัวอย่างสำหรับการทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* รวม 60 ตัวอย่าง เป็นพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างส่งตรวจที่ทราบผลการตรวจด้วยวิธีการเพาะเชื้อและชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection โดยเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* จำนวน 60 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

1.1 สารพันธุกรรมจากท่อปัสสาวะ จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.2 สารพันธุกรรมจากตัวอย่างปัสสาวะ จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.3 สารพันธุกรรมจากปากมดลูก จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.4 สารพันธุกรรมจากทวารหนัก จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.5 สารพันธุกรรมจากช่องคอ จำนวน 10 ตัวอย่าง

นอกจากนั้นเป็นสารพันธุกรรมที่ทราบว่าให้ผลลบด้วยวิธีเพาะเชื้อและชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection จำนวน 10 ตัวอย่าง

2. ตัวอย่างสำหรับการประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อรวม 240 ตัวอย่าง ใช้การคำนวณกลุ่มตัวอย่างจากสูตรคำนวณ[8] โดยที่

- ค่าความไวที่คาดหวังของน้ำยา in-house real time PCR = 90%
- ค่าความจำเพาะที่คาดหวังของน้ำยา in-house real time PCR = 90%
- ความชุกของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในประเทศไทย[9] = 1.3%
- ค่าความแม่นยำ (±คาดหวัง) = 0.10
- ค่าความเชื่อมั่น = 95%
- ค่าอัตราการถอนตัวจากโครงการ = 10%

**Sensitivity/Specificity - Estimation**

| | |
|---|---|
| Expected sensitivity: | 0.90 |
| Expected specificity: | 0.90 |
| Prevalence of disease (p): | 1.3 |
| Precision (± expected): | 0.10 |
| Confidence level 100(1 - α): | 95 % |
| Expected dropout rate: | 10 % |
| Calculate / Reset | |
| Sample size for sensitivity, $n_{sen}$ = | 27 |
| Sample size for specificity, $n_{spec}$ = | -115 |
| Final sample size (largest), n = | 27 |
| Final sample size (with 10% dropout), $n_{drop}$ = | 30 |

จากการคำนวณต้องใช้กลุ่มตัวอย่างสำหรับการประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ 30 ตัวอย่าง และเพื่อความครอบคลุมกับชนิดของตัวอย่างส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่มีอย่างหลากหลาย ผู้วิจัยจึงคัดเลือกตัวอย่างแบบกลุ่ม ดังนี้

2.1 สารพันธุกรรมจากตัวอย่างท่อปัสสาวะหรือปัสสาวะที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพาะเชื้อจำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบจำนวน 30 ตัวอย่าง

2.2 สารพันธุกรรมจากตัวอย่างปากมดลูกที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพาะเชื้อ

จำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบจำนวน 30 ตัวอย่าง

2.3 สารพันธุกรรมจากตัวอย่างทวารหนักที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพาะเชื้อจำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบจำนวน 30 ตัวอย่าง

2.4 สารพันธุกรรมจากตัวอย่างช่องคอที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพาะเชื้อจำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบจำนวน 30 ตัวอย่าง

**การเก็บตัวอย่างและการขนส่ง**

สารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างท่อปัสสาวะ (Urethral swab) ปัสสาวะ (Urine) ปากมดลูก (Cervical swab) ทวารหนัก (Rectal swab) และช่องคอ (Pharyngeal swab) เป็นตัวอย่างที่เหลือจากตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *C. trachomatis* ในงานประจำวัน โดยได้มีการขออนุญาตใช้ตัวอย่างสารพันธุกรรมภายในหน่วยงานห้องปฏิบัติการเพื่อทำการศึกษาวิจัยจากผู้อำนวยการกองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ก่อนนำมาทำการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างถูกเก็บไว้ที่ตู้เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ภายในระยะเวลา 12 เดือนก่อนนำมาใช้ทำการทดสอบ

**วิธีการทดสอบ**

**1. ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae***

**1.1 วิธีสกัดสารพันธุกรรม**

สำหรับตัวอย่าง swab ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน (Vortex) จากนั้นแบ่งตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 µl ใส่ในหลอด 1.5 micro centrifuge tube สำหรับตัวอย่างปัสสาวะให้นำปัสสาวะ 1 มิลลิลิตรมาปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีก่อนนำตะกอนส่วนที่เหลือ 200 ไมโครลิตรไปสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างสิ่งส่งตรวจด้วยชุดสกัดที่พัฒนาขึ้น[10]

**1.2 Primer และ Probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae***

วิธี in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย Primer และ Probe ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย *porA* pseudogene (PorA gene) สำหรับเชื้อ *N. gonorrhoeae* และ Human Beta-globin gene ใช้เป็นตัวควบคุมภายในโดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer และ Probe ที่ใช้ในการทดสอบ (ตารางที่ 1)[11]

**ตารางที่1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของของ Primer และ Probe ที่ใช้ในการทดสอบด้วยน้ำยาที่พัฒนาขึ้น**

| ยีนเป้าหมาย | Primer และ Probe | ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3' |
|---|---|---|
| *N. gonorrhoeae* (PorA gene) | *PorA*-Forward primer | CAG CAT TCA ATT TGT TCC GAG TC |
| | *PorA*-Reverse primer | GAA CTG GTT TCA TCT GAT TAC TTT CCA |
| | *PorA*-Probe | HEX -CGC CTA TAC GCC TGC TAC TTT CAC GC- BBQ |
| Human Beta-globin gene | Human Beta-globin-Forward primer | TTG CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC |
| | Human Beta-globin-Reverse primer | ACA GGG CAG TAA CCG CAG ACT TCT CC |
| | Human Beta-globin-Probe | Cy5 -ACC TCA AAC AGA CAC CAT GGT GCA CCT GAC TCC- BBQ |

