

บทนำ

Chlamydia trachomatis เป็นเชื้อก่อโรคทางเพศสัมพันธ์ที่สำคัญโรคหนึ่งที่พบทั่วโลกทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้วและกำลังพัฒนา (1, 4, 17, 18) ในเพศชายทำให้เกิดโรคหนองในเทียม และโรคแทรกซ้อนอื่น ๆ เช่น prostatitis, epididymitis, urethral stricture และทำให้เป็นหมันได้ (1, 5, 30) ในเพศหญิงทำให้เกิดการอักเสบของปากมดลูก, เกิดการแท้ง, เกิดโรคแทรกซ้อน และเป็นหมันได้เช่นเดียวกับเพศชาย (1,5, 30) ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อมีอยู่ไม่มากนัก เนื่องจากขั้นตอนตรวจหาและเลี้ยงเชื้อค่อนข้างยุ่งยาก ต้องใช้ผู้ชำนาญ, ใช้เวลานาน และสารที่ใช้มีราคาแพง วิธีการที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปคือ cell culture ปัจจุบันได้มีการตรวจโดยวิธีการอื่น ๆ อีกหลายวิธี เช่น direct fluorescent antibody test (DFA), DNA hybridization เช่น Gen Probe (PACE 2 system), polymerase chain reaction (PCR), Enzyme immunoassay (EIA) (2, 6, 8, 13, 30) หลายวิธีดังกล่าวผลิตออกมาในรูปแบบ kit สำเร็จรูป (30, 33, 35) ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เช่น Gen-Probe (San Diego, California) และ EIA ซึ่งผลิตออกมาจากหลายบริษัท (Chlamydiazyme (Abbott), IDEIA Chlamydia test (Novo Nordisk) Syva Microtrack EIA เป็นต้น) วิธีการดังกล่าวค่อนข้างสะดวกและรวดเร็ว และมักทำเปรียบเทียบกับวิธี cell culture

เนื่องจากในประเทศไทยถึงแม้จะมีการศึกษาการติดเชื้อนี้ทางเพศสัมพันธ์อยู่บ้าง แต่มักทำการศึกษาในเพศหญิง ในเพศชายจึงไม่มีข้อมูลส่วนนี้ การศึกษานี้จะเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาขั้นพื้นฐานของเชื้อนี้ในเพศชาย และเป็นการศึกษาร่วมกับเชื้อหนองใน (*Neisseria gonorrhoeae*) ซึ่งก็ได้ใช้วิธีของ Gen Probe เปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อและจากกล้องจุลทรรศน์โดยตรงด้วย ข้อมูลนี้จะมีประโยชน์ทางระบาดวิทยา และเป็นข้อมูลสำหรับแพทย์ในการเลือกการรักษาได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการเปรียบเทียบวิธีตรวจหาเชื้อทั้งสองชนิดในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์การติดเชื้อได้ถูกต้องยิ่งขึ้นด้วย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Chlamydia trachomatis เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ ในผู้ชายเป็นสาเหตุของโรคหนองในเทียม ในผู้หญิงทำให้เกิดการอักเสบของปากมดลูก (cervicitis) ในชายทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนได้แก่ prostatitis, epididymitis, urethral stricture และทำให้เป็นหมันได้ สำหรับโรคแทรกซ้อนในผู้หญิงได้แก่ salpinggitis และเป็นหมันได้เช่นเดียวกับผู้ชาย (1, 5, 30) การติดเชื้อในเด็กแรกเกิดเป็นการติดเชื้อหลังคลอด จากการที่มารดามีเชื้อที่ช่องคลอดก่อให้เกิดการอักเสบและปอดบวม (1, 5, 31)

Chlamydia เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในเซลล์โฮสต์ มีวงจรชีวิตที่ซับซ้อนต่างจากแบคทีเรียทั่ว ๆ ไป (27, 30) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* จึงเป็นวิธีค่อนข้างยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานาน จึงไม่นิยมศึกษาในห้องปฏิบัติการประจำนอกรอกนอก ในการทำวิจัย ทำให้การศึกษาเชื้อมีในประเทศไทยไม่แพร่หลายนัก (1) อย่างไรก็ตามวิธีที่ใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยเชื้อมีด้วยกันหลายวิธี เช่น DNA hybridization, PCR (polymerase chain reaction) และ วิธี Enzyme immunoassay (EIA) (2, 6, 8, 13, 30, 37) วิธี DNA hybridization และ EIA เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน และให้ผลความไว และความจำเพาะสูง (8, 9, 15, 29) ดังนั้นการศึกษาคัดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ในครั้งนี้จะใช้วิธีทั้งสองและวิธี tissue culture ช่วยในการแปลผล

เนื่องจากการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ทั้งในหญิงและชายเป็นโรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ที่พบได้บ่อยที่สุดในอเมริกา ประมาณว่าในแต่ละปีจะมีผู้ติดเชื้อนี้ถึง 4 ล้านราย และค่าใช้จ่ายที่ใช้รักษาถึงปีละ 2 พันล้านเหรียญสหรัฐ (12, 27, 34) การศึกษาในประเทศไทยยังไม่แพร่หลาย และทำในกลุ่มประชากรจำนวนน้อยหรือในกลุ่มเสี่ยง เนื่องจากวิธีการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการค่อนข้างยุ่งยาก และอุปกรณ์ส่วนใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศในลักษณะ kit สำเร็จรูปซึ่งมีราคาแพง (1, 15) การศึกษาในประเทศไทยมักศึกษาในเพศหญิงกลุ่มเสี่ยง เนื่องจากความยุ่งยากในการตรวจ และค่าใช้จ่ายที่สูง ทำให้ข้อมูลการติดเชื้อในเพศชายมีน้อย (1, 31, 34) นอกจากนี้แพทย์ก็มักมุ่งรักษาเชื้อ *Chlamydia* พร้อมกันไป โดยมิได้ตรวจหาเชื้อก่อโรคโดยตรงทำให้การรักษาไม่ได้ผลเท่าที่ควร การศึกษาค้นคว้าจึงต้องการตรวจหาการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ในเพศชายที่เข้าทำการรักษาในศูนย์กามโรคและเอดส์ เขต 6 จังหวัดขอนแก่น และ รพ.ศูนย์ขอนแก่น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานขั้นต้นทางด้านระบาดวิทยาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อีสานเหนือ) โดยใช้วิธี DNA hybridization (Gen Probe), EIA และ tissue culture เป็นตัวช่วยในการแปลผล ทั้งนี้ได้ตรวจหนองในแท้ร่วมด้วย (*Neisseria gonorrhoeae*) โดยใช้ทั้งวิธีการเพาะเชื้อ และ DNA hybridization นอกจากนี้ยังได้ตรวจดูความสัมพันธ์ของการติดเชื้อเพียงชนิดเดียวและติดเชื้อร่วมกันด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

8.1 ศึกษาความชุกชุมของเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* ในผู้ชายที่มาตรวจรักษาที่ศูนย์กามโรคขอนแก่น และ รพ.ศูนย์ขอนแก่น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางระบาดวิทยาทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อีสานเหนือ)

8.2 เปรียบเทียบวิธีการตรวจหา *Chlamydia trachomatis* โดยวิธี DNA hybridization, วิธี EIA และวิธี tissue culture

- 8.3 เปรียบเทียบการตรวจหา *Neisseria gonorrhoeae* โดยวิธีเพาะเชื้อ และ DNA hybridization
- 8.4 เปรียบเทียบการติดเชื้อร่วมกันและการติดเชื้อเพียงชนิดเดียวของเชื้อทั้งสองชนิด
- 8.5 อาชีพและอายุของชายที่ติดเชื้อทั้งสองชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

9.1 เป็นข้อมูลทางวิชาการ และระบาดวิทยาเกี่ยวกับเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และเชื้อหนองใน ในผู้ป่วยชายแถบภาคอีสานเหนือ เพื่อเป็นพื้นฐานทางวิชาการในการที่หน่วยงานอื่น ๆ จะนำไปศึกษาและหาทางป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อนี้ต่อไป

9.2 ทราบถึงความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายทั้งบวกและลบและความคุ้มค่าของวิธี DNA hybridization วิธี EIA, และวิธี tissue culture ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ในผู้ป่วยชาย เพื่อเป็นแนวทางเลือกวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม ทั้งประหยัดค่าใช้จ่ายที่สุด

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคที่เกิดจากเชื้อ *Chlamydia trachomatis* เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่ก่อปัญหาอย่างมาก ทั้งในชายและหญิง (1, 5, 30, 31) ในเด็กอ่อนก็ทำให้เกิดตาอักเสบและปอดบวมได้ (1, 30, 31) ในสหรัฐอเมริกาโรคติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* เป็นโรคทางเพศสัมพันธ์ที่พบได้บ่อยที่สุดโรคหนึ่ง ความชุกชุมของเชื้อนี้ในสหรัฐอเมริกาในเพศชายพบประมาณ 9% ถึง 14% ทั้งในพวกที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ (29, 30, 31) โดยเปรียบเทียบจากชุดทดสอบและวิธีการหลายประเภท ความชุกชุม (Prevalence) ของโรคติดเชื้อนี้มีมากกว่าการติดเชื้อหนองในถึง 2 ถึง 10 เท่า (12, 13) โรคติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ที่มีรายงานต่าง ๆ เป็นรายงานที่ทำในกลุ่มประชากรเฉพาะกลุ่ม การประมาณตัวเลขในกลุ่มประชากรทั่วไปทำได้ยาก (1, 31, 34) ในการศึกษาวิจัยของต่างประเทศพบว่า การติดต่อของเชื้อ *Chlamydia trachomatis* จากชายไปหญิง หรือจากหญิงไปชายในผู้ที่มีเพศสัมพันธ์กันพบว่ามี ความบ่อยในการตรวจพบไม่แตกต่างกันคือ 68% (28) และพบว่าความชุกชุมของโรคติดเชื้อนี้ในสตรีที่ไม่ตั้งครรภ์ มีตั้งแต่ร้อยละ 4.1 ถึงร้อยละ 34.7 ขึ้นกับประชากรที่ทำการศึกษา (1, 12, 18, 34) สำหรับสตรีที่ตั้งครรภ์จะพบการติดเชื้อนี้ได้ร้อยละ 5-7 แต่อาจพบได้สูงถึงร้อยละ 20 ในกลุ่มสตรีตั้งครรภ์ที่มีฐานะทางเศรษฐกิจต่ำหรือชนกลุ่มน้อยบางกลุ่ม (12, 34) สำหรับข้อมูลในประเทศไทยจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์พบว่า ความชุกชุมโรคติดเชื้อนี้ในผู้ที่มารับการตรวจรักษาที่คลินิกนรีเวช ในผู้แสดงอาการพบ 8.5% และผู้ไม่แสดงอาการพบ 4.1% ส่วนผู้ที่มาตรวจที่คลินิกวางแผนครอบครัวพบการติดเชื้อนี้ 8.6% ส่วนในหญิงบริการทางเพศพบการติดเชื้อ 29.6% (1, 23, 25)

เนื่องจากเชื้อหนองในซึ่งเกิดจากเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* มีอาการใกล้เคียงกับการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ซึ่งเป็นหนองในเทียม จึงมักมีการวิจัยเชื้อทั้งสองนี้ร่วมกันไป (32) เช่น ในประเทศออสเตรเลีย พบการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อสองชนิดพบในเพศชาย 3.5% และพบในเพศหญิง 17.6% และยังพบว่า การพบเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งในเพศชายพบบ่อย (frequency) ใกล้เคียงกัน แต่ในเพศหญิงจะพบการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* เพียงอย่างเดียวบ่อยกว่าการติดเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* เพียงอย่างเดียว (32) ส่วนการวิจัยของ Mulhall และคณะ (22) พบว่า ความชุกชุมของเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* และ *Chlamydia trachomatis* ในประเทศออสเตรเลีย มีการติดเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ลดลงเรื่อย ๆ แต่สำหรับเชื้อ *Chlamydia trachomatis* พบว่าค่อนข้างคงที่ระหว่าง 2.5% - 14% เมื่อสำรวจจากผู้ป่วยที่มาทำการรักษาที่คลินิกโรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ และ 5% เมื่อสำรวจจากผู้ป่วยที่มาทำการรักษาที่คลินิกวางแผนครอบครัว (22) ซึ่งความชุกชุมของการติดเชื้อทั้งสองนี้เมื่อสำรวจในประเทศจีน ผลแตกต่างจากประเทศออสเตรเลีย, สหรัฐอเมริกา และอีกหลายประเทศโดยพบว่า ผู้ป่วยที่เข้ามารักษาที่คลินิกโรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ เมื่อเปรียบเทียบการติดเชื้อ 3 ชนิด คือ *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* และ *Ureaplasma urealyticum* พบว่า ส่วนใหญ่ติดเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* สูงสุด และในชายจะพบมากกว่าในหญิง (14)

คุณสมบัติของ *Chlamydia* จัดเป็นแบคทีเรียพวก obligate intracellular ที่มีการเจริญอยู่ในเซลล์โฮสต์ มีผนังเซลล์ที่คล้ายแบคทีเรียอื่น ๆ แต่ก็มีคุณสมบัติหลายอย่างคล้ายไวรัสคือมีขนาดเล็กและเจริญภายในเซลล์เท่านั้น ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจึงจำเป็นต้องใช้วิธีเพาะในเซลล์เนื้อเยื่อ (cell culture) ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่ว ๆ ไป (27, 30) ดังนั้นการวินิจฉัยเชื่อนี้ในห้องปฏิบัติการจึงทำได้ยาก ค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานานเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ (2, 15)

