

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

การประเมินประสิทธิภาพของวิธี In-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ

Chlamydia trachomatis และ *Neisseria gonorrhoeae* จากตัวอย่างปัสสาวะEFFICIENCY EVALUATION OF AN IN-HOUSE REAL TIME PCR ASSAY
FOR THE DETECTION OF *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*
IN URINE SPECIMENS

ศิริมล ภูมิเนียม

Siwimol Phoomniyom,

บุศรา บำรุงศักดิ์

Busara Bamrungsak

กรศิริ บุญประเทือง

Kornsiri Boonprathueng

พงศธร แสงประเสริฐ

Pongsathorn Sangprasert

รุ่งนภา เหลืองประสิทธิ์

Runnapa Luengprasit

ณัฐพล งามจิระธรรม

Nattapon Ngarmjiratham

รสพร กิตติเยวามาลย์

Rossaphorn kittiyaowaman

กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

Bangrak STIs Center,

กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

Division of AIDS and STIs,

กรมควบคุมโรค

Department of disease control

Received: 15/10/2020

Revised: 02/11/2020

Accepted: 03/12/2020

บทคัดย่อ

กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ให้บริการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธี in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเองเพื่อใช้ในงานประจำวัน ตัวอย่างส่งตรวจที่ใช้มีหลากหลายชนิด ได้แก่ ตัวอย่างจากท่อปัสสาวะ ตัวอย่างจากปากมดลูก ตัวอย่างจากทวารหนัก ตัวอย่างจากช่องคอ ซึ่งปัจจุบันตัวอย่างปัสสาวะ เป็นอีกตัวอย่างหนึ่งสำหรับการทดสอบ เนื่องจากง่ายต่อการเก็บและสามารถเก็บได้ด้วยตนเอง และไม่ทำให้เจ็บปวด การศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธี in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นในการ ตรวจหาเชื้อทั้งสองชนิดนี้เปรียบเทียบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG ในตัวอย่าง ปัสสาวะจำนวน 100 ตัวอย่าง ร่วมกับการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นเอง ชุดน้ำยา APTIMA และวิธีย้อมสีแกรมในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยทำการประเมินความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบและค่าความถูกต้อง รวมทั้งการเปรียบเทียบความคุ้มค่าของชุดน้ำยาและวัสดุ วิทยาศาสตร์ที่ใช้ตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ด้วยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ

ผลการศึกษาพบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการทดสอบทุกค่าการประเมินคิดเป็นร้อยละ 100 เปรียบเทียบกับชุดน้ำยา APTIMA ผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อพบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้น และชุดน้ำยา APTIMA ให้ผลการทดสอบทุกค่าการประเมินคิดเป็นร้อยละ 100 เช่นเดียวกัน ขณะที่วิธีย้อมสีแกรม มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบและค่าความถูกต้อง ร้อยละ 80, 100, 100, 96 และ 96.55 ตามลำดับ นอกจากนี้วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความคุ้มค่าคิดเป็น 252 บาทต่อการทดสอบขณะที่ชุดน้ำยา สำเร็จรูปคิดเป็น 718 บาทต่อการทดสอบ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นเองมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีอ้างอิงและวิธีมาตรฐานในทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบด้วยความคุ้มทุนมากกว่าน้ำยาส่งตรวจในราคาความคุ้มทุนที่มากกว่า 2.8 เท่า ดังนั้นวิธีที่ใช้ในงานบริการประจำวันสำหรับตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* จากตัวอย่างปัสสาวะมีประสิทธิภาพและมีความน่าเชื่อถือ ประหยัดงบประมาณการจัดซื้อน้ำยาตรวจวิเคราะห์และลดค่าใช้จ่ายในการให้บริการ ส่งผลให้ผู้ป่วยสามารถเข้าถึงการบริการได้มากยิ่งขึ้น นำไปสู่การได้รับการรักษาและลดการแพร่กระจายเชื้อไปยังผู้อื่น

Abstract

Bangrak STIs Center provides routine service for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* detection by using in-house real time PCR assay. There are various types of specimens, including urethral swab, cervical swab, rectal swab and throat swab. Currently, a urine specimen is another specimen for testing because it's easy to collect with self-collection process and it doesn't make patients pain. The objective of this study was to evaluate the efficiency of in-house real time PCR assay in the detection of these two pathogens compared with APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG from 100 urine samples. Together with the study to compare the efficiency of in-house real time PCR assay, APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG and Gram stain method for *N. gonorrhoeae* detection. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy were analyzed. The comparative cost-effectiveness of the reagent and material used for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* detection by nucleic acid amplification testing was also assessed.