**1.3 ขั้นตอนการทดสอบ**

การศึกษานี้ใช้น้ำยา LightCycler® Multiplex DNA Master (Roche Diagnostic, เยอรมนี) ในการทดสอบโดยใช้ที่ปริมาณ 3 µl ต่อปฏิกิริยาการทดสอบโดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้นของ condition ระหว่าง 200-500 nM เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* พบว่าความเข้มข้นน้อยกว่า 200 nm ไม่สามารถตรวจหาเชื้อได้ครบทุกตัวอย่าง[11]

1.3.1 ทดสอบความเข้มข้นและปริมาณ primer และ probe ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* แบบแยกหลอดปฏิกิริยา (Singleplex in-house real time PCR for PorA gene)

1.3.2 ทดสอบความเข้มข้นและปริมาณ primer และ probe ในการตรวจหาตัวควบคุมภายใน แบบแยกหลอดปฏิกิริยา (Singleplex in-house real time PCR for Human Beta-globin gene)

1.3.3 ทดสอบความเข้มข้นและปริมาณ primer และ probe ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และตัวควบคุมภายในร่วมกันในหนึ่งหลอดปฏิกิริยา (Duplex in-house real time PCR for PorA gene and Human Beta-globin gene)

โดยตัวอย่างทั้งหมดจะถูกทำการทดสอบ 2 ซ้ำ เพื่อความถูกต้อง แม่นยำของผลการตรวจวิเคราะห์

ตัวควบคุมบวก (Positive control) ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ สารพันธุกรรมของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ผ่านการทดสอบแล้วพบว่าให้ผล *N. gonorrhoeae* เป็นบวกด้วยน้ำยา Real-time PCR สำเร็จรูปโดยเป็นสารพันธุกรรมที่เหลือจากตัวอย่างทดสอบความชำนาญ (EQA *C. trachomatis/N. gonorrhoeae*, Labquality, ฟินแลนด์ ปี พ.ศ. 2563) สารพันธุกรรมถูกเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้และตัวควบคุมลบ (Negative control) ได้แก่ Rnase free water

**1.4 ทำการทดสอบโดยเครื่อง Real time PCR**

ใช้เครื่อง CFX96™ Real time System (Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา) ในการทดสอบโดยมีโปรโตคอลการทดสอบ ดังนี้

1.4.1 Pre-incubate ที่อุณหภูมิ 95° C 3 นาที

1.4.2 Denature ที่อุณหภูมิ 95° C 10 วินาที

1.4.3 Annealing และ Extension ที่อุณหภูมิ 55° C 30 วินาทีและอ่านสัญญาณสีฟลูออเรสเซนต์สี HEX สำหรับยีน PorA และสี Cy5 สำหรับยีน Human Beta-globin gene

1.4.4 PCR Cycle จำนวน 45 รอบ

**1.5 การวิเคราะห์ผล**

ตรวจสอบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นต้องมีลักษณะเป็น Amplification curve และทำการเปรียบเทียบค่า Cycle threshold (Ct) value หรือค่าจำนวนรอบการทำงานของ real time PCR ที่ให้ค่าแสงฟลูออเรสเซนต์ตัดกับเส้น Threshold โดยสภาวะที่เหมาะสมควรจะมีค่า Ct ต่างจากค่า Ct ของวิธีอ้างอิง (Anyplex™ CT/NG Real-time Detection) ไม่เกิน 2-3 รอบ

**2. ประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ**

สภาวะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ได้จากการทดสอบก่อนหน้าที่จะถูกใช้สำหรับทดสอบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อโดยใช้ค่าทางสถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล และการแปลผลการทดสอบด้วยน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีหลักการ ดังนี้

2.1 ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae*: พบ Amplification curve ของสัญญาณสี HEX สำหรับยีน PorA และมีค่า Ct≤40 และ/หรือพบ Amplification curve ของสัญญาณสี Cy5 สำหรับยีน Human Beta-globin และมีค่า Ct≤40

2.2 ผลลบต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae*: พบ Amplification curve ของสัญญาณสี Cy5 สำหรับยีน Human Beta-globin และมีค่า Ct≤40 เท่านั้น

2.3 แปลผลไม่ได้: ไม่พบ Amplification curve ของสัญญาณสี HEX สำหรับยีน PorA และไม่พบ Amplification curve ของสัญญาณสี Cy5 สำหรับ Human Beta-globin gene

ในกรณีที่ผลการทดสอบด้วยชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นและวิธีเพาะเชื้อให้ผลไม่สอดคล้องกัน ให้ทำการทดสอบด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection (Seegene, เกาหลีใต้)

**3. เปรียบเทียบต้นทุนการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยชุดน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อ**

## ผลการศึกษา

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยมีสัดส่วนน้ำยา in-house real time PCR ในแต่ละความเข้มข้นปฏิกิริยาสำหรับตรวจหายีน PorA และยีน Human Beta-globin แบบ Singleplex in-house real time PCR (ตารางที่ 2 และ 3)

**ตารางที่ 2 สัดส่วนน้ำยา in-house real time PCR ในแต่ละความเข้มข้นปฏิกิริยา (200-500 nM) สำหรับตรวจหายีน PorA แบบ Singleplex in-house real time PCR**