Chlamydia มีโครงสร้าง 2 ชนิดในวงจรชีวิต คือ เป็นแบบ elementary body (EB) และ reticulate body (RB) รูปร่างของ EB มีขนาดเล็กมากเพียง 0.3 ไมครอน สามารถอยู่ภายนอกเซลล์และเป็นระยะติดต่อ ส่วนชนิด RB มีขนาดโตกว่า EB สามารถอยู่ภายในเซลล์ และเป็นระยะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (27) EB ติดต่อเข้าสู่ host โดยวิธี phagocytosis อยู่ใน lysosome EB จะเปลี่ยนรูปร่างและโครงสร้างเป็นเซลล์ RB และแบ่งตัวแบบ binary fission อยู่ใน membrane-bound vacuole เป็น inclusion มีขนาดใหญ่ RB จะเปลี่ยนแปลงเป็น EB จำนวนมาก และแตกออกมาจากผนังเซลล์โฮสต์ ออกมานอกเซลล์ (27)

ส่วนประกอบของแอนติเจนที่ใช้ในการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนแรก คือ ส่วนที่เป็นแอนติเจนชนิดโปรตีนที่อยู่ในส่วนนอก (outer membrane protein) ของ EB ของเชื้อใช้แยก type ได้ถึง 15 ซีโรไทป์ โดยชนิด A, B, Ba, C ทำให้เกิดโรคริดสีดวงตา (trachoma) ชนิด D-K ทำให้เกิดการติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ ทำให้เกิดตาอักเสบ และโรคปอดบวมในเด็ก ชนิด L₁, L₂, L₃

ทำให้เกิดโรคกามโรคต่อมน้ำเหลือง (Lymphogranuloma venereum) ส่วนที่สองเป็นแอนติเจนชนิดคาร์โบไฮเดรต ส่วนนี้จัดเป็น genus specific ซึ่งเป็นส่วนของ lipopolysaccharide (LPS) (1, 8, 9, 13, 27) การตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี EIA นิยมตรวจแอนติเจนส่วนนี้ และส่วนใหญ่เป็นอุปกรณ์สำเร็จรูปที่บริษัทต่าง ๆ ผลิตแอนติบอดีต่อ LPS ขึ้นมา (8, 9, 13)

การตรวจหาเชื้อในปัจจุบันทางห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี เช่น วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (cell culture), ตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดี โดยวิธี enzyme immunoassay (EIA), immunofluorescence, วิธี direct DNA hybridization และ polymerase chain reaction (PCR) เป็นต้น (2, 3, 6, 8, 9, 13, 29) วิธีดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะค่อนข้างสูงใกล้เคียงกัน แต่ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ kit ซึ่งมีราคาแพงมาก การจะตัดสินใจว่าผลที่ได้เป็นบวกจริงหรือลบจริง ต้องให้ผลการทดสอบในสองวิธีตรงกัน แต่ถ้าผลไม่ตรงกันจะต้องตัดสินใจวิธีที่สาม ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้วิธี cell culture ตัดสิน (2, 3, 6, 8, 9, 13, 29) จากการวิจัยโดยทั่วไปพบว่า cell culture มีความจำเพาะ (specificity) มากที่สุด จึงนิยมใช้เป็น "gold standard" (2, 8, 9, 15) ถึงแม้ว่าวิธี cell culture จะนิยมใช้เป็น gold standard สำหรับตรวจหาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* แต่ความไวของวิธีนี้ก็มียางานตั้งแต่ 33% ถึง 95% เมื่อใช้กับ endocervical swab ที่ใช้ตรวจ 1 อัน (13, 33) นักวิจัยบางรายรายงานว่าความจำเพาะและคุณค่าของการทำนายเป็นบวก (positive predictive value, PPV) ของวิธีการทดสอบชนิดใหม่ ๆ จะต่ำกว่าความเป็นจริงถ้าใช้วิธี cell culture เป็นมาตรฐาน (16, 21, 33) อย่างไรก็ตาม Thejls และคณะ (1994) ได้แนะนำว่า การพิจารณาตัวอย่างที่ตรวจว่าให้ผลบวกสามารถพิจารณาว่าเป็นบวกจริง เมื่อผลการทดสอบที่ไม่ใช่ tissue culture ให้ผลบวก 2 วิธีการทดสอบ แต่ถ้าวิธี cell culture ให้ผลบวกวิธีเดียวก็ให้ถือว่าเป็นบวกจริงเช่นกัน นอกจากนี้วิธี cell culture ยังมีปัญหาที่คือการเพาะเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2 วันขึ้นไป และต้องการการ transport ในความเย็นที่เหมาะสม swab ใช้ต้อง swab พิเศษ มิฉะนั้นเชื้อจะตาย ค่าใช้จ่ายสูง และยุ่งยาก ต้องมีความชำนาญพิเศษ (1, 15) ดังนั้นห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปจึงเพาะเชื้อไม่ได้ (1) ทำให้มีความพยายามในการตรวจหาเชื้อที่มีความไว และความจำเพาะที่ดี และขณะเดียวกันก็จะสะดวกและรวดเร็ว ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ยุ่งยาก ปัจจุบันมีชุดทดสอบที่ใช้จำแนกเชื้อ *Chlamydia trachomatis* กว่า 10 ประเภท ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ kit สำเร็จรูป (35) ดังนั้น EIA และ DNA hybridization จึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมหนึ่ง และนิยมใช้ในปัจจุบันในรูปของ kit สำเร็จรูป (8, 9, 13, 15, 29) วิธีดังกล่าวจะมีความไวและความจำเพาะค่อนข้างสูง คือ อยู่ในช่วง 80% ถึงมากกว่า 90% ขึ้นไป (8, 9, 13, 15, 29) การวิจัยครั้งนี้จึงใช้วิธีทั้งสองที่สะดวกและรวดเร็วกว่า ตรวจหาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ในผู้ติดเชื้อเพศชายเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านระบาดวิทยาต่อไป

วัสดุและวิธีการทดลอง

(Materials and Methods)

1. การเก็บรวบรวมสิ่งส่งตรวจ

ผู้ป่วยที่ทำการศึกษา ได้จากผู้ที่เข้ารับการรักษาที่ศูนย์กามโรคและเอดส์ เขต 6 และโรงพยาบาล ศูนย์ขอนแก่น การเก็บสิ่งส่งตรวจ เก็บจาก urethra ของผู้ชายโดยใช้ swab ขนาดเล็กสอดเข้าไปใน urethra ให้ลึกประมาณ 3-5 ซม. แล้วดึงออกมา การเก็บตัวอย่างแต่ละตัวอย่างจะเก็บ 3 swab โดย

swab 1 ใช้เก็บตัวอย่างเพื่อนำไปทำ cell culture (*Chlamydia trachomatis*) ซึ่งต้องใช้ swab จำเพาะ เพราะเชื้อตายง่ายต้องพยายามรักษาให้มีชีวิตอยู่

swab 2 ใช้เก็บตัวอย่างเพื่อนำไปทำ DNA hybridization ของเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae*

swab 3 ใช้เก็บตัวอย่างเพื่อนำไปทำ EIA (*Chlamydia trachomatis*)

