นิพนธ์ต้นฉบับ **Original Article**

การพัฒนาและทวนสอบชุดตรวจหาการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR ที่คลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN IN-HOUSE REAL-TIME PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* IN SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS CLINIC

บุศรา บำรุงศักดิ์* Busara Bamrungsak*
ศิวิมล ภูมินิยม* Siwimol Phoomniyom*
รุ่งนภา เหลืองประสิทธิ์* Rungnapa Luengprasit*
**กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์* **Bangrak STIs Center,*
กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ *Division of AIDS and STIs,*
กรมควบคุมโรค *Department of disease control*

Received: 16/01/2020
Accepted: 12/03/2020

Abstract

In providing laboratory diagnostic service for *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), there is a need to develop an accurate and affordable test kit. This study aimed to assess efficiency and cost of in-house real-time PCR assay as compare to commercial real-time PCR test kit in the diagnosis of *C. trachomatis* infection in routine service sexually transmitted infections (STIs) laboratory. In this study, known 100 positive and 30 negative samples for *C. trachomatis* as identified by cell culture, a standard method in diagnosis of *C. trachomatis*, were used in the comparison. All 130 samples were tested by in-house real-time PCR in which primer and probe was developed to specify with *C. trachomatis* at cryptic plasmid, and commercial test kit (Anyplex CT/NG real-time detection (V3.1) kit, Gene Excellence Co. LTD., South Korea). Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value were analyzed both for in-house real-time PCR and commercial kit against cell culture. Costs of the two tests were compared.

Results showed that tests performed by in-house real time PCR was accurate and comparable with commercial real time PCR kit. The sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of the in-house real time PCR were 100%, 96.7%, 99% and 100%, respectively. Cost of the in-house real-time PCR was 177 baht/test while commercial kit was 808 baht/test.

One of the samples negative for *C. trachomatis* by cell-culture was found to be positive both by in-house real-time PCR and commercial kit. It is possible that real-time PCR technique may have higher sensitivity value over cell culture method. Based on the finding from this study, it can be concluded that in house real time PCR has excellent accuracy similar to commercial real-time PCR kit but with lower cost. The in-house real-time PCR for *C. trachomatis* detection kit can be used in routine service STIs Laboratory.

บทคัดย่อ

ในงานบริการห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์มีความจำเป็นต้องพัฒนาและใช้ชุดตรวจคัดกรองหาการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ ราคาไม่แพง การศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ประเมินประสิทธิภาพและราคาต้นทุน เปรียบเทียบระหว่างวิธี in-house real-time PCR กับชุดตรวจสำเร็จรูปที่ใช้ในปัจจุบัน เพื่อตรวจหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ในขั้นตอนการศึกษาวิจัย ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างจำนวน 100 ตัวอย่างที่พบผลบวก และ 30 ตัวอย่างที่พบผลลบ ต่อเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี cell culture ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานมาศึกษาเปรียบเทียบกัน ตัวอย่างทั้งหมด 130 ตัวอย่างได้ถูกนำไปทดสอบด้วยชุดตรวจ in-house real-time PCR ซึ่งได้พัฒนา primer และ probe ตำแหน่ง Cryptic Plasmid (CP) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. trachomatis* เปรียบเทียบกับชุดตรวจสำเร็จรูป จากนั้นได้วิเคราะห์ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ ของชุดตรวจ in-house real-time PCR เปรียบเทียบกับชุดตรวจสำเร็จรูป (ชุดตรวจ Anyplex CT/NG real-time detection (V3.1), บริษัทยีนเอ็กเซลเลนซ์,ประเทศเกาหลีใต้) พร้อมทั้งได้คำนวณต้นทุนเปรียบเทียบระหว่างสองวิธี

ผลการศึกษาวิจัยพบว่า ชุดตรวจ in-house real-time PCR kit ให้ผลถูกต้องเทียบเท่ากับชุดตรวจสำเร็จรูป การศึกษานี้พบความไว ร้อยละ 100 ความจำเพาะ ร้อยละ 96.7 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 99 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 ตามลำดับ ราคาต้นทุนวิธี in-house real-time PCR 177 บาท/test ส่วนชุดตรวจสำเร็จรูป ราคา 808 บาท/test

ในการศึกษาครั้งนี้ พบตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวก *C. trachomatis* ทั้งสองวิธี คือ in-house real-time PCR และชุดตรวจสำเร็จรูป ขณะที่ผลเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ผลลบ อาจเป็นไปได้ว่าวิธี real-time PCR มีความไวสูงกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ และผลจากการวิจัยชี้ชัดว่า การตรวจหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR ให้ผลถูกต้องเทียบเท่าชุดตรวจสำเร็จรูป แต่มีราคาถูกกว่ามาก ชุดตรวจ in-house real-time PCR นี้สามารถนำมาใช้ตรวจงานประจำในห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

คำสำคัญ:	Keywords:
เชื้อคลามัยเดีย ทราโคมาติส,	*Chlamydia trachomatis,*
เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง,	*Polymerase Chain Reaction (PCR),*
วิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเอง	*In-house real-time PCR*

บทนำ

สถานการณ์โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ในภาพรวมของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากอัตราป่วย 18.8 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2557 เป็น 30.4 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2561 โดยอัตราป่วยที่พบบ่อยที่สุดคือ โรคหนองใน ซึ่งมีอัตราป่วย 10.2, 12.5, 14.3, 15.8 และ 14.0 ต่อประชากรแสนคน และโรคหนองในเทียม ซึ่งมีอัตราป่วย 3.0, 3.8, 3.5, 3.2 และ 3.3 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2557-2561 ตามลำดับ[1]

การตรวจวินิจฉัยโรคหนองในซึ่งเกิดจากเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* (NG) ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ สามารถตรวจด้วยวิธีย้อมสีแกรม (Gram stain) ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มีอาการจากท่อปัสสาวะและปากมดลูกมีความไว (Sensitivity) ร้อยละ 90 ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 95[2] ส่วนวิธีมาตรฐานคือ การเพาะเชื้อ (Culture) ความไว (Sensitivity) ร้อยละ 85 ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 95[3] สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคหนองในเทียมซึ่งเกิดจากเชื้อ *Chlamydia trachomatis* (CT) วิธีมาตรฐานคือ

