

เรื่อง การพัฒนาและทวนสอบชุดตรวจหาการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ด้วย

วิธี 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

นางสาวบุศรา บำรุงศักดิ์

นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ

นางสาวศิริมล ภูมิเนียม

นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ

นางสาวรุ่งนภา เหลืองประสิทธิ์

เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญงาน

กลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการกองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค หัวหน้ากลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ที่สนับสนุนงบประมาณในการดำเนินการวิจัย เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยทางคลินิก กลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์สำหรับการเก็บส่งตรวจอาสาสมัคร หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ และขอขอบคุณ ผศ.ดร.รัตนา ลาวัจ คณะเทคนิคการแพทยมหาวิทยาลัยมหิดล ที่เป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำตลอดการศึกษานี้และขอขอบคุณทีมวิจัยทุกท่านที่ร่วมดำเนินการจนงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

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.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, Polymerase Chain Reaction (PCR), In-house real-time PCR

บทคัดย่อ

ในงานบริการห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์มีความจำเป็นต้องพัฒนาและใช้ชุดตรวจคัดกรองการติดเชื้อ *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 ตัวอย่าง ได้ถูกนำไปทดสอบด้วยชุดตรวจ 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: เชื้อคลามิเดีย ทราโคมาติส, เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง, วิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเอง

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	II
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญรูปภาพ	VI
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และเอกสารการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 4 ผลการศึกษา	12
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	19
เอกสารอ้างอิง	21

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดการทดสอบ <i>C. trachomatis</i> in-house real-time PCR	11
ตารางที่ 2. ส่วนประกอบของชุดน้ำยาตรวจ <i>C. trachomatis</i> in house real time PCR	12
ตารางที่ 3. เปรียบเทียบส่วนประกอบน้ำยา in-house real time PCR ใน Experiment 1 และ 2 condition	13
ตารางที่ 4. การปรับลดสัดส่วนปริมาณน้ำยา Multiplex master mix และส่วนประกอบอื่น ๆ ใน Experiment	14
ตารางที่ 5. สัดส่วนของน้ำยา in-house ใน Experiment 4	15
ตารางที่ 6. เปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ <i>C. trachomatis</i> ระหว่างชุดตรวจสำเร็จรูป และชุดตรวจ In-house real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน	17
ตารางที่ 7. ต้นทุนของชุดตรวจหาการติดเชื้อ <i>Chlamydia trachomatis</i> ด้วยวิธี In-house real-time PCR	18
ตารางที่ 8. ต้นทุนของชุดตรวจหาการติดเชื้อ <i>C. trachomatis</i> ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป (Anyplex CT/NG real-time detection (V3.1) kit, บริษัทยีนเอ็กเซลเลนซ์ ประเทศเกาหลีใต้)	18

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1. ตัวอย่างจาก urethral swab, cervical swab, rectal swab, pharyngeal swab	8
รูปที่ 2. กราฟแสดงค่า Cycle threshold (Ct) ของเชื้อ <i>C. trachomatis</i>	12
รูปที่ 3. กราฟแสดงค่า Ct ของเชื้อ <i>Chlamydia trachomatis</i> เปรียบเทียบระหว่าง 2 Experiment conditon	13
รูปที่ 4. กราฟแสดงค่า Ct ของเชื้อ <i>C. trachomatis</i> เปรียบเทียบระหว่าง 5 conditon	15
รูปที่ 5. กราฟแสดงค่า Ct ของเชื้อ <i>C. trachomatis</i> เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น 6 condition	16

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สถานการณ์โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ในภาพรวมของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก อัตราป่วย 18.8 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2557 เป็น 30.4 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2561 โดย อัตราป่วยที่พบบ่อยที่สุดคือ โรคหนองใน ซึ่งมีอัตราป่วย 10.2, 12.5, 14.3, 15.8 และ 14.0 ต่อประชากรแสน คน และโรคหนองในเทียม ซึ่งมีอัตราป่วย 3.0, 3.8, 3.5, 3.2 และ 3.3 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2557- 2561 ตามลำดับ¹

การตรวจวินิจฉัยโรคหนองในซึ่งเกิดจากเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* (NG) ทาง ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ สามารถตรวจด้วยวิธีย้อมสีแกรม (Gram stain) ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มีอาการ จากท่อปัสสาวะและปากมดลูกมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 90 ความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 95² ส่วนวิธีมาตรฐานคือการเพาะเชื้อ (Culture) ความไว (sensitivity) ร้อยละ 85 ความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 95³ สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคหนองในเทียมซึ่งเกิดจากเชื้อ *Chlamydia trachomatis* (CT) วิธีมาตรฐานคือการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture) ซึ่งมีความจำเพาะ (specificity) สูง แต่มีความไว (sensitivity) ต่ำ และมีข้อเสียคือ ขั้นตอนการตรวจยุ่งยาก และเจ้าหน้าที่ต้องมีทักษะความชำนาญในการเลี้ยง เซลล์ และต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน วิธีนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจในงานประจำวัน ของห้องปฏิบัติการกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ซึ่งให้บริการเฉพาะทางในการดูแลรักษาผู้ป่วยและการ ตรวจวินิจฉัยโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์โดยห้องปฏิบัติการกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ใช้วิธี Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) ในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *C. trachomatis* ซึ่งมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 83.3 ความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 99⁴