In-house real time PCR assay showed all 100% correlation agreement with APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG. The result of *N. gonorrhoeae* comparison with culture method showed both in-house real time PCR assay and APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG also had all 100% correlation agreement. Meanwhile Gram stain showed sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy 80%, 100%, 100%, 96% and 96.55%, respectively. The cost-effectiveness of in-house real time PCR for CT/NG was 252 bath/test while the commercial kit was 718 bath/test.

The in-house real time PCR assay showed acceptable performance characteristics in comparison with the reference and the gold standard methods in all specimens tested with the cost-effectiveness more than 2.8 times. Therefore, our routine service for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* detection from urine specimen is effective and reliable. Help save budget on the purchase of analytical reagents and reduce the service cost result in more patient access in service unit, leading to better treatment and less transmission of pathogen to others.

คำสำคัญ:

เชื้อคลาไมเดีย ทราโคมาติส, เชื้อไนซิเรีย โกโนเรียอี,
วิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น

Keywords:

Chlamydia trachomatis, *Neisseria gonorrhoeae*,
In-house real time PCR assay

บทนำ

N. gonorrhoeae และ *C. trachomatis* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคหนองในและโรคหนองในเทียม ซึ่งเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ที่พบมากที่สุดทั่วโลก⁽¹⁾ ขณะที่ในประเทศไทยสถานการณ์โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ 5 โรคหลัก ได้แก่ โรคซิฟิลิส โรคหนองใน โรคหนองในเทียม โรคแผลริมอ่อน กามโรคของท่อและต่อมน้ำเหลือง ในภาพรวมของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากอัตราป่วย 18.8 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2557 เป็น 33.8 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2562 โดยพบอัตราป่วยบ่อยที่สุดในโรคหนองในซึ่งมีอัตราป่วย 10.2, 12.5, 14.3, 15.8, 14.6 และ 14.8 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2557-2562 ตามลำดับ ขณะที่โรคหนองในเทียมมีอัตราป่วย 3.0, 3.8, 3.5, 3.2, 3.4 และ 3.3 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2557-2562 ตามลำดับ⁽²⁾

การติดเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ในผู้ป่วยส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการ⁽³⁻⁵⁾ ดังนั้นการตรวจคัดกรองเชื่อก่อนโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์อย่างมีประสิทธิภาพและทั่วถึงจึงมีความสำคัญในการบริหารจัดการผู้ติดเชื้อและยังสามารถป้องกัน การแพร่เชื้อไปยังผู้อื่นได้ แม้ว่าการตรวจวินิจฉัยโรคหนองในซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จะสามารถตรวจได้ด้วยวิธีย้อมสีแกรม วิธีเพาะเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับ การตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* วิธีย้อมสีแกรม มีความไวร้อยละ 90 ความจำเพาะร้อยละ 95 ขณะที่วิธีเพาะเชื้อมีความไวร้อยละ 85 ความจำเพาะร้อยละ 95 ในตัวอย่างส่งตรวจจากผู้ป่วยที่มีอาการทางท่อปัสสาวะและปากมดลูก⁽⁶⁻⁷⁾ สำหรับเชื้อ *C. trachomatis* ซึ่งเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ก่อให้เกิดโรคหนองในเทียม การตรวจ วินิจฉัยด้วยวิธีมาตรฐานคือการเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง แต่มีความไวต่ำและมีข้อเสียคือ ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน ราคาแพง ขั้นตอนการตรวจยุ่งยาก เจ้าหน้าที่ต้องมีทักษะความชำนาญ ในการเลี้ยงเซลล์และต้องมีความระมัดระวังในการขนส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการ⁽³⁾ ในปัจจุบันวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อหรือ

Nucleic acid amplification testing (NAAT) เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ที่นิยมใช้เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง ในตัวอย่างส่งตรวจที่หลากหลายไม่ว่าจะเป็นตัวอย่างจากอวัยวะเพศ ทวารหนักหรือช่องคอ⁽⁸⁻¹⁰⁾

ตัวอย่างส่งตรวจที่ได้รับการทดสอบและแนะนำว่าสามารถใช้เพื่อตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ได้แก่ ตัวอย่างส่งตรวจปากมดลูก (cervical swab) ตัวอย่างส่งตรวจช่องคลอด (vagina swab) ในผู้หญิง ตัวอย่างส่งตรวจท่อปัสสาวะ (urethral swab) ในผู้ชาย และตัวอย่างปัสสาวะ (urine) ในผู้หญิงและผู้ชาย⁽¹¹⁾ และชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ให้ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* จากตัวอย่างอวัยวะเพศ ได้แก่ ชุดน้ำยา Abbott RealTime m2000 CT/NG (Abbott Molecular, สหรัฐอเมริกา), Amplicor and Cobas CT/NG test (Roche Molecular Diagnostics, สหรัฐอเมริกา), APTIMA (Hologic, สหรัฐอเมริกา), BD ProbeTec ET and Qx (Becton Dickinson, สหรัฐอเมริกา) และ Xpert CT/NG Assay (Cepheid, สหรัฐอเมริกา)⁽¹²⁾ และการศึกษาเลือกใช้น้ำยา APTIMA เป็นน้ำยาอ้างอิงในการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae*

กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ให้บริการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* จากตัวอย่างท่อปัสสาวะ ตัวอย่างส่งตรวจปากมดลูก ตัวอย่างส่งตรวจทวารหนัก และตัวอย่างส่งตรวจช่องคอด้วยวิธี in-house real time PCR หรือเรียกวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในงานประจำวัน ตัวอย่างปัสสาวะเป็นหนึ่งในตัวอย่างส่งตรวจที่ได้รับคำแนะนำว่าสามารถใช้ตรวจหาเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ สามารถเก็บได้ง่าย ไม่ทำให้คนไข้เจ็บปวดคลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์จึงเริ่มมีการส่งตรวจตัวอย่างปัสสาวะในงานบริการ แต่เนื่องจากตัวอย่างปัสสาวะเป็นตัวอย่าง

ที่ยังไม่เคยส่งตรวจมาก่อน คณะผู้ศึกษาจึงได้ทำการประเมินวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยชุดน้ำยาที่มีความไวและความจำเพาะที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างปัสสาวะ โดยทำการประเมินประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* จากตัวอย่างปัสสาวะเปรียบเทียบกับชุดน้ำยา APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG หรือเรียกชุดน้ำยา APTIMA และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น ชุดน้ำยา APTIMA และวิธีย้อมสีแกรมในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* เทียบกับวิธีเพาะเชื้อ รวมทั้งเปรียบเทียบความคุ้มค่าของชุดน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในงานประจำวันกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* เปรียบเทียบกับน้ำยา APTIMA ในตัวอย่างปัสสาวะ
- 2) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น ชุดน้ำยา APTIMA และวิธีย้อมสีแกรมในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ ในตัวอย่างปัสสาวะ
- 3) เปรียบเทียบความคุ้มค่าของวิธีตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ด้วยชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นและชุดน้ำยา APTIMA

วิธีการศึกษา

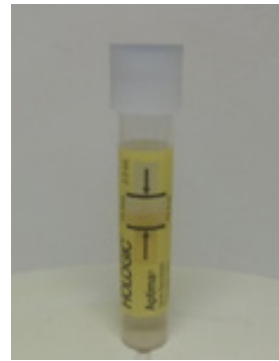
การคัดเลือกตัวอย่าง

ตัวอย่างเก็บจากผู้มารับบริการเพศชาย และหญิงในทุกช่วงอายุ ณ คลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ในช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคม 2563 โดยเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงทางเพศสัมพันธ์และมีการใช้วิธีเจาะเพศในการมีเพศสัมพันธ์ ทั้งแสดงและไม่แสดงอาการทางคลินิก รวม 100 ตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างและการขนส่ง

ผู้มารับบริการได้รับคำแนะนำจากพยาบาล วิชาชีพให้ทำการเก็บปัสสาวะในช่วงแรกของการถ่าย (First void urine) ปริมาณ 20 มิลลิลิตรด้วยตนเองก่อน นำตัวอย่างส่งไปยังห้องปฏิบัติการกลาง ตัวอย่างปัสสาวะในกระปุกเก็บปัสสาวะจากผู้ป่วยแต่ละรายจะถูกแบ่งใส่ชุดเก็บตัวอย่าง APTIMA Urine Specimen Collection Kit หรือเรียกว่าชุดเก็บตัวอย่าง APTIMA ในปริมาณ 2 มิลลิลิตรภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากการเก็บตัวอย่าง⁽¹³⁾ ดังรูปที่ 1

รูปที่ 1: ตัวอย่างปัสสาวะในชุดเก็บตัวอย่าง APTIMA



ตัวอย่างปัสสาวะในกระปุกเก็บปัสสาวะและตัวอย่างปัสสาวะในชุดเก็บตัวอย่าง APTIMA จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสก่อนนำส่งห้องปฏิบัติการ อนุชีววิทยา กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ จากนั้นตัวอย่างปัสสาวะในกระปุกเก็บปัสสาวะจะถูกนำมาทำการทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม วิธี in-house real time PCR หรือเรียกว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น จะทำการตรวจภายใน 7 วัน หลังจากการเก็บตัวอย่าง ขณะที่ตัวอย่างปัสสาวะในชุดเก็บตัวอย่าง APTIMA จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยน้ำยาสำเร็จรูป APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG เรียกย่อว่าชุดตรวจ APTIMA จะทำการตรวจภายใน 30 วันหลังจากการเก็บตัวอย่าง⁽¹³⁾ ณ ห้องปฏิบัติการศูนย์ความร่วมมือ ไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุข

วิธีการทดสอบ

APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG

ชุดน้ำยา APTIMA มีรายละเอียดของหลักการ โดยย่อ คือ ใช้เทคโนโลยีการจับยีนเป้าหมาย Transcription-Mediated Amplification (TMA) และ Dual Kinetic Assay (DKA) ในการตรวจหา 16S rRNA ของเชื้อ *C. trachomatis* และ 23S rRNA ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยใช้ปริมาณตัวอย่างส่งตรวจ 400 ไมโครลิตร และมีกระบวนการทดสอบในขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ ขั้นตอน Target capture release, Amplification, Hybridization และ Selection ตรวจวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วยหลักการ chemiluminescent และแปลผลอย่างอัตโนมัติด้วยโปรแกรมการตรวจวิเคราะห์⁽¹⁴⁾

In-house real time PCR assay for CT/NG

นำตัวอย่างปัสสาวะ 1 มิลลิลิตรมาปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีก่อนนำตะกอนส่วนที่เหลือ 200 ไมโครลิตรไปสกัดสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae*

ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostic, เยอรมนี) สารพันธุกรรมที่ได้ถูกนำไปใช้ทำการทดสอบต่อด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

วิธีที่พัฒนาขึ้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย Primer และ Probe ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย Cryptic Plasmid gene (CP) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. trachomatis*⁽¹⁵⁾ โดย Probe ประยุกต์ใช้ BBQ แทน BHQ1 และใช้ความเข้มข้นของ Primer และ Probe มากกว่าที่ความเข้มข้น 10 μ M เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย Primer และ Probe ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย PorA gene ที่จำเพาะต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae*⁽¹⁵⁾ โดย Probe ประยุกต์ใช้ HEX แทน LC610 และใช้ความเข้มข้นของ Primer และ Probe มากกว่าที่ 10 μ M ส่วน Human Beta-globin gene ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer และ Probe ที่ใช้ในการทดสอบดังข้อมูลในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของของ Primer และ Probe (15-16) ที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

ยีนเป้าหมาย	Primer และ Probe	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'
<i>C. trachomatis</i> (CP gene) ⁽¹⁵⁾ ประยุกต์ในส่วนของ Probe โดยใช้ BBQ แทน BHQ1 และใช้ความเข้มข้นของ Primer และ Probe มากกว่าที่ความเข้มข้น 10 μ M	CP-Forward primer	AAC CAA GGT CGA TGT GAT AG
	CP-Reverse primer	TCA GAT AAT TGG CGA TTC TT
	CP-Probe	FAM -CGA ACT CAT CGG CGA TAA GG- BBQ
<i>N. gonorrhoeae</i> (PorA gene) ⁽¹⁵⁾ ประยุกต์ในส่วนของ Probe โดยใช้ HEX แทน LC610 และใช้ความเข้มข้นของ Primer และ Probe มากกว่าที่ความเข้มข้น 10 μ M	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 ⁽¹⁶⁾	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

การเตรียมน้ำยา (Master mix) สำหรับการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* และ Human Beta-globin gene ด้วยชุดน้ำยา LightCycler® Multiplex DNA Master (Roche Diagnostic, เยอรมนี) ผสมน้ำยาตามตารางที่ 2 และ 3 ตารางที่ 2 แสดงสัดส่วนของน้ำยา Master mix หลอดที่ 1 สำหรับตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* ใน 1 reaction (15 ไมโครลิตร)

น้ำยา	ปริมาณ (μl)
PCR grade water	10
LightCycler® Multiplex DNA Master	3
10 μM CP-Forward primer	0.8
10 μM CP-Reverse primer	0.8
10 μM CP-Probe	0.4

ตารางที่ 3 แสดงสัดส่วนของน้ำยา Master mix หลอดที่ 2 สำหรับตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และ Human Beta globin gene ใน 1 reaction (15 ไมโครลิตร)

น้ำยา	ปริมาณ (μl)
PCR grade water	10
LightCycler® Multiplex DNA Master	3
10 μM PorA-Forward primer	0.4
10 μM PorA-Reverse primer	0.4
10 μM PorA-Probe	0.2
10 μM Human Beta-globin-Forward primer	0.4
10 μM Human Beta-globin-Reverse primer	0.4
10 μM Human Beta-globin-Probe	0.2