ในกรณีของผู้ป่วยชายที่แสดงอาการโดยมีหนองไหลออกมา ให้นำหนองหรือ discharge นั้น ไปเพาะเชื้อสำหรับเชื้อหนองในแท้ด้วย (*Neisseria gonorrhoeae*)

2. ข้อมูลและประวัติผู้ป่วย

ประกอบด้วย ชื่อ-สกุล, อาชีพ, การศึกษา, ความสัมพันธ์ทางเพศ, อาการ และอื่น ๆ ดังแบบสอบถามที่แนบมาด้วย

3. การทดลองในห้องปฏิบัติการ

Chlamydia trachomatis

1. Cell culture

นำ swab มาเพาะเชื้อลงบน Mc Coy cells ซึ่งมีความไวสูง และนิยมมากที่สุด เมื่อเชื้อ *Chlamydia* เจริญจะทำให้เกิด intracytoplasmic inclusion body ซึ่งตรวจได้โดยวิธีย้อมด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ที่ conjugate อยู่กับ monoclonal antibody ต่อ *Chlamydia* ซึ่งจะติดสีน้ำตาลและเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์

Cell culture สำหรับเชื้อ *Chlamydia trachomatis* โดยย่อทำดังนี้ เพาะเลี้ยง McCoy cell ให้ได้ monolayers โดยบรรจุอยู่ใน shell vial ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ cover glass ขนาด 12 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยง McCoy cell จนได้ monolayers แล้วทิ้ง cell culture medium และนำ 1 มิลลิตร ของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ vortex แล้วใส่ลงไป และนำไป centrifuge ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 35° เซลเซียส หลังจาก centrifuge ใส่ maintenance medium (ที่มี 2 µg/ml cycloheximide) จำนวน 1 มิลลิตรลงไป แล้วนำไปอบที่ 35° เซลเซียส ที่มี CO₂ 5% เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำ monolayers

มา fix ด้วย 95% ethanol เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้อมด้วย fluorescein conjugated antichlamydia murine monoclonal antibody จากนั้นนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 10 เท่า และ 40 เท่า การพิจารณาว่าให้ผลบวกคือพบ inclusion body

2. Nucleic acid hybridization (Gen-Probe (GP), PACE 2 assay)

swab ใน lysis buffer ของวิธีการนี้ ใช้ 100 ไมโครลิตร นำไปทำ DNA hybridization โดยใช้หลัก DNA probe และตรวจวัดด้วยเครื่อง luminometer และปฏิบัติตามที่บริษัทผลิต kit กำหนด หลักการโดยย่อของ DNA hybridization ของ Gen-Probe ก็คือ ribosomal RNA (rRNA) ของเชื้อ *Chlamydia trachomatis* หรือ *Neisseria gonorrhoeae* ย้อมเป็นคู่สม (complementary) กับ DNA สายเดี่ยวของเชื้อนั้นที่ติดฉลากด้วย acridinium ester ความจำเพาะเจาะจงในการจับคู่กันนำไปวัดด้วยเครื่องที่เรียกว่า luminometer ขั้นตอนโดยย่อทำดังนี้

1) ขั้นตอน Hybridization : นำสิ่งส่งตรวจที่เก็บไว้มาตั้งที่อุณหภูมิห้อง แล้ว vortex 5 วินาที จากนั้นจุด 100 ไมโครลิตร ใส่หลอด (positive, negative control ทำเช่นเดียวกัน) จากนั้นใส่ 100 ไมโครลิตร probe reagent ลงไปในแต่ละหลอด แล้วไปบ่มที่ 60° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2) ขั้นตอน Separation : นำหลอดจาก water bath มาใส่ 1 มิลลิลิตรของ separation solution (ซึ่งประกอบด้วย metallic microbeads ซึ่งจะจับกับ hybridized probe) เขย่าให้เข้ากันดี แล้วนำไปบ่มที่ 60° C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวางหลอดทิ้งชุดลงในตะแกรงแม่เหล็ก (magnetic separation unit) ประมาณ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทิ้ง supernatant ไป แล้วใส่ wash solution และทิ้งไว้ 20 นาที จึงทิ้งน้ำล้างนั้น แล้วนำไปตรวจหา DNA-RNA hybrid

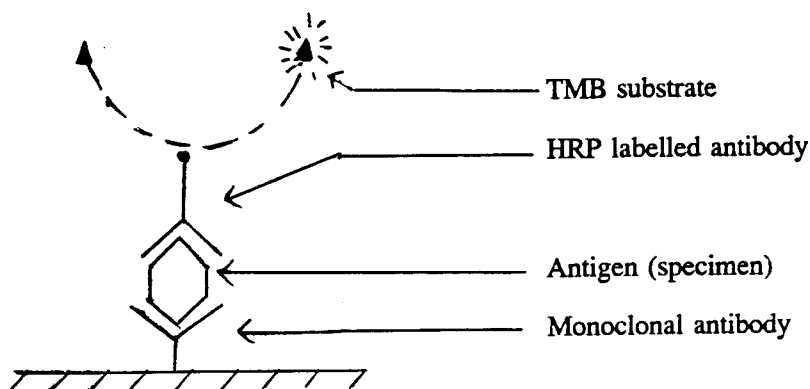
3) ขั้นตอน Detection : วัดค่า DNA-RNA hybrid ในรูปของแสงที่ปล่อยออกมาโดยใช้เครื่อง luminometer (Leader 50, Gen-Probe, Inc., San Diego) ค่าที่ถือว่าเป็นบวกคือตัวอย่างที่มีค่า Relative Light Units (RLUs) แตกต่างจากค่า RLUs ที่เป็น negative references มากกว่า 350 RLUs

3. EIA test

Swab ใน lysis buffer ของวิธีการนี้ ใช้ 100 ไมโครลิตร นำไปทำ EIA test ตามที่บริษัทกำหนด (Bioquest, Australia) ซึ่งมีลักษณะเป็น direct sandwich EIA ดังไดอะแกรม (บริษัทจะมี lysis buffer มากับ kit เรียบร้อยแล้ว)

ขั้นตอนโดยย่อของการทำ EIA คือ นำ 100 ไมโครลิตรของตัวอย่างที่ต้องการตรวจ, positive และ negative control ใส่ในถาดหลุมที่มีแอนติบอดีเคลือบอยู่แล้ว แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่ 37° C หลังจากล้าง 3 ครั้งแล้ว, 25 ไมโครลิตรของ monoclonal antibody ที่ติดฉลากด้วย Horseradish peroxidase (HRP) และ diluent buffer จะถูกใส่ลงไปในแต่ละหลุม จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็น

เวลา 1 ชั่วโมง หลังจากล้างอีก 6 ครั้ง จึงใส่ 100 ไมโครลิตร 3, 3', 5, 5' tetramethyl benzidine (TMB) ลงไป แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยใส่ 1 M กรดซัลฟูริก 50 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจดูสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง photometer ที่ 450 นาโนเมตร (nm) ตัวอย่างที่พิจารณาว่าให้ผลบวกคือ ให้ค่า OD (optical density) มากกว่าค่า cut off value



