รายละเอียดผลการดำเนินการของโครงการ

1. สรุปผลการดำเนินงานของโครงการโดยย่อ

ในการศึกษาเชื้อหนองในที่แยกจากโรงพยาบาลบางรักในปี 2550 จำนวนทั้งสิ้น 113 isolates พบว่าเชื้อทั้งหมดไวต่อสารต้านจุลชีพ ceftriaxone, cefixime, spectinomycin และ cefuroxime ในขณะที่มีอุบัติการณ์การดื้อต่อ penicillin, quinolone, tetracycline จำนวน จำนวน 95 isolates (84.1%), 107 isolates (94.7%) และ 99 isolates (87.6%) ตามลำดับ โดยเชื้อดื้อ penicillin ทุกตัว สร้างเอนไซม์ Penicillinase (Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*, PPNG) และในการพัฒนาวิธีการทดสอบทางอณูชีววิทยา โดยการทำ Multiplex PCR และตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI โดยชุดทดสอบนี้พัฒนาเพื่อการวินิจฉัยเชื้อหนองในและติดตามเพื่อการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อได้ โดยสามารถตรวจแยก PPNG (penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*), TRNG (tetracycline resistant *Neisseria gonorrhoeae*), QRNG (quinolone resistant *Neisseria gonorrhoeae*) ได้ นอกจากนี้ สามารถบอกชนิดของพลาสมิดที่ควบคุมเชื้อ PPNG และ TRNG โดยการบอกชนิดของพลาสมิด Africa, Toronto, Asia ใน PPNG ได้จากการออกแบบ primers คือ Primers GC-1 (5'-AAC TCA CGG ACA AAA TCA GCC-3'), GC-2 (5'-CAC CTA TAA ATC TCG CAA GCC-3'), GC-3 (5'-AAC GCA AGC AGG ACG AAA TC-3') และ GC-4 (5'-CCT CCA CCT TCA TCC TCA GC-3'), Tet M gene ของพลาสมิดชนิด American และ Dutch type ของ TRNG คือ Primers Tet MF (5'-ACT GTT GAA CCG AGY AAA CCT-3') และ Tet MR (5'-TCT ATC CGA CTA TTT GGA CGA CG-3') และการตรวจเชื้อ QRNG จากการตรวจ mutation ที่ตำแหน่ง serine-91 ของ gyrase A gene โดยใช้ primer GyrAF (5'-CGG CGC GTA CTG TAC GCG ATG CA-3') และ GyrAR (5'-AAT GTC TGC CAG CAT TTC ATG TGA GA-3') (Tanaka M และคณะ 2000) นอกจากนี้เพื่อประโยชน์ในการที่จะนำชุดทดสอบไปใช้ตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างตรวจ จึงมีการใช้ Internal control ในปฏิกิริยา คือ primers GFPuvF (5'-GTC AGT GGA GAG GGT GAA GG-3'), GFPuvR (5'-ACC ATG TGG TCA CGC TTT TC-3') และพลาสมิดที่มียีน GFPuv อยู่ ซึ่งเมื่อนำ ชุดทดสอบใช้กับเชื้อจำนวน 48 isolates พบว่าได้ผลดี โดยไม่มี cross reaction กับเชื้ออื่น และ internal control พบ band เสมอ ผลการศึกษาความไวต่อสารต้านจุลชีพโดยวิธีทางอณูชีววิทยา ให้ผลสอดคล้อง กับวิธีทาง phenotype โดยเชื้อ PPNG ทุกตัวพบพลาสมิดโดยพบเป็นชนิด Africa, Toronto, Asia จำนวน 32, 5, และ 3 isolates ตามลำดับ และเชื้อดื้อยา Tetracycline พบพลาสมิดชนิด American และ Dutch เป็น 25 และ 14 isolates ตามลำดับ และพบ Ser-91 mutation ในเชื้อทุกตัวที่ไม่ไวต่อ Ciprofloxacin นั่นคือ ชุดทดสอบนี้มีประโยชน์ทั้งการใช้วินิจฉัยและบอกความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อหนองในได้ดี

ในการทดสอบเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยหนองในที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลบางรักที่แยกได้จากปี 2543, 2545 และ 2550 จำนวนทั้งสิ้น 273 isolates ผลที่ได้พบว่า การวินิจฉัยโดยชุดทดสอบให้ผลการ