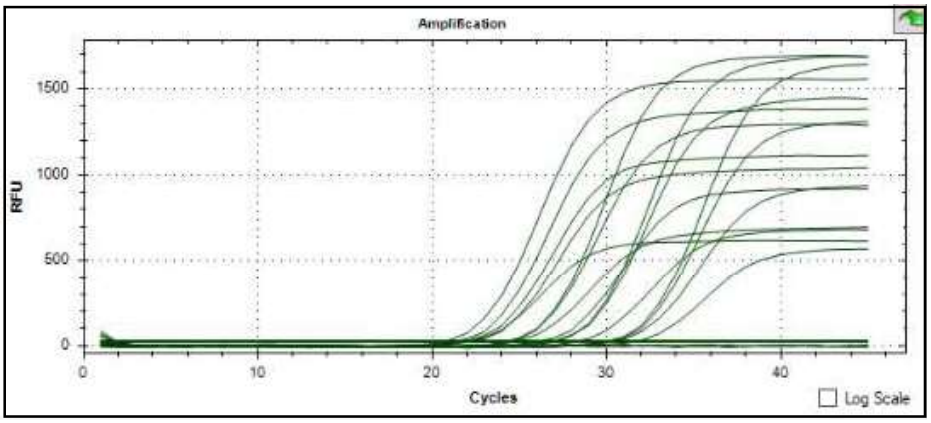
| น้ำยา in-house real time PCR | ความเข้มข้นปฏิกิริยา | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 200 nM | 300 nM | 400 nM | 500 nM |
| LightCycler® Multiplex DNA Master | 3 µl | 3 µl | 3 µl | 3 µl |
| Rnase free water | 11 µl | 10.5 µl | 10 µl | 9.5 µl |
| 10 µm *PorA* Forward primer | 0.4 µl | 0.6 µl | 0.8 µl | 1 µl |
| 10 µm *PorA* Reverse primer | 0.4 µl | 0.6 µl | 0.8 µl | 1 µl |
| 10 µm *PorA* probe | 0.2 µl | 0.3 µl | 0.4 µl | 0.5 µl |
| Reagent volume | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl |
| Sample volume | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl |

**ตารางที่ 3 สัดส่วนน้ำยา in-house real time PCR ในแต่ละความเข้มข้นปฏิกิริยา (200-500 nM) สำหรับตรวจหายีน Human Beta-globin แบบ Singleplex in-house real time PCR**

| น้ำยา in-house real time PCR | ความเข้มข้นปฏิกิริยา | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 200 nM | 300 nM | 400 nM | 500 nM |
| LightCycler® Multiplex DNA Master | 3 µl | 3 µl | 3 µl | 3 µl |
| Rnase free water | 11 µl | 10.5 µl | 10 µl | 9.5 µl |
| 10 µm *PorA* Forward primer | 0.4 µl | 0.6 µl | 0.8 µl | 1 µl |
| 10 µm *PorA* Reverse primer | 0.4 µl | 0.6 µl | 0.8 µl | 1 µl |
| 10 µm *PorA* probe | 0.2 µl | 0.3 µl | 0.4 µl | 0.5 µl |
| Reagent volume | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl |
| Sample volume | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl |

ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นปฏิกิริยาตั้งแต่ 200-500 nM สามารถตรวจหายีน PorA ในตัวอย่างส่งตรวจทุกชนิดที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยมีค่า Ct เฉลี่ยใกล้เคียงกับค่า Ct ที่ตรวจด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection และสามารถตรวจหาตัวควบคุมภายในได้ในตัวอย่างส่งตรวจทุกชนิดที่ให้ผลบวกและลบต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* (รูปที่ 1-2 และตารางที่ 4-5)

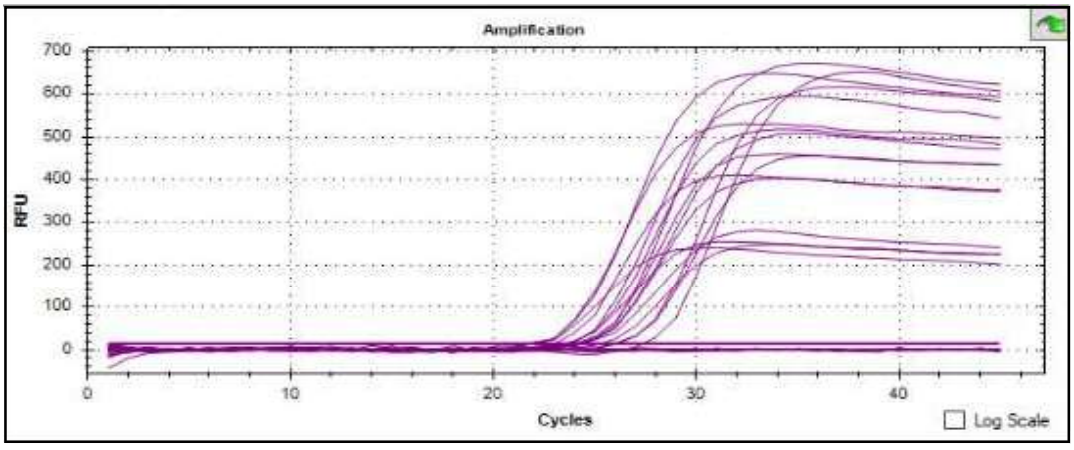
**รูปที่ 1 กราฟแสดง Amplification curve ของสัญญาณสี HEX ในการตรวจหายีน PorA ในตัวอย่างส่งตรวจที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae***