เมื่อผสมน้ำยาแล้วให้แบ่งน้ำยาแต่ละหลอดลงในหลอด real time PCR tube สำหรับ *C. trachomatis* และ real time PCR tube สำหรับ *N. gonorrhoeae* และ Human Beta globin gene หลอดละ 15 μl จากนั้นเติมสารพันธุกรรมของตัวอย่างส่งตรวจที่สกัด, Positive control และ reagent control หลอดละ 5 μl ก่อนนำเข้าเครื่อง CFX96TM Real time System (Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา) Positive control หรือตัวควบคุมผลบวกคือ สารพันธุกรรมของเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ที่ผ่านการทดสอบแล้วพบว่าให้ผล *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* เป็นบวกโดยเป็นสารพันธุกรรมที่เหลือจากตัวอย่างทดสอบความชำนาญ (EQA *C. trachomatis*/ *N. gonorrhoeae*, Labquality, ฟินแลนด์ ปี พ.ศ. 2562) สารพันธุกรรมถูกเก็บรักษาไว้

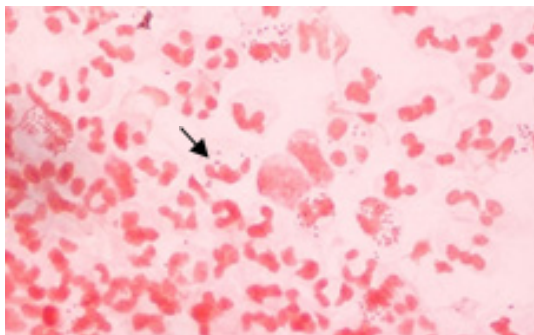
ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้เกณฑ์การแปลผล รายงานผลบวกต่อเชื้อ *C. trachomatis* หรือ *N. gonorrhoeae* เมื่อสี FAM หรือ HEX (ตามลำดับ) มีค่า Ct ≤40 ร่วมกับ Amplification curve ของสัญญาณสี เป็น S curve ส่วน Human Beta-globin gene เป็นตัวควบคุมคุณภาพของตัวอย่าง วัดสัญญาณสี Cy5 ควรจะมีค่า Ct≤40 แสดงว่าตัวอย่างเหมาะสมและมีคุณภาพดี จึงออกรายงานผลได้

หากผลการทดสอบที่ได้มีความขัดแย้งกันระหว่างผลการตรวจด้วยน้ำยา APTIMA และวิธีที่พัฒนาขึ้นตัวอย่างส่งตรวจจะถูกทำการทดสอบเพิ่มเติมด้วยน้ำยา Anyplex™ CT/NG Real-time Detection (Seegene, เกาหลีใต้)

วิธีย้อมสีแกรมสำหรับตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae*

เก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากท่อปัสสาวะป้ายลงบนสไลด์และทำการย้อมสีโดยใช้สี Crystal violet สี Gram Iodine น้ำยา Decolorizer และสี Safranin จากนั้นนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Bright field condenser รูปที่ 2 เป็นรูปที่แสดงผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* รายงานพบ “Gram negative diplococci Intracellular” หรือ “Gram negative diplococci Extracellular” หรือ “Gram negative diplococci Intracellular and Extracellular”

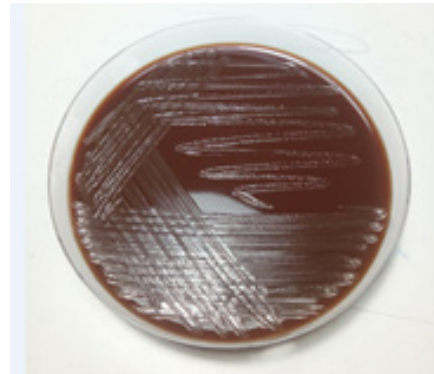
รูปที่ 2: ผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีย้อมสีแกรม พบ “Gram negative diplococci Intracellular and Extracellular”



วิธีเพาะเชื้อสำหรับตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae*

เก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากท่อปัสสาวะและ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bangrak I Media จากนั้นบ่มเลี้ยงเชื้อในตู้ CO2 Incubator ที่ $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ในบรรยากาศที่มี 5% CO2 และความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้อ่านผลและทดสอบด้วยการดูลักษณะโคโลนีร่วมกับการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *N. gonorrhoeae* โคโลนีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* มีลักษณะกลม นูน สีเทาขาวแสงขนาด 0.5–2 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 3

รูปที่ 3: ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *N. gonorrhoeae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bangrak I Media



การวิเคราะห์ข้อมูล

การประเมินประสิทธิภาพของวิธี in-house real time PCR มีสองวิธี วิธีแรก คือ เปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับชุดน้ำยา APTIMA โดยการวิเคราะห์ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบและค่าความถูกต้อง วิธีที่สอง โดยการนำแต่ละวิธี/น้ำยาที่ใช้ในการตรวจ *N. gonorrhoeae* มาเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