ทดสอบที่สัมพันธ์สูงกับการตรวจวินิจฉัยโดย conventional method โดยสัมพันธ์กับการตรวจเชื้อดื้อ penicillin, ดื้อ tetracycline ด้วยความเข้มข้นสูง (TRNG) และไม่ไวต่อ ciprofloxacin 100%, 98.9% และ 100% ตามลำดับ ซึ่งชนิดของ resistance plasmid ที่พบสูง คือ Africa type สำหรับ penicillinase producing *N. gonorrhoeae* (PPNG) และ America type สำหรับ TRNG นอกจากนี้ พบเชื้อที่มี mutation ของ Serine 91 ของยีน gyrase A ซึ่งพบได้ในเชื้อไม่ไวต่อ ciprofloxacin สูงเช่นกัน โดยพบอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยามีแนวโน้มสูงขึ้น โดยสามารถนำชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นศึกษากับตัวอย่างตรวจที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เติมเชื้อในปัสสาวะ พบว่า ได้ผลดีเมื่อใช้ตะกอนที่เตรียมได้หลังจากสกัดด้วย 1% tritonX ที่มี proteinase K หรือ Chelex 100 ใน Tris-EDTA buffer แต่เมื่อนำไปทดลองใช้กับตัวอย่างตรวจผู้ป่วยโดยเทียบกับวิธีแยกโดยวิธี commercial kit พบว่า มีบางรายไม่สามารถ ใช้ได้เมื่อเทียบกับวิธี commercial kit ดังนั้นจึงใช้วิธี commercial kit ในการเตรียมตัวอย่างตรวจเพื่อตรวจด้วยวิธีอณูชีววิทยา พบว่าผลที่ได้จากวิธีอณูชีววิทยาเมื่อเทียบกับวิธีอื่น เช่น วิธีกล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเชื้อ และเปรียบเทียบผลการดื้อยาของเชื้อเมื่อทดสอบกับชุดตรวจวินิจฉัยโรคหนองในที่พัฒนาขึ้น กับเชื้อจากโคโลนีที่เพาะเลี้ยงได้ สำหรับตัวอย่างตรวจผู้ป่วยหญิง นำมาใช้ประโยชน์ได้ในการวินิจฉัยและการดื้อต่อยา penicillin และ ciprofloxacin แต่ไม่สามารถใช้ในการแยก TRNG ได้ เพราะพบได้ในเกือบทุกตัวอย่างตรวจแม้ไม่พบเชื้อหนองในทั้งวิธีทางกล้องจุลทรรศน์ การเพาะเชื้อ และวิธีทางอณูชีววิทยา สำหรับผู้ป่วยชายสามารถใช้ชุดตรวจกับตัวอย่างตรวจเพื่อการวินิจฉัยและการดื้อต่อ penicillin, tetracycline และ ciprofloxacin ได้ดี อย่างไรก็ตาม ความไวของการทดสอบมีค่าใกล้เคียงกับวิธีเพาะเชื้อเท่านั้น จึงควรมีการพัฒนาให้ดีขึ้นต่อไป

2. ผลงานวิจัย

2.1 บทนำ

โรคหนองใน (gonorrhoeae) เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่พบได้บ่อยชนิดหนึ่ง โดย WHO ประมาณอุบัติการณ์ผู้ป่วยใหม่โรคหนองใน ในปี 2542 ถึง 62 ล้านคน จากผู้ป่วยโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่รักษาได้ (curable sexually transmitted infections) จำนวน 340 ล้านคน ซึ่งพบสูงที่สุดจากประชากรในกลุ่มประเทศแถบ South และ Southeast Asia (27 ล้านคน) โดยรายงานอุบัติการณ์ของโรคข้อมูลที่ได้ยังไม่สมบูรณ์และถูกต้องนัก เนื่องจากหลายปัจจัยรวมทั้งกระบวนการเก็บข้อมูลและวิธีการวินิจฉัย ซึ่งการวินิจฉัยมีการใช้อาการทางคลินิกและวิธีการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งผู้ติดเชื้อมีทั้งแสดงอาการและไม่แสดงอาการ สำหรับวิธีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมีหลายวิธีและแต่ละวิธีมีความไวและความจำเพาะแตกต่างกัน นอกจากนี้เชื้อก่อโรค (*Neisseria gonorrhoeae*) ยังเป็นเชื้อที่เป็นปัญหาเนื่องจากการดื้อยา มีรายงานเชื้อดื้อยาได้หลายชนิดและพบอุบัติการณ์เชื้อดื้อยาสูงด้วย เช่น *N. gonorrhoeae* ดื้อยาเพนนิซิลิน โดยการสร้างเอนไซม์ penicillinase ที่เรียกว่า penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) และเชื้อดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolones ที่เรียกว่า Quinolone resistance *Neisseria gonorrhoeae* (QRNG) โดยอุบัติการณ์เชื้อดื้อยามีแนวโน้มสูงขึ้นในประเทศต่างๆ ทั่วโลก ซึ่ง