**ตารางที่ 4 ผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในตำแหน่งยีน PorA ที่ความเข้มข้น 200-500 nM แบบ Singleplex in-house real time PCR**

| ชนิดตัวอย่างส่งตรวจ | ผลเดิมด้วยวิธีเพาะเชื้อและชุดน้ำยา Anyplex™ CT/NG Real-time Detection | | ผลการทดสอบสำหรับ ยีน PorA (Singleplex in-house real time PCR) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ความเข้มข้น 200 nM | | ความเข้มข้น 300 nM | | ความเข้มข้น 400 nM | | ความเข้มข้น 500 nM | |
| | แปลผล | Ct | แปลผล | Mean Ct | แปลผล | Mean Ct | แปลผล | Mean Ct | แปลผล | Mean Ct |
| Urethral swab | Positive | 21.32 | Positive | 23.35 | Positive | 21.41 | Positive | 21.03 | Positive | 20.29 |
| Urine | Positive | 27.83 | Positive | 27.83 | Positive | 25.56 | Positive | 26.22 | Positive | 26.62 |
| Cervical swab | Positive | 30.84 | Positive | 31.17 | Positive | 29.63 | Positive | 29.80 | Positive | 29.73 |
| Rectal swab | Positive | 21.27 | Positive | 21.57 | Positive | 21.39 | Positive | 23.04 | Positive | 23.24 |
| Pharyngeal swab | Positive | 36.02 | Positive | 37.92 | Positive | 37.11 | Positive | 36.35 | Positive | 35.20 |
| Mix negative samples | Negative | N/A | Negative | N/A | Negative | N/A | Negative | N/A | Negative | N/A |

**รูปที่ 2 กราฟแสดง Amplification curve ของสัญญาณสี Cy5 ในการตรวจหายีน Human Beta-globin ในตัวอย่างส่งตรวจที่ให้ผลบวกและลบต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae***



**ตารางที่ 5 ผลการตรวจหาตัวควบคุมภายใน ในตำแหน่งยีน Human Beta-globin ที่ความเข้มข้น 200-500 nM แบบ Singleplex in-house real time PCR**

| ชนิดตัวอย่างส่งตรวจ | ผลเดิมด้วยวิธีเพาะเชื้อและชุดน้ำยา Anyplex™ CT/NG Real-time Detection | | ผลการทดสอบสำหรับ ยีน Human Beta-globin (Singleplex in-house real time PCR) ความเข้มข้น 200 nM | | ความเข้มข้น 300 nM | | ความเข้มข้น 400 nM | | ความเข้มข้น 500 nM | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | แปลผล | Ct | แปลผล | Mean Ct | แปลผล | Mean Ct | แปลผล | Mean Ct | แปลผล | Mean Ct |
| Urethral swab | Positive | 24.95 | Positive | 23.62 | Positive | 26.14 | Positive | 26.01 | Positive | 27.40 |
| Urine | Positive | 21.83 | Positive | 21.82 | Positive | 23.05 | Positive | 21.93 | Positive | 21.92 |
| Cervical swab | Positive | 24.64 | Positive | 25.33 | Positive | 24.12 | Positive | 24.37 | Positive | 24.41 |
| Rectal swab | Positive | 23.00 | Positive | 24.30 | Positive | 24.08 | Positive | 23.57 | Positive | 23.61 |
| Pharyngeal swab | Positive | 34.91 | Positive | 35.66 | Positive | 35.81 | Positive | 35.95 | Positive | 35.01 |
| Mix negative samples | Negative | 32.91 | Negative | 33.34 | Negative | 33.26 | Negative | 32.67 | Negative | 31.23 |

การทดสอบแบบแยกหลอดปฏิกิริยา (Singleplex in-house real time PCR) ในการตรวจหายีน PorA และยีน Human Beta-globin พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบตรวจหายีนทั้งสองชนิดอยู่ที่ 200-300 nM เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของปฏิกิริยาที่น้อยแต่ก็ยังสามารถตรวจหายีนเป้าหมายได้ด้วยค่า Ct ที่ใกล้เคียงกับวิธีอ้างอิง ผู้วิจัยทำการทดสอบตรวจหายีนทั้งสองชนิดในหลอดเดียวกัน (Duplex in-house real time PCR) โดยกำหนดความเข้มข้นทดสอบ 4 สภาวะ ได้แก่ ความเข้มข้น *PorA*/Human Beta-globin gene ที่ 200/200 nM, 200/300 nM, 300/300 nM, 300/200 nM โดยมีสัดส่วนน้ำยา in-house real time PCR ในแต่ละความเข้มข้นปฏิกิริยาสำหรับตรวจหายีน Por และยีน Human Beta-globin ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน (ตารางที่ 6)

**ตารางที่ 6 สัดส่วนน้ำยา in-house real time PCR ใน 4 สภาวะความเข้มข้นปฏิกิริยา สำหรับตรวจหายีน PorA และยีน Human Beta-globin ร่วมกัน (Duplex in-house real time PCR)**

| น้ำยา in-house real time PCR | ความเข้มข้นปฏิกิริยา PorA gene/Human Beta-globin gene 200/200 nM | 200/300 nM | 300/300 nM | 300/200 nM |
|---|---|---|---|---|
| LightCycler® Multiplex DNA Master | 3 µl | 3 µl | 3 µl | 3 µl |
| Rnase free water | 10 µl | 9.5 µl | 9 µl | 9.5 µl |
| 10 µm *PorA* Forward primer | 0.4 µl | 0.4 µl | 0.6 µl | 0.6 µl |
| 10 µm *PorA* Reverse primer | 0.4 µl | 0.4 µl | 0.6 µl | 0.6 µl |
| 10 µm *PorA* probe | 0.2 µl | 0.2 µl | 0.3 µl | 0.3 µl |
| 10 µm Human Beta-globin gene Forward primer | 0.4 µl | 0.6 µl | 0.6 µl | 0.4 µl |
| 10 µm Human Beta-globin gene Reverse primer | 0.4 µl | 0.6 µl | 0.6 µl | 0.4 µl |
| 10 µm Human Beta-globin gene probe | 0.2 µl | 0.3 µl | 0.3 µl | 0.2 µl |
| Reagent volume | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl |
| Sample volume | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl |

ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นปฏิกิริยาทั้ง 4 สภาวะสามารถตรวจหายีน PorA และยีน Human Beta-globin ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันในตัวอย่างส่งตรวจทุกชนิดที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* และมีค่า Ct เฉลี่ยใกล้เคียงกับค่า Ct ที่ตรวจด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection และในตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ก็สามารถตรวจพบสัญญาณสีฟลูออเรสเซนต์ของยีน Human Beta-globin ได้ ซึ่งความเข้มข้นของปฏิกิริยาที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจหายีนทั้ง 2 ชนิดได้ คือ 200/200 nM (รูปที่ 3 และตารางที่ 7)

**รูปที่ 3 กราฟแสดง Amplification curve ของสัญญาณสี HEX และ Cy5 ในการตรวจหายีน PorA และ ยีน Human Beta-globin ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน**




**ตารางที่ 7 ผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในตำแหน่งยีน PorA และตัวควบคุมภายในตำแหน่งยีน Human Beta-globin ที่ความเข้มข้น 200-300 nM แบบ Duplex in-house real time PCR**

| ชนิดตัวอย่างส่งตรวจ | ผลเดิมด้วยวิธีเพาะเชื้อและชุดน้ำยา Anyplex™ CT/NG Real-time Detection | | ผลการทดสอบสำหรับยีน PorA และยีน Human Beta-globin (Duplex in-house real time PCR) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ความเข้มข้น 200/200 nM | | ความเข้มข้น 200/300 nM | | ความเข้มข้น 300/300 nM | | ความเข้มข้น 300/200 nM | |
| | แปลผล | Ct (PorA/Beta-globin) | แปลผล | Mean Ct (PorA/Beta-globin) | แปลผล | Mean Ct (PorA/Beta-globin) | แปลผล | Mean Ct (PorA/Beta-globin) | แปลผล | Mean Ct (PorA/Beta-globin) |
| Urethral swab | Positive | 21.32/24.95 | Positive | 23.51/23.19 | Positive | 22.14/25.48 | Positive | 22.07/26.87 | Positive | 21.11/26.05 |
| Urine | Positive | 27.83/21.83 | Positive | 28.10/22.25 | Positive | 26.95/22.83 | Positive | 27.46/20.81 | Positive | 26.19/21.64 |
| Cervical swab | Positive | 30.84/24.64 | Positive | 32.47/24.12 | Positive | 31.87/24.06 | Positive | 29.92/23.33 | Positive | 29.77/23.79 |
| Rectal swab | Positive | 21.27/23.00 | Positive | 21.81/23.01 | Positive | 21.34/23.82 | Positive | 22.84/22.95 | Positive | 22.61/23.21 |
| Pharyngeal swab | Positive | 36.02/34.91 | Positive | 37.26/35.49 | Positive | 37.48/35.51 | Positive | 36.94/35.20 | Positive | 36.57/34.86 |
| Mix negative samples | Negative | NA/32.91 | Negative | NA/32.94 | Negative | NA/32.87 | Negative | NA/32.11 | Negative | NA/32.05 |

ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยนี้สรุปได้ว่า ความเข้มข้นน้อยที่สุดของปฏิกิริยา real time PCR สำหรับตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ร่วมกับตัวควบคุมภายใน คือ ความเข้มข้นที่ 200 nM สำหรับยีน PorA และความเข้มข้นที่ 200 nM สำหรับยีน Human Beta-globin (200/200 nM) โดยใช้สัดส่วนของน้ำยา in-house real time PCR ดังนี้

- LightCycler® Multiplex DNA Master 3 µl
- Rnase free water 10 µl
- 10 µm *PorA* Forward primer 0.4 µl
- 10 µm *PorA* Reverse primer 0.4 µl
- 10 µm *PorA* probe 0.2 µl
- 10 µm Human Beta-globin gene Forward primer 0.4 µl
- 10 µm Human Beta-globin gene Reverse primer 0.4 µl
- 10 µm Human Beta-globin gene probe 0.2 µl

ในการวิเคราะห์ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของชุดน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อให้ผลการทดสอบตามประเภทของตัวอย่างทดสอบดังนี้ ตัวอย่างท่อปัสสาวะหรือปัสสาวะและตัวอย่างปากมดลูกให้ค่าการทดสอบทุกค่า คิดเป็นร้อยละ 100 ขณะที่ประสิทธิภาพ ของน้ำยา in-house real time PCR ในตัวอย่างช่องทางทวารหนักมีค่าความไว ร้อยละ 100 ความจำเพาะ ร้อยละ 86.67 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 88.24 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 และในตัวอย่างช่องคอ ค่าความไว ร้อยละ 100 ความจำเพาะ ร้อยละ 96.67 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 96.77 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 (ตารางที่ 8)

**ตารางที่ 8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อในตัวอย่างท่อปัสสาวะหรือปัสสาวะ ตัวอย่างจากปากมดลูก ตัวอย่างจากทวารหนัก และตัวอย่างจากช่องคอ**

| In-house real time PCR | Culture | | Sensitivity (%) | Specificity (%) | PPV (%) | NPV (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ตัวอย่างท่อปัสสาวะหรือปัสสาวะ | Positive | Negative | | | | |
| Positive | 30 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Negative | 0 | 30 | | | | |
| ตัวอย่างจากปากมดลูก | Positive | Negative | | | | |
| Positive | 30 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Negative | 0 | 30 | | | | |
| ตัวอย่างจากทวารหนัก | Positive | Negative | | | | |
| Positive | 30 | 4 | 100 | 86.67 | 88.24 | 100 |
| Negative | 0 | 26 | | | | |
| ตัวอย่างจากช่องคอ | Positive | Negative | | | | |
| Positive | 30 | 1 | 100 | 96.67 | 96.77 | 100 |
| Negative | 0 | 29 | | | | |

