

## การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมและการประเมินประสิทธิภาพ

ชุดน้ำยา In-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae*

## ณ ศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

VALIDATION THE OPTIMAL CONDITION AND EVALUATION EFFICIENCY  
OF IN-HOUSE REAL TIME PCR FOR *NEISSERIA GONORRHOEAE*  
DETECTION AT BANGRAK STIS CENTER

ศิริวิมล ภูมินิยม

Siwimol Phoomniyom

พงศธร แสงประเสริฐ

Pongsathorn Sangprasert

ณัฐนรี เกิดเทพ

Natnaree Girdthep

รุ่งนภา เหลืองประสิทธิ์

Rungnapa Luenprasit

บุศรา บำรุงศักดิ์

Busara Bamrungsak

นภาพรรัตน์ ภัทรประยูร

Napararat Pattarapayoon

รอสพร กิตติเยวามาลัย

Rossaphorn Kittiyaowamarn

กลุ่มบางรักโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

Bangrak STIs Center,

กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

Division of AIDS and STIs,

กรมควบคุมโรค

Department of Disease Control

Received: 29/11/2021

Revised: 15/12/2021

Accepted: 11/01/2022

## บทคัดย่อ

*Neisseria gonorrhoeae* เป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่พบมากที่สุด การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพเป็นสิ่งสำคัญในการตรวจวินิจฉัย วิธีเพาะเชื้อยังคงเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ขณะที่ในปัจจุบันวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นวิธีที่มีความสำคัญมากขึ้น การศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมและประเมินประสิทธิภาพร่วมกับการประเมินต้นทุนของชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ

ตัวอย่างทดสอบในการศึกษานี้ ได้แก่ ตัวอย่างจากท่อปัสสาวะ ตัวอย่างจากปากมดลูก ตัวอย่างจากทวารหนักและตัวอย่างจากช่องคลอดจากผู้มารับบริการ ณ ศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ตัวอย่างทดสอบ 60 ตัวอย่างถูกนำมาใช้สำหรับการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ขณะที่ 240 ตัวอย่างถูกนำมาใช้สำหรับการศึกษาเพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา ตัวอย่างทั้งหมด 300 ตัวอย่างถูกทดสอบด้วยน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นโดยมีการพัฒนาไพรเมอร์และโพรบซึ่งจำเพาะต่อยีน PorA สำหรับเชื้อ *N. gonorrhoeae* และจำเพาะต่อยีน human-beta globin สำหรับตัวควบคุมภายใน จากนั้นวิเคราะห์ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ การศึกษานี้ใช้น้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection ในกรณีนี้ที่ผลการทดสอบระหว่างสองวิธีให้ผลไม่สอดคล้องกัน

ผลการทดสอบพบว่า สภาวะความเข้มข้นปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* คือ ความเข้มข้น 200 nM และความเข้มข้น 200 nM สำหรับตัวควบคุมภายในเช่นเดียวกัน น้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และตัวควบคุมภายในได้ภายในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน ให้ค่าการประเมินประสิทธิภาพทุกค่าการทดสอบคิดเป็นร้อยละ 100 ในตัวอย่างส่งตรวจจากอวัยวะสืบพันธุ์ ขณะที่ มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบคิดเป็น 100, 86.67, 88.24, 100 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างจากทวารหนัก และร้อยละ 100, 96.67, 96.77, 100 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างจากช่องคอ การศึกษานี้พบผลที่ไม่สอดคล้องกันในตัวอย่างทดสอบ 5 ราย โดยเป็นตัวอย่างจากช่องทางอื่นนอกเหนือจากอวัยวะ สืบพันธุ์ทั้งหมดซึ่งให้ผลไม่พบเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพาะเชื้อแต่พบเชื้อในการตรวจด้วยน้ำยา in-house real time PCR และน้ำยาลำเร็จรูปที่ใช้หลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม น้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้น มีต้นทุน 165 บาทต่อการทดสอบ ขณะที่วิธีเพาะเชื้อมีต้นทุน 76 บาทต่อการทดสอบ และแม้ว่าน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นจะมีราคาสูงกว่าวิธีเพาะเชื้อ แต่ในแง่ของการตรวจวินิจฉัยน้ำยาที่พัฒนาขึ้นนี้มีความคุ้มค่า ที่มากกว่าด้วยความไวและความจำเพาะในการตรวจพบเชื้อโดยเฉพาะในตัวอย่างช่องทางอื่นนอกเหนือจากอวัยวะ สืบพันธุ์