การทราบความไวต่อยาต้านจุลชีพจึงเป็นสิ่งสำคัญ นอกจากปัญหาดังกล่าว ยังพบว่า เชื้อ *N. gonorrhoeae* สามารถส่งต่อยีนดื้อยาระหว่างเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยกันและกับเชื้ออื่นๆ ได้ เช่น *Haemophilus ducreyi, Haemophilus parainfluenzae, Escherichia coli* เป็นต้น ดังนั้น ถ้าการควบคุมโรคไม่มีประสิทธิภาพดีพอก็จะก่อให้เกิดการระบาดของเชื้อ *N. gonorrhoeae* และเชื้ออื่นๆ ที่ดื้อยา

สำหรับประเทศไทย พบผู้ป่วยโรคหนองในเป็นอันดับสองของผู้ป่วยกามโรคทั้งหมดทั่วประเทศ พบถึง 41% ในปี 2538 แล้วมีอุบัติการณ์ลดลงจนถึงปี 2541 (31.5%) จากนั้นมีอัตราเพิ่มขึ้นเป็น 33% และ 36% ในปี 2542 และปี 2543 ตามลำดับ โดยพบเชื้อดื้อยาสูงทั้ง PPNG และ QRNG จากการศึกษาของคณะผู้วิจัย พบเชื้อ PPNG เป็น 48.5% ในปี 2543 และ 80.0% ในปี 2545 ในขณะที่พบเชื้อดื้อต่อ norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin เป็น 63.2%, 27.9%, 27.9% ในปี 2543 และ 82.0%, 59.3%, 50.3% ในปี 2545 ตามลำดับ โดยเชื้อ PPNG ที่แยกได้ พบพลาสมิดทั้งสามชนิด คือ Africa, Asia, และ Toronto type และมีการกระจายแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาที่แยกได้ จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านระบาดวิทยาได้เช่นเดียวกัน

เห็นได้ว่า การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งต้องการวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง เพื่อนำไปใช้ในการวินิจฉัยผู้ติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นประโยชน์เพื่อการรักษา การเฝ้าระวังโรค รวมถึงการตรวจในผู้ติดเชื้อที่ไม่มีอาการ ป้องกันการแพร่ระบาดของโรคเชื้อหนองในดื้อยาและเชื้ออื่นๆ เนื่องจากการส่งต่อยีนดื้อยา ดังนั้นคณะผู้วิจัย ต้องการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* และคุณสมบัติการดื้อยาของเชื้อโดยวิธีทางอณูชีววิทยา เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยเพื่อการรักษาและติดตามด้านระบาดวิทยา

2.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

ผู้ป่วยโรคหนองในมีอุบัติการณ์และเชื้อดื้อยาสูงในประเทศไทย โดยการวินิจฉัยจะใช้วิธีทางกล้องจุลทรรศน์และการเพาะเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะดีแต่มีความไวไม่มากนัก เช่น ผู้ป่วยได้รับยามาก่อนซึ่งทำให้ข้อมูลที่ได้ถูกต้อง และผู้ติดเชื้อไม่ได้รับการรักษา มีผลให้มีเกิดการแพร่กระจายเชื้อรวมถึงการดื้อยาของเชื้อ *N. gonorrhoeae* และ เชื้ออื่นๆที่ได้รับยืนดื้อยา ดังนั้นคณะผู้วิจัยต้องการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยและคุณสมบัติการดื้อยาของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ทางห้องปฏิบัติการโดยวิธีทางอณูชีววิทยาเพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยเพื่อการรักษาและติดตามด้านระบาดวิทยา

2.3 การดำเนินการวิจัยตามวัตถุประสงค์

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่เก็บไว้ที่ -70 °C มาเพาะเลี้ยงบน chocolated agar plate ใน candle jar แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง ส่วนเชื้ออื่นๆ ที่จะทดสอบความจำเพาะของชุดทดสอบ ให้เลือกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

2. ศึกษา antimicrobial susceptibility patterns

ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อหนองในซึ่งทดสอบบน chocolated agar plate โดยทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น penicillin, ceftriaxone, spectinomycin, norfloxacin, ofloxacin และ ciprofloxacin เป็นต้น

3. ทดสอบหายีนดื้อยาโดยวิธี PCR

ศึกษาชนิดของพลาสมิดที่พบในเชื้อ PPNG และตรวจตำแหน่งการ mutate ของยีนที่ก่อให้เกิดการดื้อยา ciprofloxacin ที่พบบ่อย

4. พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคหนองใน

- ศึกษาหายีนที่เหมาะสมในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยวิธี simple PCR และ multiplex PCR ซึ่งโดยรวมวิธีวินิจฉัยและการตรวจยีนดื้อยาร่วมด้วย
- ทดสอบชุดตรวจวินิจฉัยโรคหนองในกับเชื้อ known control เพื่อศึกษาความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ

5. ทดสอบชุดตรวจวินิจฉัยโรคหนองในกับตัวอย่างตรวจที่ได้จากผู้ป่วย

- พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างตรวจ
- ทดสอบตัวอย่างตรวจตัวอย่างตรวจด้วยวิธีการอื่น เช่น วิธีทางกล้องจุลทรรศน์, การเพาะเชื้อ
- ทดสอบชุดตรวจวินิจฉัยโรคหนองในที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างตรวจโดยเทียบกับวิธีอื่น

6. วิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการทดสอบชุดตรวจวินิจฉัยโรคหนองในที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างตรวจมาประเมินและเทียบผลที่ได้กับวิธีอื่น

2.4 ผลงานวิจัยที่ได้รับ

1. เชื้อหนองในและความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ

1.1 ได้รับเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่แยกจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลบางรักในช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคม ปี 2550 จำนวน 150 isolates และเทียบกับเชื้อปี 2543 และ ปี 2545

1.2 ทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อหนองในที่ได้รับโดยวิธี Disc diffusion โดยศึกษาต่อสารต้านจุลชีพ penicillin, cefuroxime, ceftriaxone, cefixime, spectinomycin, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin และ tetracycline จากการศึกษาเชื้อจำนวน 113 isolates พบว่า เชื้อทั้งหมดไวต่อสารต้านจุลชีพ ceftriaxone, cefixime, cefuroxime และ spectinomycin ในขณะที่พบอุบัติการณ์การดื้อต่อ penicillin, norfloxacin,ofloxacin, ciprofloxacin, และ tetracycline จำนวน 95 isolates (84.1%), 107 isolates (94.7%), 98 isolates (86.7%), 98 isolates (86.7%) และ 99 isolates (87.6%) ตามลำดับ โดยเชื้อดื้อ penicillin ทุก isolates มีการสร้างเอนไซม์ Penicillinase (Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*, PPNG) (ตารางที่ 1) และพบเชื้อดื้อ tetracycline จำนวนมากที่มี zone size $\leq$19 มิลลิเมตร และนำไปตรวจ ทดสอบหา MIC เพื่อแยกเชื้อ Tetracycline resistant *N. gonorrhoeae* (TRNG)

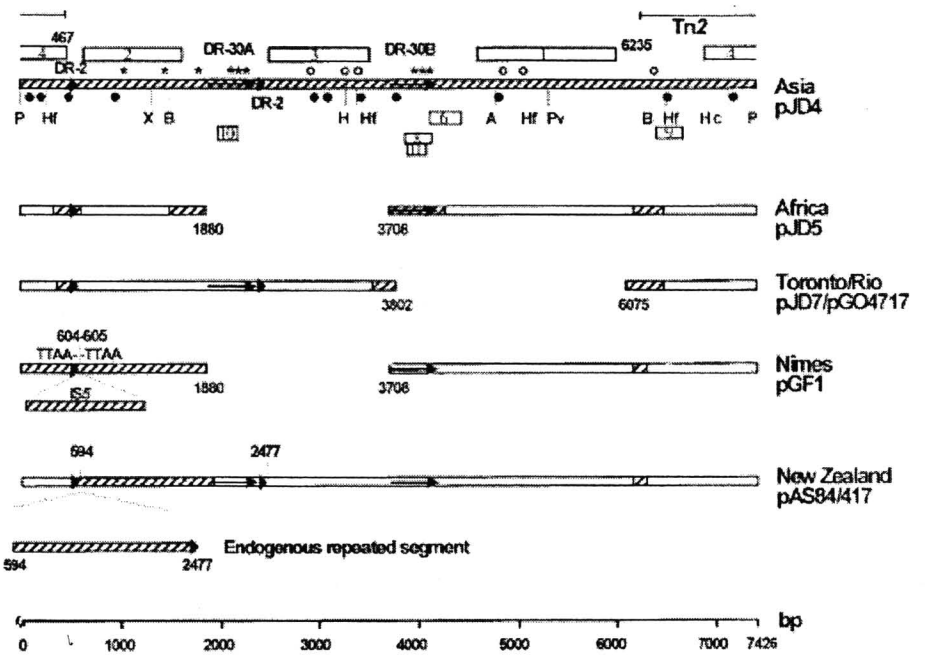
ตารางที่ 1 ตารางแสดงความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อหนองในจำนวน 113 isolates ที่แยกจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลบางรักในช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคม ปี 2550