(Specificity) สูง แต่มีความไว (Sensitivity) ต่ำ และมีข้อเสียคือ ขั้นตอนการตรวจยุ่งยาก และเจ้าหน้าที่ต้องมีทักษะความชำนาญในการเลี้ยงเซลล์ และต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน วิธีนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจในงานประจำวันของห้องปฏิบัติการกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ซึ่งให้บริการเฉพาะทางในการดูแลรักษาผู้ป่วยและการตรวจวินิจฉัยโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์โดยห้องปฏิบัติการกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ใช้วิธี Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) ในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *C. trachomatis* ซึ่งมีความไว (Sensitivity) ร้อยละ 83.3 ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 99[4]

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์กำลังประสบปัญหาในการจัดซื้อน้ำยาตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C. trachomatis* เนื่องจากบริษัทผู้ผลิตน้ำยาตรวจวิเคราะห์ *C. trachomatis* ด้วยวิธี ELISA ของบริษัท Trinity ประเทศไอร์แลนด์ซึ่งเป็นบริษัทผู้ผลิตน้ำยาตรวจแห่งเดียวในโลกได้ทำการยกเลิกผลิตน้ำยาดังกล่าวเนื่องจากไม่สามารถหาแหล่งผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพได้

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค ซึ่งมีบทบาทหน้าที่ในการตรวจบริการคัดกรองหาการติดเชื้อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ซึ่งโดยเฉลี่ยจะมีผู้มารับบริการประมาณ 4,000-5,000 ราย/ปี และเป็นแหล่งศึกษาดูงานด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ให้กับบุคลากรทางการแพทย์ทั้งไทยและต่างชาติกำลังประสบปัญหาในการจัดซื้อน้ำยาตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C. trachomatis* ซึ่งทำให้เกิดโรคหนองในเทียม เนื่องจากบริษัทผู้ผลิตน้ำยาตรวจวิเคราะห์ *C. trachomatis* ด้วยวิธี ELISA ซึ่งเป็นบริษัทผู้ผลิตแห่งเดียวในโลกได้ทำการยกเลิกผลิตน้ำยาดังกล่าวเนื่องจากไม่สามารถหาแหล่งผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพได้ คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะแก้ไขปัญหาหน้างานโดยการพัฒนานำเทคโนโลยีด้าน อณูชีวโมเลกุล (Molecular Laboratory) ซึ่งมีความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) สูง[5,6,7] มาใช้ตรวจในงานบริการประจำวัน แต่ด้วยข้อจำกัดของงบประมาณ จึงไม่สามารถซื้อชุดตรวจสำเร็จรูปที่มีราคาสูงปริมาณมากเท่ากับจำนวนผู้มารับบริการแต่ละปีมาใช้ในงานบริการประจำวันได้

คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาชุดตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR โดยทวนสอบวิธีการในแต่ละขั้นตอนจนได้ผลแม่นยำ แล้วจึงนำมาเปรียบเทียบความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Prediction Value) และค่าทำนายผลลบ (Negative Prediction Value) กับชุดตรวจสำเร็จรูป เพื่อนำมาใช้ตรวจบริการในงานประจำ สำหรับตัวอย่างตรวจในงานประจำคือ Urethral Swab จากผู้มารับบริการชาย, Cervical Swab จากผู้มารับบริการหญิง, Urethral Swab, Rectal Swab และ Throat Swab จากผู้มารับบริการชายที่มีเพศสัมพันธ์กับชาย คณะผู้วิจัยคาดว่าชุดตรวจ in-house real-time PCR จะมีประสิทธิภาพ ความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value) เทียบเท่ากับหรือสูงกว่าวิธีมาตรฐาน คือการเพาะเลี้ยงเซลล์และชุดตรวจสำเร็จรูป และมีราคาถูก

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1) เพื่อพัฒนาชุดตรวจหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR สำหรับใช้ในงานบริการห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

2) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นเองโดยวิธี in-house real-time PCR กับ ชุดตรวจสำเร็จรูป (Commercial Kit) ที่ขายตามท้องตลาด เปรียบเทียบกับผลตรวจ cell culture

3) เปรียบเทียบต้นทุนชุดตรวจหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR และชุดตรวจสำเร็จรูปที่จำหน่ายตามท้องตลาด

วิธีการศึกษา

การคัดเลือกตัวอย่าง

คณะผู้ศึกษาวิจัยได้คัดเลือกตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ รวม 130 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ทราบว่าเป็นผลบวกต่อเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ 100 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างจาก Urethral Swab และ Cervical Swab อย่างละ 30 ตัวอย่าง และจาก Rectal Swab และ pharyngeal swab อย่างละ 20 ตัวอย่าง นอกจากนั้นเป็นตัวอย่างที่ทราบว่าเป็นผลลบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ 30 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจาก Urethral Swab, Cervical Swab, Rectal Swab หรือ Pharyngeal Swab (รูปที่ 1)

รูปที่ 1: ตัวอย่างจาก Urethral Swab, Cervical Swab, Rectal Swab, Pharyngeal Swab

ในการวิจัยครั้งนี้ ได้นำผลการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture) ซึ่งถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานมาเป็นผลการทดสอบเปรียบเทียบ ทั้งนี้ผลการตรวจด้วยวิธี Cell Culture นี้ มีความจำเพาะ (Specificity) สูง แต่มีความไว (Sensitivity) ต่ำ เทคนิคนี้มีข้อเสียคือ ขั้นตอนการตรวจยุ่งยาก และเจ้าหน้าที่ต้องมีทักษะความชำนาญในการเลี้ยงเซลล์ และต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน วิธีนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจในงานประจำวันของห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ทั่วไป ในกรณีของกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ได้กำหนดระยะเวลาในการรายงานผล (Turnaround time) 5 วันทำการ ดังนั้นการตรวจด้วยวิธี Cell Culture จึงไม่เหมาะสมต่อการให้บริการตรวจ วินิจฉัย และรักษาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ในคลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ แต่สามารถนำมาเป็นผลการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* อ้างอิงในการวิจัยได้เป็นอย่างดี