ไดอะแกรม แสดงการตรวจหาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* โดยวิธี EIA ของบริษัท Bioquest

Neisseria gonorrhoeae

1. Direct examination

นำหนองหรือ swab ป้ายสไลด์ แล้วนำไปย้อมสีแกรม เชื้อจะติดสีแกรมลบ รูปร่างคล้ายไต หรือเม็ดถั่วหันด้านเว้าเข้าหากันอยู่เป็นคู่ (diplococci kidney shape) พบเชื้อทั้งในและนอกเม็ดเลือดขาวขึ้นกับระยะที่ติดเชื้อ

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae*

หนองหรือ swab ที่ป้ายหนองจะถูกศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (direct examination) โดยการย้อมสีแกรมและถูกเพาะเลี้ยงลงบน Thayer-Martin medium ซึ่งใส่ยาปฏิชีวนะลงไป บ่มที่ 37° เซลเซียสใน 5% CO₂ เป็นเวลา 1-2 วัน โคโลนีที่ขึ้นจําแนกว่าเป็น *Neisseria gonorrhoeae* โดยดูจากลักษณะโคโลนี, ย้อมสีแกรม, การทดสอบ oxidase ให้ผลบวก และลักษณะโคโลนีที่ไม่ชัดเจนในบางสิ่งส่งตรวจอาจยืนยันด้วยการทดสอบคุณสมบัติการใช้น้ำตาล glucose, maltose และ sucrose ถ้าเป็นเชื้อหนองในจะใช้น้ำตาล glucose ได้อย่างเดียว

3. Nucleic acid hybridization (Gen-Probe (GP), PACE 2 assay)

วิธีการทำเช่นเดียวกับ *Chlamydia trachomatis* และสามารถทำควบคู่กันไปได้

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการตรวจโดยวิธี cell culture, EIA และ Gen Probe PACE 2 ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ urethral swab จำนวน 140 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบ			จำนวน (%)
cell culture	EIA	PACE 2	
+	+	+	7 (5.00)
+	+	-	0
+	-	+	2 (1.43)
+	-	-	1 (0.71)
-	+	+	2 (1.43)
-	+	-	1 (0.71)
-	-	+	0
-	-	-	127 (90.72)
รวม			140 (100)

จากตารางที่ 1 จะพบว่า ผลการทดสอบให้บวกทั้งสามการทดสอบ จะมีจำนวนตัวอย่างเป็นบวกมากที่สุด คือ 7 ตัวอย่าง ส่วนที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกในหนึ่งการทดสอบมีเพียง 2 ตัวอย่าง คือ 1 ตัวอย่างเป็นบวกโดยการทดสอบวิธี cell culture (ถือว่าเป็นบวกจริง) และอีก 1 ตัวอย่างเป็นบวกจากการทดสอบวิธี EIA (ถือว่าเป็นบวกปลอม)



ตารางที่ 2 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของการตรวจพบเชื้อ *Chlamydia trachomatis* จากตัวอย่างส่งตรวจ urethral swabs จำนวน 140 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับผลบวกจริง

การทดสอบที่ให้ผลบวก	จำนวน (%)
cell culture	1 (0.71)
สองวิธีการทดสอบ	4 (2.86)
สามวิธีทดสอบ	7 (5.00)
รวม	12 (8.57)

๗๗

๒๕

๒๐๑

๐.๕๔๗

๑.๖๖๗

ผลบวกจริง หมายถึง ให้ผลบวกกับวิธี cell culture วิธีเดียว หรือให้ผลบวกอย่างน้อยสองการทดสอบ

จากตารางที่ 2 จำนวนการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ที่เป็นผลบวกจริง พบจำนวน 12 คน (8.57%)

ตารางที่ 3 ความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), และคุณค่าของการทำนาย (predictive value) ในการตรวจหาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* โดยวิธี EIA, cell culture และ PACE 2 เมื่อใช้ผลบวกจริงเป็น “gold standard” ในผู้ป่วยชาย 140 คน

วิธีทดสอบ	ประเภทของผู้ป่วย	จำนวนผู้ป่วย	ความไว (%)	ความจำเพาะ (%)	คุณค่าการทำนาย	
					เป็นบวก	เป็นลบ
cell culture	แสดงอาการ	116	83.3 (10/12)	100 (104/104)	100 (10/10)	98.11 (104/106)
	ไม่แสดงอาการ	24	ND	ND	ND	ND
EIA	แสดงอาการ	116	75 (9/12)	99.04 (103/104)	90 (9/10)	97.17 (103/106)
	ไม่แสดงอาการ	24	ND	ND	ND	ND
PACE 2	แสดงอาการ	116	91.67 (11/12)	100 (104/104)	100 (11/11)	99.05 (104/105)
	ไม่แสดงอาการ	24	ND	ND	ND	ND

ND (Not determined) = ตรวจไม่พบเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ในผู้ป่วยชายที่ไม่แสดงอาการโดยวิธีการทดสอบทั้งสองวิธี

จากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าวิธี PACE 2 มีความไว, ความจำเพาะ, คุณค่าของการทำนายทั้งบวกและลบในเปอร์เซ็นต์สูงสุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น คือ 91.67%, 100%, 100% และ 99.05% ตามลำดับ วิธี EIA เมื่อเปรียบเทียบกับ gold standard จะเป็นวิธีที่ให้ความไว, ความจำเพาะ และคุณค่าของการทำนายต่ำที่สุดในสามวิธี

ตารางที่ 4 ความชุกชุม (Prevalence) ของการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ในเพศชายแยกตามการ
แสดงอาการ

ประเภทของผู้ป่วย	จำนวนทั้งหมด	ตรวจพบเชื้อ	
		จำนวน	(%)
แสดงอาการ (symptomatic)	116	12	10.34
ไม่แสดงอาการ (asymptomatic)	24	0	0
รวม	140	12	8.57

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่า ความชุกชุมของการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ในเพศชายที่มา
รักษาที่ศูนย์กามโรคขอนแก่น และโรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น คิดเป็น 8.57% แต่ถ้าพิจารณาในผู้ป่วยที่
มาทำการรักษาแล้วติดเชื้อเป็นผู้แสดงอาการทั้งสิ้น ดังนั้นคิดเป็น 10.34% ส่วนผู้ไม่แสดงอาการไม่พบ
เลย (0%) แต่เนื่องจากในผู้ไม่แสดงอาการจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยน้อยเกินไปจึงสรุปยาก

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* โดยวิธีเพาะเชื้อ (culture), PACE 2 และการตรวจหาเชื้อจากกล้องจุลทรรศน์โดยตรง (Direct examination)