Antimicrobial resistance patterns	Number of isolates (%)
Susceptible	1 (0.9%)
Penicillinase producing *N. gonorrhoeae* (PPNG)	0 (0%)
Tetracycline resistance	2 (1.8%)
Quinolone resistance	5 (4.4%)
Norfloxacin resistance	5 (4.4%)
Ofloxacin resistance	5 (4.4%)
Ciprofloxacin resistance	5 (4.4%)
PPNG and Tetracycline resistance	3 (2.7%)
PPNG and quinolone resistance	8 (7.1%)
PPNG and norfloxacin resistance	8 (7.1%)
PPNG and ofloxacin resistance	8 (7.1%)
PPNG and ciprofloxacin resistance	8 (7.1%)
Tetracycline and quinolone resistance	10 (8.8%)
Tetracycline and norfloxacin resistance	10 (8.8%)
Tetracycline and ofloxacin resistance	9 (8.0%)
Tetracycline and ciprofloxacin resistance	9 (8.0%)
PPNG, tetracycline, and quinolone resistance	84 (74.3%)
PPNG, tetracycline and norfloxacin resistance	84 (74.3%)
PPNG, tetracycline and ofloxacin resistance	76 (67.3%)
PPNG, tetracycline and ciprofloxacin resistance	76 (67.3%)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2. พัฒนาชุดทดสอบโรคหนองใน

2.1 พัฒนาชุดทดสอบโรคหนองในโดยออกแบบ primer GC-1 ถึง GC-4 (โดยใช้ลำดับเบสดังรูปที่ 1) เพื่อใช้ตรวจเชื้อและชนิดของพลาสมิด Africa, Toronto, Asia ใน PPNG นอกจากนี้มีการออกแบบ primer Tet MF และ Tet MR เพื่อใช้ตรวจเชื้อและชนิดของพลาสมิด American และ Dutch type ใน TRNG และใช้ primer GyrAF และ GyrAR (Tanaka M และคณะ, 2000) เพื่อตรวจ quinolone resistant determining region (QRDR) ของ gyrase A gene เพื่อการวินิจฉัยเชื้อหนองในและเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I จะตรวจเชื้อ QRNG จากการพบ mutation ที่ตำแหน่ง serine-91 ของ gyrase A gene โดยนำ primers ทั้งหมดมาใช้ในปฏิกิริยาเดียวกัน (multiplex PCR) และใช้ primer GFPuvF และ GFPuvR และพลาสมิดที่มียีน GFPuv อยู่ร่วมในปฏิกิริยาด้วยเพื่อใช้เป็น internal control ในชุดตรวจวินิจฉัยโรคหนองใน เพื่อ ปีนชุดทดสอบที่จะนำไปสู่การทดสอบในตัวอย่างตรวจต่อไปได้ (ตารางที่ 2)



รูปที่ 1 ภาพแสดงการเปรียวเทียบลำดับเบสของพลาสมิดชนิดต่างๆ ของเชื้อหนองในที่ดื้อ penicillin (Pagotto *et al.* Sequence analysis of the family of penicillinase-producing plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. Plasmid 2000;**43:** 24–34).

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของ Primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR

ชื่อ	ลำดับเบส	เอกสารอ้างอิง
GC-1	5'-AAC TCA CGG ACA AAA TCA GCC-3'	การศึกษานี้
GC-2	5'-CAC CTA TAA ATC TCG CAA GCC-3'	การศึกษานี้
GC-3	5'-AAC GCA AGC AGG ACG AAA TC-3'	การศึกษานี้
GC-4	5'-CCT CCA CCT TCA TCC TCA GC-3'	การศึกษานี้
Tet MF	5'-ACT GTT GAA CCG AGY AAA CCT-3'	การศึกษานี้
Tet MR	5'-TCT ATC CGA CTA TTT GGA CGA CG-3'	การศึกษานี้
GyrAF	5'-CGG CGC GTA CTG TAC GCG ATG CA-3'	Tanaka M และคณะ, 2000
GyrAR	5'-AAT GTC TGC CAG CAT TTC ATG TGA GA-3'	Tanaka M และคณะ, 2000
GFPuvF	5'-GTC AGT GGA GAG GGT GAA GG-3'	การศึกษานี้
GFPuvR	5'-ACC ATG TGG TCA CGC TTT TC-3'	การศึกษานี้