การพัฒนาชุดทดสอบ in-house real-time PCR และการศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจกับชุดตรวจสำเร็จรูป (ชุดตรวจ Anyplex CT/NG real-time detection (V3.1), บริษัทยีนเอ็กเซลเลนซ์,ประเทศเกาหลีใต้)

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการพัฒนาชุดทดสอบ in-house real-time PCR ดังนี้

1. ศึกษาวิธีการพัฒนาทดสอบชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) และชุดตรวจ *C. trachomatis* in-house real-time PCR โดยมีขอบเขตการดำเนินงานดังนี้

1.1 ศึกษาพัฒนาทดสอบ ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยวิธีที่ทีมวิจัยคิดค้น เปรียบเทียบกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (High Pure PCR Template Preparation kit, บริษัทโรช ไดแอกโนติกส์, ประเทศเยอรมัน) (คัดเลือกชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปจากกระบวนการจัดซื้อน้ำยาตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี E-bidding ตามระเบียบราชการ)

1.2 ศึกษาและคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ primer และ แสงฟลูออเรสเซนต์ (probe) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. trachomatis* ที่ต้องการศึกษา (โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวได้ผ่านการทดสอบ cross reaction สายพันธุ์อื่น ๆและได้รับการตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศแล้ว

1.3 Validation Method: ชุดตรวจ *C. trachomatis* in-house real-time PCR

- ทดสอบและทวนสอบความเข้มข้น

และปริมาณ primer และแสงฟลูออเรสเซนต์ (probe) Positive Control และ Negative Control โดยทำการศึกษาตามเงื่อนไข 4 Experiment ดังจะได้กล่าวต่อไป

- ทดสอบสภาวะปฏิกิริยา PCR reaction (Optimized condition PCR) จนเหมาะสม

1.4 นำ sample จำนวน 130 ตัวอย่าง มาทดสอบทั้งวิธี In-house real-time PCR และตามขั้นตอนของชุดตรวจสำเร็จรูป แล้วเปรียบเทียบความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ทั้งสองวิธี

1.5 เปรียบเทียบต้นทุนของชุดตรวจหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR และชุดตรวจสำเร็จรูป (Commercial Kit) (ชุดตรวจ Anyplex CT/NG real-time detection (V3.1), บริษัทยีนเอ็กเซลเลนซ์,ประเทศเกาหลีใต้)

2. ศึกษาพัฒนาทดสอบขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยวิธีที่ทีมวิจัยคิดค้น เปรียบเทียบกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป โดยมีวิธีการดังนี้

2.1 การเตรียม Stock Lysis solution, Lysis solution และ phosphate buffered saline (PBS)

- วิธีการเตรียม Stock Lysis solution เตรียม 100 ml

1. 0.5% Tween-20 500 µl
2. 0.5% Nomidet P-40 500 µl
3. น้ำกลั่น (Distilled water) 98 ml

ผสมเข้าด้วยกันใส่ในขวดแล้วนำไป Autoclave

- การเตรียม Lysis solution

1. Proteinase K (stock) 10 µg/ml 10 µl
2. Lysis stock 990 µl

- การเตรียม PBS ปริมาตร 1 ลิตร

1. NaCl 7.65 g
2. Na_2HPO_4 0.724 µl
3. KH_2PO_4 0.21 g
4. DW 1,000 ml

2.2 วิธีการสกัดตัวอย่างสิ่งส่งตรวจด้วยชุดสกัดที่พัฒนาขึ้น

1. ใส่ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ 200 µl ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
2. ใส่ phosphate buffered saline (PBS) 1,000 µl ลงในหลอดตัวอย่างสิ่งส่งตรวจข้อ 1 จากนั้น mix ให้เข้ากัน
3. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที
4. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 g นาน 10 นาที
5. เทส่วนใสทิ้ง ซับด้วยกระดาษกรอง
6. เติม Lysis solution 30 ตl จากนั้น mix ให้เข้ากันแล้ว spin down 10 วินาที
7. บ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชั่วโมง
8. นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที (ทำลายโปรตีน)
9. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้หายร้อน แล้วนำไปทดสอบตามขั้นตอนต่อไป

หมายเหตุ *หากไม่ได้ทำการทดสอบต่อทันทีให้เก็บสิ่งส่งตรวจที่สกัดดีเอ็นเอแล้วไว้ตู้เย็นอุณหภูมิ-20°C

2.3 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งส่งตรวจ (High Pure PCR Template Preparation kit, บริษัทโรชไดแอกโนสติกส์, ประเทศเยอรมัน)

1. เตรียมสิ่งส่งตรวจจำนวน 200 µl ใส่ในหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube
2. เติม Binding Buffer จำนวน 200 µl, mix
3. เติม Proteinase K จำนวน 40 µl (เติม DNA/RNA free water) จำนวน 4.5 ml ใส่ใน Lyophilize.

   Proteinase K เก็บไว้ในตู้เย็น -20บC
4. Mix ทันที และ incubate ที่ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที
5. เติม ethanol absolute จำนวน 100 µl, mix well
6. ดูด solution ทั้งหมดจากข้อ 1-5 ใส่ลง

ในชุด High Pure Filter Tube/ Collection tube

7. นำไป centrifuge ที่ 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที

8. เทน้ำส่วนใสใน collection tube ทิ้ง และนำ High Pure Filter Tube เดิมย้ายไปใส่ใน collection tube ใหม่ จากนั้นเติม inhibitor removal buffer จำนวน 500 μl, Centrifuge ที่ 8,000 g เป็นเวลา 1 นาที

9. เทน้ำส่วนใสใน collection tube ทิ้ง และนำ High Pure Filter Tube เดิมย้ายไปใส่ใน collection tube ใหม่ จากนั้นเติม wash buffer จำนวน 500 μl (ครั้งที่ 1), Centrifuge ที่ 8,000 g เป็นเวลา 1 นาที

10. เทน้ำส่วนใสใน collection tube ทิ้ง และนำ High Pure Filter Tube เดิมย้ายไปใส่ใน collection tube ใหม่ จากนั้นเติม Wash buffer จำนวน 500 μl (ครั้งที่ 2), Centrifuge ที่ 8,000 g เป็นเวลา 1 นาที