ตัวอย่างทดสอบที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันระหว่างการทดสอบด้วยน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อ ถูกนำมาทำการทดสอบต่อด้วยน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection ผลการทดสอบพบว่าตัวอย่างทดสอบจากช่องทางทวารหนักและช่องคอจำนวน 5 ตัวอย่างให้ผลการทดสอบด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection สอดคล้องกับการทดสอบด้วยน้ำยา in-house real time PCR (ตารางที่ 9)

**ตารางที่ 9 ผลการทดสอบในตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน**

| Sample No. | Sample site | Culture method | Tested result | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | In-house real time PCR | Ct value | Anyplex™ CT/NG Real-time | Ct value |
| 004R | Rectal | Negative | Positive | 26.15 | Positive | 25.55 |
| 008R | Rectal | Negative | Positive | 31.08 | Positive | 29.12 |
| 021R | Rectal | Negative | Positive | 33.57 | Positive | 33.55 |
| 029R | Rectal | Negative | Positive | 28.71 | Positive | 29.87 |
| 012P | Pharyngeal | Negative | Positive | 36.70 | Positive | 35.43 |

**Cycle threshold (Ct) value** คือ ค่าจำนวนรอบของการทำงานของ real time PCR ที่ให้ค่าแสงฟลูออเรสเซนต์ตัดกับเส้น Threshold เป็นค่าที่บ่งชี้ความเข้มข้นของเชื้อเป้าหมายที่ต้องการทดสอบ โดยมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับความเข้มข้นเชื้อ

การศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนของชุดตรวจหาการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยชุดน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อ พบว่าค่าใช้จ่ายต้นทุนของน้ำยา In-house real time PCR อยู่ที่ 165 บาทต่อหนึ่งการทดสอบในขณะที่ต้นทุนของวิธีเพาะเชื้ออยู่ที่ 76 บาทต่อหนึ่งการทดสอบ ทั้งนี้การคิดความคุ้มทุนคิดเฉพาะน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์เท่านั้น (ตารางที่ 10)

**ตารางที่ 10 ต้นทุนน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์ชุดน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อ**

| ต้นทุนน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์น้ำยา In-house real time PCR | | ต้นทุนน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์วิธีเพาะเชื้อ | |
|---|---|---|---|
| รายการ | ราคาต่อหน่วย (บาท) | รายการ | ราคาต่อหน่วย (บาท) |
| 1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง (MEM transport media) | 20 | 1. Bangrak I media สำหรับเก็บตัวอย่าง | 13 |
| 2. ชุดสกัดสารพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้น | 50 | 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด Chocolate agar | 23 |
| 3. Forward/Reverse Primer (2 ชุด; *PorA*, Beta-globin gene) | 6 | 3. ย้อมสีแกรม | 23 |
| 4. Probe (2 ชุด; *PorA*, Beta-globin gene) | 43 | 4. Oxidase test | 1 |
| 5. LightCycler® Multiplex DNA Master | 37 | 5. Superoxol test | 1 |
| 6. PCR tube with cap | 5 | 6. น้ำตาล Glucose | 2 |
| 7. Filter tip | 2 | 7. น้ำตาล Maltose | 2 |
| 8. Microcentrifuge tube | 2 | 8. น้ำตาล Sucrose | 2 |
| | | 9. น้ำตาล Lactose | 2 |
| | | 10. Cefinase | 7 |
| **รวม** | **165** | **รวม** | **76** |

## อภิปรายและสรุป

การศึกษาวิจัยนี้มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer และประยุกต์ใช้ Probe จากการศึกษาของ Hopkins MJ และคณะ[6] ในการพัฒนาชุดน้ำยาตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* สัดส่วนขององค์ประกอบต่างๆ ในน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพด้านความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบเทียบเท่ากับวิธีเพาะเชื้อในตัวอย่างที่มาจากอวัยวะสืบพันธุ์ ขณะที่ในตัวอย่างอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ ได้แก่ ตัวอย่างทวารหนักและตัวอย่างจากช่องคอ ชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตัวอย่างทรวรหนักมีค่าความไว ร้อยละ 100 ความจำเพาะ ร้อยละ 86.67 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 88.24 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 และมีตัวอย่างในช่องคอ มีค่าความไว ร้อยละ 100 ความจำเพาะ ร้อยละ 96.67 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 96.77 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Hopkins MJ ซึ่งได้เปรียบเทียบน้ำยา real time PCR ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีเพาะเชื้อในตัวอย่างส่งตรวจปัสสาวะ โดยน้ำยา real time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไว ร้อยละ 96.90 ความจำเพาะ ร้อยละ 99.80[6] และสอดคล้องกับการศึกษาจากตัวอย่างทดสอบปากมดลูก (Cervical swab) ของ KEHL SC และคณะซึ่งประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Abbott LCx Neisseria gonorrhoeae assay เทียบกับวิธีเพาะเชื้อ โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Abbott LCx Neisseria gonorrhoeae assay ให้ค่าการประเมินประสิทธิภาพที่สูงเช่นเดียวกันโดยมีความไว ร้อยละ 94.30 และความจำเพาะ ร้อยละ 99.40[12]