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์กำลังประสบปัญหาในการจัดซื้อ น้ำยาตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C. trachomatis* เนื่องจากบริษัทผู้ผลิตน้ำยาตรวจวิเคราะห์ *C. trachomatis* ด้วยวิธี ELISA ของบริษัท Trinity ประเทศไอร์แลนด์ซึ่งเป็นบริษัทผู้ผลิตน้ำยาตรวจแห่งเดียวในโลกได้ทำการยกเลิก ผลิตน้ำยาดังกล่าวเนื่องจากไม่สามารถหาแหล่งผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพได้

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทาง เพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค ซึ่งมีบทบาทหน้าที่ในการตรวจบริการคัดกรองหาการติดเชื้อโรคติดต่อทาง เพศสัมพันธ์ ซึ่งโดยเฉลี่ยจะมีผู้มารับบริการประมาณ 4,000-5,000 ราย/ปี และเป็นแหล่งศึกษาฐานงานด้าน โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ให้กับบุคลากรทางการแพทย์ทั้งไทยและต่างชาติกำลังประสบปัญหาในการจัดซื้อ น้ำยาตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C. trachomatis* ซึ่งทำให้เกิดโรคหนองในเทียม เนื่องจากบริษัทผู้ผลิตน้ำยาตรวจ วิเคราะห์ *C. trachomatis* ด้วยวิธี ELISA ซึ่งเป็นบริษัทผู้ผลิตแห่งเดียวในโลกได้ทำการยกเลิกผลิตน้ำยา ดังกล่าวเนื่องจากไม่สามารถหาแหล่งผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพได้คณะผู้วิจัยจึงมี แนวคิดที่จะแก้ไขปัญหาหน้างานโดยการพัฒนานำเทคโนโลยีด้านอณูชีวโมเลกุล (Molecular Laboratory) ซึ่ง มีความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) สูง^{5,6,7} มาใช้ตรวจในงานบริการประจำวัน แต่ด้วยข้อจำกัด

ของงบประมาณ จึงไม่สามารถซื้อชุดตรวจสำเร็จรูปที่มีราคาสูงปริมาณมากเท่ากับจำนวนผู้มารับบริการแต่ละปีมาใช้ในการให้บริการประจำวันได้

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

วัตถุประสงค์

- 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

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และเอกสารการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายงานสถานการณ์แนวโน้มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ของศูนย์ควบคุมโรคประเทศสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) พบว่าในปี พ.ศ. 2556 มีผู้ป่วยหนองในเทียม จาก เชื้อ *Chlamydia trachomatis* ในประเทศสหรัฐอเมริกาทั้งหมด 1,401,906 ราย คิดเป็น 446.6 ต่อประชากรแสนคน มีอัตราการลดลง 1.5% เมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2555 หนองใน มีผู้ป่วยทั้งหมด 333,004 ราย คิดเป็น 106.1 ต่อประชากรแสนคน มีอัตราการลดลง 0.6% เมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2555 และซิฟิลิสมีผู้ป่วยทั้งหมด 17,375 ราย คิดเป็น 5.5 ต่อประชากรแสนคน เพิ่มขึ้น 10% เมื่อเปรียบเทียบกับปีพ.ศ. 2555⁸

สำหรับสถานการณ์โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ในประเทศไทยจากรายงาน 506 ของสำนักโรคบาติวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่าอัตราป่วยมีแนวโน้มลดลงจากอัตราป่วย 19.49 ต่อประชากรแสนคนในปี 2552 เป็น 18.63 ต่อประชากรแสนคนในปี 2556 เมื่อจำแนกรายโรคพบว่าหนองใน เป็นโรคที่พบบ่อยที่สุด 10.42 ต่อประชากรแสนคน รองลงมาได้แก่ซิฟิลิส 3.67 ต่อประชากรแสนคน หนองในเทียม 3.07 ต่อประชากรแสนคน แผลริมอ่อน 0.94 ต่อประชากรแสนคน และกามโรคของต่อมและท่อน้ำเหลือง 0.54 ต่อประชากรแสนคน ตามลำดับ⁹

สำหรับโรคหนองในเทียมเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Chlamydia trachomatis* เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่พบในผู้ป่วยที่มีอาการและไม่มีอาการสำหรับผู้ติดเชื้อ *C. trachomatis* โดยไม่มีอาการพบในผู้หญิงร้อยละ 70 ผู้ชายร้อยละ 50 ทำให้ไม่ได้รับการตรวจและรักษาอาจจะก่อให้เกิดโรคแทรกซ้อนโดยผู้ติดเชื้อนี้และไม่ได้รักษาจะเกิดการอักเสบของอวัยวะสืบพันธุ์ร้อยละ 40 ร้อยละ 20 เป็นหมัน ร้อยละ 18 ปวดท้องเรื้อรัง ร้อยละ 9 ตั้งครรภ์นอกมดลูก อาการผู้ป่วยชายจะมีอาการปัสสาวะแสบขัด อาจมีมูกใสหรือมูกขุ่น คันที่ท่อน้ำปัสสาวะ ผู้ป่วยหญิงส่วนใหญ่ไม่มีอาการ ส่วนน้อยอาจมีตกขาว¹⁰

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้พัฒนานำเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอณูชีววิทยาเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ในหลอดทดลองเป็นวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ได้เข้ามามีบทบาทในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูง อย่างไรก็ตาม PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) นั้นมีข้อจำกัดคือ ใช้เวลานาน, มีหลายขั้นตอน, มีโอกาสปนเปื้อนได้ง่าย จึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์แบบต้องการผลด่วน จากข้อจำกัดเบื้องต้น

เทคนิค Real-time PCR (Real Time polymerase chain reaction) หรือ quantitative PCR (qPCR : quantitative real time polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะและสามารถติดตามวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทุกรอบของการเพิ่มจำนวนในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (real-time detection) โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (Primer) 1 คู่ ร่วมกับตัวตรวจจับ (probe) ที่ถูกออกแบบเป็นสายสั้นๆให้มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อเป้าหมายที่ต้องการตรวจ สำหรับprobeจะมีการติดสี

Fluorescence เทคนิคนี้อาศัยการตรวจวัดสัญญาณสารเรืองแสงที่ถูกปล่อยออกมา ปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบ โดยทั่วไป ดีเอ็นเอที่เพิ่มจากการทำปฏิกิริยา PCR จะเพิ่มเป็นลักษณะกราฟรูปตัว S (sigmoid หรือ exponential curve) โดยแกน Y แสดงสัญญาณการเรืองแสง และแกน X แสดงจำนวนรอบของการเพิ่มจำนวน การทำ real-time PCR เพื่อที่จะให้ได้ข้อมูลที่ต้องการแม่นยำ การตรวจวัดผลผลิต PCR ในเวลาที่เกิดขึ้นจะเฉพาะในช่วง exponential phase ซึ่งเป็นช่วงที่ระดับสัญญาณสารเรืองแสงสูงเหนือระดับ threshold และมีแนวโน้มการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (exponential) เท่านั้น^{11,12,13}

การตรวจวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสงในเทคนิค real-time PCR สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ ดังนี้

1. DNA binding fluorescent dyes

การตรวจวัดปริมาณสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่โดยใช้สารฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายคู่ได้ (DNA binding fluorescent dyes) โดยทั่วไปที่นิยมใช้ คือ SYBR Green I ซึ่งสามารถจับกับบริเวณ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่แบบไม่จำเพาะ เมื่อจับแล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเปล่งแสงออกมา ดังนั้นเมื่อเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย real-time PCR สัญญาณของสารเรืองแสง SYBR Green I ก็จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น เนื่องจาก SYBR Green สามารถจับได้กับดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) ทุกชนิด ดังนั้นการเกิด ผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (non-specific DNA) หรือการเกิดการจับกันของไพรเมอร์ (primer dimer) ในปฏิกิริยา PCR จะทำให้ค่าของปริมาณสารเรืองแสงที่วัดได้ไม่แม่นยำ และไม่บ่งบอกถึงปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่ศึกษาที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ที่แท้จริงได้

2. Probe-based assay

การตรวจวัดปริมาณสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่โดยใช้โพรบ (probe) ไปเกิดการไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่ โดยโพรบที่ใช้จะเป็นนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้น ๆ (oligonucleotide) ที่เป็นสายเดี่ยว และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่ได้กับบริเวณที่ต้องการศึกษา โพรบที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ TaqMan probe, Molecular Beacons, FRET Hybridization probes, และ Scorpion probe เป็นต้น ซึ่งโพรบแต่ละชนิดจะมีหลักการในการทำงานแตกต่างกันไป โดยโพรบที่นิยมใช้มากที่สุดคือ TaqMan probe ซึ่งเป็น oligonucleotide สายเดี่ยวที่มีการติดฉลากสารเรืองแสง (fluorophore) ที่ปลาย 5' และติดตัวดับ (Quencher) ที่ปลาย 3' ซึ่งในสภาวะปกติจะไม่มีการเรืองแสงเนื่องจาก Quencher จะยับยั้งโมเลกุลของสารเรืองแสงที่ติดไว้ที่โพรบไม่ให้ปล่อยพลังงานออกมา แต่ในขณะที่เกิดปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอน annealing โพรบจะเข้าไปจับดีเอ็นเอต้นแบบในบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันได้ และในขั้นตอน extension เมื่อเอนไซม์ DNA polymerase ทำการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติ 5'→3' exonuclease activity ซึ่งสามารถย่อย TaqMan probe ได้ ทำให้โมเลกุลของสารเรืองแสงและ Quencher หลุดออกจากกัน ดังนั้นจึงเกิดการเรืองแสงขึ้น โดยปริมาณสารเรืองแสงจะแปรผันกับปริมาณของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น^{11,12,13}