11. เทน้ำส่วนใสใน collection tube ทิ้ง และนำ collection tube เดิมใส่กลับเข้าไปใน High Pure Filter Tube จากนั้นนำไปปั่น spin down เป็นเวลา 10 นาที เพื่อชะล้างส่วนที่ค้าง filter ออก

12. นำ High Pure Filter Tube จากข้อ 11 ย้ายมาใส่หลอด 1.5 microcentrifuge tube เติม Elution buffer จำนวน 50 μl

13. นำไป centrifuge ที่ 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที

14. กรณียังไม่ทำการทดสอบทันทีให้เก็บตัวอย่างที่สกัดแล้วไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

2.4 ศึกษาและคัดเลือก primer และ probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. trachomatis* ที่ต้องการศึกษา โดยใช้ค่าการทดสอบความไว/ความจำเพาะ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1: แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดการทดสอบ C. trachomatis in-house real-time PCR[8]

Primer: CP gene -F for *C. trachomatis* (5'-AAC-CAA-GGT-CGA-TGT-GAT-AG-3')
Primer: CP gene -R for *C.trachomatis* (5'-TCA-GAT-AAT-TGG-CGA-TTC-TT-3')
Probe: CP gene -FAM for *C. trachomatis* (5'-CgAACTCATCggCgATAAgg-3')
หมายเหตุ Cryptic Plasmid gene (CP) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. trachomatis*

2.5 Validation Method

ในขั้นตอน Validation ชุดตรวจ *C. trachomatis* in-house real-time PCR นี้ ได้ดำเนินการเป็น Experiment 4 ขั้นตอนย่อย ได้แก่

Experiment 1: การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *C. trachomatis* ตามขั้นตอนของชุดตรวจสำเร็จรูป (ชุดตรวจ Anyplex CT/NG real-time detection (V3.1), บริษัทยีนเอ็กเซลเลนซ์,ประเทศเกาหลีใต้)

Experiment 2: ศึกษาความเหมาะสมความเข้มข้นของ condition โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้น 800 nM ของชุดตรวจสำเร็จรูป ใน Experiment ที่ 1

Experiment 3: Fix ความเข้มข้นของ Primer (จากข้อสรุปผลการศึกษาความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสม Experiment 1 หรือ Experiment 2) เพื่อศึกษาสัดส่วนปริมาณน้ำยา Multiplex Master mix จากเดิมปริมาณ 10 μl/reaction และลดปริมาณเป็น 8 μl, 5 μl, 3 μl, 2 μl, 1 μl/reaction

Experiment 4: Fix ปริมาณน้ำยา multiplex master mix ปริมาณที่ได้จากผลการทดสอบ Experiment ที่ 3 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ condition ระหว่าง 100-600 nM ที่ความเหมาะสม

2.6 การทดสอบโดยเครื่อง Bio-Rad CFX 96 โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

1. PCR cycle จำนวน 45 cycles
2. Pre-incubate อุณหภูมิ 95°C 3 นาที
3. Denaturation อุณหภูมิ 95°C 10 วินาที
4. Annealing และ Extension อุณหภูมิ 55°C 30 วินาที

2.7 การรายงานผล

ผลบวก: พบ Amplification curve ของสัญญาณสี FAM สำหรับ CP gene พบ Amplification curve

ค่า Cycle threshold (Ct) ≤40

ผลลบ: ไม่พบ Amplification curve ของสัญญาณสี FAM สำหรับ CP gene พบ Amplification curve

ค่า Cycle threshold (Ct) >40

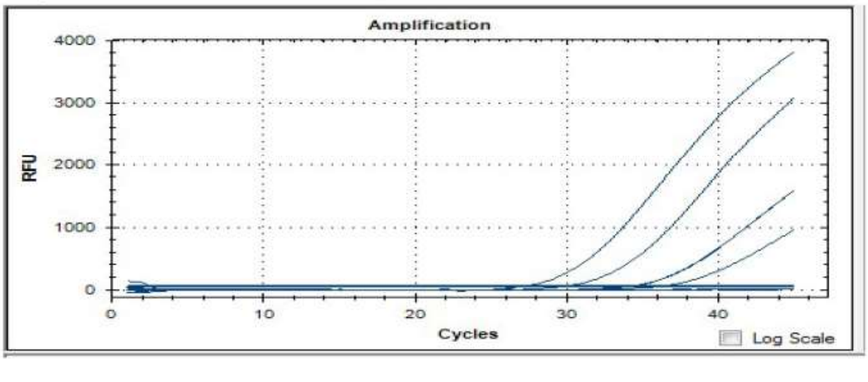
ผลการศึกษา

ผลศึกษาพัฒนาทดสอบขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยวิธีที่ทีมวิจัยคิดค้น เปรียบเทียบกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปชุด High Pure PCR Template Preparation บริษัทโรช ไดแอกโนติกส์ ประเทศเยอรมัน (ตารางที่ 2) นั้นให้ผลตรงกันทั้ง 130 ตัวอย่าง และผลค่า Cycle threshold (Ct) ใกล้เคียงกันกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป โดยค่า Ct เชื้อ *C. trachomatis* 130 ตัวอย่าง อยู่ระหว่าง 20-38 cycle (รูปที่ 2)

ในขั้นตอนการ Validation พบว่าชุดตรวจ *C. trachomatis* In-house real-time PCR ใน Experiment 1 การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *C. trachomatis* (เอกสารในกล่องน้ำยาระบุว่าน้ำยา Multiplex master mix 1 vial มีปริมาตร 880 μl)

ตารางที่ 2: ส่วนประกอบของชุดน้ำยาตรวจ *C. trachomatis* in house real time PCR

สัดส่วนของน้ำยา	ปริมาตร (μl)
Multiplex master mix	10
Rnase free water	3
20 μm Forward primer, conc. 800 nM	0.8
20 μm Reverse primer	0.8
20 μm Probe	0.4
DNA template	5
Total volume	20