ข้อมูลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะในตัวอย่างทดสอบที่หลากหลายด้วยผลการทดสอบ ที่มีความถูกต้อง สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน ดังนั้นชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นสำหรับ ตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยในงานประจำวันได้

## Abstract

*Neisseria gonorrhoeae* is one of the most common sexually transmitted pathogens. Fast and effective laboratory diagnostics are very important. The gold standard for *N. gonorrhoeae* diagnostic is culture method. Meanwhile nucleic acid amplification tests (NAATs) are critical new tools to diagnose *N. gonorrhoeae* infections. The aim of this study is to validate and assess the efficiency together with assessing the cost of the validated in-house real time PCR as compare to culture method.

The urethral, cervical, rectal and pharyngeal specimens from patients attended at Bangrak STIs Center, Thailand were used in this study. Sixty samples were used for validation experiment, while two hundred and forty samples were used in the comparison. All three hundred samples were tested by in-house real time PCR in which primers and probes were designed to specify at PorA pseudogene of *N. gonorrhoeae* and human-beta globin gene as an internal control. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were analyzed. Anyplex<sup>TM</sup> CT/NG Real-time Detection, commercial NAAT kit, was used to analyze the discrepancy result.

The suitable condition of PCR reaction for *N. gonorrhoeae* detection was at concentration 200 nM and also 200 nM for internal control. Validated duplex in-house real time PCR showed 100% correlation with culture method for genital specimens, while sensitivity, specificity, PPV and NPV were 100%, 86.67%, 88.24%, 100%, respectively for rectal swab and 100%, 96.67%, 96.77%, 100%, respectively for

pharyngeal swab specimens. All five discrepancy results were negative by culture, but positive by in-house real time PCR and the commercial NAAT kit. The cost of the duplex in-house real time PCR was 165 Baht/test, while culture was 76 Baht/test. Although in-house real time PCR assay is more expensive than culture, but in term of diagnosis it is more cost-effective. The in-house real time PCR can detect *N. gonorrhoeae* with high sensitivity and specificity, especially in extra-genital specimen.

Based on our finding, in-house real time PCR is a rapid, sensitivity and specificity on various types of specimen with high accuracy similar to culture method. Our validated duplex in-house real-time PCR for *N. gonorrhoeae* detection can be used in routine service.

<p><b>คำสำคัญ</b> เชื้อหนองใน, อิน เฮาส์ เรียลไทม์ พีซีอาร์, วิธีเพาะเชื้อ</p>	<p><b>Keywords</b> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, In-house real time PCR, Culture</p>
--	--

### บทนำ

*N. gonorrhoeae* แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคหนองในซึ่งเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่มีความสำคัญมากที่สุด ข้อมูลสถานการณ์โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ 5 โรคหลัก ได้แก่ โรคซิฟิลิส โรคหนองใน โรคหนองในเทียม โรคแผลริมอ่อน กามโรคของท่อและต่อมน้ำเหลืองในภาพรวมของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยพบอัตราป่วยบ่อยที่สุดในโรคหนองใน ซึ่งมีอัตราป่วย 12.5, 14.3, 15.8, 14.6, 14.8 และ 11.9 ต่อประชากรแสนคนในปี พ.ศ. 2558-2563 ตามลำดับ<sup>(1)</sup> การพบอัตราการติดเชื้อหนองในที่เพิ่มขึ้น อาจเกิดจากลักษณะของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่มีแนวโน้มดื้อยาได้ง่าย ลักษณะของโรคมักไม่มีอาการแสดงทำให้ผู้ป่วยสามารถแพร่เชื้อไปยังผู้อื่นได้ง่ายและไม่ได้รับการรักษา การตรวจวินิจฉัยที่มีขั้นตอนยุ่งยาก ราคาแพง การไม่ติดตามผลการรักษาอย่างเหมาะสม และยา cephalosporin ซึ่งเป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาโรคหนองในพบรายงานเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น<sup>(2)</sup>