จากการศึกษาของ David M. และคณะ ในปี 2005 ได้ทำตรวจหาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* ด้วยวิธี In-house multiplex real-time PCR โดยใช้ nuclease (TaqMan-ABI7500) และ hybridization (LightCycler probe format) เปรียบเทียบกับวิธี Conventional PCR solid-phase hybridization โดยใช้ porA pseudogene สำหรับเป็นยีนในการตรวจหาเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* และเชื้อ *Chlamydia trachomatis* โดยใช้ยีนส่วน Major outer membrane protein โดยพบว่าทั้งสามวิธีมีความไว และความจำเพาะ แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย และผลการศึกษพบว่า มีตัวยับยั้งรบกวนในปฏิกิริยา PCR ยังต้องพัฒนาขั้นตอนตรวจต่อไป¹⁴

Katia Jaton และคณะ ในปี 2006 ได้ทำการศึกษาการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* ในสิ่งส่งตรวจ first void urine หรือ genital swabs ด้วยวิธี real time PCR โดยใช้ primers และ probe ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของส่วน cryptic plasmid (GenBank accession nos M19487, Y00505, J03321, X06707 and X07547) จากเชื้อ *C. trachomatis* 5 สายพันธุ์ (serotypes A, B, D, L1 and L2,) โดยออกแบบ Primer จากซอฟต์แวร์บริษัท Applied Biosystems forward primer Ctr_F (5'-CATGAAAACCTCGTTCCGAAATAGAA-3'), reverse primer Ctr_R (5'-TCAGAGCTTTACCTAACACGCATA3') ซึ่ง amplify ขนาด 71 bp DNA segment ของเชื้อ *C. trachomatis* และ a minor-groove binder probe labelled ด้วย 5'FAM (6-carboxyfluorescein) Ctr_P (59-TCGCATGCAAGATATCGA-3') และได้ทำทดสอบ cross reaction กับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ โดยเปรียบเทียบการตรวจด้วยวิธี real time PCR เทียบกับ Cobas Amplicor พบว่าผลการศึกษาทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน¹⁵

Jalal และคณะ ในปี 2006 พบว่า 7-10 copies cryptic plasmid ซึ่งเป็น target ของเชื้อ *C. trachomatis* มีความไว sensitive มากกว่ายีน MOMP (Major outer-membrane protein) ซึ่งเป็น target ของเชื้อ *C. trachomatis* หลายๆ การศึกษาจึงเลือกใช้ยีน cryptic plasmid ในการตรวจวิเคราะห์¹⁶

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คณะผู้วิจัยต้องการพัฒนาทวนสอบชุดตรวจหาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* เพื่อรองรับการตรวจบริการผู้ป่วยในงานประจำ โดยตัวอย่างตรวจในงานประจำคือ urethral swab จากผู้มารับบริการชาย; cervical swab จากผู้มารับบริการหญิง; urethral swab, rectal swab และ throat swab จากผู้มารับบริการชายที่มีเพศสัมพันธ์กับชาย วิธีการตรวจด้วยเทคนิค Nucleic acid amplification tests (NAATs) จึงเป็นทางเลือกในการศึกษาค้นคว้านี้ เนื่องจากมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูง แต่เทคนิคนี้มีข้อเสียคือ ชุดตรวจสำเร็จรูป (commercial kit) ที่ขายตามท้องตลาด CT/NG multiplex real time PCR kit มีราคาแพงมาก ประมาณ (900-1,000 บาท/test) ซึ่งไม่เหมาะสมกับบริบทของหน่วยงาน

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาทวนสอบชุดน้ำยาตรวจหาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และด้วยวิธี in-house real-time PCR โดยใช้ primer/probes ที่ออกแบบจำเพาะแต่ละเชื้อ และทวนสอบในแต่ขั้นตอนจนได้ผลแม่นยำ (optimized condition & validation test) จากนั้นจึงเปรียบเทียบความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) กับชุดตรวจสำเร็จรูป