รูปที่ 2: กราฟแสดงค่า Cycle thershold (Ct) ของเชื้อ *C. trachomati*

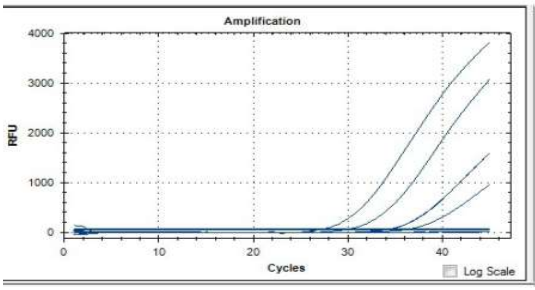
นอกจากนี้ พบว่าตัวอย่าง Urethral Swab, Cervical Swab, Rectal Swab, Throat Swab ทั้งหมด ที่ทราบว่าเป็นผลบวกการติดเชื้อ *C. trachomatis* จากวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 100 ตัวอย่าง เมื่อนำไปทดสอบตามขั้นตอนของชุดตรวจสำเร็จรูป ให้ผลบวก 100 ตัวอย่างตรงกัน ส่วนตัวอย่างที่ทราบว่าเป็นผลลบต่อเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ 30 ราย ไปทดสอบกับชุดตรวจสำเร็จรูปบริษัทยีนเอ๊กเซสเลนซ์ พบว่าให้ผลลบจำนวน 29 ตัวอย่าง มีตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจ Rectal Swab จำนวน 1 ตัวอย่าง ให้ผลบวกเชื้อ *C. trachomatis* เมื่อนำไปตรวจยืนยันด้วยชุดตรวจสำเร็จรูปแตกต่างบริษัท (FTD Urethritis basic kit, บริษัทกิบไทย, ประเทศลักเซมเบิร์ก) ก็ให้ผลบวกเช่นกัน

ใน Experiment 2 ซึ่งเป็นการศึกษาความเหมาะสมความเข้มข้นของ condition โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้น condition 800 nM ของ ใน Experiment ที่ 1 (ตารางที่ 3)

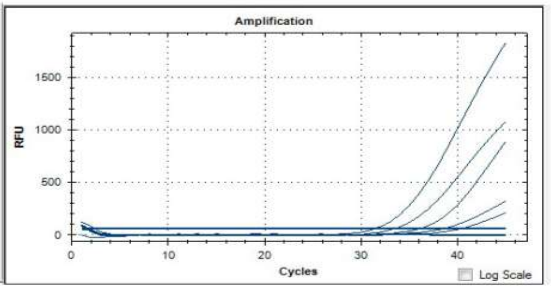
ตารางที่ 3: เปรียบเทียบส่วนประกอบน้ำยา in-house real time PCR ใน Experiment 1 และ 2 condition

น้ำยาสำเร็จรูป	Experiment 1 condition ปริมาณ (μl)	น้ำยา In-house	Experiment 2 Condition ปริมาณ (μl)
Mutiplex master mix	10	Mutiplex master mix	10
Rnase free water	3	Rnase free water	3
20 μm Forward primer, conc. 800 nM	0.8	10 μm Forward primer, conc. 400 nM	0.8
20 μm Reverse primer	0.8	10 μm Reverse primer	0.8
20 μm Probe	0.4	10 μm Probe	0.4
DNA template	5	DNA template	5
Total volume	20	Total volume	20

ผลการศึกษา พบว่า Experiment 1 condition และ Experiment 2 condition ให้ค่าผลบวก และมีค่า Ct ใกล้เคียงกัน ส่วนความเข้มข้นที่ 800 nM สามารถตรวจจับสัญญาณได้ดีกว่า (รูปที่ 3)



Experiment 1 condition



Experiment 2 condition

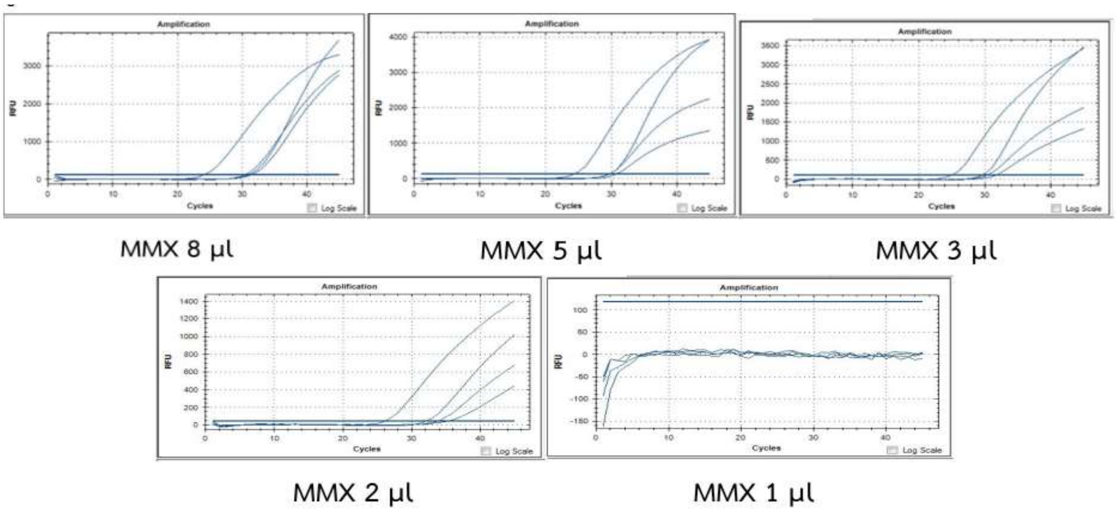
รูปที่ 3: กราฟแสดงค่า Ct ของเชื้อ *Chlamydia trachomatis* เปรียบเทียบระหว่าง 2 Experiment conditon

ผลการศึกษาใน Experiment 3 พบว่า Fix ความเข้มข้นของ Primer 15 μm ความเข้มข้นของ condition 750 μm เพื่อศึกษาสัดส่วนปริมาณน้ำยา Multiplex master mix สำเร็จรูปจากเดิมปริมาณ 10 μl/reaction ลดปริมาณเป็น 8 μl, 5 μl, 3 μl, 2 μl, 1 μl/reaction (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4: การปรับลดสัดส่วนปริมาณน้ำยา Multiplex master mix และส่วนประกอบอื่นๆ ใน Experiment