วิธีทดสอบ			จำนวนที่พบเชื้อ (%)
culture	PACE 2	Slide exam.	
+	+	+	16 (11.43)
+	+	-	1 (0.71)
+	-	+	1 (0.71)
+	-	-	0 (0)
-	+	+	4 (2.86)
-	+	-	0 (0)
-	-	-	118 (84.29)
รวม			140 (100)

จากตารางที่ 5 ผลการทดลองโดยการตรวจหาเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* โดยวิธีการทดสอบต่าง ๆ ไปด้วยกันได้ดี เนื่องจากไม่มีผลการทดสอบที่ให้ผลบวกโดยวิธีเดียวเลย

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความไว, ความจำเพาะ, คุณค่าของการทำนาย ในการตรวจหาเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* โดยวิธี PACE 2 เมื่อใช้การเพาะเชื้อเป็น “gold standard” และเมื่อใช้วิธีหลายวิธีร่วมกัน

วิธีทดสอบ	ความไว %	ความจำเพาะ %	คุณค่าการทำนาย	
			เป็นบวก	เป็นลบ
A	94.4 (17/18)	96.7 (118/122)	80.95 (17/21)	99.16 (118/119)
B	95.5 (21/22)	100.0 (118/118)	100.0 (21/21)	99.16 (118/119)

A = วิธี PACE 2 เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อที่เป็น gold standard

B = วิธี PACE 2 เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ, direct examination และลักษณะอาการในการช่วยพิจารณา

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้วิธีอื่นช่วยในการพิจารณาว่ามีการติดเชื้อหนองในหรือไม่ นอกจากการเพาะเชื้อเป็น gold standard เพียงอย่างเดียว ทำให้การทดสอบโดย PACE 2 มีความไว และความจำเพาะมากขึ้น

ตารางที่ 7 ความชุกชุม (Prevalence) ของการติดเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ในเพศชาย แยกตามการ
แสดงอาการ

ประเภทของผู้ป่วย	จำนวนทั้งหมด	ตรวจพบเชื้อ	
		จำนวน	%
แสดงอาการ (symptomatic)	116	21	(18.1)
ไม่แสดงอาการ (asymptomatic)	24	1	(4.2)
รวม	140	22	(15.7)

จากตารางที่ 7 แสดงความชุกชุมของเชื้อหนองในในเพศชายในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือในผู้ป่วย
ที่มาทำการรักษาที่ศูนย์กามโรคและโรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น พบว่า มีความชุกชุมในอัตราเปอร์เซ็นต์
ที่สูง คือ 15.7% และส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะแสดงอาการ

ตารางที่ 8 ความชุกชุม (Prevalence) ของการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* แยกตามอายุ

อายุ	จำนวนทั้งหมด	ติดเชื้อ <i>Chlamydia trachomatis</i>		ติดเชื้อ <i>Neisseria gonorrhoeae</i>		รวม จำนวน (%)
		จำนวน	(%)	จำนวน	(%)	
15-24	47	5	(10.6)	12	(25.5)	17 (36.2)
25-34	51	5	(9.8)	7	(13.7)	12 (23.5)
35-44	30	2	(6.7)	2	(6.7)	4 (13.3)
45-54	10	0	(0)	1	(10)	1 (10)
≥ 55	2	0	(0)	0	(0)	0 (0)
รวม	140	12	(8.57)	22	(15.7)	34 (24.3)

หมายเหตุ : ไม่มีผู้ติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ร่วมกับ *Neisseria gonorrhoeae* เลย

จากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าอายุที่มีการติดเชื้อทั้ง *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* มากที่สุด คือ อายุระหว่าง 15-24 ปี และมีแนวโน้มว่าลดลงตามอายุ

ตารางที่ 9 ความชุกชุม (Prevalence) ของการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* แยกตามอาชีพ

อาชีพ	จำนวนทั้งหมด	จำนวนที่ตรวจพบเชื้อ <i>Chlamydia trachomatis</i>		จำนวนที่ตรวจพบเชื้อ <i>Neisseria gonorrhoeae</i>		รวม	
		จำนวน	(%)	จำนวน	(%)	จำนวน	(%)
ผู้ใช้แรงงาน	58	9	(15.52)	10	(17.24)	19	(33.3)
ข้าราชการ	23	2	(8.7)	2	(8.7)	4	(17.4)
อื่น ๆ	59	1	(1.69)	10	(16.95)	11	(18.64)
นักเรียน, นักศึกษา	13	0		4	(30.77)		
เกษตรกร	27	0		3	(11.11)		
นักธุรกิจ	11	1	(9.1)	1	(9.1)		
คนว่างงาน	5	0		2	(40)		
ถูกจ้างทั่วไป	3	0		0	(0)		
รวม	140	12	(8.57)	22	(15.7)	34	(24.3)

จากตารางที่ 9 พบว่า อาชีพผู้ใช้แรงงาน (กรรมกร) เป็นอาชีพที่มีการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* มากที่สุด และนักเรียน, นักศึกษา เป็นกลุ่มที่มีการติดเชื้อหนองในมากที่สุด รองลงมาคือ อาชีพผู้ใช้แรงงาน

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* จากผู้ป่วยชายโดยวิธี urethral swab โดยใช้วิธีการตรวจสอบ 3 วิธีคือ cell culture, EIA และ PACE 2 และตรวจหาเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* โดยวิธีเพาะเชื้อ, PACE 2 และ direct examination ความชุกชุม (Prevalence) ของเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ในเพศชายคือ 8.57% (12/140) โดยผู้ที่พบเชื้อทั้งหมดเป็นผู้ป่วยที่แสดงอาการ (12/116) คือ 10.34% แต่ในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการไม่พบเลย (0/24) ดังนั้นในการจะหาความชุกชุมในผู้ป่วยชายที่ไม่แสดงอาการคงต้องใช้ตัวอย่างจำนวนมาก แต่เนื่องจากผู้ป่วยชายที่มาทำการรักษาที่โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่นและศูนย์กามโรคเขต 4 ขอนแก่น มักจะเป็นผู้ที่มีอาการจึงจะมาปรึกษาแพทย์ ดังนั้นจึงทำให้จำนวนผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการมีน้อย สำหรับความชุกชุมของเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* พบในเพศชายถึง 15.7% และส่วนใหญ่เป็นผู้แสดงอาการ 18.1% (21/116) พบเชื้อในผู้ไม่แสดงอาการเพียง 4.2% (1/24) ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* เลย

อายุของเพศชายที่มีการติดเชื้อทั้ง *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* อยู่ในวัยฉกรรจ์ คือ 15-24 ปี อาชีพที่พบการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* มากที่สุดคือ อาชีพผู้ใช้แรงงาน ส่วนอาชีพที่พบการติดเชื้อหนองในมากที่สุด คือ อาชีพนักเรียน, นักศึกษา และอาชีพผู้ใช้แรงงาน