ผลการศึกษา

ตัวอย่างปัสสาวะ 100 ตัวอย่าง มาจากผู้มารับบริการเพศชายจำนวน 78 ราย และผู้มารับบริการเพศหญิงจำนวน 22 ราย โดย 17 ตัวอย่าง ร้อยละ 17 ให้ผลบวกต่อเชื้อ *C. trachomatis* และ 16 ตัวอย่าง ร้อยละ 16 ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ตัวอย่างที่ให้ผลตรวจพบทั้ง 2 เชื้อ (CT/NG coinfection) จำนวน 4 ตัวอย่าง ร้อยละ 4 โดยการทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นและน้ำยา APTIMA ผลการทดสอบประสิทธิภาพวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* เปรียบเทียบกับ APTIMA ให้ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบและค่าความถูกต้องคิดเป็นร้อยละ 100 ในทุกค่าการทดสอบ ดังข้อมูลในตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* เปรียบเทียบกับน้ำยา APTIMA

In-house real time PCR	APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG		
<i>C. trachomatis</i>	Positive	Negative	Total
Positive	17	0	17
Negative	0	83	83
Total	17	83	100
Sensitivity	100%		
Specificity	100%		
PPV	100%		
NPV	100%		
Accuracy	100%		

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* เปรียบเทียบกับน้ำยา APTIMA

In-house real time PCR	APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG		
<i>N. gonorrhoeae</i>	Positive	Negative	Total
Positive	16	0	16
Negative	0	84	84
Total	16	84	100
Sensitivity	100%		
Specificity	100%		
PPV	100%		
NPV	100%		
Accuracy	100%		

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น น้ำยา APTIMA และวิธีย้อมสีแกรมเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ ในตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมด 87 ตัวอย่าง ไม่ได้ส่งตรวจด้วยวิธีเพาะเชื้อ จำนวน 13 ตัวอย่าง พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นและน้ำยา APTIMA มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยความไวร้อยละ 100 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 100 ค่าทำนายผลลบร้อยละ

100 และค่าความถูกต้องร้อยละ 100 ขณะที่ 3 ใน 87 ตัวอย่าง ร้อยละ 3.45 ให้ผลลบด้วยวิธีย้อมสีแกรม แต่ให้ผลบวกด้วยวิธีเพาะเชื้อ ดังนั้น วิธีย้อมสีแกรมมีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก, ค่าทำนายผลลบและค่าความถูกต้องคิดเป็นร้อยละ 80, 100, 100, 96 และ 96.55 ตามลำดับดังข้อมูลในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น, น้ำยา APTIMA และวิธีย้อมสีแกรมเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ

In-house real time PCR	วิธีเพาะเชื้อ			APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG	วิธีเพาะเชื้อ			วิธีย้อม แกรม	วิธีเพาะเชื้อ		
	Positive	Negative	Total		Positive	Negative	Total		Positive	Negative	Total
Positive	15	0	15	Positive	15	0	15	Positive	12	0	12
Negative	0	72	72	Negative	0	72	72	Negative	3	72	75
Total	15	72	87*	Total	15	72	87*	Total	15	72	87*
Sensitivity	100%			100%			80%				
Specificity	100%			100%			100%				
PPV	100%			100%			100%				
NPV	100%			100%			96%				
Accuracy	100%			100%			96.55%				

การเปรียบเทียบความคุ้มค่าของน้ำยาตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นและน้ำยาลำเร็จรูป APTIMA จำนวนที่ 4,000 การทดสอบต่อปีตามจำนวนผู้มารับบริการต่อปี ณ คลินิกบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ พบว่าค่าใช้จ่ายต้นทุนของน้ำยาที่พัฒนาขึ้นอยู่ที่ 1,008,000 บาทหรือคิด

เป็นต้นทุน 252 บาทต่อหนึ่งการทดสอบในขณะที่ต้นทุนของการนำยาลำเร็จรูป APTIMA อยู่ที่ 2,872,000 บาทหรือคิดเป็นต้นทุน 718 บาทต่อหนึ่งการทดสอบ ทั้งนี้การคิดความคุ้มค่า คิดเฉพาะน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์เท่านั้น ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ต้นทุนน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์วิธีที่พัฒนาขึ้นและน้ำยาลำเร็จรูป APTIMA

ต้นทุนน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์วิธี In-house real time PCR			ต้นทุนน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์น้ำยาลำเร็จรูป APTIMA Combo 2 Assay for CT/NG		
รายการ	ราคาต่อหน่วย (บาท)	4,000 การทดสอบ/ปี (บาท)	รายการ	ราคาต่อหน่วย (บาท)	4,000 การทดสอบ/ปี (บาท)
1. กระปุกเก็บปัสสาวะ	8	32,000	1. กระปุกเก็บปัสสาวะ	8	32,000
2. ชุดสกัดสารพันธุกรรม	70	280,000	2. APTIMA Urine specimen collection kit	160	640,000
3. Forward/Reverse Primer (3 ชุด; CP, PorA, Beta-globin gene)	12	48,000	3. APTIMA Combo2 Assay with Accessories	550	2,200,000
4. Probe (3 ชุด; CP, PorA, Beta-globin gene)	70	280,000			
5. LightCycler® Multiplex DNA Master	80	320,000			
6. PCR tube with cap	10	40,000			
7. Filter tip	0.5	2,000			
8. Microcentrifuge tube	1.5	6,000			
รวม		1,008,000 บาท	รวม		2,872,000 บาท

