รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อเรื่อง ภาษาไทย

รูปแบบการติดเชื้อและลักษณะเด่นทางพันธุกรรมของ *Chlamydia trachomatis* สายพันธุ์ที่พบบ่อยในผู้หญิงที่เป็นโรคท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่างและช่วงบนอักเสบ

ชื่อเรื่อง ภาษาอังกฤษ

Infection type and unique genetic characteristics of major *Chlamydia trachomatis* strains in females with lower and upper genital tract infections

รหัสโครงการ

SCH-NR-2010-09-02

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ	อาจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ
ผู้ร่วมวิจัย	แพทย์หญิง กัญน์พรรณ สุคนธ์พันธุ์
นิสิตช่วยงาน	นางสาว แพรไพลิน จารุจินดา

17 มกราคม 2556

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อเรื่อง ภาษาไทย

รูปแบบการติดเชื้อและลักษณะเด่นทางพันธุกรรมของ *Chlamydia trachomatis* สายพันธุ์ที่พบบ่อยในผู้หญิงที่เป็นโรคท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่างและช่วงบนอักเสบ

ชื่อเรื่อง ภาษาอังกฤษ

Infection type and unique genetic characteristics of major *Chlamydia trachomatis* strains in females with lower and upper genital tract infections

รหัสโครงการ

SCH-NR-2010-09-02

รายนามคณะผู้วิจัย

1. อาจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ
   ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. แพทย์หญิง กัญน์จพรรณ สุคนธ์พันธุ์
   แผนกสูตินรีเวชกรรม โรงพยาบาลพุทธชินราช
3. นางสาว แพรไพลิน จารุจินดา
   นิสิตปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันเริ่มต้นโครงการ 2 พฤษภาคม 2554
วันสิ้นสุดโครงการ 31 พฤษภาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
ศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ปีงบประมาณที่ได้รับทุน ปีงบประมาณ 2553

บทคัดย่อ

คลามัยเดียเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ทั่วโลกทั้งในเพศหญิงและเพศชาย โดยอาการและความรุนแรงของโรคนั้นขึ้นอยู่กับรูปแบบของการติดเชื้อ ระยะเวลาการติดเชื้อ และชนิดของกลุ่มพื้นฐานและสายพันธุ์ของเชื้อ การตระหนักถึงความเป็นไปได้ของการติดเชื้อในลักษณะคงอยู่แบบแอบแฝงของคลามัยเดียในกลุ่มผู้ติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์นับเป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ยาปฏิชีวนะที่ใช้กันในปัจจุบันอาจไม่สามารถรักษาการติดเชื้อได้อย่างหายขาด ขึ้นกับสถานะของเชื้อขณะนั้นว่าอยู่ในวงจรชีวิตแบบปกติหรือแบบแอบแฝง และยังไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสำหรับการป้องกันโรคนี้ โครงการวิจัยนี้จึงศึกษารูปแบบการติดเชื้อและลักษณะเด่นทางพันธุกรรมของ *Chlamydia trachomatis* ยีน outer membrane protein A และยีน *tryptophan synthase A* ของสายพันธุ์ที่พบในผู้หญิงที่เป็นโรคท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่างและช่วงบนอักเสบก่อนและหลังการรักษา เพื่อนำเสนอข้อมูลรายละเอียดและข้อชี้แจงเกี่ยวกับการคงอยู่ของเชื้อคลามัยเดียในผู้หญิงไทยแม้ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ สนับสนุนความสำคัญของการศึกษาการติดเชื้อในลักษณะแอบแฝงของคลามัยเดียและสายพันธุ์หรือลักษณะเด่นทางพันธุกรรมของยีนเหล่านี้ (หากมี) และช่วยให้บุคลากรด้านสาธารณสุขและชุมชนมีแนวทางการป้องกันและรักษาโรคที่เหมาะสมยิ่งขึ้นเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อสู่คู่สมรสหรือบุตร

Abstract

Chlamydia trachomatis is a major bacterial cause of sexually transmitted disease in females and males worldwide. Severity of the disease depends on type of infection, duration of infection, and serovar and strain of the infection. Awareness of the possibility of persistent *C. trachomatis* infection in sexually transmitted disease individuals is important, especially when current antibiotics may not be able to terminate the infection depending on the status of the infection, active or persistent infection. At present, no effective vaccine is available. Hence, this research indentified infection type and unique genetic characteristics of major *C. trachomatis* strains in females with lower and upper genital tract infections, before and after antibiotic treatment. The study revealed preliminary evidence and supporting information about the persistence of the chlamydiae after the antibiotic treatment, strengthening the importance and the necessity for further study on persistent *Chlamydia* and their unique serovar or genetic characteristic of tryptophan synthase A gene in clinical subjects in Thailand. This will promote enthusiasm to health officers and communities to find better strategies for disease control and treatment of this disease, helping to reduce the disease transmission occurrences between infected partners as well as from the infected mothers to their babies.

บทนำ

โรคท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์อักเสบ

โรคท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์อักเสบ หมายถึง การอักเสบเฉียบพลันหรือเรื้อรังของอวัยวะสืบพันธุ์ โรคนี้มีความสำคัญ เนื่องจากมักพบในสตรีวัยเจริญพันธุ์ ถ้าได้รับการวินิจฉัยล่าช้า รักษาไม่เพียงพอหรือไม่ถูกต้อง จะเกิดภาวะแทรกซ้อนได้ ในเพศหญิงจะแบ่งอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์เป็นสองส่วน คือ การอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่าง ซึ่งประกอบด้วย ช่องคลอด และปากมดลูก และการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงบน ซึ่งประกอบด้วย มดลูก ท่อนำไข่ รังไข่ รวมทั้งเอ็นต่าง ๆ ที่ยึดอวัยวะเหล่านี้ และเยื่อบุช่องท้องบริเวณอุ้งเชิงกราน สาเหตุของโรคนี้คือการติดเชื้อของแบคทีเรีย ซึ่งมักพบการติดเชื้อของแบคทีเรียที่ติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ประกอบด้วย เชื้อหนองใน (*Neisseria gonorrhoea*) เชื้อหนองในเทียม (*Chlamydia trachomatis*) และ *Mycoplasma homines* โดยพบว่า เชื้อหนองใน และเชื้อหนองในเทียมเป็นสาเหตุหลักของโรคนี้ คิดเป็นร้อยละ 50 ถึง 60 (http://healthy.in.th/disease/pelvic% 20inflammatory%20disease/) และที่สำคัญพบว่าการติดเชื้อด้วยเชื้อหนองในเทียมนั้น มักจะไม่แสดงอาการ หรือมีอาการเพียงเล็กน้อย โดยในเพศหญิงอาจมีเพียงอาการตกขาวผิดปกติ ปัสสาวะแสบขัด และอาการปวดท้องน้อย จึงมักไม่ได้รับการรักษา (http://www.lovecarestation.com/th/cms/detail.php?id=61) ส่งผลให้เกิดโรคที่รุนแรงจากการติดเชื้อในระยะยาว อาทิเช่น อุ้งเชิงกรานหรืออวัยวะสืบพันธุ์เพศชายอักเสบ ภาวะการมีบุตรยาก และเป็นหมัน เหล่านี้พบได้ทั้งในเพศหญิงและเพศชาย

แบคทีเรีย Chlamydia trachomatis

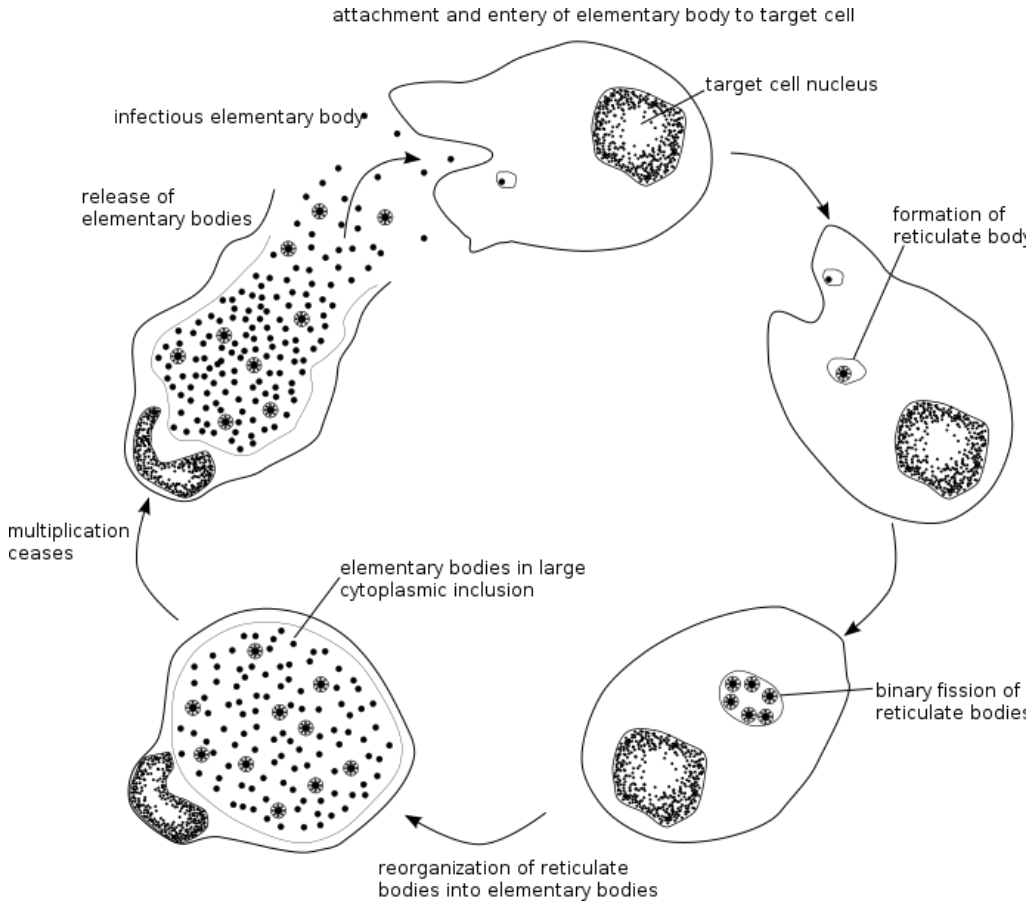
C. trachomatis เป็นแบคทีเรียก่อโรคในคน ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างกลม มีขนาดเล็ก เจริญอยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต กล่าวคือเจริญและสืบพันธุ์โดยการแบ่งตัวภายในเซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ภายนอกเซลล์ (obligate intracellular bacteria) จัดเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่าง โครงสร้างและวงจรชีวิตที่ซับซ้อน *แบ่งเป็นสองระยะ คือ* ระยะที่มีชีวิตอยู่นอกเซลล์ สามารถติดต่อและเข้าสู่เซลล์ได้แต่ไม่มีกิจกรรมของสิ่งมีชีวิต เรียกคลามัยเดียระยะนี้ว่า *elementary body (EB)* และระยะที่มีชีวิตอยู่ภายในเซลล์ มีกิจกรรมของสิ่งมีชีวิต คือมีการเจริญ การสร้างโปรตีน มีขนาดที่ใหญ่กว่า EB และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแต่ไม่สามารถติดต่อได้ เรียกคลามัยเดียระยะนี้ว่า *reticulate body (RB)* (Hogan *et al.*, 2004; Mpiga and Ravaoarinoro, 2006)

C. trachomatis จัดเป็นสาเหตุหลักของโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์*ทั่วโลก ทั้งในเพศหญิงและเพศชาย* มีรายงานว่า มีประชากรมากกว่า 600 ล้านคนทั่วโลกที่ติดเชื้อคลามัยเดียและกว่า 92 ล้านคนติดเชื้อเพิ่มขึ้นทุกปี (Beagley and Timms, 2000; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2005) สำหรับประเทศไทยพบการติดเชื้อส่วนใหญ่ในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย อาชีพ ขายบริการ ครอบครัวมีอาชีพเกษตรกรรม และได้รับการศึกษาน้อยกว่า 7 ปี (Paz-Bailley *et al.*, 2003; Rugpao *et al.*, 2010) ที่สำคัญคาดว่าจำนวนผู้ที่ติดเชื้อคลามัยเดียที่แท้จริงมีมากกว่าที่รายงานเป็นจำนวนมากเนื่องจากการติดเชื้อส่วนใหญ่เป็นแบบไม่แสดงอาการ โดยพบในเพศหญิงสูงถึงร้อยละ 75 และในเพศชายสูงถึงร้อยละ 50 (Beagley and Timms, 2000; Somboonna, 2010; CDC, 2011) ทำให้ไม่ได้รับการตรวจและรักษาซึ่งก่อให้เกิดการอักเสบเรื้อรังและโรคแทรกซ้อน และหากไม่ได้รับการรักษาจะเกิดการอักเสบของอุ้งเชิงกรานถึงร้อยละ 40 เป็นหมันร้อยละ 20 ปวดท้องเรื้อรังร้อยละ 18 ตั้งครรภ์นอกมดลูกร้อยละ 9 นอกจากนี้ทารกที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื้อดังกล่าวอาจมีโรคแทรกซ้อน เช่น เยื่อบุตาอักเสบ และปอดบวม ในปัจจุบันพบว่ายังไม่มีวัคซีนที่สามารป้องกันการติดเชื้อโดย *C. trachomatis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังไม่มียาปฏิชีวนะที่รักษาการติดเชื้อคลามัยเดียขณะวงจร

ชีวิตแบบแอบแฝงได้ เนื่องจากยาปฏิชีวนะ *doxycycline* ขนาด 100 มิลลิกรัม สองครั้งต่อวัน เป็นเวลาสิบสี่วัน ที่ใช้ในปัจจุบันออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นสังเคราะห์โปรตีน แต่เชื้อที่อยู่ในวงจรชีวิตแบบแอบแฝงไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนใดๆ ยกเว้นโปรตีนที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านให้มาทำลายเซลล์ของเจ้าบ้านเอง เช่น Heat shock protein 60 ยาปฏิชีวนะจึงไม่มีผลต่อคลามัยเดียในสภาวะนี้ *(*Matsumoto and Manire, 1970; Kahane and Friedman, 1992; Hogan *et al.*, 2004*)*