ขณะที่ผลการประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้นในตัวอย่างทดสอบอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งได้แก่ ทวารหนักและช่องคอให้ผลไม่สอดคล้องกับวิธีเพาะเชื้อในทุกตัวอย่างทดสอบ และเมื่อนำตัวอย่างเหล่านั้นมาทดสอบด้วยน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำเร็จรูป ผลการทดสอบให้ผลตรงกันในทุกตัวอย่างสอดคล้องกับการศึกษาของ Ewa Skulska และคณะ ซึ่งได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของวิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Real-Time PCR DUPLICα® Real-Time เทียบกับวิธีเพาะเชื้อในตัวอย่างทดสอบจากท่อปัสสาวะ (Urethral swab) ตัวอย่างจากปากมดลูก (Cervical swab) ตัวอย่างจากทวารหนัก (Rectal swab) และตัวอย่างจากช่องคอ (Pharyngeal swab) จำนวน 93 ตัวอย่าง พบว่าทั้งสองวิธีสามารถตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoea* ได้สอดคล้องกันถึงร้อยละ 85.90 ขณะที่ร้อยละ 14.10 ของผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoea* ด้วยวิธีเพาะเชื้อให้เป็นลบแต่ด้วยวิธี real time PCR ให้ผลบวก แสดงให้เห็นว่าวิธี real time PCR มีความไวมากกว่าวิธีเพาะเชื้อ[13] เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Boyadzhyan B และคณะซึ่งทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาสำเร็จรูปที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม น้ำยา APTIMA GC Assays เปรียบเทียบกับน้ำยา APTIMA Combo 2 Assay และวิธีเพาะเชื้อ พบว่าน้ำยาสำเร็จรูปทั้ง 2 ชนิดให้ผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ตรงกันทุกรายขณะที่วิธีเพาะเชื้อไม่สามารถตรวจหาเชื้อจำนวน 3 ตัวอย่างจากตัวอย่างทดสอบปัสสาวะและ swab 4 ตัวอย่าง จากการศึกษานี้สะท้อนให้เห็นว่าวิธีเพาะเชื้อมีความไวต่ำอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากไม่สามารถตรวจหาเชื้อได้โดยมีอัตราการพลาดการตรวจหาเชื้อร้อยละ 28.00[4] ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่างอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์จำนวน 5 ตัวอย่างให้ผลลบด้วยวิธีเพาะเชื้อแต่ให้ผลบวกด้วยวิธี Real-time PCR เมื่อดูผลการตรวจหาเชื้อในช่องทางอื่นที่อาสาสมัครใช้ในการมีเพศสัมพันธ์ พบว่าตัวอย่าง 4 รายจาก 5 รายมีผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoea* ในช่องทางอวัยวะสืบพันธุ์ (ท่อปัสสาวะ) และผลการทดสอบทั้ง 5 ตัวอย่างนี้ด้วยน้ำยา Real-time PCR สำเร็จรูปก็ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoea* ด้วยเช่นกัน วิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อด้วยความไวและความจำเพาะที่สูง

แม้ว่าวิธีเพาะเชื้อจะเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยหาการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* และผลการศึกษาเปรียบเทียบความคุ้มทุนของน้ำยาและวัสดุ

วิทยาศาสตร์ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและวิธีเพาะเชื้อ พบว่าชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้น มีราคาต้นทุนสูงกว่าวิธีเพาะเชื้อประมาณ 2.2 เท่า แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูปแล้วยังมีราคาต้นทุนที่ต่ำกว่า 2.8 เท่า เช่นเดียวกัน[11] และถึงแม้ว่าชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นจะมีราคาต้นทุนที่สูงกว่าวิธีเพาะเชื้อ แต่จากผลการศึกษาวิจัยมากมาย พบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสม วิธีเพาะเชื้อมีความไวอยู่ในช่วงร้อยละ 85-95 สำหรับการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและอาจจะมีความไวแค่ร้อยละ 50 ในผู้หญิงที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง นอกจากนี้ชนิดและคุณภาพของตัวอย่างทดสอบและสภาวะในการขนส่งตัวอย่างเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อวิธีเพาะเชื้อเนื่องจาก *N. gonorrhoeae* เป็นเชื้อที่มีความเปราะบางและตายง่าย[14] และวิธี Nucleic acid amplification test (NAATs) หรือการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อมีประโยชน์และมีข้อดีกว่าหลาย ๆ วิธี เนื่องจากมีความไว ความจำเพาะสูงและยังสามารถตรวจหาเชื้อได้ในตัวอย่างส่งตรวจที่หลากหลาย โดยเฉพาะในตัวอย่างอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ อีกทั้งวิธีเพาะเชื้อใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์มากกว่า 48 ชั่วโมง ขั้นตอนการตรวจยุ่งยาก เจ้าหน้าที่ต้องมีทักษะมีความชำนาญในการเลี้ยงเชื้อและต้องมีความระมัดระวังในการขนส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการ[3] ขณะที่วิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ได้ภายในระยะเวลา 3-4 ชั่วโมง การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี real-time PCR สามารถตรวจพบเชื้อจากสารพันธุกรรมถึงแม้ว่าเชื้อจะไม่มีชีวิตแล้ว ขณะที่วิธีเพาะเชื้อตรวจหาได้เฉพาะเชื้อที่มีชีวิตเท่านั้นซึ่งแสดงถึงการติดเชื้อในขณะนั้น ดังนั้นการนำวิธี real-time PCR มาตรวจวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อควรดูประวัติของผู้ป่วยร่วมด้วย หากเป็นผู้ป่วยใหม่และไม่เคยตรวจพบเชื้อมาก่อน สามารถใช้วิธี real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อได้ แต่หากผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าตรวจพบเชื้อ *N. gonorrhoeae* มาก่อนและกำลังได้รับการรักษาควรเว้นช่วงระยะเวลาไว้ 3 สัปดาห์หลังจากได้รับการรักษา ถึงจะสามารถใช้วิธี real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อ เนื่องจากอาจจะมีสารพันธุกรรมของเชื้อหลงเหลืออยู่ในช่วงระยะเวลารักษาถึงแม้ว่าเชื้อจะตายไปแล้ว[15]