2.2 ทำ PCR ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR buffer, $MgCl_2$, dNTPs, primer GC-1, primer GC-2, primer GC-3, primer GC-4, primer TetMF, primer TetMR, primer GFPuvF, primer GFPuvR, primer GyrAF, primer GyrAR, *Taq* DNA polymerase, pGFPuv และเชื้อที่ปรับความขุ่น McFarland No. 0.5 (หลังต้มที่ 95°C 20 นาที)

จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนโดยการนำเข้าเครื่อง Thermocycler ตามโปรแกรมดังนี้

1 cycle Incubate ที่ 94°C 5 นาที

35 cycles Denaturing ที่ 94°C 30 วินาที

Annealing ที่ 60°C 30 วินาที

Extension ที่ 72°C 1.5 นาที

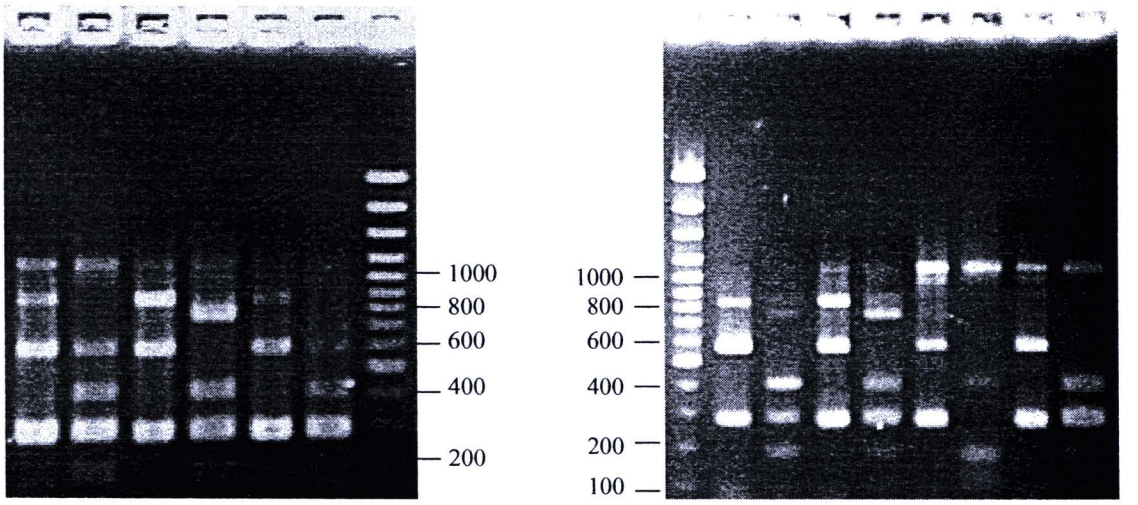
1 cycle Extension ที่ 72°C 10 นาที

mutation ที่ตำแหน่ง serine-91 ของ gyrase A gene และชนิดของพลาสมิดใน TRNG ทำโดยนำ products ที่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I แล้วนำ products ก่อนและหลัง run บน 1.5% agarose gel และแปลผลโดยใช้ ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ขนาดของ Products ที่พบก่อนและหลังตัดด้วย *Hinf* I หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I

Primers	Genes	Characteristics	Product size (bp)	
			Before cut	After cut
GC-1 ถึง GC-4	Plasmid types in PPNG	Africa	1070	1070
		Asia	737	737
		Toronto / Rio	435	435
TetMF+TetMR	TetM in plasmid types of TRNG	American	842	748, 94
		Dutch	842	571, 176, 94
GyrAF+GyrAR	QRDR in Gyrase A	Mutation at Ser-91	278	278
		Non mutation at Ser-91	278	166, 112
GFPuvF+GFPuvR	GFPuv		572	395, 177

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



รูปที่ 2 ภาพแสดง band patterns ของเชื้อหนองในดื้อสารต้านจุลชีพแบบต่างๆ โดย Lane เลขคี่ และเลขคู่ แสดง products ของตัวอย่างตรวจเดียวกัน ก่อนและหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI ตามลำดับ

Lane 1-2 แทนเชื้อ PPNG, TRNG, ไม่ไวต่อ ciprofloxacin มีพลาสมิดชนิด Africa (PPNG), Dutch (TRNG),

Lane 3-4, 9-10 แทนเชื้อ PPNG, TRNG, ไม่ไวต่อ ciprofloxacin มีพลาสมิดชนิด Africa (PPNG), America (TRNG),

Lane 5-6 แทนเชื้อ Non-PPNG, TRNG, ไม่ไวต่อ ciprofloxacin มีพลาสมิดชนิด Dutch (TRNG),