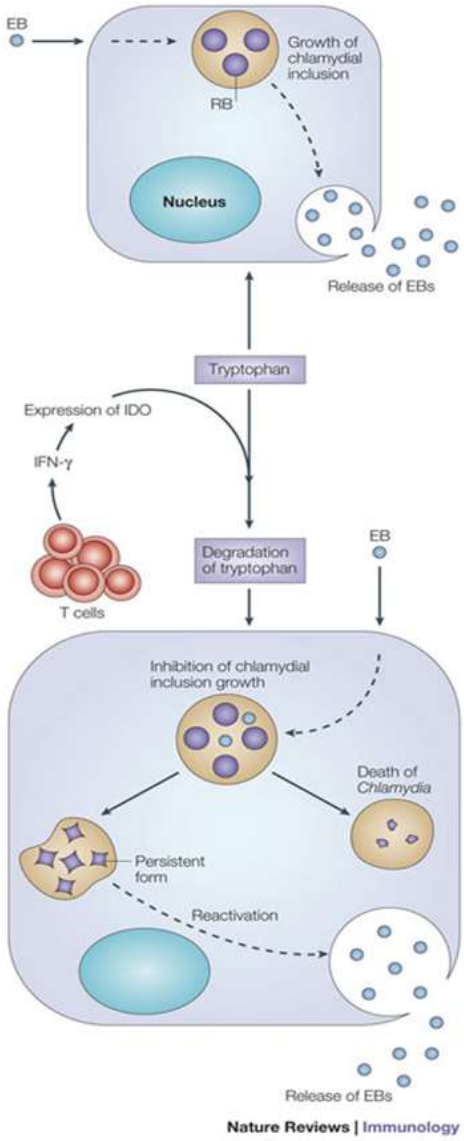
วงจรชีวิตของแบคทีเรีย C. trachomatis

ประกอบไปด้วยวงจรชีวิตสองแบบ คือ แบบปกติและแบบแอบแฝง ซึ่งมีลักษณะแสดงดัง**รูปที่ 1**



รูปที่ 1 วงจรชีวิตแบบปกติของแบคทีเรีย *C. trachomatis* (http://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydia_trachomatis)

วงจรชีวิตของ *C. trachomatis* มีภาวะที่ระบบกลไกของมันเองไม่ทำงานแต่เป็นพาหะได้ เรียกว่า EB เป็นระยะติดต่อเข้าไปอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านโดยอยู่ใน membrane-bound vacuole ที่เรียกว่า อินคลูชั่น (inclusion) ภายในอินคลูชั่น EB จะเปลี่ยนรูปร่างและโครงสร้างเป็น RB ซึ่งเป็นระยะที่ระบบกลไกของมันทำงาน มีการแบ่งตัวแบบ binary fission ทำให้มีจำนวนมากขึ้นส่งผลให้ inclusion มีขนาดใหญ่ขึ้น และเมื่อได้จำนวนที่พอเพียง RBs โดยเฉลี่ยประมาณ 24-48 ชั่วโมงภายหลังการเข้าสู่เซลล์ขึ้นกับสายพันธุ์ RBs จึงเปลี่ยนรูปร่างและโครงสร้างกลับเป็น EBs แล้วออกนอกเซลล์โดยวิธี extrusion หรือทำให้เซลล์เจ้าบ้านแตก (Somboonna *et al.*, 2010) (**รูปที่ 1**) อย่างไรก็ตาม เมื่อไม่นานมานี้ นักวิจัยคลามัยเดีย ได้ค้นพบวงจรชีวิตอีกแบบของคลามัยเดีย คือ วงจรชีวิตแบบแอบแฝง (**รูปที่ 2**)



รูปที่ 2 ผลของ IFN-γ และการสังเคราะห์กรดอะมิโนทริปโทเฟนต่อวงจรชีวิตแบบแอบแฝงของ *C. trachomatis* (รูปภาพนำมาจาก Robert *et al.*, 2005*)*

ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์จะใช้ interferon-gamma (IFN-γ) ในการกำจัดหรือยับยั้งการขยายพันธุ์ของ C. trachomatis โดยทำลายกรดอะมิโนทริปโทเฟน (tryptophan) ซึ่งจำเป็นในการขยายพันธุ์ของ *C. trachomatis* ผ่านเอนไซม์ indoleamine-2,3-dioxgenase (IDO) (Hogan, 2004) ซึ่งจากรายงานวิจัยที่มีมาก่อนพบว่าระดับความเข้มข้นของ IFN-γ ในคน และความสามารถที่ต่างกัน ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนทริปโทเฟน จากสารตั้งต้นอินโดล ขึ้นกับสายพันธุ์และสิ่งแวดล้อมอื่นๆ อาทิ การติดเชื้อร่วมโดยแบคทีเรีย *Neisseria gonorrhaea* หรือไวรัส human papilloma virus (HPV) เหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบแอบแฝง (persistent infection) (James, 2011; Samoff *et al.*, 2005) ซึ่งส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในระยะยาวเนื่องจากคลามัยเดียอาศัยอยู่แบบไม่แสดงตัว แต่กระตุ้นให้เกิดการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อของเจ้าบ้านเองโดยคงผลิตโปรตีนที่คล้ายกับโปรตีนที่มีในมนุษย์ ส่งผลให้ผู้ติดเชื้อผลิตภูมิคุ้มกันขึ้นมาทำลายตัวเอง เรียกว่าโรคแพ้ภูมิตัวเอง (immunopathological disease) นำไปสู่การท้องนอกมดลูกเนื่องจากความผิดปกติของเนื้อเยื่อบริเวณมดลูกและท่อนำไข่ หรือเป็นหมันได้ในที่สุด ทั้งในเพศหญิงและเพศชาย (Dean *et al.*, 2000; Dean *et al.*, 2001)

คำนิยามดั้งเดิมของการติดเชื้อแบบแอบแฝงของ *C. trachomatis* คือการที่แบคทีเรียมีชีวิตอยู่ภายในเซลล์แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า *C. trachomatis* สามารถอาศัยอยู่แบบแอบแฝงในภาวะที่ร่างกายผลิตภูมิคุ้มกัน IFN-γ ในระดับที่พอเหมาะเพื่อหลบหลีกการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ก่อนที่ระดับ IFN-γ จะสูงจนสามารถทำลายคลามัยเดีย และเมื่อนำ IFN-γ ออกไป หรือมีสารตั้งต้นอินโดลที่พอเพียง หรือเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างอินโดลได้ดีกว่าปกติ คลามัยเดียจะกลับเข้าสู่สภาวะไม่แอบแฝง หรือสภาวะการติดเชื้อแบบปกติ ทั้งนี้ ยาปฏิชีวนะ doxycycline ที่ใช้กันโดยแพทย์แผนปัจจุบัน สามารถทำลายคลามัยเดียได้เฉพาะ RBs ที่อาศัยอยู่แบบปกติ (Kahane and Friedman, 1992; Hogan *et al.*, 2004*)*

IFN-γ ที่ถูกกระตุ้นด้วยภูมิคุ้มกันของร่างกายจะกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) ซึ่งทำหน้าที่ทำลายกรดอะมิโนทริปโทเฟนที่จำเป็นในการขยายพันธุ์ของ *C.* trachomatis แม้การทำลายกรดอะมิโนทริปโทเฟนจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของคลามัยเดีย แต่การขาดกรดอะมิโนชนิดนี้ของคลามัยเดียที่อยู่ในลักษณะ RBs อาจนำไปสู่การติดเชื้อแบบแอบแฝง และเมื่อมีการนำ IFN-γ ออกจากระบบหรือมีการให้กรดอะมิโนทริปโทเฟน คลามัยเดียที่อยู่ในวงจรชีวิตแบบแอบแฝงจะกลับเข้าสู่วงจรชีวิตแบบปกติเพื่อเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายพันธุ์ต่อไป (Robert *et al.*, 2005*)*

การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *C. trachomatis*

ปัจจุบัน *C. trachomatis* ถูกจัดจำแนกเป็น 19 กลุ่ม (serovars) ตามแอนติบอดี้ที่จำเพาะและตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างโปรตีน major outer membrane protein (MOMP) ที่ชื่อว่า outer membrane protein (ompA) โดยสามารถจัดเป็นสามกลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ก่อโรคทางตา (biovar trachoma) ได้แก่ serovars A ถึง C รวม Ba และ Da กลุ่มที่ก่อโรคทางระบบสืบพันธุ์ แบบไม่เชื่อมต่อถึงระบบท่อน้ำเหลืองทั่วร่างกาย (biovar non-invasive urogenital) ได้แก่ serovars D ถึง K รวม Da, Ia และ Ja และกลุ่มที่ก่อโรคทางระบบสืบพันธุ์ที่เชื่อมโยงไปถึงระบบท่อน้ำเหลืองทั่วร่างกาย (biovar lymphogranuloma venereum, invasive urogenital) ได้แก่ serovars L_1 ถึง L_3 รวม L_2a ซึ่งสามารถรุกรานและเพิ่มจำนวนในเซลล์โมโนไซต์ในท่อน้ำเหลืองได้ (CDC, 2005)

โดย serovars D ถึง K รวม Da, Ia และ Ja ซึ่งก่อโรคทางระบบสืบพันธุ์และตาของบุตรที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื้อ ในประเทศไทยพบการติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจาก serovar F, D และ E ตามลำดับ (Yamazaki *et al.*, 2005; Franceschi *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มดังกล่าวก็ไม่สามารถแบ่งกลุ่มตามรูปแบบการติดเชื้อได้ และเป็นรายงานวิจัยที่ศึกษาเมื่อเจ็ดปีที่แล้ว ดังนั้น คลามัยเดียอาจมีวิวัฒนาการเพิ่มเติม กอปรกับเทคนิคการตรวจที่แม่นยำขึ้น อีกทั้งงานวิจัยยังดังกล่าวยังไม่ให้ความสำคัญต่อการศึกษารูปแบบการติดเชื้อแบบแอบแฝง

รูปแบบการติดเชื้อของแบคทีเรีย *C. trachomatis*

รูปแบบการติดเชื้อของ *C. trachomatis* มีสองแบบ คือ การติดเชื้อแบบปกติ แบบไม่แอบแฝง หรือเรียกว่าแบบฉับพลัน (Acute infection) ซึ่งยาปฏิชีวนะที่ใช้กันในปัจจุบันสามารถรักษาได้ และการติดเชื้อแบบเชื้อคงอยู่ในลักษณะแอบแฝง (Persistent infection) ซึ่งแม้ว่าผู้ป่วยจะไม่แสดงอาการ แต่เชื้อโรคส่วนใหญ่ยังคงคอยผลิตโปรตีนที่ทำให้ร่างกายของเราผลิตภูมิคุ้มกันขึ้นมาทำลายเซลล์ของเราเอง (immunopathological disease) ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อท่อนำไข่หรือท่อนำอสุจิ โดยรวมพบมากถึงร้อยละ 75 ในเพศหญิง และร้อยละ 50 ในเพศชาย ที่ติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการของโรคทำให้ไม่ได้รับการตรวจและรักษาจนนำไปสู่โรคในขั้นที่รุนแรงและไม่สามารถรักษาได้ คือการเป็นหมันหรือตาบอด (Dean *et al.*, 2000; Dean *et al.*, 2001; CDC, 2011) ดังนั้นการตระหนักถึงรูปแบบการติดเชื้อในลักษณะ

คงอยู่แบบแอบแฝงของคลามัยเดียจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีนี้ซึ่งยาปฏิชีวนะที่ใช้กัน ณ ปัจจุบัน อาจไม่สามารถรักษาการติดเชื้อได้อย่างหายขาด ขึ้นกับสถานะของเชื้อว่าอยู่ในวงจรชีวิตแบบปกติหรือแบบแอบแฝง และวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสำหรับการป้องกันโรคนี้ยังไม่มี อีกทั้งในประเทศไทยยังพบว่างานวิจัยและการศึกษาการติดเชื้อแบบแอบแฝงของ *C. trachomatis* โดยอาศัยวิธีการทางจุลชีววิทยานั้นยังไม่มี ดังนั้นโครงงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษารูปแบบของการติดเชื้อและการกระจายสายพันธุ์ของ *C. trachomatis* ที่พบในผู้หญิงไทย ที่มีอาการของโรคท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่างและช่วงบนอักเสบ ความสัมพันธ์ของกลุ่มพื้นฐานหรือสายพันธุ์กับรูปแบบของการติดเชื้อ ความสัมพันธ์ของกลุ่มพื้นฐานหรือสายพันธุ์ที่ระบาดกับบริเวณของระบบท่อทางเดินสืบพันธุ์ที่มีอาการอักเสบและช่วงอายุของผู้ป่วย และการได้มาซึ่งแหล่งสายพันธุ์ *C. trachomatis* ที่น่าสนใจเพื่อเป็นแหล่งอ้างอิงสำหรับงานวิจัยในลำดับถัดไป งานวิจัยนี้ยังมีความสำคัญต่อบุคลากรด้านสาธารณสุขให้มีความตระหนักถึงปัญหาการติดเชื้อในลักษณะคงอยู่แบบแอบแฝงของคลามัยเดียที่นำไปสู่ปัญหาการมีบุตรยากในปัจจุบัน ช่วยพัฒนาแนวทางการรักษาและการป้องกันโรคนี้และโรคติดเชื้อเรื้อรังอื่นๆ ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อสู่คู่สมรสหรือบุตรที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื้อ และลดปัญหาที่ไม่อาจแก้ไขได้ที่อาจเกิดขึ้นจากการติดเชื้อในลักษณะนี้ ตัวอย่างแนวทางในการรักษา อาทิเช่น มีการตรวจสถานะของการติดเชื้อขณะนั้นของคลามัยเดียว่าเป็นแบบปกติหรือแบบแอบแฝง การลดการกระตุ้นที่ทำให้เกิดการติดเชื้อแบบแอบแฝงเพื่อให้คลามัยเดียกลับมาดำรงชีวิตในวงจรชีวิตแบบปกติก่อนแล้วจึงให้ยาปฏิชีวนะ และการให้คู่สมรสทุกคู่ที่วางแผนมีบุตรได้รับการตรวจว่ามีการติดเชื้อคลามัยเดียหรือไม่ เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- บ่งชี้รูปแบบของการติดเชื้อของ *C. trachomatis* ที่พบบ่อยในเพศหญิงอายุระหว่าง 15-30 ปี ที่ป่วยเป็นโรคท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่างและช่วงบนในประเทศไทย
- บ่งชี้สายพันธุ์ที่ระบาดและตามรูปแบบของการติดเชื้อที่พบในประเทศไทย
- อธิบายความแตกต่างและลักษณะเด่นทางพันธุกรรมที่อาจเกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการและลักษณะในทางการติดเชื้อและการก่อโรคที่ต่างกัน
- ได้มาซึ่งสายพันธุ์ที่น่าสนใจเพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิงสำหรับการศึกษาต่อ แนวทางการรักษาและการป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ผลของการสนับสนุนจากโครงการวิจัยนี้มีส่วนช่วยให้เกิดสิ่งตีพิมพ์เป็นบทความฟื้นวิชา บทความทางวิชาการ และบทความวิจัย (กำลังรวบรวมกับผลของงานวิจัยจากโครงการวิจัยที่ได้รับเงินสนับสนุนทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอยู่ระหว่างดำเนินการเขียนสิ่งตีพิมพ์ และจะจัดส่งให้ในภายหลังเมื่อสิ่งตีพิมพ์ได้รับตีพิมพ์) รวมทั้งสิ้น 3 ฉบับ