ผู้วิจัยคาดว่าประโยชน์ของการศึกษาครั้งนี้ ชุดตรวจหาการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* ด้วยวิธี in-house CT/NG multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นจะมีความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) เทียบเท่าชุดตรวจสำเร็จรูป สามารถลดต้นทุน ลดเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ และนำมาใช้งานได้จริงในห้องปฏิบัติการกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. Autopipette
2. Microfilter tip
3. Centrifuge
4. Flask
5. Beaker
6. Cylinder
7. Microcentrifuge tube
8. Transport tube
9. Rack
10. Cool box
11. กระดาษกรอง

สารเคมี

1. 0.5% Tween-20
2. 0.5% Nomidet P-40
3. น้ำกลั่น (Distilled water)
4. Proteinase K (stock) 10 µg/ml
5. Lysis stock
6. NaCl
7. Na₂HPO₄
8. KH₂PO₄
9. Distill water
10. Binding Buffer
11. Ethanol
12. CP_F/ CP_R Primer
13. Probe
14. Multiplex master mix
15. RNase free water

วิธีการศึกษา

การคัดเลือกตัวอย่าง

คณะผู้ศึกษาวิจัยได้คัดเลือกตัวอย่างในการศึกษารั้งนี้ 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



ในการวิจัยครั้งนี้ได้นำผลการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) ซึ่งถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานมาเป็นผลการทดสอบเปรียบเทียบ ทั้งนี้ผลการตรวจด้วยวิธี cell culture นี้มีความจำเพาะ (specificity) สูง แต่มีความไว (sensitivity) ต่ำ เทคนิคนี้มีข้อเสียคือ ขั้นตอนการตรวจยุ่งยากและเจ้าหน้าที่ต้องมีทักษะความชำนาญในการเลี้ยงเซลล์ และต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน วิธีนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจในงานประจำวันของห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ทั่วไป ในกรณีของกลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ได้กำหนดระยะเวลาในการรายงานผล (Turnaround time) 5 วันทำการ ดังนั้นการตรวจด้วยวิธี Cell culture จึงไม่เหมาะสมต่อการให้บริการตรวจวินิจฉัยและรักษาการติดเชื้อ *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 แสงฟลูออเรสเซนซ์ (probe) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. trachomatis* ที่ต้องการศึกษา (โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวได้ผ่านการทดสอบ cross reaction สายพันธุ์อื่นๆและได้รับการตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศแล้ว

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

- ทดสอบและทวนสอบความเข้มข้นและปริมาณ primer และแสงฟลูออเรสเซนซ์ (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 ₂ HPO ₄ | 0.724 µl |
| 3. KH ₂ PO ₄ | 0.21 g |
| 4. DW | 1,000 ml |

2.2 วิธีการสกัดตัวอย่างสิ่งส่งตรวจด้วยชุดสกัดที่พัฒนาขึ้น

1. ใส่ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ 200 μ l ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
2. ใส่ phosphate buffered saline (PBS) 1,000 μ l 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 μ l 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 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจ (High Pure PCR Template Preparation kit, บริษัทโรชไดแอ็กโนสติกส์, ประเทศเยอรมัน)

1. เตรียมสิ่งส่งตรวจจำนวน 200 μ l ใส่ในหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube
2. เติม Binding Buffer จำนวน 200 μ l, mix
3. เติม Proteinase K จำนวน 40 μ l (เติม DNA/RNA free water) จำนวน 4.5 ml ใส่ใน Lyophilize Proteinase K เก็บไว้ในตู้เย็น -20°C
4. Mix ทันที และ incubate ที่ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที
5. เติม ethanol absolute จำนวน 100 μ l, mix well
6. ดูด solution ทั้งหมดจากข้อ 1-5 ใส่ลงในชุด 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 μ l, 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 μ l (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 μ l (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 × g เป็นเวลา 1 นาที

14. กรณียังไม่ทำการทดสอบทันทีให้เก็บตัวอย่างที่สกัดแล้วไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

2.4 ศึกษาและคัดเลือก primer และ probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. trachomatis* ที่ต้องการศึกษา
โดยใช้ค่าการทดสอบความไว/ความจำเพาะ ดังผลในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดการทดสอบ *C. trachomatis* in-house real-time PCR¹⁷

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

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 จากเดิม ปริมาณ 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

บทที่ 4

ผลการศึกษา

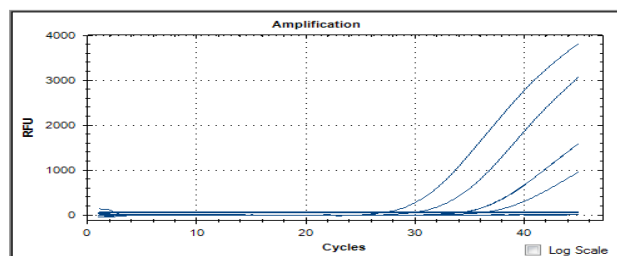
ผลศึกษาพัฒนาทดสอบขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยวิธีที่ทีมวิจัยคิดค้น เปรียบเทียบกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปชุด High Pure PCR Template Preparation บริษัทโรช ไดแอกโนติกส์ ประเทศเยอรมัน นั้นให้ผลตรงกันทั้ง 130 ตัวอย่าง และผลค่า Cycle threshold (Ct) ใกล้เคียงกันกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป โดยค่า Ct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