งานห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ให้บริการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยวิธีการเพาะเชื้อ และวิธีการย้อมสีแกรมในงานประจำวัน วิธีเพาะเชื้อถือเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อชนิดนี้ มีความจำเพาะสูง แต่มีข้อเสียคือ ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน

เจ้าหน้าที่ต้องมีทักษะความชำนาญและเป็นวิธีที่มีความไวต่ำในตัวอย่างส่งตรวจอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์<sup>(3)</sup> วิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อหรือ Nucleic acid amplification testing (NAAT) เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่นิยมในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงในตัวอย่างส่งตรวจที่หลากหลายไม่ว่าจะเป็นตัวอย่างจากอวัยวะสืบพันธุ์ ตัวอย่างส่งตรวจอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ ได้แก่ ตัวอย่างจากทวารหนักและตัวอย่างจากช่องคอ<sup>(4-5)</sup> ชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมมีหลากหลายชนิดและมีน้ำยาที่พัฒนาขึ้นเองหรือที่เรียกว่าน้ำยา in-house real time PCR การตรวจหาเชื้อด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปมักมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เป็นอุปสรรคต่อการเข้าถึงบริการของผู้ป่วย ดังนั้นงานห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ จึงได้ทำการพัฒนาชุดน้ำยาเพื่อตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* พร้อมทั้งประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (วิธีเพาะเชื้อ) ก่อนนำมาใช้ในงานประจำวันจากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นโดย MJ Hopkins และคณะ ซึ่งได้ทำการประเมินความไวและความจำเพาะของน้ำยาที่พัฒนาขึ้นจากตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 1,028 ตัวอย่างเปรียบเทียบ

กับชุดน้ำยาสำเร็จรูป COBAS Amplicor NG assay ในปี ค.ศ. 2010 ผลการศึกษาพบว่า น้ำยาที่พัฒนาขึ้นมีความไว และความจำเพาะต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* คิดเป็น ร้อยละ 100<sup>(6)</sup> นอกจากนี้ JME Venter และคณะได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยา in-house real time PCR กับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Aptima assay ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* จากตัวอย่างจากปัสสาวะ ตัวอย่างจาก ทวารหนักและตัวอย่างจากช่องคอในปี ค.ศ. 2019 พบว่า น้ำยา in-house real time PCR มีค่าความไวร้อยละ 82.4 ในตัวอย่างจากทวารหนัก ร้อยละ 83.3 ในตัวอย่างจาก ช่องคอ และร้อยละ 85.7 ในตัวอย่างจากปัสสาวะ และ มีความจำเพาะ ร้อยละ 100 ในตัวอย่างส่งตรวจทุกชนิด ที่ทำการทดสอบ<sup>(7)</sup> การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเพื่อ เปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยา in-house real time PCR กับน้ำยาสำเร็จรูป ซึ่งอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสาร พันธุกรรมเช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามวิธีเพาะเชื้อยัง ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในตัวอย่างส่งตรวจจากอวัยวะสืบพันธุ์และตัวอย่างอื่น นอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ ถึงแม้ว่าการศึกษาเปรียบเทียบ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีเพิ่มปริมาณ สารพันธุกรรมกับวิธีเพาะเชื้อยังมีอยู่น้อย ทั้งนี้อาจเป็น เพราะวิธีเพาะเชื้อมักมีความไวต่ำในตัวอย่างส่งตรวจอื่น นอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์<sup>(3)</sup> ปัจจุบันงานห้องปฏิบัติ การโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์การแพทย์บางรัก ด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ใช้วิธีเพาะเชื้อเป็นวิธีตรวจ ยืนยันการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และทดสอบความไว ต่อสารดีออกซิซีฟ ในงานประจำวัน แต่ด้วยข้อจำกัด หลาย ๆ อย่างของวิธีเพาะเชื้อที่ต้องใช้ระยะเวลาการคอยผลนาน ใช้ความชำนาญในการทดสอบสูง และมักมีความไวต่ำใน ตัวอย่างอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ งานห้องปฏิบัติ การโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์การแพทย์บางรัก ด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์จึงได้พัฒนาวิธีที่อาศัย หลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่ มีความไว ความจำเพาะสูง และมีความเหมาะสมในการ ตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างส่งตรวจที่หลากหลาย เพื่อใช้ในงาน ประจำวัน ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทดสอบหาสภาวะ

ที่เหมาะสมของน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนา ขึ้นและใช้สภาวะดังกล่าวในการทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ โดยมีน้ำยา สำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection (Seegene, เกาหลีใต้) เป็นน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบกรณี ผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อให้ผลขัดแย้งกัน

ผู้วิจัยคาดหวังว่าชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นสามารถ นำมาใช้ในงานประจำวันด้วยราคาและประสิทธิภาพของ น้ำยาที่ผู้รับบริการสามารถเข้าถึงบริการและให้ผล การตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง ลดการแพร่เชื้อ นำไปสู่ การลดปัญหาเชื้อดื้อยา และสามารถนำความรู้ที่ได้ไป ถ่ายทอดให้กับหน่วยงานห้องปฏิบัติการเครือข่าย ทั่วประเทศเพื่อ พัฒนาศักยภาพบุคลากรในการ เปิดห้องปฏิบัติการ คลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ให้กับประชากรกลุ่มเสี่ยงได้เข้าถึงบริการเพื่อให้สามารถ ได้รับการตรวจ วินิจฉัย รักษา รวมทั้งในการป้องกัน ควบคุมการแพร่ระบาดของโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

## วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae*
2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ ในด้านความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและ ค่าทำนายผลลบ
3. เพื่อเปรียบเทียบต้นทุนของการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยชุดน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อ

## วิธีการศึกษา

### การคัดเลือกตัวอย่าง

ตัวอย่างสำหรับการทดสอบเพื่อหาสภาวะที่ เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ในการ ตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และตัวอย่างสำหรับการ ประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยา in-house real time PCR

เป็นตัวอย่างจากผู้มารับบริการเพศชายและหญิงในทุกช่วงอายุ ณ คลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ในช่วงเดือนมกราคม - ตุลาคม 2563 โดยเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงทางเพศสัมพันธ์และมีการใช้ช่องทางการมีเพศสัมพันธ์ได้แก่ท่อปัสสาวะ (Urethral swab) หรือ ปัสสาวะ (Urine) ปากมดลูก (Cervical swab) ทวารหนัก (Rectal swab) หรือช่องคอ (Pharyngeal swab) ทั้งแสดงอาการและไม่แสดงอาการทางคลินิก รวม 300 ตัวอย่าง

1. ตัวอย่างสำหรับการทดสอบเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* รวม 60 ตัวอย่าง เป็นพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างส่งตรวจที่ทราบผลการตรวจด้วยวิธีการเพาะเชื้อและชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection โดยเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* จำนวน 60 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

1.1 สารพันธุกรรมจากท่อปัสสาวะ จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.2 สารพันธุกรรมจากตัวอย่างปัสสาวะ จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.3 สารพันธุกรรมจากปากมดลูก จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.4 สารพันธุกรรมจากทวารหนัก จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.5 สารพันธุกรรมจากช่องคอ จำนวน 10 ตัวอย่าง

นอกจากนั้นเป็นสารพันธุกรรมที่ทราบว่าได้ผลลบด้วยวิธีเพาะเชื้อและชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection จำนวน 10 ตัวอย่าง

2. ตัวอย่างสำหรับการประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อรวม 240 ตัวอย่าง ใช้การคำนวณกลุ่มตัวอย่างจากสูตรคำนวณ<sup>(8)</sup> โดยที่

- ค่าความไวที่คาดหวังของน้ำยา in-house real time PCR = 90%

- ค่าความจำเพาะที่คาดหวังของน้ำยา in-house real time PCR = 90%

- ความชุกของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในประเทศไทย<sup>(9)</sup> = 1.3%