Lane 7-8 แทนเชื้อ Non-PPNG, TRNG, ไม่ไวต่อ ciprofloxacin มีพลาสมิดชนิด America (TRNG),

Lane 11-12 แทนเชื้อ PPNG, ไวต่อ ciprofloxacin มีพลาสมิดชนิด Africa (PPNG),

Lane 13-14 แทนเชื้อ PPNG, ไม่ไวต่อ ciprofloxacin มีพลาสมิดชนิด Africa (PPNG)

3. ทดสอบความจำเพาะของชุดทดสอบนำชุดทดสอบเชื้อหนองในที่พัฒนาขึ้นทดสอบกับเชื้อชนิดอื่นอย่างละ 1 ตัว คือ Beta-hemolytic streptococcus group B, alpha-streptococci, *Streptococcus pneumoniae,* Beta-hemolytic streptococcus group D, Beta-hemolytic streptococcus group A, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus flavus, Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Erysipelotrix rhusiopathiae, Listeria monocytogenes, Corynebacterium diptheriae, Bacillus subtilis, Neisseria sicca, Neisseria mucosa, Moraxella catarrhalis, Klebsiella pneumoniae, Yersenia enterocolytica, Enterobacter aerogenes, Vibrio cholerae, Aeromonas hydrophila, Plesiomonas shigelloides, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25283, *Acinetobacter baumanii, Serratia marcescens, Shigella flexeneri, Escherichia coli* ATCC 25922, *Providencia rettgeri, Proteus mirabilis, Edwardsiella tarda, Morganella morganii, Citrobacter freundii, Salmonella enteritidis, Salmonella arizonae, Haemophilus influenzae, Pasteurella multocida,* พบว่า ชุดทดสอบมีความจำเพาะสูงโดยไม่มี cross reaction กับเชื้ออื่นรวมทั้ง Non-pathogenic Neisseria

4. ใช้ชุดทดสอบเพื่อแยกวินิจฉัยเชื้อหนองใน

นำชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นทดสอบเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ทราบผลวามไวต่อสารต้านจุลชีพแล้ว จำนวน 48 isolates พบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับผลที่ศึกษาโดยวิธี Disc diffusion และพบว่าเชื้อ PPNG ทุกตัว (n = 40 isolates) มีพลาสมิดโดยพบเป็นชนิด Africa, Toronto, Asia จำนวน 32, 5 และ 3 isolates ตามลำดับ ซึ่งพบว่า zone size ต่อ penicillin disc มีความแตกต่างกันตามชนิดของพลาสมิด โดย isolate ที่มีพลาสมิดชนิด Toronto หรือ Asia มีขนาด zone แคบ (6-10 มิลลิเมตร) ในขณะที่ isolate ที่มีพลาสมิดชนิด Africa มีช่วงขนาด zone ที่พบมีช่วงกว้าง (6-26 มิลลิเมตร) และเชื้อที่พบพลาสมิดชนิด America หรือ Dutch (ซึ่งแสดงถึงเชื้อเป็น TRNG) พบเฉพาะในเชื้อดื้อ Tetracycline โดยพบเป็น TRNG สูง (39/42 (92.9%) isolates ของเชื้อดื้อ Tetracycline) ซึ่งพบเป็นพลาสมิดชนิด America และ Dutch จำนวน 25 และ 14 isolates ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่าเชื้อที่มีพลาสมิดชนิด Toronto หรือ Asia พบเฉพาะ Dutch type (100%) ในขณะที่เชื้อที่มีพลาสมิดชนิด Africa พบทั้ง America และ Dutch แต่เป็นชนิด America สูงถึง 88.9% ของเชื้อที่พบพลาสมิดในเชื้อดื้อ Tetracycline

นอกจากนี้เมื่อนำชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นทดสอบเชื้อ *N. gonorrhoeae* จำนวนมากขึ้น จำนวนรวมทั้งสิ้น 273 isolates (เป็นเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยหนองในที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลบางรักปี 2543 2545 และ 2550) ผลที่ได้พบว่า การวินิจฉัยโดยชุดทดสอบให้ผลการทดสอบที่สัมพันธ์ดีกับการตรวจวินิจฉัยโดย conventional method โดยสัมพันธ์กับการตรวจการดื้อของเชื้อต่อ penicillin 100% การดื้อต่อ tetracycline ด้วยความเข้มข้นสูง (TRNG) 98.9% และไม่ไวต่อ ciprofloxacin 100% ตามลำดับ โดยพบอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยามีแนวโน้มสูงขึ้นตามช่วงเวลา ซึ่งชนิดของพลาสมิดดื้อยาที่พบสูง คือ Africa type สำหรับ penicillinase producing *N. gonorrhoeae* (PPNG) และ America type สำหรับ TRNG นอกจากนี้ พบว่าเชื้อมี mutation ของ Serine 91 ของยีน gyrase A ซึ่งพบในเชื้อที่ไม่ไวต่อ ciprofloxacin สูงเช่นกัน