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

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

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

รูปที่ 2. กราฟแสดงค่า Cycle threshold (Ct) ของเชื้อ *C. trachomatis*



นอกจากนี้ พบว่าตัวอย่าง urethral swab, cervical swab, rectal swab, throat swab ทั้งหมดที่ทราบว่าเป็นผลบวกการติดเชื้อ *C. trachomatis* จากวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 100 ตัวอย่าง เมื่อนำไปทดสอบตามขั้นตอนของชุดตรวจสำเร็จรูป ให้ผลบวก 100 ตัวอย่างตรงกัน ส่วนตัวอย่างที่ทราบว่าเป็นผลลบต่อเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ 30 ราย ไปทดสอบกับชุดตรวจสำเร็จรูปบริษัท ยีนเอ็กเซสเลนซ์ พบว่าให้ผลลบจำนวน 29 ตัวอย่าง มีตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจ rectal swab จำนวน

1 ตัวอย่าง ให้ผลบวกเชื้อ *C. trachomatis* เมื่อนำไปตรวจยืนยันด้วยชุดตรวจสำเร็จรูปแตกต่างบริษัท (FTD Urethritis basic kit, บริษัทกิ๊ปไทย, ประเทศลักเซมเบิร์ก) ก็ให้ผลบวกเช่นกัน

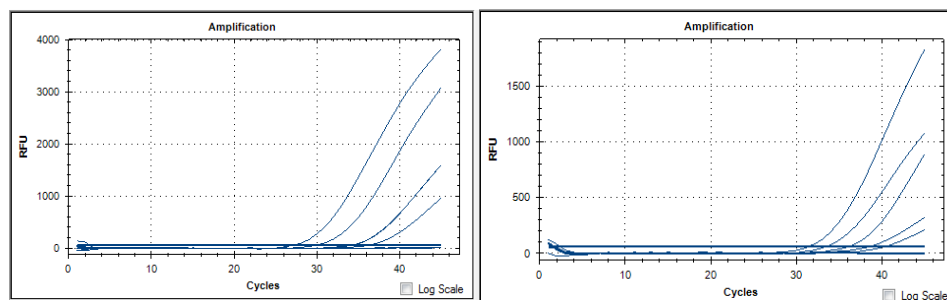
ใน Experiment 2 ซึ่งเป็นการศึกษาความเหมาะสมความเข้มข้นของ condition โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้น condition 800 nM ของ ใน experiment ที่ 1 ดังตารางที่ 3

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)
Multiplex master mix	10	Multiplex 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 ดังรูปที่ 3.

รูปที่ 3 กราฟแสดงค่า Ct ของเชื้อ *Chlamydia trachomatis* เปรียบเทียบระหว่าง 2 Experiment condition



Experiment 1 condition

Experiment 2 condition

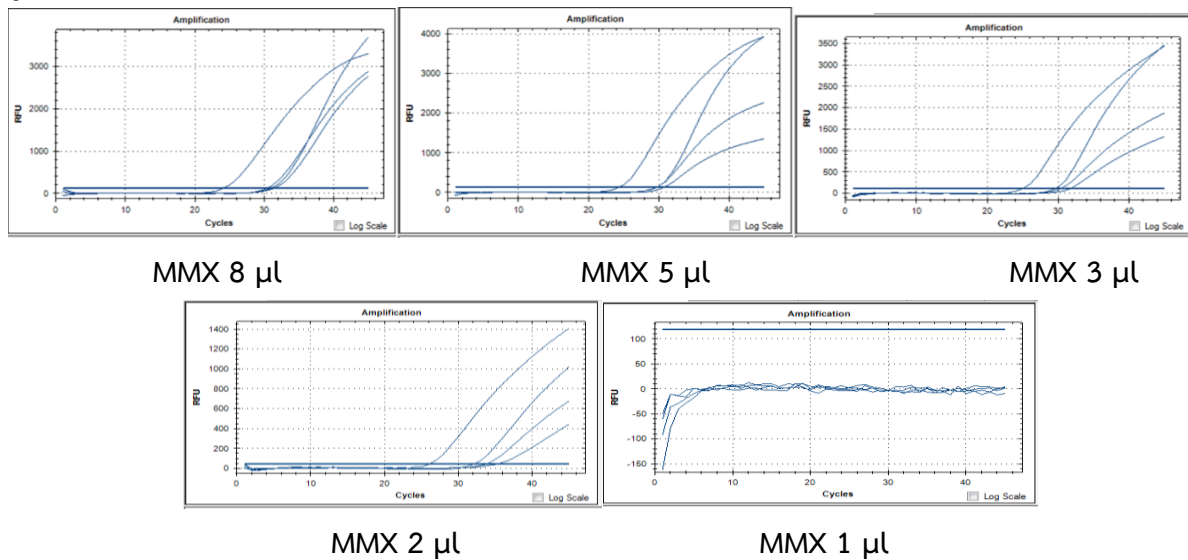
ผลการศึกษาใน Experiment 3 พบว่า Fix ความเข้มข้นของ Primer 15 μM ความเข้มข้นของ condition 750 μM เพื่อศึกษาสัดส่วนปริมาณน้ำยา Multiplex master mix สำเร็จรูปจากเดิมปริมาณ 10 μl /reaction ลดปริมาณเป็น 8 μl , 5 μl , 3 μl , 2 μl , 1 μl /reaction ดังตารางที่ 4