- ค่าความแม่นยำ ( $\pm$  คาดหวัง) = 0.10

- ค่าความเชื่อมั่น = 95%

- ค่าอัตราการถอนตัวจากโครงการ = 10%

Sensitivity/Specificity - Estimation	
Expected sensitivity:	<input type="text" value="0.90"/>
Expected specificity:	<input type="text" value="0.90"/>
Prevalence of disease (p):	<input type="text" value="1.3"/>
Precision ( $\pm$ expected):	<input type="text" value="0.10"/>
Confidence level 100(1 - $\alpha$ ):	<input type="text" value="95"/> %
Expected dropout rate:	<input type="text" value="10"/> %
<input type="button" value="Calculate"/> <input type="button" value="Reset"/>	
Sample size for sensitivity, $n_{sen}$ =	<input type="text" value="27"/>
Sample size for specificity, $n_{spec}$ =	<input type="text" value="-115"/>
Final sample size (largest), n =	<input type="text" value="27"/>
Final sample size (with 10% dropout), $n_{drop}$ =	<input type="text" value="30"/>

จากการคำนวณต้องใช้กลุ่มตัวอย่างสำหรับการประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ 30 ตัวอย่าง และเพื่อความครอบคลุมกับชนิดของตัวอย่างส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่มีอยู่อย่างหลากหลาย ผู้วิจัยจึงคัดเลือกตัวอย่างแบบกลุ่ม ดังนี้

2.1 สารพันธุกรรมจากตัวอย่างท่อปัสสาวะหรือปัสสาวะที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพาะเชื้อจำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบจำนวน 30 ตัวอย่าง

2.2 สารพันธุกรรมจากตัวอย่างปากมดลูกที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพาะเชื้อ

จำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบจำนวน 30 ตัวอย่าง

2.3 สารพันธุกรรมจากตัวอย่างทวารหนัก  
 ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพาะเชื้อ  
 จำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบจำนวน 30 ตัวอย่าง

2.4 สารพันธุกรรมจากตัวอย่างช่องคอที่ให้  
 ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพาะเชื้อจำนวน  
 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบจำนวน 30 ตัวอย่าง  
**การเก็บตัวอย่างและการขนส่ง**

สารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างท่อปัสสาวะ  
 (Urethral swab) ปัสสาวะ (Urine) ปากมดลูก (Cervical  
 swab) ทวารหนัก (Rectal swab) และช่องคอ (Pharyn-  
 geal swab) เป็นตัวอย่างที่เหลือจากตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ  
*C. trachomatis* ในงานประจำวัน โดยได้มีการขออนุญาต  
 ใช้ตัวอย่างสารพันธุกรรมภายในหน่วยงานห้องปฏิบัติการ  
 เพื่อทำการศึกษาวิจัยจากผู้อำนวยการกองโรคเอดส์และ  
 โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ก่อนนำมาทำการตรวจวิเคราะห์  
 ตัวอย่างถูกเก็บไว้ที่ตู้เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส  
 ห้องปฏิบัติการกลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ภายใน  
 ระยะเวลา 12 เดือนก่อนนำมาใช้ทำการทดสอบ

## วิธีการทดสอบ

1. ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house  
 real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae*

### 1.1 วิธีสกัดสารพันธุกรรม

สำหรับตัวอย่าง swab ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้  
 ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน (Vortex) จากนั้นแบ่งตัวอย่างใน  
 อาหารเลี้ยงเชื้อ 200 µl ใส่ในหลอด 1.5 micro  
 centrifuge tube สำหรับตัวอย่างปัสสาวะให้นำปัสสาวะ  
 1 มิลลิลิตรมาปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา  
 10 นาทีก่อนนำตะกอนส่วนที่เหลือ 200 ไมโครลิตรไป  
 สกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างส่งตรวจ  
 ด้วยชุดสกัดที่พัฒนาขึ้น<sup>(10)</sup>

1.2 Primer และ Probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ  
*N. gonorrhoeae*

วิธี in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเพิ่ม  
 ปริมาณสารพันธุกรรมด้วย Primer และ Probe ที่จำเพาะ  
 ต่อยีนเป้าหมาย *porA* pseudogene (PorA gene) สำหรับ  
 เชื้อ *N. gonorrhoeae* และ Human Beta-globin gene  
 ใช้เป็นตัวควบคุมภายในโดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ  
 Primer และ Probe ที่ใช้ในการทดสอบ (ตารางที่ 1)<sup>(11)</sup>