น้ำยา in house	ปริมาณ (μl)	ปริมาณ (μl)	ปริมาณ (μl)	ปริมาณ (μl)	ปริมาณ (μl)
Multiplex master mix (MMX)	8	5	3	2	1
Rnase free water	4.5	7.5	9.5	10.5	11.5
15 μm Forward primer, conc. 750 nM	1	1	1	1	1
15 μm Reverse primer	1	1	1	1	1
15 μm Probe	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
DNA template	5	5	5	5	5
Total volume	20	20	20	20	20

พบว่าเมื่อ Fix ความเข้มข้นของ Primer 15 μm ความเข้มข้นของ condition 750 μm ลดสัดส่วนปริมาณน้ำยา Multiplex master mix เป็น 8 μl, 5 μl ,3 μl, 2 μl/reaction สามารถอ่านกราฟได้ แต่เมื่อปริมาณลดเหลือเป็น 1 μl ไม่สามารถอ่านกราฟได้ (รูปที่ 4) และข้อมูลจากกราฟยังแสดงให้เห็นว่าสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับน้ำยา Multiplex master mix คือ 3 μl เนื่องจากใช้ปริมาณน้ำยา Multiple master mix น้อยที่สุดโดยที่ยังสามารถตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* ได้ และค่า Ct เหมาะสม ข้อมูลนี้ยังแสดงว่า ในการตรวจหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* โดยวิธี in-house real-time PCR สามารถประหยัดน้ำยา Multiplex Master mix สำเร็จรูปที่มีราคาแพงได้



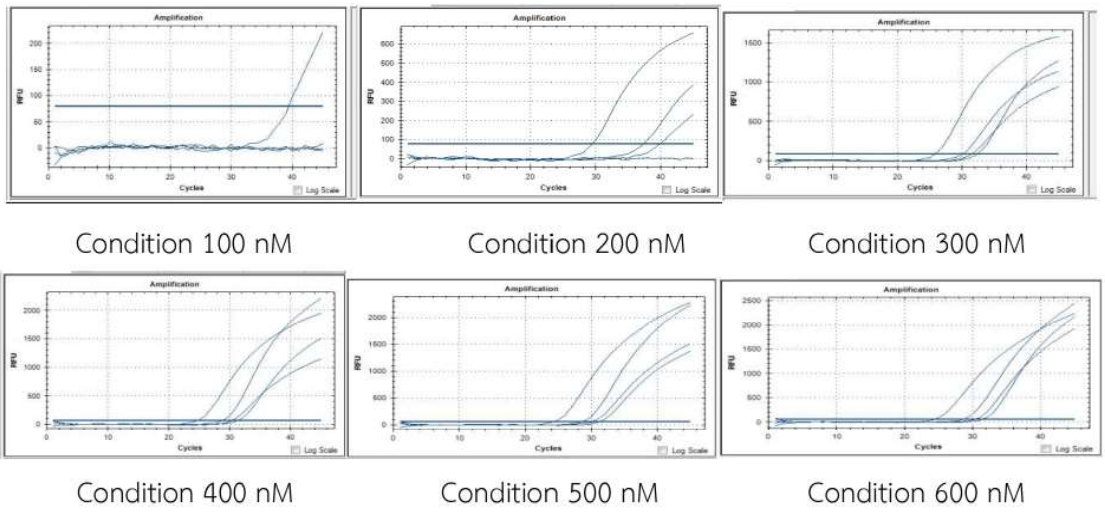
รูปที่ 4: กราฟแสดงค่า Ct ของเชื้อ *C. trachomatis* เปรียบเทียบระหว่าง 5 conditon

ในการศึกษา Experiment 4 เป็นการ Fix ปริมาณน้ำยา Multiplex master mix ที่ระดับ 3 µl เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ condition 6 ระดับ ระหว่าง 100-600 nM เพื่อหาความเข้มข้นที่ความเหมาะสม ดังข้อมูลสัดส่วนของน้ำยา in-house (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5: สัดส่วนของน้ำยา in-house ใน Experiment 4

น้ำยา in-house	ความเข้มข้น condition					
	100 nM	200 nM	300 nM	400 nM	500 nM	600 nM
Multiplex DNA Master	3	3	3	3	3	3
Rnase free water	11.5	11	10.5	10	9.5	9
10 µm Forward primer	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2
10 µm Reverse primer	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2
10 µm Probe	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6

พบว่า เมื่อลดสัดส่วนค่าความเข้มข้นของ condition จากชุดตรวจสำเร็จรูปซึ่งมีความเข้มข้น 800 nM ลดครึ่งหนึ่ง และใช้ master mix 3 µl ความเข้มข้นของ Primer, Probe 10 µm และ condition ความเข้มข้น 400 nM มีความเหมาะสม แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยกว่า 400 nM จะได้ผลบวก *C. trachomatis* ค่า Ct ที่ต่ำกว่า (รูปที่5)



รูปที่ 5: กราฟแสดงค่า Ct ของเชื้อ *C. trachomatis* เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น 6 condition

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัย สามารถสรุปได้ว่า Final PCR condition สำหรับ in-house real-time PCR เป็นดังนี้

- Multiplex Master mix = 3 µl
- Rnase free water = 10 µl
- 10 µm Forward primer = 0.8 µl, conc. 400 nM
- 10 µm Reverse primer = 0.8 µl
- 10 µm Probe = 0.4 µl
- 10 µm Probe = 0.4 µl

และในการรายงานผล รายงานผลดังนี้

- ผลบวก: พบ Amplification curve ของสัญญาณสี FAM สำหรับ CP gene และมีค่า Ct ≤40

- ผลลบ: ไม่พบ Amplification curve ของสัญญาณสี FAM สำหรับ CP gene หรือพบ Amplification curve ที่มีค่า Ct >40