1. **Somboonna N**, Sukonpan K, Sayasathid S. การติดเชื้อแบบแอบแฝงของคลามัยเดียที่ก่อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์. *พุทธชินราชเวชสาร* 2010; **27**:519-24.
2. **Somboonna N**. การคงอยู่แบบแอบแฝงของเชื้อคลามัยเดียหลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในหญิงที่ติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์. *พุทธชินราชเวชสาร* 2012; **29**(1): 108-113. (ได้ระบุทุนสนับสนุนจากศนวท. ในกิตติกรรมประกาศแล้ว แต่เนื่องจากรูปแบบของบทความทางวิชาการนี้ไม่ระบุกิตติกรรมประกาศในสิ่งตีพิมพ์)
3. **Somboonna** N, Boonpleng P, Khummin R. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and its co-infection with human papillovius and *Neisseria gonorrhoaea* among females with urogenital tract symptoms. In preparation.

การทบทวนวรรณกรรม

วรรณกรรมที่ [1] - [2], [5], [9], [12] : สรุปอัตราการติดเชื้อคลามัยเดียในประชากรกลุ่มต่างๆ อาการของโรค ปัจจัยเสี่ยง และงบประมาณที่รัฐใช้เพื่อการจัดการกับโรคนี้ จัดทำโดย The United States CDC

วรรณกรรมที่ [3] – [4], [6] - [8], [10] - [11], [13], [15] - [17], [19], [22] - [24] : หลักฐานภายนอก (*in vitro*) และภายใน (*in vivo*) ของ *C. trachomatis* ในการก่อโรคแบบแอบแฝง คำนิยามและลักษณะของการติดเชื้อแบบแอบแฝงของ *C. trachomatis* และปัจจัยที่เอื้อต่อการติดเชื้อแบบแอบแฝง เช่น ยาเพนนิซิลิน การขาดแคลนกรดอะมิโน Tryptophan การขาดแคลนธาตุเหล็ก การติดเชื้อร่วมจากเชื้อไวรัสที่ก่อโรคเอดส์และโรคมะเร็งปากมดลูก และความร้อนสูง ทั้งนี้ถึงแม้ว่า *C. trachomatis* ในแต่ละสายพันธุ์โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่พบบ่อยในการติดเชื้อแบบแอบแฝงนั้น มีความสามารถในการเข้าสู่ ดำรงชีวิต และคงอยู่ในภาวะ Persistent infection ได้ต่างกัน

วรรณกรรมที่ [14] – [6] : ระบบภูมิคุ้มกันต่อคลามัยเดีย แนวทางการรักษา

วรรณกรรมที่ [18], [21] : การคัดแยกและการเจริญเติบโต *C. trachomatis* สายพันธุ์ที่ได้จากการติดเชื้อแบบไม่แอบแฝงและสายพันธุ์ที่ได้จากเกิดการติดเชื้อแบบแอบแฝง นอกจากนี้ วรรณกรรมที่ [7] และ [11] ยังเป็นแหล่งอ้างอิงสำหรับระเบียบวิธีการวิจัยและวิธีการดำเนินการวิจัยที่เสนอในโครงการวิจัยนี้

วรรณกรรมที่ [20] – [10] : ความสำคัญของยีน Tryptophan synthase A ซึ่งสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน Tryptophan จากสารตั้งต้น Indole กับความหลากหลายของสายพันธุ์ของ *C. trachomatis* และวิธีการก่อโรคที่ต่างกัน ทั้งนี้ พบว่าการขาดแคลนกรดอะมิโน Tryptophan หรือสายพันธุ์ที่ยีน Tryptophan synthase A ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน Tryptophan ได้จะมีแนวโน้มที่จะหลบเข้าสู่การติดเชื้อแบบแอบแฝง

วรรณกรรมที่ [21] : ความสำคัญของยีน cytotoxin ในความเป็นพิษต่อ (ทำลาย) เซลล์เจ้าบ้านของแบคทีเรีย

การออกแบบการวิจัย

ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย - อาการท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่างอักเสบ และช่วงบนอักเสบ

ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร - รูปแบบการติดเชื้อและลักษณะเด่นทางพันธุกรรมของยีนอ้างอิง *ompA* ที่ใช้บ่งชี้สายพันธุ์ของ *C. trachomatis* (หากมี)

การออกแบบการทดลอง - บ่งชี้รูปแบบการติดเชื้อแบบไม่แอบแฝงและแบบแอบแฝง และจัดกลุ่มพื้นฐาน (serovars) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ompA* จากตัวอย่างผู้ป่วยเพศหญิง อายุระหว่าง 15-30 ปี ที่มีการอักเสบของระบบท่อทางเดินสืบพันธ์ช่วงล่าง (50 คน) และจากผู้ป่วยที่มีการอักเสบของระบบท่อทางเดินสืบพันธ์ช่วงบน (50 คน) ก่อนและหลังได้รับการรักษา รวมแล้วมีทั้งหมด 100 คน และ 200 ตัวอย่าง ทั้งนี้ ตัวอย่างที่ได้จะถูกจัดเก็บในรูปแบบตัวเลขแบบสุ่ม และไม่มีการเชื่อมโยงไปสู่ชื่อหรือข้อมูลของคนไข้ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของรูปแบบของการติดเชื้อกับลักษณะเด่นทางพันธุกรรม จะดำเนินการโดยการศึกษายีน trypophan synthase A และยีน cytotoxin นอกจากนี้ การได้มาซึ่งสายพันธุ์ที่เกี่ยวเนื่องกับการติดเชื้อแบบไม่แอบแฝง และแบบแอบแฝงนั้น เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับงานวิจัยเชิงซับซ้อนในระดับโมเลกุลที่จะมีการศึกษาในลำดับต่อไป

ข้อมูล - ผู้ป่วยเพศหญิง อายุระหว่าง 15-30 ปี ที่มีการอักเสบของระบบท่อทางเดินสืบพันธ์ช่วงล่าง (50 คน) และจากผู้ป่วยที่มีการอักเสบของระบบท่อทางเดินสืบพันธ์ช่วงบน (50 คน) ก่อนและหลังได้รับการรักษา ที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก รวมแล้วมีทั้งหมด 100 คน และ 200 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ได้จะถูกจัดเก็บในรูปแบบตัวเลขแบบสุ่ม เพื่อไม่ให้มีการเชื่อมโยงไปสู่ชื่อหรือข้อมูลของคนไข้ และเพื่อหลีกเลี่ยงข้อบังคับทางจริยธรรมที่เกี่ยวกับการทำงานวิจัยกับข้อมูลของคน

ตัวอย่างแรก: เก็บวันที่ผู้ป่วยตามเกณฑ์ที่เลือกเข้ารับการตรวจ และก่อนรับการรักษา ซึ่งเริ่มทำในวันเดียวกัน

ตัวอย่างที่สอง: เก็บสองสัปดาห์หลังจากที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาครบตามกำหนดเป็นเวลาสองสัปดาห์

วิธีการเก็บข้อมูล - เก็บตัวอย่างตามวิธีของ M4RT Culture Transport Universal Kit (Remel, USA) โดยแพทย์และผู้ชำนาญการทางสูติศาสตร์-นารีเวชวิทยาในน้ำเลี้ยงที่ -80 องศาเซลเซียส

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล - วิเคราะห์ความถี่ของการระบาดของแต่ละสายพันธุ์ ต่อการติดเชื้อแบบไม่แอบแฝง และแบบแอบแฝง รวมถึงอัตราการเกิดการติดเชื้อที่มีมากกว่า 1 สายพันธุ์ ต่อ 1 คนไข้, ความแตกต่างทางข้อมูลทางลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่รายงานพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตแบบแอบแฝง รวมถึงอธิบายความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างกันนี้กับความสามารถในการก่อให้เกิดการติดเชื้อในรูปแบบที่ต่างกัน, ผลของ electropherogram, basic local alignment search tool (BLAST), multiple sequence alignment, neighbor-joining tree

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตพื้นที่ที่จะศึกษาวิจัย คือพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก (ภาคกลางตอนบน)
ขอบเขตเชิงเนื้อหา คือ
(i) การเก็บตัวอย่าง (cervical swab) จากผู้ป่วยเพศหญิง อายุระหว่าง 15-30 ปี ที่มีการอักเสบของระบบท่อทางเดินสืบพันธ์ช่วงล่าง (50 คน) และจากผู้ป่วยที่มีการอักเสบของระบบท่อทางเดินสืบพันธ์ช่วงบน (50 คน) ก่อนและหลังได้รับการรักษา รวมแล้วมีทั้งหมด 100 คน และ 200 ตัวอย่าง ทั้งนี้ ตัวอย่างที่ได้จะถูกจัดเก็บในรูปแบบตัวเลขแบบสุ่ม และไม่มีการเชื่อมโยงไปสู่ชื่อหรือข้อมูลของคนไข้
การให้ข้อมูลแก่กลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย กระทำโดยการแจกเอกสารข้อมูลที่เกี่ยวข้องให้อ่านพร้อมอธิบายหากไม่เข้าใจโดยผู้ที่จะทำการเก็บตัวอย่าง
(ii) การบ่งชี้สายพันธุ์ของ *C. trachomatis* ตามวิธีที่ใช้กันในกลุ่มผู้วิจัยทางคลามัยเดีย กล่าวคือ การจัดกลุ่มและการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน outer membrane protein A (*ompA*)
(iii) การวิเคราะห์ความถี่ของการระบาดของแต่ละสายพันธุ์ ต่อการติดเชื้อแบบไม่แอบแฝง และแบบแอบแฝง รวมถึงอัตราการเกิดการติดเชื้อที่มีมากกว่า 1 สายพันธุ์ ต่อ 1 คนไข้ เรียกการติดเชื้อลักษณะนี้ว่า การติดเชื้อแบบผสม (mixed infections) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้จากผลทาง electropherogram (สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบผสม สามารถแบ่งแยกได้ด้วยวิธีตามบรรณานุกรมที่ [21])

นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ยังมีการวิเคราะห์ความแตกต่างทางข้อมูลทางลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่รายงานพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตแบบแอบแฝง รวมถึงอธิบายความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างกันนี้กับความสามารถในการก่อให้เกิดการติดเชื้อในรูปแบบที่ต่างกัน โดยงานวิจัยนี้สนใจยีน trypophan synthase A ซึ่งจากผลของงานวิจัยที่มีมาก่อน และจากงานวิจัยที่เคยทำ พบว่ายีนแรกมีส่วนช่วยในกลไกการเข้าสู่ภาวะ active infection และยีนที่สองมีส่วนช่วยในกลไกการทำลายเซลล์เจ้าบ้านของแบคทีเรีย

อย่างไรก็ตาม ในอนาคตจะต้องเก็บข้องมูลเพิ่มเติมและคัดเลือก *C. trachomatis* บางสายพันธุ์เพื่อทำการเพาะเลี้ยงและคัดแยก *C. trachomatis* สายพันธุ์เดี่ยวที่สนใจ ด้วยวิธี shotgun cell culture harvest assay และสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบแอบแฝง ด้วยวิธี modified shotgun cell culture harvest assay รายละเอียดเทคนิควิธีทำอยู่ในบรรณานุกรมที่ [18]

ขอบเขตเชิงประชากรและกลุ่มตัวอย่าง คือ ผู้ป่วยที่มีการอักเสบของเชิงกรานช่วงล่าง (50 คน) และผู้ป่วยที่มีการอักเสบของเชิงกรานช่วงบน (50 คน) ก่อนและหลังได้รับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก รวมแล้วมีทั้งหมด 100 คน 200 ตัวอย่าง ทั้งนี้กระบวนการรักษาที่ใช้เป็นกระบวนการรักษาที่ใช้กันอยู่ ณ ปัจจุบันสำหรับผู้ป่วยที่มีการอักเสบของเชิงกราน และการรักษานี้ครอบคลุมถึงการป้องกันการเป็นไปได้ที่ผู้ป่วยอาจกลับมาติดเชื้อได้อีกจากคู่เพศสัมพันธ์ (sex partners) โดยการเชื้อเชิญให้คู่เพศสัมพันธ์มาเข้ารับการตรวจและการรักษา และการควบคุมการมีเพศสัมพันธ์ในช่วงที่ได้รับการรักษาตลอดจนถึงตอนเก็บตัวอย่างในเวลา 2 สัปดาห์หลังได้รับการรักษา

ระเบียบวิธีวิจัย

กรอบแนวคิด ทฤษฎี ที่เกี่ยวข้องและนำมาใช้สนับสนุนการวิจัย (Theory)