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 (ดังรูปที่ 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 condition



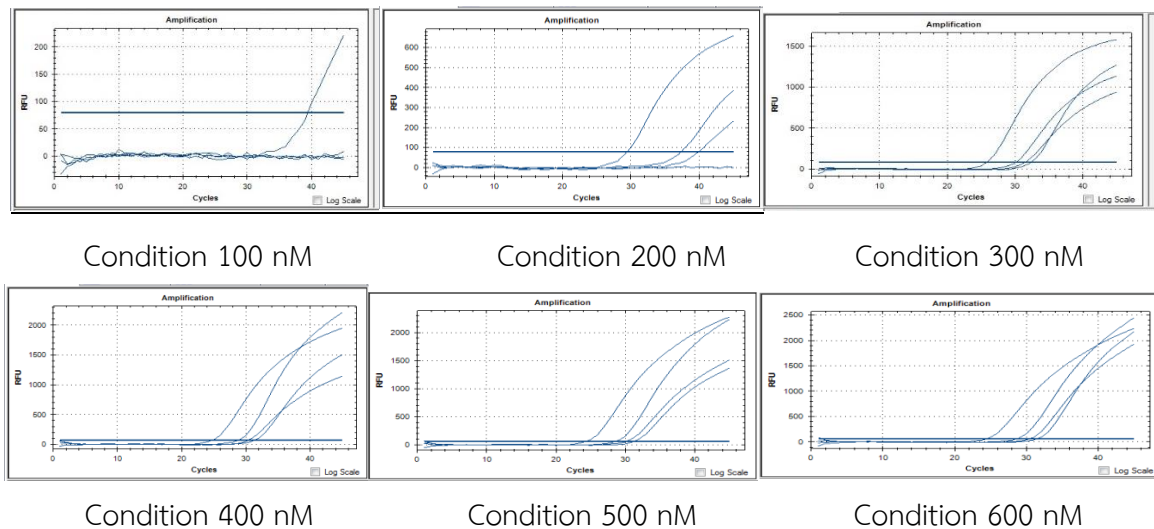
ในการศึกษา Experiment 4 เป็นการ Fix ปริมาณน้ำยา Multiplex master mix ที่ระดับ 3 µl เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ condition 6 ระดับ ระหว่าง 100-600 nM เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ดังข้อมูลสัดส่วนของน้ำยา in-house ในตารางที่ 5

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 (รูปที่ 5.)

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 μ l
- Rnase free water = 10 μ l
- 10 μ m Forward primer = 0.8 μ l, conc. 400 nM
- 10 μ m Reverse primer = 0.8 μ l
- 10 μ m Probe = 0.4 μ l
- 10 μ m Probe = 0.4 μ l

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 เปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* ระหว่างชุดตรวจสำเร็จรูป และชุดตรวจ In-house real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

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

		ผลการตรวจ cell culture ต่อเชื้อ <i>C. trachomatis</i>		รวม
		+ve	-ve	
ผลการตรวจ real-time PCR ต่อเชื้อ <i>C. trachomatis</i> 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 ซึ่งเป็นจำนวนค่าประมาณที่ต้องตรวจในแต่ละปี หรือคิดเป็นต้นทุน 257 บาทต่อการตรวจ 1 การทดสอบ อย่างไรก็ตาม เมื่อได้ปรับสัดส่วนน้ำยาและ condition แล้ว สามารถเพิ่มปริมาณการตรวจได้อีก 1,800 ตัวอย่าง ทำให้ตรวจเพิ่มขึ้นเป็น 5,800 ตัวอย่าง คิดเป็นต้นทุน 177.34 บาท ต่อ 1 การทดสอบ ดังตารางที่ 7 ในขณะที่ต้นทุนของการจัดซื้อน้ำยาชุดตรวจสำเร็จรูปของบริษัทอื่น เอ็กซ์เซลเลนซ์ อยู่ที่ 3,232,000 บาท ต่อ 4,000 การทดสอบ คิดเป็น 808 บาท ต่อ 1 การทดสอบ ดังตารางที่ 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 จากบริษัทยีนเอ็กเซลเลนซ์เท่ากับ $3,232,000/4,000 = 808$ บาท/การทดสอบ