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer และ Probe ที่ใช้ในการทดสอบด้วยน้ำยาที่พัฒนาขึ้น

ยีนเป้าหมาย	Primer และ Probe	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'
<i>N. gonorrhoeae</i> (PorA gene)	PorA-Forward primer	CAG CAT TCA ATT TGT TCC GAG TC
	PorA-Reverse primer	GAA CTG GTT TCA TCT GAT TAC TTT CCA
	PorA-Probe	HEX -CGC CTA TAC GCC TGC TAC TTT CAC GC- BBQ
Human Beta-globin gene	Human Beta-globin-Forward primer	TTG CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC
	Human Beta-globin-Reverse primer	ACA GGG CAG TAA CCG CAG ACT TCT CC
	Human Beta-globin-Probe	Cy5 -ACC TCA AAC AGA CAC CAT GGT GCA CCT GAC TCC- BBQ

### 1.3 ขั้นตอนการทดสอบ

การศึกษานี้ใช้น้ำยา LightCycler® Multiplex  
 DNA Master (Roche Diagnostic, เยอรมนี) ในการ  
 ทดสอบโดยใช้ที่ปริมาณ 3 µl ต่อปฏิกิริยาการทดสอบโดย  
 ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นของ condition ระหว่าง

200-500 nM เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ในการหา  
 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* พบว่า  
 ความเข้มข้นน้อยกว่า 200 nM ไม่สามารถตรวจหาเชื้อ  
 ได้ครบทุกตัวอย่าง<sup>(11)</sup>

1.3.1 ทดสอบความเข้มข้นและปริมาณ primer และ probe ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* แบบแยกหลอดปฏิบัติการ (Singleplex in-house real time PCR for PorA gene)

1.3.2 ทดสอบความเข้มข้นและปริมาณ primer และ probe ในการตรวจหาตัวควบคุมภายใน แบบแยกหลอดปฏิบัติการ (Singleplex in-house real time PCR for Human Beta-globin gene)

1.3.3 ทดสอบความเข้มข้นและปริมาณ primer และ probe ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และตัวควบคุมภายในร่วมกันในหนึ่งหลอดปฏิบัติการ (Duplex in-house real time PCR for PorA gene and Human Beta-globin gene)

โดยตัวอย่างทั้งหมดจะถูกทำการทดสอบ 2 ซ้ำ เพื่อความถูกต้อง แม่นยำของผลการตรวจวิเคราะห์

ตัวควบคุมบวก (Positive control) ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ สารพันธุกรรมของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ผ่านการทดสอบแล้วพบว่าให้ผล *N. gonorrhoeae* เป็นบวกด้วยน้ำยา Real-time PCR สำเร็จรูปโดยเป็นสารพันธุกรรมที่เหลือจากตัวอย่างทดสอบความชำนาญ (EQA *C. trachomatis/N. gonorrhoeae*, Labquality, ฟินแลนด์ ปี พ.ศ. 2563) สารพันธุกรรมถูกเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้และตัวควบคุมลบ (Negative control) ได้แก่ Rnase free water

**1.4 ทำการทดสอบโดยเครื่อง Real time PCR**  
ใช้เครื่อง CFX96™ Real time System (Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา) ในการทดสอบโดยมีโปรโตคอลการทดสอบ ดังนี้

1.4.1 Pre-incubate ที่อุณหภูมิ 95° C 3 นาที

1.4.2 Denature ที่อุณหภูมิ 95° C 10 วินาที

1.4.3 Annealing และ Extension ที่อุณหภูมิ 55° C 30 วินาทีและอ่านสัญญาณสีฟลูออเรสเซนส์ HEX สำหรับยีน PorA และสี Cy5 สำหรับยีน Human Beta-globin gene

1.4.4 PCR Cycle จำนวน 45 รอบ

## 1.5 การวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นต้องมีลักษณะเป็น Amplification curve และทำการเปรียบเทียบค่า Cycle threshold (Ct) value หรือค่าจำนวนรอบการทำงานของ real time PCR ที่ให้ค่าแสงฟลูออเรสเซนส์ตัดกับเส้น Threshold โดยสถานะที่เหมาะสมควรมีค่า Ct ต่างจากค่า Ct ของวิธีอ้างอิง (Anyplex™ CT/NG Real-time Detection) ไม่เกิน 2-3 รอบ