สืบเนื่องจากรายงานที่มีมาก่อนและผลของการทดลองเบื้องต้นที่ข้าพเจ้าเคยทำมาแล้วกับตัวอย่างของผู้ติดเชื้อในเมืองซานฟรานซิสโก รัฐแคลิฟอร์เนีย ดังได้กล่าวในบททบทวนวรรณกรรม และงานวิทยานิพนธ์ในระดับปริญญาเอกของข้าพเจ้า ตามลำดับ สมมติฐานของงานวิจัยนี้คือ การติดเชื้อแบบแอบแฝงของ *C. trachomatis* ในประชากรไทยนั้นมีอยู่จริงและส่งให้ให้ผู้ที่ติดเชื้อในลักษณะนี้ยังมีเชื้อคงอยู่แม้ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะแล้วจากคลินิกหรือจากโรงพยาบาล ฉะนั้น ผลของงานวิจัยนี้จะแสดงให้เห็นถึงรูปแบบและอัตราของการติดเชื้อของ *C. trachomatis* ที่เป็นได้ทั้งแบบไม่แอบแฝง และแบบแอบแฝง ซึ่งยาปฏิชีวนะสามารถรักษาให้หายขาดได้เฉพาะกรณีของการติดเชื้อแบบไม่แอบแฝง และลักษณะเด่นรวมถึงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของ serovar และของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บ่งชี้ serovar คือ *ompA* ในสายพันธุ์ที่เหมาะต่อการก่อให้เกิดโรคท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่างและช่วงบนอักเสบ แบบไม่แอบแฝง และแบบแอบแฝง สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อแบบแอบแฝงที่สนใจ คือยีน trypophan synthase A และคาดว่าสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อแบบแอบแฝงนั้น อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในลักษณะที่ทำให้สายพันธุ์นั้นมีความสามารถมากขึ้นที่จะเดินทางเข้าสู่ภาวะ persistent infection ได้ เมื่อได้รับความเครียดจาก gamma-interferon ในระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อ (gamma-interferon มีหน้าที่ทำลาย tryptophan) หรือในทางกลับกันอาจมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในลักษณะที่ก่อให้เกิดความสามารถที่ลดลงของสายพันธุ์นั้นในการใช้ Indole เพื่อผลิตกรดอะมิโน trypophan (จากบรรณานุกรมที่ [10] และผลการทดลองงานวิทยานิพนธ์ในระดับปริญญาเอกของข้าพเจ้า พบว่าปริมาณของ trypophan มีผลต่อการเข้าสู่ภาวะ persistent infection จริง)

เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. Micro Test™ M4RT ของบริษัท Thermo Fisher Scientific (Kansas, USA)
2. Agarose powder ของบริษัท AMRESCO® (Ohio, USA)
3. Lysozyme ของบริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd (Singapore Science Park II, Singapore)
4. 1 kb plus DNA ladder ของบริษัท Invitrogen (New York, USA)
5. GeneRuler™100 bp Plus DNA Ladder ของบริษัท Invitrogen (New York, USA)
6. TBE buffer (Tris/Borate/EDTA)
7. Double distilled water
8. 70% Ethanol
9. 10% Bleach
10. 1× PBS (Phosphate Buffered Saline; NaCl/KCl/Na_2HPO_4/KH_2PO_4)
11. Isopropanal ของบริษัท MERCK (Darmstadt, Germany)
12. EmeraldAmp® GT PCR Master Mix ของบริษัท TAKARA BIO INC. (Shiga, Japan)
13. High Pure Template Preparation Kit ของบริษัท Roche Diagnostics (Indiana, USA)
14. PureLink® Quick Gel Extraction Kit ของบริษัท Invitrogen

ขอจริยธรรม

ดำเนินการขออนุญาตเก็บตัวอย่างและขอจริยธรรมตามแบบฟอร์มที่สถานที่เก็บตัวอย่างกำหนด และงานวิจัยนี้ผ่านการรับรองจริยธรรมจากโรงพยาบาลพุทธชินราช

คัดเลือกและเก็บตัวอย่าง

กำหนดลักษณะของผู้ป่วยที่เลือกและวิธีการรักษาตามหลักการที่ระบุโดย CDC เก็บตัวอย่างตามวิธีของ M4RT Culture Transport Universal Kit (Remel, USA) โดยแพทย์และผู้ชำนาญการทางสูติศาสตร์-นารีเวชวิทยา

สกัดจีโนมดีเอ็นเอ

ตามขั้นตอนของ High Pure Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) และวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของจีโนมดีเอ็นเอโดย Spectophotometry ที่ 260 (A_{260}) และ 280 (A_{280}) นาโนเมตร ตามลำดับ โดยค่า A_{260}/A_{280} ในช่วง 1.8-2.0 แสดงว่าจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพบริสุทธิ์ ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อน ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน

การบ่งชี้สายพันธุ์ serovars และความแตกต่างทางพันธุกรรมหรือ Clonal variants ของ *C. trachomatis*

บ่งชี้สายพันธุ์ของ *C. trachomatis* ตามวิธีที่ใช้กันในกลุ่มผู้วิจัยทางคลามัยเดีย กล่าวคือ ทำ *ompA* PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อคลามัยเดียและมีการใช้กันโดยทั่วไป เป็นที่ยอมรับในกลุ่มผู้วิจัยคลามัยเดีย ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ตัดเจลที่ตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ทำการเพิ่มปริมาณ ทำความสะอาดโดยใช้ PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) และส่ง DNA Sequencing Service (Macrogen Inc., Korea) จากนั้นทำการบ่งชี้สายพันธุ์โดยการ BLASTN เปรียบเทียบกับข้อมูล non-redundant nucleotide sequences ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) **(**http://www.ncbi.nlm.nih.gov/**)** และวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบกับ *C. trachomatis* 19 กลุ่มพื้นฐานที่ใช้อ้างอิงกันทั่วไปในงานวิจัยคลามัยเดียระดับนานาชาติ โดยใช้โปรแกรม MEGA 4.0 (Center for Evolutionary Functional Genomics, Tempe, AZ, USA; http://www.megasoftware.net/) และจัดกลุ่มทางต้นไม้ neighbor-joining tree ของ MEGA สำหรับ mixed infections สามารถวิเคราะห์เบื้องต้นได้จากผลของ electropherogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *ompA*

C. trachomatis 19 กลุ่มพื้นฐานที่ใช้อ้างอิง ได้แก่ *C. trachomatis* สายพันธุ์ A/SA-1, B/TW-5, Ba/Apache-2, C/TW-3, D/UW-3, Da/TW-448, E/Bour, F/IC-Cal3, G/UW-57, H/UW-4, I/UW-12, Ia/IU-4168, J/UW-36, Ja/UW-92, K/UW-31, L1/440, L2/434, L2a/TW-396 และ L3/404

ความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *trpA*

วิธีทำเหมือนที่กล่าวข้างต้น ยกเว้นใช้ไพรเมอร์ และอุณหภูมิจุดหลอมละลายในโปรแกรมพีซีอาร์ (Thermocycling profile) ที่เหมาะสำหรับยีน Trypophan synthase A และ Cytotoxin ตามลำดับ

วิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความถี่ของการพบคลามัยเดียโดยวิธีนี้จากตัวอย่าง cervical swab ในผู้หญิงที่มีอาการท่าทางเดินระบบสืบพันธ์ช่วงล่าง และช่วงบนอักเสบ และในกลุ่มผู้ที่ไม่มีอาการ (กลุ่มควบคุม) อัตราระบาดของแต่ละสายพันธุ์ ระบุชนิดของการติดเชื้อ โดยถ้าหลังการรักษาพบสายพันธุ์เหมือนก่อนการรักษาแสดงว่าเป็นรูปแบบการติดเชื้อแบบแอบแฝง แต่ถ้าหลังการรักษาไม่พบคลามัยเดียแสดงว่าสามารถรักษาหายเป็นรูปแบบการติดเชื้อแบบไม่แอบแฝง และเปรียบเทียบความแตกต่างและการจัดกลุ่มต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ompA* และ *trpA* ระหว่างสายพันธุ์คนไข้ที่พบกับสายพันธุ์อ้างอิง

ผลการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มผู้ที่มีอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่างมีทั้งหมด 40 คน แยกเป็นตัวอย่างก่อนรักษา 39 ตัวอย่าง ตัวอย่างหลังรักษา 21 ตัวอย่าง กลุ่มผู้ที่มีอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงบนมีทั้งหมด 35 คน แยกเป็นตัวอย่างก่อนรักษา 35 ตัวอย่าง ตัวอย่างหลังรักษา 7 ตัวอย่าง กลุ่มที่ระบุไม่ได้ว่ามีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์แต่ไม่ระบุว่าเป็นช่วงล่างหรือช่วงบน และระบุไม่ได้ว่าก่อนหรือหลังรักษา 10 ตัวอย่าง และกลุ่มผู้ที่ไม่มีอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ (กลุ่มควบคุม) 58 ตัวอย่าง

โดยใช้สัญลักษณ์ ตัวอักษร L หรือ ล แทน ผู้ที่มีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่าง
ตัวอักษร U หรือ บ แทน ผู้ที่มีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงบน
ตัวอักษร U/L หรือ UN แทน ผู้ที่มีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์แต่ไม่ระบุว่าเป็นช่วงล่างหรือช่วงบน
ตัวอักษร C แทน ผู้ที่ไม่มีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์อักเสบ
ตัวเลข แทน ลำดับของตัวอย่าง
ตัวอักษร bf หรือ ก แทน ตัวอย่างก่อนการรักษา
ตัวอักษร af หรือ ล แทน ตัวอย่างหลังการรักษา

ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของจีโนมดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้จากตัวอย่างคนไข้

ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของจีโนมดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้ แบ่งตามกลุ่ม ได้ผลดัง**ตารางที่ 1**

กลุ่มผู้ที่มีอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่าง พบค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอ ตั้งแต่ 6.50 ถึง 295.20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ย คือ 51.00 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าเฉลี่ย A260/280 เท่ากับ 1.845 *แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยรวมมีคุณภาพบริสุทธิ์*

กลุ่มผู้ที่มีอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงบน พบค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอ ตั้งแต่ 2.55 ถึง 270.20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ย คือ 150.60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าเฉลี่ย A260/280 เท่ากับ 1.975 *แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยรวมมีคุณภาพบริสุทธิ์*

กลุ่มที่ระบุไม่ได้ว่ามีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์แต่ไม่ระบุว่าเป็นช่วงล่างหรือช่วงบน และระบุไม่ได้ว่าก่อนหรือหลังรักษา พบค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอ ตั้งแต่ 2.60 ถึง 99.60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ย คือ 73.63 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าเฉลี่ย A260/280 เท่ากับ 1.835 *แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยรวมมีคุณภาพบริสุทธิ์*

กลุ่มควบคุม พบค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอ ตั้งแต่ 2.30 ถึง 126.10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ย คือ 16.80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าเฉลี่ย A260/280 เท่ากับ 1.790 *แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยรวมมีโปรตีนปนเปื้อนเล็กน้อย*

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของจีโนมดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้จากกลุ่มผู้ที่มีอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่าง (**A**) กลุ่มผู้ที่มีอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงบน (**B**) กลุ่มที่ระบุไม่ได้ (**C**) และกลุ่มควบคุม (**D**)

A.

ลำดับ	ชื่อตัวอย่าง	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/µl)	A260/280
1	L1bf	38.30	1.65
2	L2bf	206.00	1.85
3	L2af	8.15	1.85
4	L3bf	33.00	1.62
5	L3af	65.95	1.86
6	L4bf	34.00	1.64
7	L5bf	77.20	1.80
8	L5af	18.85	1.89
9	L6bf	162.75	1.88
10	L7bf	37.90	1.84
11	L8bf	162.55	1.87
12	L9bf	197.20	1.86
13	L10bf	66.60	1.84
14	L10af	195.60	1.85
15	L11bf	47.50	1.87
16	L11af	169.50	1.86
17	L12bf	34.25	1.87
18	L12af	26.50	1.85
19	L13bf	80.05	1.84
20	L13af	223.50	1.86
21	L14bf	111.35	1.88
22	L14af	229.20	2.00
23	L15bf	171.45	1.85
24	L16bf	62.80	1.78
25	L16af	117.70	1.84
26	L17bf	17.05	1.77
27	L18bf	109.25	1.83
28	L18af	38.90	1.66
29	L19bf	77.15	1.89
30	L19af	151.60	1.85
31	L20bf	110.10	1.81
32	L21bf	6.50	1.44
33	L22bf	32.80	1.83
34	L22af	38.55	1.91

35	L23af	131.05	1.86
36	L24bf	81.60	1.84
37	L25bf	94.30	1.82
38	L26bf	49.55	1.88
39	L27bf	27.95	1.51
40	L27af	7.95	1.62
41	L28bf	271.00	1.82
42	L28af	18.25	1.41
43	L29bf	9.10	1.97
44	L30bf	244.60	1.84
45	L31bf	62.45	1.80
46	L32bf	83.60	2.01
47	L32af	93.25	2.01
48	L33bf	77.45	1.88
49	L33af	9.00	1.68
50	L34bf	35.25	2.00
51	L35bf	12.45	1.54
52	L36bf	14.10	1.63
53	L37bf	7.70	1.74
54	L37af	14.25	1.90
55	L38bf	295.20	1.85
56	L38af	65.55	1.93
57	L39bf	18.40	2.03
58	L39af	25.20	1.97
59	L40bf	59.90	2.14
60	L40af	63.70	2.04

B.

ลำดับ	**ชื่อตัวอย่าง**	**ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/µl)**	**A260/280**
1	U1bf	270.20	1.85
2	U1af	2.55	2.29
3	U2bf	12.80	1.94
4	U2af	32.50	1.92
5	U3bf	8.55	1.90
6	U3af	73.65	1.87
7	U4bf	331.45	1.83

8	U5bf	16.40	1.93
9	U6bf	6.50	1.65
10	U6af	6.25	2.03
11	U7bf	42.85	1.81
12	U7af	34.00	1.62
13	U8bf	42.00	1.28
14	U9bf	58.60	1.71
15	U10bf	23.80	1.26
16	U11bf	19.60	1.23
17	U12bf	59.50	1.77
18	U13bf	44.40	1.83
19	U14bf	265.50	1.83
20	U14af	76.70	1.83
21	U15bf	49.15	1.77
22	U16bf	67.05	1.78
23	U17bf	260.80	1.84
24	U18bf	54.25	1.85
25	U19bf	119.30	1.84
26	U20bf	154.45	1.84
27	U21bf	145.15	1.84
28	U22bf	2.95	1.62
29	U23bf	10.15	1.84
30	U24bf	63.60	1.84
31	U25bf	6.65	1.83
32	U26bf	219.00	1.88
33	U27bf	64.35	1.95
34	U28bf	224.65	1.87
35	U29bf	296.10	1.84
36	U30bf	19.20	1.73
37	U31bf	26.50	2.54
38	U32bf	150.30	1.95
39	U32af	14.00	2.99
40	U33bf	28.40	2.44
41	U34bf	30.80	2.57
42	U35bf	31.00	2.10

C.