อภิปรายและสรุป

จากการศึกษาวิจัยพบว่าการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* จากตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป APTIMA พบว่ามีประสิทธิภาพทั้งห้าด้านคือ ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบและค่าความถูกต้อง คิดเป็นร้อยละ 100 ในทุกค่าการทดสอบ ในขณะที่เดียวกันเมื่อนำชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานคือการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีประสิทธิภาพทั้งห้าด้าน คิดเป็นร้อยละ 100 ในทุกค่าการทดสอบ สำหรับเชื้อ *N. gonorrhoeae*

จากการศึกษาของ Venter JME และคณะ ที่ทำการทดสอบวิธี in-house real time duplex PCR assay เปรียบเทียบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป APTIMA พบว่าสำหรับเชื้อ *C. trachomatis* มีความไว ร้อยละ 100 ความจำเพาะ ร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 ค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 ส่วนเชื้อ *N. gonorrhoeae* มีความไว ร้อยละ 85.7 ความจำเพาะ ร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 ค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 99.5⁽¹⁷⁾ โดยการศึกษาที่พบว่า สำหรับเชื้อ *N. gonorrhoeae* จะให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าการศึกษาของ Venter JME และคณะ เนื่องจากการศึกษานี้ได้เพิ่มตัวควบคุมคุณภาพการเก็บตัวอย่างด้วยการ ตรวจหาฮีนของมนุษย์จากสิ่งส่งตรวจในทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบ การพบ Human Beta-globin gene บ่งบอกถึงตัวอย่างมีคุณภาพดี ซึ่งอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพที่ได้มีความแตกต่างกัน

การศึกษานี้มีการประยุกต์ใช้ Probe จากการศึกษาศึกษาของ Hopkins MJ และคณะ ในการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* โดยผลการศึกษาครั้งนี้ให้ค่าการตรวจวัดที่ใกล้เคียงและสอดคล้องกับการศึกษาของ Hopkins MJ ซึ่งเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Roche COBAS Taqman CT test มีค่าความไว ร้อยละ 100 และความจำเพาะ ร้อยละ 99.9 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 98.9 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 สำหรับเชื้อ *C. trachomatis* และ

เปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Roche COBAS Amplicor NG assay มีค่าความไว ร้อยละ 100 และความจำเพาะ ร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 สำหรับเชื้อ *N. gonorrhoeae*⁽¹⁵⁾ วิธีการย้อมสีแกรมเชื้อ *N. gonorrhoeae* เป็นวิธีที่นิยมใช้ตรวจวินิจฉัย เนื่องจากสามารถออกผลได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องอาศัยความชำนาญในการดูสไลด์และขึ้นอยู่กับอาการของผู้ป่วยและคุณภาพของตัวอย่างส่งตรวจ การศึกษาของต่างประเทศ Meyer และคณะ เพื่อทบทวนวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *N. gonorrhoeae* พบว่าวิธีย้อมแกรมมีความไวและความจำเพาะเท่ากับ ร้อยละ 95 และร้อยละ 97 ตามลำดับในผู้ป่วยชายที่มีอาการแสดงทางท่อปัสสาวะ ขณะที่ผู้ป่วยที่ไม่มีอาการวิธีย้อมสีแกรมมีความไวต่ำลง เนื่องจากปริมาณของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ถูกตรวจพบได้มักมีปริมาณน้อย⁽¹⁸⁾ การศึกษาครั้งนี้พบว่าวิธีย้อมสีแกรมมีความไวน้อยกว่าแต่มีความจำเพาะมากกว่า สอดคล้องกับผลของตัวอย่างส่งตรวจ 3 ตัวอย่างที่ให้ผลวิธีย้อมสีแกรมไม่สอดคล้องกับวิธีเพาะเชื้อนั้นเป็นตัวอย่างส่งตรวจจากผู้ป่วยที่ไม่มีอาการแสดง จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ค่าความไวของวิธีย้อมแกรมในการทดสอบครั้งนี้ลดลง

นอกจากนี้ผลการศึกษาเปรียบเทียบความคุ้มค่าของน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์ในการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม พบว่าชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้น มีราคาต้นทุนที่ต่ำกว่าชุดน้ำยาสำเร็จรูป 2.8 เท่า ดังนั้นการใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างปัสสาวะในงานบริการประจำวัน ช่วยประหยัดงบประมาณการจัดซื้อน้ำยาตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการได้เป็นอย่างดี และช่วยลดค่าใช้จ่ายในการให้บริการทำให้ผู้ป่วยสามารถเข้าถึงการบริการได้มากยิ่งขึ้นนำไปสู่การได้รับการรักษาและลดการแพร่กระจายของเชื้อ