## 2. ประเมินประสิทธิภาพชุดน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ

สถานะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ได้จากการทดสอบก่อนหน้าที่จะถูกใช้สำหรับทดสอบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อโดยใช้ค่าทางสถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล และการแปลผลการทดสอบด้วยน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีหลักการ ดังนี้

2.1 ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae*: พบ Amplification curve ของสัญญาณสี HEX สำหรับยีน PorA และมีค่า Ct ≤ 40 และ/หรือพบ Amplification curve ของสัญญาณสี Cy5 สำหรับยีน Human Beta-globin และมีค่า Ct ≤ 40

2.2 ผลลบต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae*: พบ Amplification curve ของสัญญาณสี Cy5 สำหรับยีน Human Beta-globin และมีค่า Ct ≤ 40 เท่านั้น

2.3 แปลผลไม่ได้: ไม่พบ Amplification curve ของสัญญาณสี HEX สำหรับยีน PorA และไม่พบ Amplification curve ของสัญญาณสี Cy5 สำหรับ Human Beta-globin gene

ในกรณีที่ผลการทดสอบด้วยชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นและวิธีเพาะเชื้อให้ผลไม่สอดคล้องกัน ให้ทำการทดสอบด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection (Seegene, เกาหลีใต้)

## 3. เปรียบเทียบต้นทุนการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยชุดน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อ

## ผลการศึกษา

การทดสอบสถานะที่เหมาะสมของชุดน้ำยา in-house real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยมีสัดส่วนน้ำยา in-house real time PCR ในแต่ละ

ความเข้มข้นปฏิกิริยาสำหรับตรวจหาเชื้อ PorA และยีน Human Beta-globin แบบ Singleplex in-house real time PCR (ตารางที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 2 สัดส่วนน้ำยา in-house real time PCR ในแต่ละความเข้มข้นปฏิกิริยา (200-500 nM) สำหรับตรวจหาเชื้อ PorA แบบ Singleplex in-house real time PCR

น้ำยา in-house real time PCR	ความเข้มข้นปฏิกิริยา			
	200 nM	300 nM	400 nM	500 nM
LightCycler® Multiplex DNA Master	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
Rnase free water	11 µl	10.5 µl	10 µl	9.5 µl
10 µm PorA Forward primer	0.4 µl	0.6 µl	0.8 µl	1 µl
10 µm PorA Reverse primer	0.4 µl	0.6 µl	0.8 µl	1 µl
10 µm PorA probe	0.2 µl	0.3 µl	0.4 µl	0.5 µl
Reagent volume	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Sample volume	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

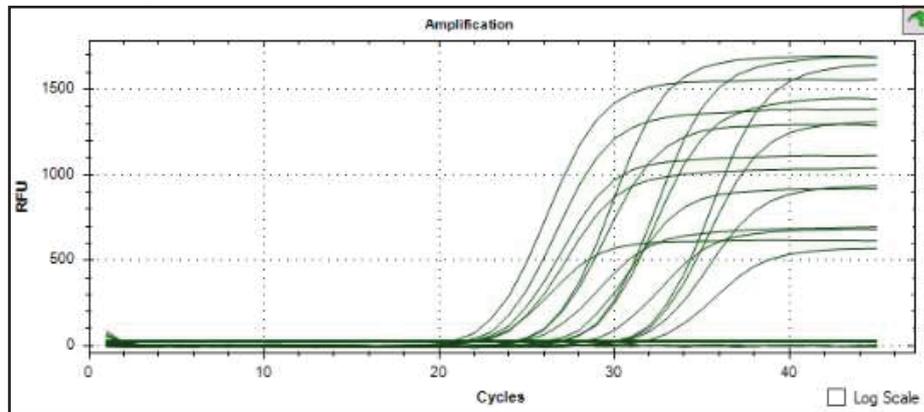
ตารางที่ 3 สัดส่วนน้ำยา in-house real time PCR ในแต่ละความเข้มข้นปฏิกิริยา (200-500 nM) สำหรับตรวจหาเชื้อ Human Beta-globin แบบ Singleplex in-house real time PCR