ลำดับ	ชื่อตัวอย่าง	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/µl)	A260/280
1	U/L1bf	73.15	1.81
2	UN 1	26.70	1.75
3	UN 2	6.85	1.69
4	UN 3	25.80	2.00
5	UN 4	2.60	4.47
6	UN 5	99.60	1.86
7	UN 6	87.25	1.90
8	UN 7	78.20	1.85
9	UN 8	12.45	1.94
10	UN 9	10.15	1.97
11	UN10	74.10	1.86

D.

ลำดับ	ชื่อตัวอย่าง	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/µl)	A260/280
1	C1	4.30	1.77
2	C2	6.90	1.72
3	C3	22.40	1.86
4	C4	9.00	1.58
5	C5	6.70	1.97
6	C6	4.50	1.97
7	C7	33.30	1.89
8	C8	58.30	1.86
9	C9	14.00	1.68
10	C10	15.10	1.63
11	C11	100.50	1.86
12	C12	137.30	1.85
13	C13	20.20	1.73
14	C14	9.00	1.91
15	C15	21.20	1.77
16	C16	8.60	1.65
17	C17	2.70	1.87
18	C18	58.30	1.78
19	C19	35.20	1.92
20	C20	19.90	1.81

21	C21	18.40	1.93
22	C22	2.30	1.92
23	C23	6.00	1.94
24	C24	3.50	1.76
25	C25	28.00	1.80
26	C26	10.06	1.74
27	C27	17.50	1.61
28	C28	18.50	1.74
29	C29	38.10	1.84
30	C30	11.90	1.69
31	C31	34.40	1.68
32	C32	19.20	2.07
33	C33	49.80	1.90
34	C34	18.20	2.01
35	C35	35.40	1.95
36	C36	11.10	2.19
37	C37	8.10	1.97
38	C38	19.10	1.83
39	C39	17.50	1.87
40	C40	37.20	1.86
41	C41	45.40	1.81
42	C42	126.10	1.85
43	C43	31.30	1.81
44	C44	24.60	1.70
45	C45	34.80	1.85
46	C46	28.20	1.88
47	C47	31.30	1.83
48	C48	26.30	1.81
49	C49	53.90	1.74
50	C50	27.40	1.66
51	C51	23.90	1.83
52	C52	32.30	1.81
53	C53	18.00	1.72
54	C54	72.80	1.76
55	C55	69.30	1.83
56	C56	61.20	1.79

57	C57	76.90	1.84
58	C58	29.30	1.81

ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ทำพีซีอาร์ยีน *C. trachomatis ompA*

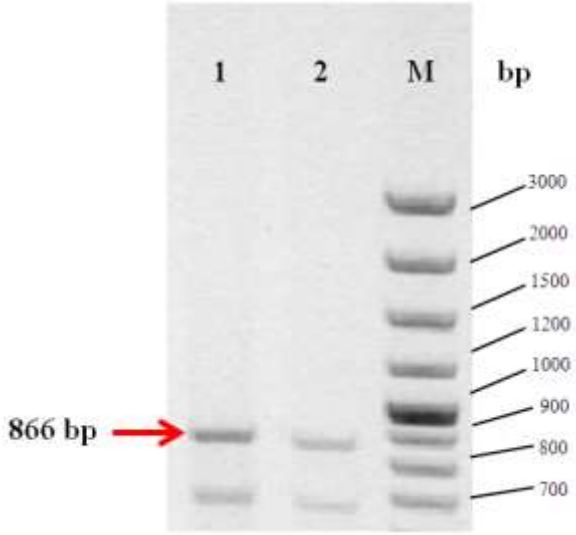
ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ต่อยีน *ompA* ของ *C. trachomatis* ด้วย BLASTN ใน NCBI พบว่ายีนนี้มีความจำเพาะเฉพาะต่อคลามัยเดีย โดยพบค่าเปอร์เซ็นต์ครอบคลุม query coverage ตั้งแต่ 80-100% (ค่าเปอร์เซ็นต์ครอบคลุมเฉลี่ย = 92%) และค่า E-value ตั้งแต่ 2e-06 ถึง 0.027

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *ompA*

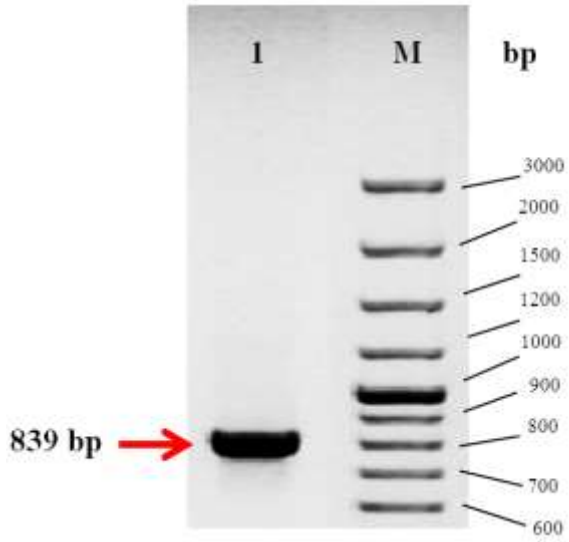
เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครบสมบูรณ์สำหรับยีน *ompA* ซึ่งมีความยาว 666-1195 ลำดับเบส (base pairs; bp) ขึ้นกับ serovar จึงต้องแบ่งส่งซีเควนซิ่งสองช่วง (จากนี้ไปขอเรียกว่า *ompA* ครึ่งแรก และ *ompA* ครึ่งหลัง) ในงานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์สองชุดเพื่อเพิ่มประมาณดีเอนเอและส่งซีเควนซิ่งของ *ompA* ครึ่งแรก และ *ompA* ครึ่งหลัง โดยผลิตภัณฑ์ *ompA* ครึ่งแรกมีขนาด 866 bp และผลิตภัณฑ์ *ompA* ครึ่งหลังมีขนาด 839 bp

รูปที่ 3 แสดงผลิตภัณฑ์ *ompA* ครึ่งแรกและครึ่งหลัง ของตัวอย่างจากกลุ่มผู้ที่มีอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ ความยาวของผลิตภัณฑ์เป็นตามที่คาดไว้คือ *ompA* ครึ่งแรกที่ประมาณ 866 bp และ *ompA* ครึ่งหลังที่ประมาณ 839 bp ทั้งนี้ ตัวอย่างควบคุมลบ (ใส่น้ำแทนดีเอ็นเอ) และตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีอาการ ไม่ให้ผลิตภัณฑ์ และให้ผลิตภัณฑ์ที่ผิดขนาด ตามลำดับ และสำหรับกรณีหลังเมื่อส่งซีเควนซิ่งผลิตภัณฑ์ที่ผิดขนาดให้ผลว่าไม่ใช่คลามัยเดีย (ไม่แสดงผล)

A.



B.



รูปที่ 3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ *ompA* ครั้งแรก (**A**) และของ *ompA* ครั้งหลัง (**B**) โดยในภาพ **A** แถวที่ 1 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ *ompA* ครั้งแรกจากตัวอย่าง L11bf แถวที่ 2 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ *ompA* ครั้งแรกจากตัวอย่าง L11af และแถว M แสดง 100 bp Plus DNA ladder ภาพ **B** แถวที่ 1 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ *ompA* ครั้งหลังจากตัวอย่าง U28bf และแถว M แสดง 100 bp Plus DNA ladder

อัตราผู้ติดเชื้อ ชนิดของกลุ่มพื้นฐาน และรูปแบบการติดเชื้อของ *C. trachomatis* ในกลุ่มต่าง ๆ

ในกลุ่มผู้หญิงที่มีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่างอักเสบ พบจำนวนผู้ติดเชื้อคลามัยเดียทั้งสิ้น 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 12.82 เมื่อแบ่งตามกลุ่มพื้นฐาน พบ serovars D มากที่สุด รองลงมาคือ E, F และ H และสามารถระบุรูปแบบการติดเชื้อแบบแอบแฝงได้ 1 ตัวอย่าง (serovar D) (**ตารางที่ 2A**) ในกลุ่มผู้หญิงที่มีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่าง พบจำนวนผู้ติดเชื้อคลามัยเดียทั้งสิ้น 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 36.67 เมื่อแบ่งตามกลุ่มพื้นฐาน พบ serovar D และ E มากที่สุด รองลงมาคือ F ตามด้วย G, H และ K และสามารถระบุรูปแบบการติดเชื้อแบบแอบแฝงได้ 4 ตัวอย่าง ซึ่งเกิดจาก *C. trachomatis* serovars D, E และ F (**ตารางที่ 2B**) ทั้งนี้ ตัวอย่างจากกลุ่มที่ระบุไม่ได้ และจากกลุ่มควบคุมทุกตัวอย่างพบว่าไม่มีผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ แสดงว่าทุกตัวอย่างไม่พบการติดเชื้อคลามัยเดีย คิดเป็นร้อยละ 0.00 (ไม่แสดงผล)

ตารางที่ 2 จำนวนผู้ติดเชื้อ ชนิดของกลุ่มพื้นฐาน และรูปแบบการติดเชื้อของ *C. trachomatis* ในกลุ่มผู้ที่มีอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงล่าง (**A**) และกลุ่มผู้ที่มีอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงบน (**B**)

A.

อายุ	ชื่อตัวอย่าง	ก่อน/หลังรักษา	พบคลามัยเดียหรือไม่	หากพบเป็น serovar	รูปแบบการติดเชื้อ
15	L8bf	ก่อน	พบ	E	ยังระบุไม่ได้
16	L1bf	ก่อน	พบ	F	ยังระบุไม่ได้
17	L26bf	ก่อน	ไม่พบ		
18	L9bf	ก่อน	ไม่พบ		
19	L37bf	ก่อน	ไม่พบ		

19	L37af	หลัง	ไม่พบ		
20	L12bf	ก่อน	ไม่พบ		
20	L12af	หลัง	ไม่พบ		
20	L35bf	ก่อน	พบ	D	ยังระบุไม่ได้
21	L4bf	ก่อน	ไม่พบ		
21	L10bf	ก่อน	ไม่พบ		
21	L10af	หลัง	ไม่พบ		
22	L17bf	ก่อน	ไม่พบ		
22	L38bf	ก่อน	ไม่พบ		
22	L38af	หลัง	ไม่พบ		
23	L6bf	ก่อน	ไม่พบ		
23	L33bf	ก่อน	ไม่พบ		
23	L33af	หลัง	ไม่พบ		
23	L34bf	ก่อน	ไม่พบ		
24	L24bf	ก่อน	ไม่พบ		
24	L36bf	ก่อน	ไม่พบ		
26	L13bf	ก่อน	ไม่พบ		
26	L13af	หลัง	ไม่พบ		
27	L2bf	ก่อน	ไม่พบ		
27	L2af	หลัง	ไม่พบ		
28	L11bf	ก่อน	พบ	D	แอบแฝง
28	L11af	หลัง	พบ	D	แอบแฝง
28	L14bf	ก่อน	ไม่พบ		
28	L14af	หลัง	ไม่พบ		
29	L18bf	ก่อน	ไม่พบ		
29	L18af	หลัง	ไม่พบ		
30	L29bf	ก่อน	ไม่พบ		
30	L31bf	ก่อน	ไม่พบ		
31	L32bf	ก่อน	ไม่พบ		
31	L32af	หลัง	ไม่พบ		
33	L7bf	ก่อน	ไม่พบ		
33	L25bf	ก่อน	ไม่พบ		
34	L27bf	ก่อน	ไม่พบ		
34	L27af	หลัง	ไม่พบ		
34	L28bf	ก่อน	ไม่พบ		
34	L28af	หลัง	ไม่พบ		

35	L30bf	ก่อน	ไม่พบ		
35	L39bf	ก่อน	ไม่พบ		
35	L39af	หลัง	ไม่พบ		
36	L20bf	ก่อน	ไม่พบ		
36	L22bf	ก่อน	ไม่พบ		
36	L22af	หลัง	ไม่พบ		
36	L23af	หลัง	พบ	H	ระบุไม่ได้
42	L16bf	ก่อน	ไม่พบ		
42	L16af	หลัง	ไม่พบ		
44	L5bf	ก่อน	ไม่พบ		
44	L5af	หลัง	ไม่พบ		
45	L21bf	ก่อน	ไม่พบ		
47	L19bf	ก่อน	ไม่พบ		
47	L19af	หลัง	ไม่พบ		
ไม่ระบุ	L3bf	ก่อน	ไม่พบ		
ไม่ระบุ	L3af	หลัง	ไม่พบ		
ไม่ระบุ	L15bf	ก่อน	ไม่พบ		

B.