คณะผู้ศึกษาได้วางแผนการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคตเพื่อพัฒนาวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยชุดน้ำยาตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ในรูปแบบ in-house multiplex real time PCR ซึ่งสามารถตรวจหา

เชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* ได้พร้อมกัน ในหลอดเดียวกัน ช่วยลดค่าใช้จ่ายด้านน้ำยาลงไปได้อีก ครึ่งหนึ่ง นอกจากนี้ความรู้ที่ได้สามารถนำไปถ่ายทอด ให้กับหน่วยงานเครือข่าย เพื่อให้สามารถให้บริการ ตรวจหาเชื้อทั้ง 2 ชนิดในคลินิกโรคติดต่อทาง เพศสัมพันธ์ส่วนภูมิภาค ช่วยส่งเสริมให้ประชากร กลุ่มเสี่ยงทั่วประเทศเข้าถึงบริการ ได้รับการรักษาและ ลดการแพร่กระจายเชื้อ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการกองโรคเอดส์และ โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ หัวหน้ากลุ่มบางรักโรคติดต่อ ทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัย และพัฒนาทางคลินิกและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ทุกท่าน สำหรับการเก็บส่งตรวจตลอดจนการนำส่งตัว อย่างและการนำข้อมูลมาใช้ประโยชน์และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุขสำหรับคำแนะนำและการดำเนินการ ตรวจหาเชื้อด้วยชุดน้ำยา APTIMA

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organisation: Global strategy for the prevention and control of Sexually transmitted infections: 2006–2015: breaking the chain of transmission [Internet]. [Cited 2020 Sep 10]. Available from http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43853/9789241563475_eng/Pdf;jessionid=B5D9ED847DD81C1795D67FFECE7D98AF?sequence=1.
2. HIV info hub. Division of AIDS and STIs [Internet]. [Cited 2020 Sep 10]. Available from <https://hivhub.ddc.moph.go.th/epidemic.php>
3. Taylor SN, Liesenfeld O, Lillis RA, Body BA, Nye M, Williams J, et al. Evaluation of the Roche cobas(R) CT/NG test for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*

- in male urine. Sex Transm Dis. 2012; 39:543–9.
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; 42:3089–93.
5. Gaydos CA, Quinn TC, Willis D, Weissfeld A, Hook EW 3rd, Martin DH, 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; 41:304–9.
6. Orellana MA, Gómez-Lus ML, Lora D. Sensitivity of Gram stain in the diagnosis of urethritis in men. Sexually Transmitted Infections. 2012; 88(4):284–7.
7. Lai-King Ng, Irene E Martin. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005; 16(1):15–25.
8. Fairley CK, Chen MY, Bradshaw CS, Tabrizi SN. Is it time to move to nucleic acid amplification tests screening for pharyngeal and rectal gonorrhoea in men who have sex with men to improve gonorrhoea control? Sex Health. 2011;8:9–11.
9. Alexander S. The challenges of detecting gonorrhoea and chlamydia in rectal and pharyngeal sites: could we, should we, be doing more? Sex Transm Infect. 2009; 85:159–160.
10. Schachter J, Moncada J, Liska S, Shayeveich C, Klausner JD. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of chlamydial and gonococcal infections of the oropharynx and rectum in men who have sex with men. Sex Transm Dis. 2008; 35:637–642.

11. Robinet S, Parisot F. Performance assessment of the AllplexTM STI Essential real-time PCR assay for the diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections in genital and extra-genital sites. J Lab Med. 2019; 43(4): 191–200.
12. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. Recommendations for laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*–2014. MMWR Morb Mortal Wkly Recom & Rep. 2014; 63:1–19.
13. APTIMA Urine Specimen Collection Kit for Male and Female Urine Specimens [Internet]. [Cited 2020 Sep 10]. Available from https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/502260-IFU-PI_002_01.pdf
14. Aptima Combo 2[®] Assay [Internet]. [Cited 2020 Nov 19]. Available from https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/502487-IFU-PI_001_01.pdf
15. 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.
16. Lawn R M, Efstratiadis A, O’Connell C, Maniatis T. The nucleotide sequence of the human beta-globin gene. Cell. 1980; 21(3):647–51.
17. Venter J M. E., Mahlangu PM, Müller EE, Lewis DA, Rebe K, Struthers H, 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 Infectious Diseases. 2019; 19(6).
18. Meyer T, Buder S. The Laboratory Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: Current Testing and Future Demands. Pathogens. 2020; 9(2):91.