4.1 ทดสอบชุดตรวจวินิจฉัยโรคหนองในกับตัวอย่างตรวจที่ได้จากผู้ป่วย

4.1.1 พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างตรวจ

ในการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการเตรียมตัวอย่างตรวจ โดยการเติมเชื้อในปัสสาวะ พบว่า การเตรียมโดยการใช้ตะกอนที่ได้หลังจากสกัดด้วย 1% triton X ที่มี proteinase K (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 250 □g/mL of proteinase K) หรือ การใช้ 20% w/v Chelex 100 Chelex 100 ใน Tris-EDTA buffer (10 mmol/L Tris-HCl [pH 8.0], 1 mmol/L EDTA) เพื่อเป็นตัวอย่างตรวจที่ใช้ในการทดสอบกับชุดตรวจสอบได้ผลดี ซึ่งเมื่อนำวิธีการดังกล่าวมาประยุกต์ ใช้ในการเตรียมตัวอย่างตรวจและเทียบผลที่ได้กับ commercial kit พบว่า สามารถใช้ในการเตรียมตัวอย่างตรวจได้แต่มีบางรายไม่สามารถใช้ได้เมื่อเทียบกับวิธี commercial kit จึงใช้วิธี commercial kit ในการเตรียมตัวอย่างตรวจผู้ป่วย

4.1.2 ทดสอบตัวอย่างตรวจด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาเทียบกับวิธีการอื่น

ทดสอบตัวอย่างตรวจกับชุดตรวจวินิจฉัยโรคหนองในที่พัฒนาขึ้นกับวิธีอื่น เช่น วิธีกล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเชื้อ และเปรียบเทียบผลการดื้อยาของเชื้อเมื่อทดสอบกับชุดตรวจวินิจฉัยโรคหนองในที่พัฒนาขึ้นกับเชื้อจากโคโลนีที่เพาะเลี้ยงได้ ซึ่งจากผลความไวต่อสารต้านจุลชีพในการแยกเชื้อเป็น PPNG, TRNG, QRNG ให้ผลการวินิจฉัยเหมือนกันของทั้งสองวิธี อย่างไรก็ตามผลการแยกเชื้อ TRNG นั้น ไม่สามารถนำมาใช้ในตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยหญิง เพราะพบได้ในเกือบทุกตัวอย่างตรวจแม้ไม่พบเชื้อหนองในทั้งวิธีทางกล้องจุลทรรศน์ การเพาะเชื้อ และวิธีทางอณูชีววิทยา โดยการศึกษาตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยหญิงจำนวน 49 ตัวอย่าง ผลที่ได้พบว่า ให้ผลบวกในการวินิจฉัยในตัวอย่างตรวจตรงกัน โดยให้ผลบวกวิธีทางกล้องจุลทรรศน์ 1 ตัวอย่าง วิธีทางการเพาะเชื้อ 3 ตัวอย่าง และวิธีทางอณูชีววิทยา 4 ตัวอย่าง ในขณะที่การศึกษาตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยชายจำนวน 76 ตัวอย่าง ผลที่ได้พบว่า ให้ผลบวกในการวินิจฉัยในตัวอย่างตรวจตรงกัน โดยให้ผลบวกวิธีทางกล้องจุลทรรศน์ 71 ตัวอย่าง วิธีทางการเพาะเชื้อ 69 ตัวอย่าง และวิธีทางอณูชีววิทยา 68 ตัวอย่าง จากผลการทดสอบที่ได้ แสดงให้เห็นว่า ในการใช้ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างตรวจผู้ป่วยหญิงนั้น นำมาใช้ประโยชน์ได้ในการวินิจฉัยและการดื้อต่อ penicillin และ ciprofloxacin แต่ไม่สามารถใช้ในการแยก TRNG ได้ สำหรับผู้ป่วยชายสามารถใช้ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างตรวจเพื่อการวินิจฉัยและการดื้อต่อ penicillin, tetracycline และ ciprofloxacin ได้ดี อย่างไรก็ตาม ความไวของการทดสอบมีค่าใกล้เคียงกับวิธีเพาะเชื้อเท่านั้น จึงควรมีการพัฒนาให้ดีขึ้นต่อไป