คณะผู้วิจัยวางแผนการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคตเพื่อพัฒนาชุดน้ำยาที่สามารถตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และเชื้อ *C. trachomatis* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่มีความสำคัญมากที่สุดในรูปแบบการตรวจในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน สามารถตรวจได้พร้อมกัน (in-house multiplex real-time PCR) ซึ่งจะสามารถลดค่าใช้จ่ายด้านน้ำยาลงไปได้และยังเป็นการเพิ่มขีดความสามารถการตรวจหาเชื้อทั้งสองชนิดทางห้องปฏิบัติการด้วยชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นเอง

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการกองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ หัวหน้าศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านสำหรับข้อมูลในการนำมาใช้ประโยชน์

## เอกสารอ้างอิง

1. HIV info hub. Division of AIDS and STIs [Internet]. [cited 2021 Oct 12]. Available from: https://hivhub.ddc.moph.go.th/epidemic.php (in Thai)
2. Wilawan Thipmontree, Chenchit Chayachinda, Rossaphorn Kittiyoawamarn. STI surveillance and prevention: gonorrhea. Siriraj Med Bull. 2020; 13(3): 196-204. (in Thai)
3. Stephanie N. Taylor, Oliver Liesenfeld, Rebecca A. Lillis, Barbara A. Body, Melinda Nye, James Williams, et al. Evaluation of the Roche cobas® CT/NG test for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in male urine. Sex Transm Dis. 2012; 39(7): 543-9. doi: 10.1097/OLQ.0b013e31824e26ff

4. Boyadzhyan B, Yashina T, Yatabe JH, Patnaik M, Hill CS. Comparison of the APTIMA CT and GC assays with the APTIMA combo 2 assay, the Abbott LCx assay, and direct fluorescent-antibody and culture assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol. 2004; 42(7): 3089-93. doi: 10.1128/JCM.42.7.3089-3093.2004
5. C. A. Gaydos, T. C. Quinn, D. Willis, A. Weiss-feld, E. W. Hook, D. H. Martin, et al. Performance of the APTIMA combo 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. J Clin Microbiol. 2003; 41(1): 304-9. doi: 10.1128/JCM.41.1.304-309. 2003
6. Mark J Hopkins, Lynne J Ashton, Fath Alloba, Anura Alawattegama, Ian J Hart. Validation of a laboratory-developed real-time PCR protocol for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine. Sex Transm Infect. 2010; 86(3): 207-11. doi: 10.1136/sti.2009.040634
7. Johanna M E Venter, Precious M Mahlangu, Etienne E Müller, David A Lewis, Kevin Rebe, Helen Struthers, et al. Comparison of an in-house real-time duplex PCR assay with commercial HOLOGIC® APTIMA assays for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia* trachomatis in urine and extra-genital specimens. BMC Infect Dis. 2019, 19: 1-7. doi: 10.1186/s12879-018-3629-0
8. Arifin WN. Sample size calculator [Internet]. Wan Nor Arifin c2017-2021 [cited 2021 October 1]. Available from: https://wnarifin.github.io/ssc/sssnsp.html
9. National AIDS Management Center Bureau of AIDS, TB and STIs. 2017 Thailand Progress Report Prevention and Control of AIDS. Nonthaburi: National AIDS Management Center, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. 2017. (in Thai)
10. Busara Bamrungsak, Siwimol Phoomniyom, Rungnapa Luengprasit. Development and validation of an in-house real-time PCR assay for the detection of *Chlamydia trachomatis* in sexually transmitted infections clinic. Thai AIDS Journal. 2020; 32 (1): 28-41. (in Thai)
11. Siwimol Phoomniyom, Busara Bamrungsak, Kornsiri Boonprathueng, Pongsathorn Sangprasert, Rungnapa Luengprasit, Nattapon Ngarmjiratam, et al. Efficiency evaluation of an in-house real-time PCR assay for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens. Thai AIDS Journal. 2020; 33 (12): 9-20. (in Thai)
12. Kehl SC, Georgakas K, Swain GR, Sedmak G, Gradus S, Singh A, et al. Evaluation of the Abbott LCx Assay for Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Endocervical Swab Specimens from Females. J. CLIN. MICROBIOL. 1998; 36(12): 3549-51.
13. Ewa Skulska, Beata Młynarczyk-Bonikowska, Szymon Walter de Walthoffen, GraŻyna Młynarczyk, Magdalena Malejczyk, Sławomir Majewski. The Comparison of Real-Time PCR and bacterial culture in laboratory diagnostics of gonorrhoea in patients of Department of Dermatology and Venereology Medical University of Warsaw. MED. DOŚW. MIKROBIOL. 2015; 67(1): 29-38. (in Polish)

14. David M Whiley, John W Tapsall, Theo P Sloots. Nucleic Acid Amplification Testing for *Neisseria gonorrhoeae* an Ongoing Challenge. J Mol Diagn. 2006; 8(1): 3-15. doi: 10.2353/jmoldx.2006.050045

15. John R. Papp, Julius Schachter, Charlotte A. Gaydos, Barbara Van Der Pol. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* -2014. MMWR Recomm Rep. 2014; 63(2): 1-19.