การศึกษาค้นคว้าเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ในเพศชายยังไม่มีข้อมูลในประเทศไทย แต่ข้อมูลในเทศหญิงได้มีการศึกษาโดย Niruthisard และคณะ, 1991 ซึ่งพบในสตรีขายบริการทางเพศ ตรวจพบผลบวกทางซีโรโลยีต่อเชื้อ *Chlamydia* สูงถึง 94.4% ข้อมูลจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์พบว่าความชุกชุมของโรคติดเชื้อนี้ในผู้ที่มารับการตรวจรักษาที่คลินิกนรีเวช ในผู้แสดงอาการพบ 8.5% และผู้ไม่แสดงอาการพบ 4.1% ส่วนผู้ที่มาตรวจที่คลินิกวางแผนครอบครัวพบความชุกชุมของเชื้อนี้ 8.6% (23, 25)

วิธีตรวจสอบหาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* เปรียบเทียบกันทั้งสามวิธี คือ cell culture, EIA และวิธี DNA hybridization (PACE 2) พบว่าวิธี PACE 2 ได้ผลดีที่สุดทั้งในค่าความไว, ความจำเพาะ, คุณค่าของการทำนายทั้งบวกและลบ (91.7%, 100%, 100%, 99.0% ตามลำดับ) แม้ว่า Kluytmans และคณะ (16) ได้ทำวิจัยเมื่อปี 1991 ว่า PACE 2 มีความสามารถในการตรวจหาเชื้อในเพศหญิงได้ดีกว่าเพศชาย และไม่เหมาะนำมาตรวจหาเชื้อในเพศชาย เมื่อเปรียบเทียบกับ cell culture ก็ตาม เนื่องจาก การวิจัยในครั้งนั้นได้พิจารณาเพียงให้ cell culture เป็น gold standard เท่านั้น แต่เมื่อ Kluytmans ได้ทำการศึกษาเมื่อปี 1994 โดยใช้เกณฑ์ที่ว่า ถ้า cell culture ให้ผลบวก หรือผลการทดสอบเป็นบวก 2 วิธี ดังนั้นถือเป็น gold standard” เช่นที่นักวิจัยหลายท่านได้แนะนำ (21, 33) จึงทำให้ค่าต่าง ๆ แยก

ต่างจากที่ Kluytmans สรุปไว้ในการวิจัยปี 1991 ซึ่งใช้ cell culture เป็น gold standard แต่เพียงอย่างเดียว โดยผลที่ได้ในปี 1991 ให้ค่าความไว, ความจำเพาะ, ค่าของการทำนายทั้งบวกและลบมีค่าต่ำ (เฉพาะความไว) คือ 77.2%, 99.6%, 96.4% และ 96.5% ในเพศชาย แต่ในเพศหญิงได้ค่า 95.2%, 98.2%, 83.3% และ 99.5% ตามลำดับ (16) แต่เมื่อ Kluytmans และคณะ, 1994 (15) ได้ทำการศึกษาใหม่ในเพศชายโดยวิธีเดิม แต่ปรับปรุงการเก็บสิ่งส่งตรวจ และใช้ PCR ช่วยในการพิจารณาผลบวกกลับปรากฏว่า ค่าความไวของ PACE 2 เพิ่มขึ้นเป็น 89.5% และความจำเพาะเพิ่มเป็น 100%

อย่างไรก็ตามผลการตรวจเป็นบวกหรือลบขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างนอกเหนือวิธีการในการตรวจอย่างเดียว ส่วนหนึ่งขึ้นกับวิธีการในการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากต้องใช้ swab หลายอันเพื่อเก็บตัวอย่างในการทดสอบหลายวิธี จึงทำให้เชื่อที่ติดมากับ swab แต่ละอันแตกต่างกัน โดยเฉพาะในกรณีที่มีผู้ป่วยไม่มีอาการ ซึ่งน่าจะมีจำนวนเชื้อน้อยอยู่แล้ว จึงตรวจไม่พบเชื้อ (7, 20) อย่างไรก็ตามการวิจัยบางแห่งพบว่า ผลการใช้ swab หลายอันดังกล่าวไม่ใช่ปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (35) แต่ปัจจัยอื่นที่สำคัญได้แก่ การใช้ transport medium ที่เหมาะสม, วิธีการเก็บสิ่งส่งตรวจที่ถูกต้อง, การเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจ, หรือการใช้ยาปฏิชีวนะก่อนมาพบแพทย์ จะมีผลให้ค่าแตกต่างไปมากกว่า (2, 19) อย่างไรก็ตามวิธี DNA probe หรือ PACE 2 ที่ใช้ตรวจทั้งในเพศหญิงและชายมีความไวและความจำเพาะอยู่ระหว่าง 60%-93% และ 59%-98% ตามลำดับ (2, 8, 11, 37) ขึ้นกับชนิดของสิ่งส่งตรวจ การตรวจที่ใช้เป็น gold standard และข้อจำกัดส่วนหนึ่งก็คือ ถ้าจำนวนของ rRNA มีน้อยคือเชื่อน้อยมาก ๆ จะไม่เพียงพอในการตรวจด้วยวิธีนี้ (15) ดังนั้นในผู้ป่วยชายที่ไม่แสดงอาการ การตรวจโดยวิธีนี้อาจจะมีความไวลดลง แต่ในการทดลองนี้ในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการก็ไม่สามารถตรวจพบเชื้อทั้ง 3 วิธีทดสอบ แต่นักวิจัยบางท่านพบว่า PACE 2 หรือ Gen-Probe มีความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวเลือกแทน cell culture เพราะมีความไวและความจำเพาะที่ดี แม้ในกลุ่มประชากรที่มี prevalence ต่ำ ๆ โดยพบว่าจำนวน inclusion bodies 1-10 ก็ยังให้ผลบวกกับการทดสอบนี้ (17) แต่ในบางท่านเสนอว่า ถ้า inclusion bodies < 5-10 จะทำให้ความไวลดลง (6) แต่สิ่งที่นักวิจัยทุกท่านให้ความสำคัญกับการตรวจโดยวิธี PACE 2 คือค่า sample-RLU-cut off-RLU ratio โดยพบว่าถ้าอยู่ระหว่าง 0.7-3.0 ควรต้องทำซ้ำ (38) แต่จากประสบการณ์ของ Chapin-Robertson (6) พบว่าปัญหาในลักษณะนี้มีเพียง 0.5%-1.0% เท่านั้น นอกจากนี้ยังขึ้นกับบุคคลที่เก็บตัวอย่าง เช่น เป็นแพทย์, พยาบาล หรือเจ้าหน้าที่ที่มีความชำนาญเพียงพอหรือไม่ และเปลี่ยนแปลงบุคคลที่เก็บตัวอย่างมากน้อยเท่าใด ผลตรงนี้ย่อมทำให้การตรวจสอบเป็นบวกหรือลบแตกต่างกันได้ (11, 21)

สำหรับวิธี EIA เมื่อตรวจโดยวิธี urethral swab ให้ผลความไวตั้งแต่ 70%-87% ขึ้นกับ EIA ที่ใช้ในแต่ละบริษัท (7, 21) เช่น แอนติบอดีที่ใช้เป็น polyclonal หรือ monoclonal antibody ต่อแอนติเจนส่วนใด และยังขึ้นกับวิธีการทดลองในแต่ละห้องปฏิบัติการ, คุณภาพของการเก็บสิ่งส่งตรวจ,