อายุ	ชื่อตัวอย่าง	ก่อน/หลัง รักษา	พบคลามัยเดีย หรือไม่	หากพบ เป็น serovar	รูปแบบการติดเชื้อ
15	U1bf	ก่อน	พบ	D	แอบแฝง
15	U1af	หลัง	พบ	D	แอบแฝง
16	U18bf	ก่อน	พบ	G	ระบุไม่ได้
16	U28bf	ก่อน	ไม่พบ	E	ระบุไม่ได้
16	U31bf	ก่อน	พบ	G	ระบุไม่ได้
16	U32bf	ก่อน	ไม่พบ		
16	U32af	หลัง	ไม่พบ		
17	U4bf	ก่อน	ไม่พบ	E	ระบุไม่ได้
17	U17bf	ก่อน	ไม่พบ		
17	U23bf	ก่อน	ไม่พบ		
19	U20bf	ก่อน	พบ	H	ระบุไม่ได้
19	U35bf	ก่อน	ไม่พบ		
20	U29bf	ก่อน	พบ	F	ระบุไม่ได้
21	U2bf	ก่อน	พบ	E	แอบแฝง

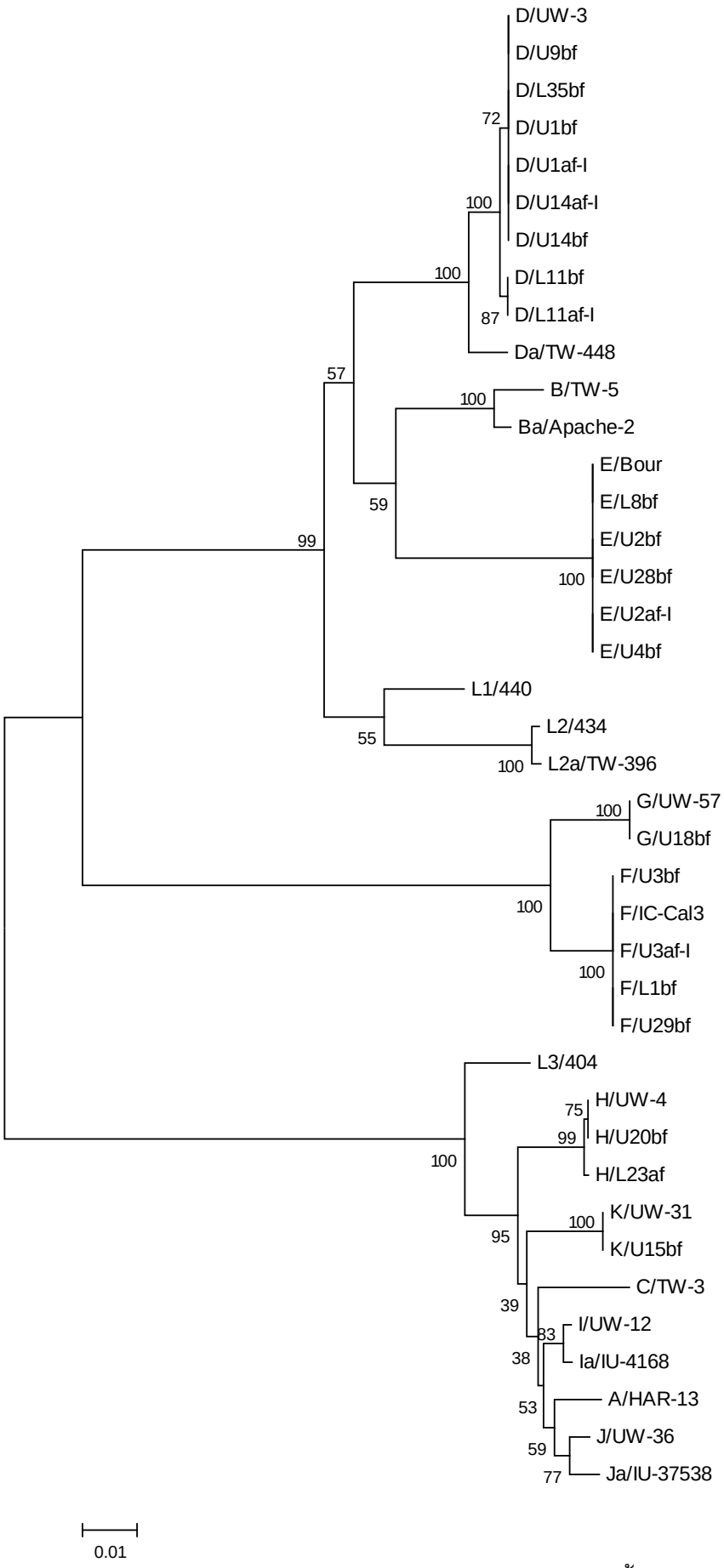
21	U2af	หลัง	พบ	E	แอบแฝง
21	U24bf	ก่อน	ไม่พบ		
22	U10bf	ก่อน	ไม่พบ		
22	U15bf	ก่อน	พบ	K	ระบุไม่ได้
22	U19bf	ก่อน	ไม่พบ		
23	U7bf	ก่อน	ไม่พบ		
24	U16bf	ก่อน	ไม่พบ		
24	U34bf	ก่อน	ไม่พบ		
25	U30bf	ก่อน	ไม่พบ		
26	U9bf	ก่อน	พบ	D	ระบุไม่ได้
26	U14bf	ก่อน	พบ	D	แอบแฝง
26	U14af	หลัง	พบ	D	แอบแฝง
26	U25bf	ก่อน	ไม่พบ		
26	U33bf	ก่อน	ไม่พบ		
29	U5bf	ก่อน	ไม่พบ		
29	U27bf	ก่อน	ไม่พบ		
31	U11bf	ก่อน	ไม่พบ		
32	U3bf	ก่อน	พบ	F	แอบแฝง
32	U3af	หลัง	พบ	F	แอบแฝง
36	U21bf	ก่อน	ไม่พบ		
40	U26bf	ก่อน	ไม่พบ		
43	U8bf	ก่อน	ไม่พบ		
48	U13af	หลัง	ไม่พบ		
53	U22bf	ก่อน	ไม่พบ		
53	U22af	หลัง	ไม่พบ		
ไม่ระบุ	U6bf	ก่อน	ไม่พบ		
ไม่ระบุ	U12bf	ก่อน	ไม่พบ		

เมื่อวิเคราะห์จำนวนผู้ที่ติดเชื้อคลามัยเดียทั้งหมด พบความหลากหลายของ serovars ของ *C. trachomatis* ที่พบในประเทศไทยในกลุ่มผู้หญิงที่มีอาการอักเสบของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ ประกอบด้วย D ร้อยละ 31.25 E ร้อยละ 25.00 F ร้อยละ 18.75 H ร้อยละ 12.50 G และ K ในสัดส่วนเท่ากันอย่างละร้อยละ 6.25

วิวัฒนาการทางต้นไม้และความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *ompA* ของ *C. trachomatis* จากผู้ติดเชื้อเปรียบเทียบกับ 19 กลุ่มพื้นฐานที่ใช้อ้างอิง

วิวัฒนาการทางต้นไม้ของยีน *ompA* ของ *C. trachomatis* ในกลุ่มผู้ที่มีอาการอักเสบช่วงบน พบว่าสายพันธุ์ที่ได้ไม่แตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์อ้างอิง แต่ในกลุ่มผู้ที่มีอาการอักเสบช่วงล่าง พบสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างทาง

พันธุกรรมกับสายพันธุ์อ้างอิง คือ L11bf และ L23bf (**รูปที่ 4**) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกับสายพันธุ์อ้างอิงในบริเวณ variable region ของ ยีน *ompA* โดยตัวอย่าง L11bf มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากสายพันธุ์อ้างอิงถึง 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งที่ 1 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 258 ในบริเวณ hotspot ที่แยกกลุ่ม serovar B, Ba, D, Da และ L_1 ถึง L_3 ออกจาก serovar อื่นโดยเปลี่ยนลำดับเบสจาก C เป็น G และตำแหน่งที่ 2 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 434 ในบริเวณ hotspot ที่แยกกลุ่ม serovar D, Da, F, G, L_1, L_2 และ L_2a ออกจาก serovar อื่นโดยเปลี่ยนลำดับเบสจาก G เป็น C และตัวอย่าง L23bf มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกับสายพันธุ์อ้างอิง 2 ตำแหน่งในบริเวณ hotspot ที่แยกกลุ่ม serovar Ba, และ L_1 ออกจาก serovar อื่น ตำแหน่งที่ 1 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 270 โดยเปลี่ยนลำดับเบสจาก C เป็น A และตำแหน่งที่ 2 คือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 271 โดยเปลี่ยนลำดับเบสจาก A เป็น C

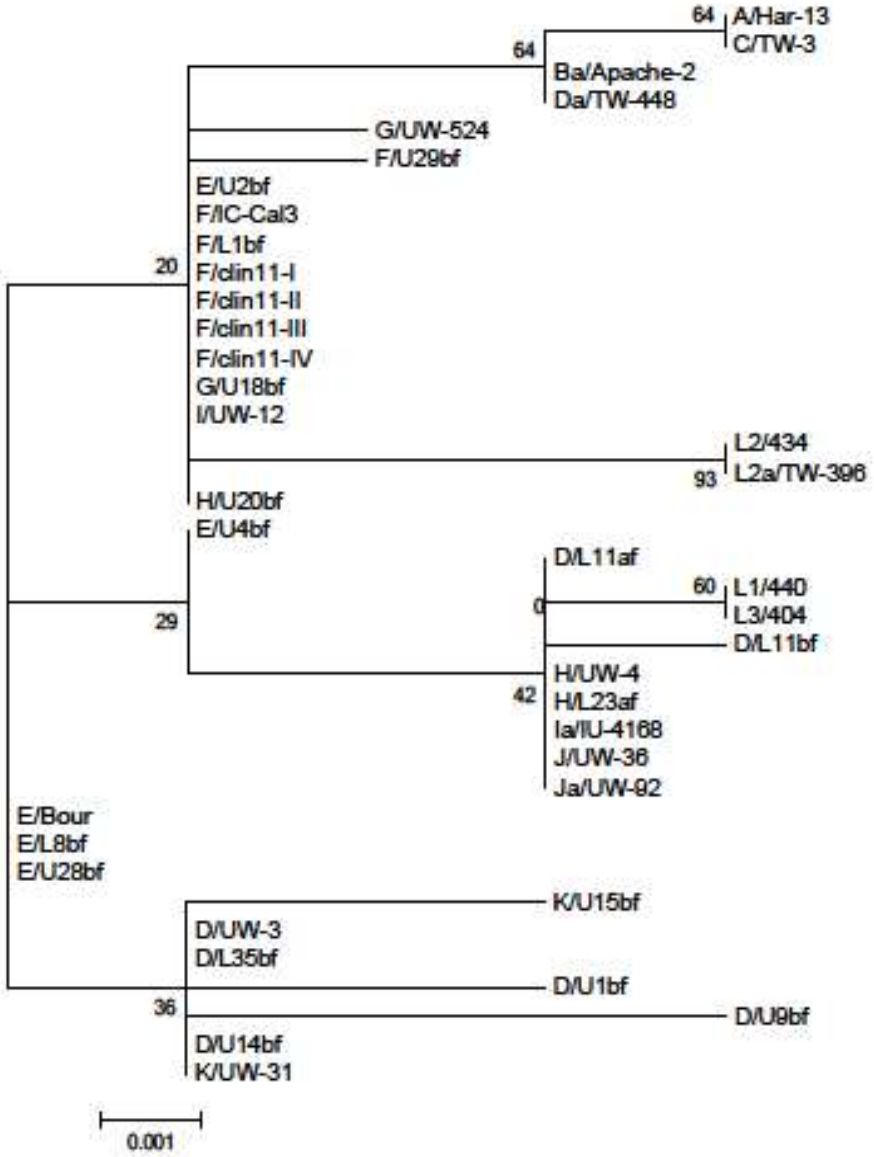


รูปที่ 4 วิวัฒนาการทางต้นไม้ของยีน *ompA* ของ *C. trachomatis* จากตัวอย่างผู้ติดเชื้อเปรียบเทียบกับ 19 สายพันธุ์อ้างอิง โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 ระยะห่างของเส้นระหว่างแต่ละตัวอย่างสัมพันธ์กับระยะห่างทางพันธุกรรมของ

ompA ตัวเลขที่กิ่งของต้นไม้ระบุร้อยละของความน่าเชื่อถือจาก 1,000 bootstrap replicates และตัวเลขข้างล่างซ้ายคือหน่วยความยาวของกิ่งซึ่งรวมทั้งหมด เป็น 1.00

วิวัฒนาการทางต้นไม้และความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *trpA* ของ *C. trachomatis* จากผู้ติดเชื้อเปรียบเทียบกับ 19 กลุ่มพื้นฐานที่ใช้อ้างอิง

วิวัฒนาการทางต้นไม้ของยีน *trpA* ของ *C. trachomatis* (**รูปที่ 5**) นอกจากจะสามารถจับกลุ่ม serovars ของคลามัยเดียตรงตามกลุ่มก่อโรคได้ดีกว่าต้นไม้ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ompA* (**รูปที่ 5)** แล้ว ยังพบมิวเทชั่นที่น่าสนใจในตัวอย่างเชื้อ D จากคนไข้หมายเลข 11 ก่อนและหลังรักษา (D/L11bf, D/L11af) ที่ทำให้เชื้อจากคนไข้นี้ถูกจัดกลุ่ม H, Ia, J, Ja, L1 และ L3 แทนกลุ่ม D และเชื้อ D/L11 อาจเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากพบมิวเทชั่นทั้งที่ *ompA* และ *trpA*



รูปที่ 5 วิวัฒนาการทางต้นไม้ของยีน *trpA* ของ *C. trachomatis* จากตัวอย่างผู้ติดเชื้อเปรียบเทียบกับ 19 สายพันธุ์อ้างอิง โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 ระยะห่างของเส้นระหว่างแต่ละตัวอย่างสัมพันธ์กับระยะห่างทางพันธุกรรมของ *ompA* ตัวเลขที่กิ่งของต้นไม้ระบุร้อยละของความน่าเชื่อถือจาก 1,000 bootstrap replicates และตัวเลขข้างล่างซ้ายคือหน่วยความยาวของกิ่งซึ่งรวมทั้งหมด เป็น 1.00