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยและพัฒนาชุดตรวจ *C. trachomatis* ด้วยวิธี In-house real-time PCR นี้ พบว่าชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพ ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เทียบเท่ากับชุดตรวจที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และการตรวจมาตรฐาน ได้แก่ ผลการตรวจด้วย cell culture ผลจากการวิจัยนี้ ได้ช่วยแก้ไขปัญหาบริการตรวจหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ในห้องปฏิบัติการคลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ เพื่อทดแทนน้ำยา ELISA ที่เลิกผลิต โดยทีมวิจัยได้นำเทคโนโลยีทาง Molecular testing มาพัฒนาในการตรวจคัดกรองในงานประจำวัน ดังผลที่พบว่าเวลาในการสกัดดีเอ็นเอรวดเร็วขึ้น 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 ซึ่งมีราคาแพง ให้เหลือเป็น 3 µl จากข้อมูล package insert เดิมของบริษัทโรชไดแอ็กโนติกส์ 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 กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ได้นำชุดตรวจคัดกรองหาการติดเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี In-house real-time PCR มาใช้ตรวจบริการงานประจำวัน ช่วยประหยัดงบประมาณของรัฐในการจัดซื้อน้ำยาตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ที่ได้รับจัดสรรอย่างจำกัด ได้เป็นอย่างดี คิดเป็นเงินที่คาดว่าจะช่วยประหยัดได้ถึงมากกว่าสองล้านบาทต่อปี

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ได้ควบคุมคุณภาพชุดทดสอบที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมานี้โดยได้เข้าร่วมโครงการควบคุมคุณภาพจากองค์กรภายนอก (EQA) จากต่างประเทศ เพื่อทดสอบหาเชื้อ *C. trachomatis* ด้วยวิธี In-house real-time PCR โดยหน่วยงานต่างประเทศได้ส่งตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง มาทดสอบ และผ่านประเมินในปีงบประมาณ 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 เพื่อพัฒนาศักยภาพบุคลากรในการเปิดห้องปฏิบัติการคลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ให้กับประชากรกลุ่มเสี่ยงได้

เข้าถึงบริการเพื่อให้สามารถได้รับการตรวจ วินิจฉัย รักษา รวมทั้งในการป้องกันควบคุมการแพร่กระจายโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ พร้อมทั้งจัดให้มีการวางแผนดำเนินการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (inter-laboratory comparison) เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพผลการตรวจวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการเอง ซึ่งถ้าเกิดผลสำเร็จ จะช่วยให้หน่วยงานสามารถปฏิบัติงานตรวจหาเชื้อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ทั้งสอง ได้โดยถือเป็นการควบคุมคุณภาพได้

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักโรคเอดส์ วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข. รายงานผลการดำเนินงานสำนักโรคเอดส์วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ 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. Centers for Disease Control and Prevention[internet].Reported STDs in the United States 2013 national data for chlamydia, gonorrhea, and syphilis 2014 [cited 2019 April 21]. Available from: <http://www.cdc.gov/std/stats13/surv2013-print.pdf>
9. กรมควบคุมโรคกระทรวงสาธารณสุข.รายงานผลการดำเนินงาน สำนักโรคเอดส์ วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ปีพ.ศ.2557.กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุม สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2557. หน้า 43.
10. นิสิต คงกรีกเกียรติ, รสพร กิตติเยาวมาลย์, เอกชัย แดงสอาด. บรรณาธิการ. แนวทางการดูแลรักษาโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ พ.ศ. 2558. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2558. หน้า 32.

11. ดร.อารีย์รัตน์ หนูนวล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
Molecular genetic testing techniques-Types of polymerase chain reaction. Binla Book (psu.ac.th).
12. 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.
13. 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.
14. David M, Whiley, Sloos P. Comparison of three in-house multiplex PCR assays for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* using real-time and conventional detection methodologies. Pathology 2005, 37(5): 364-70.
15. Katia J, Jacques B, Gilbert G. A novel real-time PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs. Journal of Medical Microbiology (2006), 55, 1667-74.
16. Jalal, H., Stephen, H., Curran, M. D., Burton, J., Bradley, M. & Carne, C. (2006b). Development and validation of a rotor-gene real-time PCR assay for detection, identification, and quantification of *Chlamydia trachomatis* in a single reaction. J Clin Microbiol 44, 206–213.
17. 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.