ในการวิเคราะห์ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ของการตรวจ PCR ทั้งสองวิธี เทียบกับผลการตรวจ cell culture ให้ผลตรงกัน โดยค่าความไว เท่ากับ ร้อยละ 100 ค่าความจำเพาะ เท่ากับ ร้อยละ 96.7 ค่าทำนายผลบวก เท่ากับ ร้อยละ 99 และค่าทำนายผลลบ เท่ากับ ร้อยละ 100 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6: เปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* ระหว่างชุดตรวจสำเร็จรูป และชุดตรวจ in-house real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

		ผลการตรวจ cell culture ต่อเชื้อ *C. trachomatis*		รวม
		+ve	-ve	
ผลการตรวจ In-house real-time PCR ต่อเชื้อ *C. trachomatis*	+ve	100	1	101
	-ve	0	29	29
	รวม	100	30	130

		ผลการตรวจ cell culture ต่อเชื้อ *C. trachomatis*		รวม
		+ve	-ve	
ผลการตรวจ real-time PCR ต่อเชื้อ *C. trachomatis* โดยน้ำยาตรวจบริษัท	+ve	100	1	101
	-ve	0	29	29
	รวม	100	30	130

หมายเหตุ ค่าความไว เท่ากับ 100/100 = 100 %
ค่าความจำเพาะ เท่ากับ 29/30 = 96.7 %
ค่าทำนายผลบวก เท่ากับ 100/101 = 99 %
ค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 29/29 = 100 %

สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนของชุดตรวจหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR และชุดตรวจสำเร็จรูป (Commercial Kit) ที่ขายตามท้องตลาด พบว่าค่าใช้จ่ายต้นทุนในการจัดซื้อชุดน้ำยาตรวจ in-house real-time PCR ก่อนการปรับสัดส่วนน้ำยา condition อยู่ที่ 1,028,000 บาท ต่อการตรวจ 4,000 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นจำนวนคาดประมาณที่ต้องตรวจในแต่ละปี หรือคิดเป็นต้นทุน 257 บาท ต่อการตรวจ 1 การทดสอบ อย่างไรก็ตาม เมื่อได้ปรับสัดส่วนน้ำยาและ condition แล้ว สามารถเพิ่มปริมาณการตรวจได้อีก 1,800 ตัวอย่าง ทำให้ตรวจเพิ่มขึ้นเป็น 5,800 ตัวอย่าง คิดเป็นต้นทุน 177.34 บาท ต่อ 1 การทดสอบ (ตารางที่ 7) ในขณะที่ต้นทุนของการจัดซื้อน้ำยาชุดตรวจสำเร็จรูปของบริษัทยีนเอ็กซ์เซลเลนซ์ อยู่ที่ 3,232,000 บาท ต่อ 4,000 การทดสอบ คิดเป็น 808 บาท ต่อ 1 การทดสอบ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7: ต้นทุนของชุดตรวจหาการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR

รายการ	ราคาต่อหน่วย (บาท)	4,000 test/ปี (บาท)
1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ in house	50	200,000
2. Primer F/Primer R	4	16,000
3. Probe	120	480,000
4. multiplex master mix	75	300,000
5. PCR strip	5	20,000
6. Filter tip	1.5	3,000
7. Microcentrifuge tube	1.5	6,000
รวม	-	1,028.000

หมายเหตุ ราคาต้นทุน น้ำยาสำหรับการตรวจ in-house real-time PCR เท่ากับ 1,028,000/4,000 = 257 บาท/การทดสอบ เมื่อลดสัดส่วนน้ำยา master mix ทำให้สามารถตรวจได้เพิ่มขึ้นอีก 1,800 การทดสอบ รวมเป็น 5,800 การทดสอบ ดังนั้นต้นทุนจึงลดลงมาเป็น 1,028,000/5,800 = 177.34 บาท/การทดสอบ

ตารางที่ 8: ต้นทุนของชุดตรวจหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป (Anyplex CT/NG real-time detection (V3.1) kit, บริษัทยีนเอ็กเซลเลนซ์ ประเทศเกาหลีใต้)

รายการ	ราคาต่อหน่วย (บาท)	4,000 test/ปี (บาท)
1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ	200	800,000
2. ชุดตรวจสำเร็จรูป CT/NG real time PCR	600	2,400,000
3. PCR strip	5	20,000
4. Filter tip	1.5	6,000
5. Microcentrifuge tube	1.5	6,000
รวม		**3,232,000**

หมายเหตุ ราคาต้นทุน น้ำยาสำหรับการตรวจ real-time PCR จากบริษัทบริษัทยีนเอ็กเซลเลนซ์เท่ากับ 3,232,000/4,000 = 808 บาท/การทดสอบ

อภิปราย

จากการศึกษาวิจัยและพัฒนาชุดตรวจ *C. trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR นี้ พบว่า ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพ ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เทียบเท่ากับชุดตรวจที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และการตรวจมาตรฐาน ได้แก่ ผลการตรวจด้วย Cell Culture ผลจากการวิจัยนี้ ได้ช่วยแก้ไขปัญหาบริการตรวจหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ในห้องปฏิบัติการคลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ เพื่อทดแทนน้ำยา ELISA ที่เลิกผลิต โดยทีมวิจัยได้นำเทคโนโลยีทาง Molecular testing มาพัฒนาในการตรวจคัดกรองในงานประจำวัน ดังผลที่พบว่า เวลาในการสกัดดีเอ็นเอรวดเร็วขึ้น มีความไว ความจำเพาะสูง

นอกจากนี้ ผลการศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนของชุดตรวจหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR พบว่ามีราคาต้นทุน 247 บาท/การทดสอบ และยังสามารถลดต้นทุนลงได้อีก โดยเป็นผลเนื่องมาจากการ validate น้ำยา in-house real-time PCR ซึ่งพบว่าสามารถลดปริมาณสัดส่วนน้ำยา Master mix ซึ่ง