สรุปผล

ผลการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงประมาณ 1.8 – 2.0 ซึ่งแสดงว่าจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดโดยวิธีที่ใช้มีความบริสุทธิ์ จากการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ต่อยีน *ompA* ของ *C. trachomatis* พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความจำเพาะสูงต่อยีน *ompA* ของ *C. trachomatis* จึงเหมาะที่จะใช้นำมาใช้ในโครงงานวิจัยนี้ และไพรเมอร์ดังกล่าวยังใช้กันอย่างแพร่หลายในกลุ่มผู้วิจัยคลามัยเดีย ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *ompA* โดยวิธีพีซีอาร์ได้ผลตามที่คาดหวังโดยพบความยาวของผลิตภัณฑ์ *ompA* ทั้งครึ่งแรกและครึ่งหลังตามขนาดที่ต้องการ และจากการหาอัตราผู้ติดเชื้อ ชนิดของกลุ่มพื้นฐาน และรูปแบบการติดเชื้อของ *C. trachomatis* ในผู้หญิงที่มีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ พบผู้ติดเชื้อคลามัยเดียส่วนใหญ่ในกลุ่มผู้หญิงที่มีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงบน แม้ว่าจะทำการเก็บเชื้อที่บริเวณปากมดลูกซึ่งจำนวนผู้ติดเชื้อที่แท้จริงน่าจะมีมากกว่านี้อีก ชี้ให้เห็นว่ามีอัตราการติดเชื้อ *C. trachomatis* ในกลุ่มผู้หญิงที่มีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ช่วงบนมีมากกว่าช่วงล่าง อีกทั้งพบการติดเชื้อคลามัยเดียแบบแอบแฝงคิดเป็นร้อยละ 100 ของตัวอย่างทั้งหมดที่สามารถระบุรูปแบบการติดเชื้อได้ เน้นความสำคัญของรูปแบบการติดเชื้อแบบแอบแฝงว่ามีอยู่จริง และควรสนับสนุนการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในด้านนี้ ทั้งนี้อัตราการติดเชื้อ *C. trachomatis* ที่พบค่อนข้างต่ำ อาจมีสาเหตุมาจาก การติดเชื้อด้วย แบคทีเรียชนิดอื่นที่แสดงอาการของโรคคล้ายคลึงกัน เช่น *N. gonorrhoeae* การสูญเสียปริมาณของแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษา และเทคนิคในการทำการทดลองของผู้วิจัย และเมื่อพิจารณาหาความสัมพันธ์ระหว่างอายุของกลุ่มผู้หญิงที่มีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์และการติดเชื้อ พบว่าอายุไม่มีความสัมพันธ์กับรูปแบบการติดเชื้อแบบแอบแฝงเนื่องจากสามารถพบการติดเชื้อแบบแอบแฝงได้ในหลายช่วงอายุ ด้านความหลากหลายของคลามัยเดีย พบคลามัยเดียทั้งสิ้น 6 กลุ่มพื้นฐาน กล่าวคือ พบ serovar D มากที่สุด ตามมาด้วย serovar E, F, H ตามลำดับ และสุดท้ายคือ serovar G และ K ในสัดส่วนเท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยในประเทศไทยที่มีมาก่อน (Yamazaki *et al*., 2005; Franceschi *et al*., 2007) และผลสำรวจของ CDC ทั่วโลก (CDC, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่า *C. trachomatis* serovar D จากตัวอย่างคนไข้ที่เก็บได้มีความน่าสนใจมากทั้งในด้านของการติดเชื้อแบบแอบแฝงและการกระจาย และควรมีการศึกษาต่อในลำดับถัดไป นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *ompA* ที่ใช้บ่งชี้และจำแนกกลุ่มพื้นฐานของ *C. trachomatis* พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *ompA* ของ *C. trachomatis* เทียบกับ 19 กลุ่มพื้นฐานที่ใช้อ้างอิงในกลุ่มช่วงล่าง แต่ยังอยู่ภายใต้กลุ่มวิวัฒนาการทางต้นไม้กับสายพันธุ์อ้างอิงเดิม ไม่มีผลต่อการจำแนก serovar ของ *C. trachomatis* แสดงว่าคลามัยเดียที่พบ ไม่ค่อยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *ompA* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง สำหรับการวิเคราะห์ยีน *trpA* พบมิวเทชั่นที่น่าสนใจในตัวอย่างเชื้อ D จากคนไข้หมายเลข 11 ก่อนและหลังรักษา (D/L11bf, D/L11af) ซึ่งเชื้อ D/L11 นี้อาจควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากพบมิวเทชั่นทั้งที่ *ompA* และ *trpA* โดยยีนทั้งสองนี้มีความสำคัญต่อคลามัยเดียในการเลือกชนิดของเนื้อเยื่อของเจ้าบ้านที่จะติดเชื้อ และต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนทริปโทเฟน ตามลำดับ

จากการทำงานวิจัยนี้ พบว่าปัญหาการติดเชื้อในรูปแบบแอบแฝงของคลามัยเดียนั้นมีอยู่จริง และนับเป็นปัญหาที่สำคัญเนื่องจากพบการติดเชื้อคลามัยเดียแบบแอบแฝงถึงร้อยละ 100 ของตัวอย่างทั้งหมดที่สามารถระบุรูปแบบการติดเชื้อได้ ดังนั้น การตระหนักถึงการติดเชื้อคลามัยเดียในรูปแบบแอบแฝง รวมถึงปัญหาที่เกิดขึ้นได้จากการรักษาและการติดเชื้อเป็นระยะเวลานาน นับเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยป้องกันปัญหาที่ร้ายแรงที่ไม่อาจแก้ไขได้ที่อาจตามมา เช่น การเป็นหมัน และตาบอดในเด็ก เป็นต้น ผลของโครงงานวิจัยนี้มีประโยชน์ต่อการพัฒนาแนวทางการรักษาและการป้องกันโรคให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อสู่คู่สมรสหรือบุตรที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื้อ

ปัญหาและอุปสรรค

- มีผู้ติดเชื้อเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลที่ทำการเก็บตัวอย่างในจำนวนน้อยกว่าที่คาดไว้มาก ทำให้การเก็บตัวอย่างใช้เวลานาน
- มีผู้ติดเชื้อหลายคนเมื่อรักษาโดยการรับประทานยาเสร็จแล้วไม่กลับมาพบแพทย์ ทำให้จำนวนตัวอย่างหลังการรักษาขาดไปในหลายผู้ป่วย
- ผลกระทบจากวิกฤตน้ำท่วมปี 2554 ทำให้การเก็บตัวอย่างหยุดชะงัก
- แพทย์ผู้เก็บตัวอย่างไม่สามารถระบุอาการอักเสบว่าเป็นช่วงล่างหรือช่วงบนในบางกรณี และบางตัวอย่างข้อความตัวอย่างเลือนจนมองไม่เห็นเนื่องจากถูกเขียนไม่ได้ (11 ตัวอย่างในกลุ่มที่ระบุไม่ได้ว่ามีอาการของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์แต่ไม่ระบุว่าเป็นช่วงล่างหรือช่วงบน และระบุไม่ได้ว่าก่อนหรือหลังรักษา) ทำให้จำนวนตัวอย่างยิ่งลดลงไปอีก

บรรณานุกรม

1. Beagley KW, Timms P. Review: *Chlamydia trachomatis* infection: incidence, health costs and prospects for vaccine development. *J Reprod Immunol* 2000; **48**:47-68.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), “Sexually transmitted disease surveillance 2010,” pp. 7-16 and 89-100, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 2011.
3. Dean D, Suchland R, Stamm W. Evidence for long-term cervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by omp1 genotyping. *J Infect Dis* 2000; **182**:909-16.
4. Dean D, Powers VC. Persistent *Chlamydia trachomatis* infections resist apoptotic stimuli. *Infection and Immunity* 2001; **69**:2442-7.
5. Franceschi S, Smith JS, Brule AVD, Herrero R, Arslan A, Anh P, et al. Cervical infection with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in women from ten areas in four continents. *Sex Trans Dis* 2007; **34**:563-69.
6. Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, Summersgill JT, Timms P. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infection and Immunity* 2004; **72**:1843-55.
7. James H. Chlamydia persistence a tool to dissect chlamydia host interactions. *Microbes and Infection* 2011; **13**: 649-662.
8. Kahane S, Friedman MG. Reversibility of heat shock in *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Microbiol Lett* .1992; **97**:25-30.
9. Lycke E, Löwhagen GB, Hallhagen G, Johannisson G, Ramstedt K. The risk of transmission of genital *Chlamydia trachomatis* infection is less than that of genital *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Sexually Transmitted Diseases* 1980; **7(1)**: 6-10.
10. Matsumoto A, Manire GP. Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol* 1970; **101**:278-85.
11. Mpiga P, Ravaoarinoro M. Chlamydia trachomatis persistence: an update. *Microbiol Res* 2006; **161**:9-19.
12. Paz-Bailley G, Kilmarx PH, Supawitkul S, Chaowanachan T, Jeeyapant S, Sternberg M, et al. Risk factors for sexually transmitted diseases in northern Thai adolescents: an audio-computer assisted self-interview with noninvasive specimen collection. *Sex Transm Dis* 2003; **30**:320-6.
13. Raulston JE. Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction *in vitro* and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infection and Immunity* 1996; **65**:4539-47.
14. Robert C, Brunham R, José R. Immunology of chlamydia infection : implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nature Publishing Group* 2005; **5**: 149-161.
15. Rugpao S, Rungruengthanakit K, Werawatanakul Y, Sinchai W, Ruengkris T, Lamlertkittikul S, et al. Risk factors and algorithms for chlamydial and gonococcal cervical infections in women attending family planning clinics in Thailand. *J Obstet Gynaecol Res* 2010; **36**:147-53.

16. Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D, Papp JR, Black CM, Unger ER. Association of *Chlamydia trachomatis* with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *American Journal of Epidemiology* 2005; **162(7)**: 668-675.
17. Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Törnberg S, Hansson BG, et al. *Chlamydia trachomatis* infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer* 1005; **116**:110-5.
18. Somboonna N, Mead S, Liu J, Dean D. Discovering and dfferentiating new and emerging clonal populations of *Chlamydia trachomatis* with a novel shotgun cell culture harvest assay. *Emerging Infect Dis* 2008; **14**(3): 445-453.
19. Somboonna N, Sukonpan K, Sayasathid S. การติดเชื้อแบบแอบแฝงของคลามัยเดียที่ก่อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์. *พุทธชินราชเวชสาร* 2010; **27**:519-24.
20. Somboonna N, Charuchinda P. ความหลากหลายของกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนทริปโทเฟนมีผลต่อรูปแบบการติดเชื้อที่ต่างกันของคลามัยเดีย. *พุทธชินราชเวชสาร* 2010; **28**(3): 287-295.
21. Somboonna N, Wan R, Ojcius DM, Pettengill MA, Joseph SJ, Chang A, Hsu R, Read TD, Dean D. Hypervirulent *Chlamydia trachomatis* clinical strain is a recombinant between lymphogranuloma venereum (L_2) and D lineages. mBio 2011; **2**(3): e00045-11 (doi:10.1128/mBio.00045-11).
22. Somboonna N. การคงอยู่แบบแอบแฝงของเชื้อคลามัยเดียหลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในหญิงที่ติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์. *พุทธชินราชเวชสาร* 2012; **29**(1): 108-113.
23. Vonck RA, Darville T, O'Connell CM, Jerse AE. Chlamydial infection increases gonococcal colonization in a novel murine coinfection model. *Infection and Immunity* 2011; **79(4)**:1566-77.
24. Yamazaki T, Hagiwara T, Kishimoto T, Sasaki N, Takahashi S, Ishihara O, et al. Distribution of *Chlamydia trachomatis* serovars among female prostitutes and non-prostitutes in Thailand, and non-prostitutes in Japan during the mid-90s. *Jpn J Infect Dis* 2005; **58**:211-3.
25. http://www.siamhealth.net/public_html/Disease/infectious/std/Clamydia.htm (access data 25 มกราคม พ.ศ.2555)
26. http://healthy.in.th/disease/pelvic%20inflammatory%20disease/ (access data 25 มกราคม พ.ศ.2555)
27. http://www.lovecarestation.com/th/cms/detail.php?id=61 (access data 25 มกราคม พ.ศ.2555)
28. *http://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydia_trachomatis* (access data 27 มกราคม พ.ศ.2555)
29. http://www.cdc.gov/std/treatment/2006/pid.htm (access data 13 กุมพาพันธ์ พ.ศ.2555)

ภาคผนวก

ดร.นราพร สมบูรณ์นะ

ตำแหน่งวิชาการปัจจุบัน อาจารย์

สถานที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-218-5094

โทรสาร 02-252-7576

E-mail: Naraporn.S@chula.ac.th

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ปี 2553 – ปัจจุบัน	อาจารย์ประจำ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปี 2553 – ปัจจุบัน	คณะทำงานระดมทุน คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปี 2553 – ปัจจุบัน	หัวหน้าคณะทำงานระดมทุน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปี 2555 – ปัจจุบัน	อาจารย์ประสานงานหลักสูตรจุลชีววิทยาประยุกต์ (นานาชาติ) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปี 2555 – ปัจจุบัน	อาจารย์ประสานงานกิจการต่างประเทศ และสำนักวิรัชกิจ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปี 2551 – 2553	นักวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สวทช.
ปี 2552	อาจารย์พิเศษ วิชา SCBT609: Biology and pathobiology of shrimp คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ปี 2552 – 2553	อาจารย์พิเศษ วิชาวิทยาศาสตร์และสิ่งแวดล้อม โรงเรียนสาธิตมัธยมสวนสุนันทา
ปี 2551	ปริญญาเอก สาขาวิศวกรรมชีวภาพ (Bioengineering) มหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย เบิร์คเล่ย์ และมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย ซานฟรานซิสโก
ปี 2548	ปริญญาโท สาขาโรคติดต่อและภูมิคุ้มกันวิทยา มหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย เบิร์กลีย์
ปี 2544	ปริญญาตรี (เกียรตินิยม อันดับ1) สาขาแบคทีเรีย มหาวิทยาลัยวิสคอนซิน เมดิสัน
ปี 2544	ปริญญาตรี สาขาชีววิทยาระดับโมเลกุลและเซลล์ มหาวิทยาลัยวิสคอนซิน เมดิสัน
ปี 2540	มัธยมศึกษาปีที่ 6 สายวิทยาศาสตร์ โรงเรียนเอเธลวอลค์เกอร์ รัฐคอนเนคติคัต
ปี 2539	รับทุนกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เพื่อศึกษาต่อขั้นปริญญาตรี-โท-เอก ประเทศสหรัฐอเมริกา
ปี 2539	มัธยมศึกษาปีที่ 5 (โล่ห์เกียรติยศ และบัตรเกียรติยศประเภทที่ 1) สายวิทยาศาสตร์ โรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปี 2538	สอบเทียบมัธยมศึกษาปีที่ 6 และเอ็นทรานซ์ติดจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปี 2529 – 2538	ประถมศึกษาปีที่ 1 ถึงมัธยมศึกษาปีที่ 4 (บัตรเกียรติยศประเภทที่ 2 เป็นประจำเกือบทุกปี) โรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานบริการวิชาการและสังคม

ปี 2551 - 2552 อาจารย์ดูแลรับผิดชอบวิทยานิพนธ์ นักศึกษาปริญญาตรี ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปี 2552 อาจารย์ดูแลรับผิดชอบวิทยานิพนธ์ นักศึกษาปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยบางมด

ปี 2552 – ปัจจุบัน กรรมการวิทยานิพนธ์ภายนอก นิสิตปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี 2552 – ปัจจุบัน อาจารย์ดูแลรับผิดชอบวิทยานิพนธ์ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ หาวิทยาลัยมหิดล

ปี 2553 – ปัจจุบัน กรรมการคณะทำงานระดมมทุน คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี 2553 - ปัจจุบัน อาจารย์ดูแลรับผิดชอบวิทยานิพนธ์ นักศึกษาปริญญาตรี ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี 2554 - ปัจจุบัน คณะกรรมการตัดสินผลงานในการแข่งขัน “The Hitachi Trophy” คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี 2554 – ปัจจุบัน Reviewer, African Journal of Biotechnology (AJB), ISI impact factor 0.565

ปี 2554 – ปัจจุบัน Reviewer, Electronic Journal of Biotechnology (EJB), ISI impact factor 0.865

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

จุลชีววิทยา โรคติดต่อชนิดแอบแฝงหรือดื้อยา พันธุกรรม เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ

บทความในวารสารวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

Diep BA, Sensabaugh GF, **Somboonna N**, Carleton HA, Perdreau-Remington F. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. J Clin Microbiol 2004; 42(5): 2080-2084. (impact factor = 4.153, citation index = 127, Journal Citation Reports 2007)

Sayasathid J, **Somboonna N**, Numchaisiri J. Case report paraplegia after thoracotomy for division and suture Patent Ductus Arteriosus (PDA). J Med Assoc Thai 2006; 89 (12): 2142-2144. (impact factor = 0.080)

Somboonna N, Mead S, Liu J, Dean D. Discovering and dfferentiating new and emerging clonal populations of *Chlamydia trachomatis* with a novel shotgun cell culture harvest assay. Emerging Infect Dis 2008; 14(3): 445-453. (impact factor = 5.775)

Sayasathid J, Tantiwongkosri K, **Somboonna N**. Unrecognized congenital heart disease among Thai children. J Med Assoc Thai. 2009; 92(3): 356-359. (impact factor = 0.080)

Somboonna N, Dean D. Limited genomes and gene transfer in the evolution of intracellular parasitism and symbiosis. *In* U.E. Schaible, and A. Haas (eds.), Intracellular niches of pathogens – a microbe’s guide through the host cell. Wiley-VCH Press, Weinheim, Germany. 2009; pp. 21-32.

Sayasathid J, Supachokchaipattana P, Pipatvech K, Sukonpan K, **Somboonna N**, Pannarunothai S. The prevalence of unrecognized congenital heart disease among the elementary school students in lower northern Thailand. Asian Biomed. 2010; 4(1): 171-175. (impact factor = 0.872)

Somboonna N, Mangkalanan S, Krittanai C, Sritunyalucksana K, Flegel TW. Mud crab susceptibility to disease from white spot syndrome virus is species-dependent. BMC Res Notes 2010; 3: 315. (impact factor is still unreleased, estimated ~ 3.000)

Somboonna N, Sukhonpan K, Sayasathid J. Persistence of *Chlamydia trachomatis* sexually transmitted diseases **การติดเชื้อแบบแอบแฝงของคลามัยเดียที่ก่อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์**. Buddhachinaraj Medical J **พุทธชินราชเวชสาร** 2010; 27(3): 519-524. (impact factor = 0.092)

Sayasathid J, **Somboonna N**, Thapmaogkol S, Buddharadsa Y, Sukonpan K. Mediastinal teratoma in a neonate with acute respiratory failure. Asian Biomed 2011; 5(1): 123-127. (impact factor = 0.872)

Somboonna N, Wan R, Ojcius DM, Pettengill MA, Joseph SJ, Chang A, Hsu R, Read TD, Dean D. Hypervirulent *Chlamydia trachomatis* clinical strain is a recombinant between lymphogranuloma venereum (L_2) and D lineages. mBio 2011; 2(3): e00045-11. doi:10.1128/mBio.00045-11. (impact factor = 5.311)

Somboonna N, Charuchinda P. Effect of tryptophan synthase gene polymorphisms on different *Chlamydia trachomatis* infection patterns ความหลากหลายของกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนทริปโทเฟนมีผลต่อรูปแบบการติดเชื้อที่ต่างกันของคลามัยเดีย. Buddhachinaraj Medical J **พุทธชินราชเวชสาร** 2010; 28(3): 287-295. (impact factor = 0.092)

Sayasathid J, Sukonpan K, **Somboonna N**. 2011. Epidemiology and etiology of congenital heart diseases. *In* D. Danijela (ed.), Congenital heart disease. InTech – Open Access Publisher, Rijeka, Croatia.

Somboonna N. 2012. Different species of crabs and viral susceptibility. *In* N. Gotsiridze-Columbus (ed.), Crabs: anatomy, habitat and ecological significance. NOVA Science Publishers, Inc., Hauppauge, New York, USA.

Somboonna N. Persistence of *Chlamydia trachomatis* after antibiotic treatment in sexually transmitted disease females การคงอยู่แบบแอบแฝงของเชื้อคลามัยเดียหลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในหญิงที่ติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์. Buddhachinaraj Medical J **พุทธชินราชเวชสาร** 2012; 29(1): 108-113. (impact factor = 0.092)

Somboonna N, Assawamakin A, Wilantho A, Tangphatsornruang S, Tongsima S. Metagenomic profiles of free-living archaea, bacteria and small eukaryotes in coastal areas of Sichang island, Thailand. BMC Genomics 2012; 13(Suppl7): S29. (impact factor = 4.073)

Somboonna N, Jankaew K, Assawamakin A, Wilantho A, Tangphatsornruang S, Tongsima S. Distinct 18S rDNA metagenomic profiles representing tsunami affected area. In preparation.

Somboonna N, Boonpleng P, Khummin R. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and its co-infection with human papillovius and *Neisseria gonorrhoaea* among females with urogenital tract symptoms. In preparation.

Somboonna N, Assawamakin A, Wilantho A, Tangphatsornruang S, Tongsima S. Diversity of 16S and 18S rDNA microorganisms in surface coral reef water of Koh Kham, Thailand. In preparation.

Somboonna N, Jankaew K, Assawamakin A, Wilantho A, Tongsima S. Metagenomic profiles of archaea and bacteria representing tsunami affected area. In preparation.

Somboonna N, Assawamakin A, Wilantho A, Tangphatsornruang S, Tongsima S. Seasonal effect on diversity of 16S and 18S rDNA microorganisms in surface coral reef water of Koh Kra, Thailand. In preparation

Somboonna N, Flegel TW, Sritunyalucksana K. Transcriptome profiles of *Scylla olivacea* persistently- and acute- infected with white spot syndrome virus. In preparation.

Hiranchan J, **Somboonna N**, Senapin S, Flegel TW. Identification of *Penaeus monodon* G protein suppressor 2 -interacting proteins by yeast two hybrid assay. In preparation.

Somboonna N, Narasimhalu N, Ferrin TE, Dean D. Diversity of tryptophan operon and polymorphic membrane protein genes among isolates from patients with persistent *Chlamydia trachomatis* infections: markers of functional loss and persistence. In preparation.

Dean D, **Somboonna N**, Nolan N, Mukhopadhyay S, Kiley M, Cook C, Read TD. Genome change over the course of a persistent *Chlamydia trachomatis* urogenital infection. In preparation.

Somboonna N, Chantratita W, Assawamakin A, Wilanto A, Tongsima S. Entire genome sequence of *Chlamydia trachomatis* E/Bour. In preparation.

Somboonna N, Suh JH, Ferrin TE, Dean D. Impaired function of tryptophan synthase among *Chlamydia trachomatis* sexually transmitted disease strains with polymorphisms in *trpA*. In preparation.

การแสดงผลงานและบทความในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

Somboonna N, Dean D. Proceeding and poster presentation on "Association of tryptophan synthase A and persistence of *Chlamydia trachomatis* sexually transmitted disease strains," Children's Hospital & Research Center Oakland Symphosium, California, USA, May 25, 2004

Somboonna N, Mead S, Dean D. Oral presentation on "Association of tryptophan synthase gene mutations and persistence of *Chlamydia trachomatis* sexually transmitted disease strains," the 2nd International *Chlamydia* Basic Research Society (CBRS), Indianapolis, Indiana, April 25-29, 2005

Somboonna N, Dean D. Proceeding and Poster presentation on "Comparative analyses of phenotypic and structural changes of tryptophan synthase proteins A and B from serial clinical isolates representing persistent *Chlamydia trachomatis* infection," Children's Hospital & Research Center Oakland Symphosium, May 26, 2006

Somboonna N, Dean D. Poster presentation on "Effects of mutated tryptophan synthase genes A and B from serial clinical isolates representing persistent *Chlamydia trachomatis* infection on chlamydial persistence," UC Berkeley & UC San Francisco annual conference, October 6, 2006

Somboonna N, Dean D. Poster presentation on "Phenotypic and Functional Characteristics of Clinical *Chlamydia trachomatis* F strains with Tryptophan Mutations," the 3rd international CBRS, Louisville, Kentucky, March 23-26, 2007

Sritunyalucksana K, Sa-guanrut P, **Somboonna N**, Mangkalanan S, Krittanai C, Flegel TW. Oral presentation on "Persistent infection of white spot syndrome virus in the mud crab *Scylla olivacea*," Thailand Research Fund (TRF), Thailand, August, 2010

Hiranchan J, Senapin S, Flegel TW, **Somboonna N**. Proceeding and Poster presentation on "Protein interaction study of *Penaeus monodon* G protein suppressor 2 by yeast two-hybrid screening. Thailand Society of Biotechnology (TSB) International Conference on Biotechnology for Healthy Living, Thailand, 20-22 October, 2010

Somboonna N, Assawamakin A, Wilantho A, Tangphatsornruang S, Tongsima S. Oral presentation on "Metagenomic profiles of free-living archaea, bacteria and small eukaryotes in coastal areas of Sichang island, Thailand," The 11th International Conference on Bioinformatics (InCoB), Thailand, October, 2012

ทุนและรางวัลที่เคยได้รับ

10 times **first- and second-role Honors Certificate**, Chulalongkorn University Demonstration School, grade 1 to grade 11

Being admitted into **Chulalongkorn University**, the top university in Thailand since the 10th grade

B.S.-Ph.D. Thai Government Scholarship from Ministry of Sciences, Technology and Environment, Thailand, May 1996 to May 2007.

First-role Honors Shield (An honors shield is respected as the highest academic award, given to the student who has outstanding academic record and extracurricular activities), Chulalongkorn University Demonstration School, July 1996

Being admitted into **Letter & Sciences Honors Society**, University of Wisconsin, Madison, Januaury 1998 to May 2001

Being admitted into **Biology Honors Program (BIOCORE)**, University of Wisconsin, Madison, Januaury 1998 to May 2001

Pin award from Thai cultural ministry for contributing to Thai society and cultures, September 2005

Conference Travel Grant, University of California, Berkeley, February 2007

Public Health Service Grant, National Institutes of Health (co-investigator), May 2007 to May 2008

Founder Region Fellowship, Soroptimist International of the Americas, May 2007 to May 2008

Undergraduate student received **1st place poster presentation award**, Naresuan University, February 2009

Graduate student received NSTDA fellowship for her M.S. study at Mahidol University

NSTDA Professional Research Group Grant (co-investigator), February 2008 to February 2010

Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund for new faculty (principle-investigator) ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2 September 2010 to 1 September 2011

Research Funds from the Faculty of Science, Chulalongkorn University, Under the Project for Interdisciplinary Research which Targeted to Collaborate with the Leading World Class University (Ludwin Maximilians-Universität München and Chulalongkorn University, LMU 1) (principle-investigator) กองทุนเพื่อการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้โครงการวิจัยเชิงบูรณาการเป้าหมายวิจัยร่วมกับมหาวิทยาลัยชั้นนำของโลก (โครงการ LMU 1), 1 October 2010 to 30 March 2012

Research Funds from the Faculty of Science, Chulalongkorn University, Under the A1B1-NS (principle-investigator) กองทุนเพื่อการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้โครงการ A1B1-NS, 1 October 2010 to 30 September 2011

Internal Research Fund from Asia Research Center (principle-investigator) ทุนวิจัยภายในประเทศ ศูนย์ส่งเสริมการวิจัยในภูมิภาคเอเชียฯ, 22 April 2011 to 21 April 2012

A New Researcher Scholarship of CSTS (Coordinating Center for Thai Government Science and Technology Scholarship Students), MOST (Ministry of Science and Technology) (principle -investigator) โครงการสนับสนุนทุนนักวิจัยใหม่ วท. ศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2 May 2011 to 1 May 2012

Thailand Research Fund (principle-investigator) ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), 15 June 2011 to 14 June 2013

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (project consultant), Inhibition of Aspergillus on Peanuts by Coating with Chitosan การยับยั้งการขึ้นของเชื้อราแอสเปอร์จิลลัสบนถั่วลิสงโดยการเคลือบด้วยไคโตซาน, 1 October 2011 to 30 September 2012

โครงการวิจัยและพัฒนา ฝ่ายบริหารงานวิจัยและพัฒนา การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (co-investigator), Study on Uranium Extraction from Thailand's Seawater การศึกษาการสกัดยูเรเนียมจากน้ำทะเลในประเทศไทย, 1 October 2011 to 31 May 2013

Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund for new faculty (principle-investigator) ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีที่ 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 26 October 2011 to 25 October 2013

The Asahi Glass Foundation (co-investigator), Environmentally friendly RF plasma treatment process of Thai silk fibers with chitosan for antibacterial ability, In contract process

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (project consultant), Prolonging Shelf Life of Brown Rice by Coating with Chitosan การยืดอายุการเก็บข้าวกล้องโดยการเคลือบด้วยไคโตซาน, 1 October 2012 – 30 September 2013

ลงชื่อ .....

(หัวหน้าโครงการ)