ประชากรที่ทำการศึกษา, ชนิดของ swab ที่ใช้, ความซุกซมของโรค (19) แต่ที่มีผลโดยตรงอย่างเห็นได้ชัดคือ จำนวน inclusion body forming units ที่มีผลให้ EIA มีความไวในเพศหญิง (cervical specimens) มากกว่าเพศชาย (urethral specimens) เนื่องจากพบ inclusion-forming units ใน cervical specimens จะพบประมาณ 10 เท่าของ urethral specimens (7) ในการวิจัยในเพศชายครั้งนี้พบว่า EIA มีความไว 75% และความจำเพาะ 99% ตามลำดับ จึงไม่เหมาะสำหรับการตรวจหาการติดเชื้อในเพศชาย เมื่อเทียบกับวิธีอื่น

สำหรับการติดเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* โดยการใช้การเพาะเชื้อหรือการพิจารณา direct examination โดยการย้อมสีแกรมจะพบเชื้อแกรมลบ รูปร่างคล้ายไตอยู่คู่กัน และการแสดงออกของอาการช่วยในการเป็น gold standard สำหรับเปรียบเทียบกับ PACE 2 ปรากฏว่าเมื่อใช้คุณสมบัติอย่างอื่นร่วมด้วยทำให้ค่าความไวเพิ่มขึ้นคือ จาก 94.4% เป็น 95.5% และความจำเพาะจาก 96.7% เป็น 100% โดยผลที่เพิ่มขึ้นเกิดในผู้ป่วยชาย 4 คนที่ผลการเพาะเชื้อเป็นลบ แต่ PACE 2 และ slide examination เป็นบวก และผู้ป่วยมีอาการแสดง พบว่าผู้ป่วยได้ใช้ยาปฏิชีวนะก่อนมาพบแพทย์ ซึ่งมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ ซึ่งอาจหายไปมากหรือไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะแล้ว แต่วิธี PACE 2 และ slide examination สามารถตรวจพบเชื้อได้อยู่ เพราะวิธีทั้งสองไม่ขึ้นกับว่าเชื้อจะมีชีวิตอยู่หรือไม่

การศึกษานี้ไม่พบการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* สาเหตุอาจเนื่องจากการที่มีหนองไหลออกมา อาจจะเป็นการล้างเอาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ออกจากท่อปัสสาวะด้วย ทำให้เชื้อ *Chlamydia trachomatis* น้อยเกินกว่าจะตรวจสอบได้

การศึกษาดังเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* โดยวิธี PACE 2 เปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อหรือทำการยืนยันโดยวิธี Accu Probe ได้รับการศึกษาจากนักวิจัยหลายท่าน (6, 10, 26) ผลที่ได้ทั้งค่าความไว, ความจำเพาะ, ค่าของการทำนายเป็นบวกและลบส่วนใหญ่มีค่าระหว่าง 95%-100% Panke และคณะ (26) แนะนำว่าตัวอย่างที่ตรวจได้มีค่า sample-RLU-cut-off-RLU ratio อยู่ระหว่าง 0.7-2.0 ควรทำการทดลองซ้ำ และนักวิจัยส่วนใหญ่ (6) ให้การสนับสนุนว่า PACE 2 เหมาะสำหรับที่จะใช้ตรวจหาเชื้อทั้งในแง่ screening และ diagnostic สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการในโรคหนองใน

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าวิธี Gen-Probe PACE 2 DNA probe เป็นวิธีที่มีความไว, ความจำเพาะ, ค่าการทำนายทั้งบวกและลบสูงสุดในการตรวจทั้งเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* ในเพศชายโดยเฉพาะผู้แสดงอาการ อีกทั้งไม่ต้องระวังมากในการ transport หรือ special handling นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในแง่ที่ว่า swab 1 อันสามารถใช้ตรวจหาทั้งเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* ทำให้สะดวกในการหาการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Chlamydia*

trachomatis และ *Neisseria gonorrhoeae* ถ้าพิจารณาในแง่การตรวจหาเชื้อ *Chlamydia trachomatis* เปรียบเทียบกับ cell culture แล้ว จะสะดวกกว่า และใช้เวลาน้อยกว่า คือเพียงประมาณ 3 ชั่วโมงก็รู้ผลได้ รวมทั้งไม่ต้องใช้ความชำนาญมากหรือข้อระวังมากเหมือน cell culture ด้วย ราคาต่อผู้ป่วยหนึ่งคนใกล้เคียงกับ cell culture คือประมาณ 130 บาท/คน แต่ถ้าเปรียบเทียบกับ EIA, EIA จะเสียค่าใช้จ่ายต่อคนแตกต่างกันออกไปขึ้นกับแต่ละบริษัท โดยทั่วไปจะประมาณ 70-150 บาท/คน (บริษัทที่ใช้ในการทดลองนี้ตกประมาณ 70 บาท/คน)

ถ้าพิจารณา PACE 2 ในแง่ที่นำมาตรวจเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ก็มีข้อดีคล้าย ๆ กับการตรวจเชื้อ *Chlamydia trachomatis* แต่จะมีข้อดีกว่าตรงที่สามารถเก็บตัวอย่างตรวจในตู้ freeze ได้นานจนกว่าจะทำการตรวจ แต่ถ้าเป็นตัวอย่างตรวจหนองในที่ทำการเพาะเชื้อต้องทำการเพาะเชื้อทันทีเพราะเชื้อตายง่าย และการเพาะเชื้อจะมีข้อระวังมาก ทั้งสภาวะที่ทำการเพาะเชื้อ, CO₂, อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น แต่ข้อเสียคือ ถ้าเปรียบเทียบราคาแล้ว ราคาการเพาะเลี้ยงเชื้อจะประมาณ 40 บาทต่อหนึ่งตัวอย่าง ขณะที่ PACE 2 ราคาประมาณ 100 บาท/หนึ่งตัวอย่าง ซึ่งแตกต่างกันมาก ข้อเสียของ PACE 2 ต่อการตรวจเชื้อทั้งสองอีกอย่างหนึ่งคือ ต้องมีตัวอย่างส่งตรวจจำนวนมาก ๆ เพราะต้องทำครั้งละประมาณ 96 ตัวอย่าง และต้องมีเครื่อง luminometer สำหรับตรวจวัด ดังนั้นการใช้ PACE 2 สำหรับตรวจหาเชื่อน่าจะเหมาะสำหรับการตรวจส่งตรวจจำนวนมาก ๆ แต่ถ้านำมาใช้ในงานประจำที่มีส่งตรวจน้อย ๆ อาจจะไม่สะดวก เพราะต้องใช้เวลาานจึงจะทำการตรวจพร้อม ๆ กัน ทำให้การรู้ผลล่าช้าออกไป