มีราคาแพง ให้เหลือเป็น 3 μl จากข้อมูล package insert เดิมของบริษัทโรชไดแอกโนติกส์ ประเทศเยอรมัน แนะนำให้ใช้ปริมาณ 4.4 μl ทำให้ราคาต้นทุนลดลง และสามารถตรวจจำนวนตัวอย่างเพิ่มขึ้นอีก 1,800 tests จากเดิม 4,000 tests รวมเป็น 5,800 tests ดังนั้นต้นทุนของชุด in- house real-time PCR จึงลดลงเป็นประมาณ 177 บาท/การทดสอบ ส่วนชุดตรวจสำเร็จรูป (Commercial Kit) (Anyplex CT/NG real-time detection (V3.1) kit, บริษัทยีนเอ็กซ์เซลเลนซ์ ประเทศเกาหลีใต้) มีราคาต้นทุน 808 บาท/การทดสอบ ซึ่งหน่วยงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ได้นำชุดตรวจคัดกรองหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR มาใช้ตรวจบริการงานประจำวัน ช่วยให้ประหยัดงบประมาณของรัฐในการจัดซื้อน้ำยาตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ได้รับจัดสรรอย่างจำกัด ได้เป็นอย่างดี คิดเป็นวงเงินที่คาดว่าจะช่วยประหยัดได้ถึงมากกว่าสองล้านบาทต่อปี

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ได้ควบคุมคุณภาพชุดทดสอบที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมานี้โดยได้เข้าร่วมโครงการควบคุมคุณภาพจากองค์กรภายนอก (EQA) จากต่างประเทศ เพื่อทดสอบหาเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR โดยหน่วยงานต่างประเทศได้ส่งตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง มาทดสอบและผ่านประเมินในปีงบประมาณ 2562 แล้ว ซึ่งจะได้มีการควบคุมคุณภาพชุดทดสอบนี้อย่างต่อเนื่องต่อไป

ผู้วิจัยได้วางแผนการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต โดยจะทำการทวนสอบเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* เพิ่มเติม และเมื่อพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ในแบบ In-house multiplex real-time PCR สำเร็จ จะนำไปถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ให้กับหน่วยงานห้องปฏิบัติการของสำนักงานป้องกันและควบคุมโรค กรมควบคุมโรค ซึ่งเป็นหน่วยงานในเครือข่ายรับผิดชอบ เพื่อพัฒนาศักยภาพบุคลากรในการเปิดห้องปฏิบัติการ คลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ให้กับประชากรกลุ่มเสี่ยงได้เข้าถึงบริการเพื่อให้สามารถได้รับการตรวจ วินิจฉัย รักษา รวมทั้งในการป้องกันควบคุมการแพร่กระจายโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ พร้อมทั้งจัดให้มีการวางแผนดำเนินการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (inter-laboratory comparison) เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพผลการตรวจวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการเอง ซึ่งถ้าเกิดผลสำเร็จจะช่วยให้หน่วยงานสามารถปฏิบัติงานตรวจหาเชื้อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ทั้งสอง ได้โดยถือเป็นการควบคุมคุณภาพได้

สรุปผลการวิจัยและประโยชน์ที่ได้รับ

1. คณะผู้วิจัยสามารถ validate ชุดตรวจคัดกรองหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี in-house real-time PCR จากตัวอย่างซึ่งเก็บจาก Urethral Swab, Cervical Swab, Rectal Swab และ Throat Swab ที่มีประสิทธิภาพมาใช้ตรวจวิเคราะห์ในงานบริการประจำวันคลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ซึ่งมีความไว (Sensitivity) ร้อยละ 100 และค่าความจำเพาะ ร้อยละ 96.7

2. สามารถลดต้นทุนในการจัดซื้อน้ำยาตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ คลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ เนื่องจากชุดตรวจ in-house real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีราคาต้นทุนเพียงประมาณ 177 บาท/การทดสอบ ขณะเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับราคาต้นทุนชุดตรวจสำเร็จรูปบริษัท A ที่มีราคาสูง 808 บาท/การทดสอบ ห้องปฏิบัติการจัดทำแผนการจัดซื้อน้ำยาดังกล่าวเฉลี่ย 4,000 การทดสอบต่อปีงบประมาณ การนำชุดน้ำยา in- house มาใช้ในงานบริการทำให้ประหยัดงบประมาณของรัฐได้ประมาณมากกว่าปีละ 2,000,000 บาท

3. ลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นใช้ระยะเวลาเพียง 1 ชั่วโมง 45 นาที ขณะที่ชุดตรวจสำเร็จรูปบริษัทโรชไดแอกโนติกส์ ใช้เวลาตรวจวิเคราะห์ 2 ชั่วโมง 30 นาที

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการกองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค หัวหน้ากลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ที่สนับสนุนงบประมาณในการดำเนินการวิจัย เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยและพัฒนาทางคลินิกกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ สำหรับการเก็บสิ่งส่งตรวจอาสาสมัคร ขอขอบคุณ ผศ.ดร.รัตนา ลาวัง คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำตลอดการศึกษาวิจัยนี้ และขอขอบคุณทีมวิจัยทุกท่านที่ร่วมดำเนินการจนงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักโรคเอดส์วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข. รายงานผลการดำเนินงาน สำนักโรคเอดส์วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ พ.ศ.2561.
2. Orellana MA, Gómez-Lus ML, Lora D. Sensitivity of Gram stain in the diagnosis of urethritis in men. Sexually Transmitted Infections.2012, 88(4):284-87.
3. Lai-King Ng, Irene E Martin. The laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae. Can J Infect Dis Med Microbiol 2005; 16(1): 15-25.
4. Kanupriya G, LaDraka B, Rakesh KB, Christen GP, Xiaofei C, Rachel JG, et al. Performance of Chlamydia trachomatis OmcB Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Serodiagnosis of Chlamydia trachomatis Infection in Women. Journal of clinical microbiology. 2018, 56(9) :275-18.
5. Bachmann LH et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis rectal infections. Journal of Clinical Microbiology 2010, 48(5): 1827-32.
6. Schachter J et al. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of Chlamydial and gonococcal infections of the oropharynx and rectum in men who have sex with men. Sexually transmitted diseases 2008, 35(7): 637-42.
7. Manisha G, Anima S, Shravan KM. Molecular Diagnosis of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in Women at High Risk of Sexually Transmitted Infections. J Microb Biochem Technol 2017, 9(6): 321-24.
8. Hopkins MJ, Ashton J, Alloba F, et al. Validation of a laboratory-developed real-time PCR protocol for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in urine. Sex Transm Infect 2010, 86: 207-11.