น้ำยา in-house real time PCR	ความเข้มข้นปฏิกิริยา			
	200 nM	300 nM	400 nM	500 nM
LightCycler® Multiplex DNA Master	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
Rnase free water	11 µl	10.5 µl	10 µl	9.5 µl
10 µm PorA Forward primer	0.4 µl	0.6 µl	0.8 µl	1 µl
10 µm PorA Reverse primer	0.4 µl	0.6 µl	0.8 µl	1 µl
10 µm PorA probe	0.2 µl	0.3 µl	0.4 µl	0.5 µl
Reagent volume	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Sample volume	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นปฏิกิริยา ตั้งแต่ 200-500 nM สามารถตรวจหาเชื้อ PorA ในตัวอย่างส่งตรวจทุกชนิดที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยมีค่า Ct เหลือใกล้เคียงกับค่า Ct ที่ตรวจด้วยชุดน้ำยา

สำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection และสามารถตรวจหาตัวควบคุมภายในได้ในตัวอย่างส่งตรวจทุกชนิดที่ให้ผลบวกและลบต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* (รูปที่ 1-2 และตารางที่ 4-5)

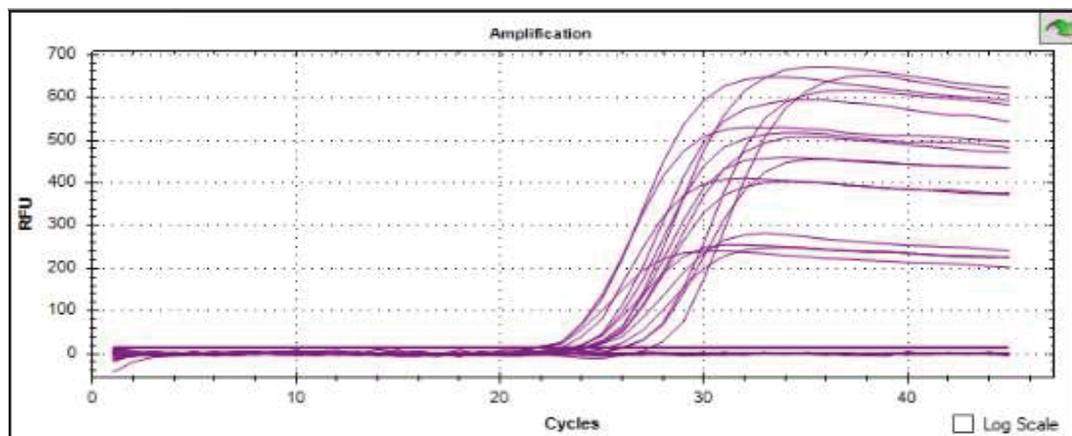
รูปที่ 1 กราฟแสดง Amplification curve ของสัญญาณสี HEX ในการตรวจหา ยีน PorA  
ในตัวอย่างส่งตรวจที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae*



ตารางที่ 4 ผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในตำแหน่งยีน PorA ที่ความเข้มข้น 200-500 nM  
แบบ Singleplex in-house real time PCR

ชนิดตัวอย่างส่งตรวจ	ผลเดิมด้วยวิธีเพาะเชื้อและชุดน้ำยา Anyplex™ CT/NG Real-time Detection		ผลการทดสอบสำหรับ ยีน PorA (Singleplex in-house real time PCR)							
			ความเข้มข้น 200 nM		ความเข้มข้น 300 nM		ความเข้มข้น 400 nM		ความเข้มข้น 500 nM	
	แปลผล	Ct	แปลผล	Mean Ct	แปลผล	Mean Ct	แปลผล	Mean Ct	แปลผล	Mean Ct
Urethral swab	Positive	21.32	Positive	23.35	Positive	21.41	Positive	21.03	Positive	20.29
Urine	Positive	27.83	Positive	27.83	Positive	25.56	Positive	26.22	Positive	26.62
Cervical swab	Positive	30.84	Positive	31.17	Positive	29.63	Positive	29.80	Positive	29.73
Rectal swab	Positive	21.27	Positive	21.57	Positive	21.39	Positive	23.04	Positive	23.24
Pharyngeal swab	Positive	36.02	Positive	37.92	Positive	37.11	Positive	36.35	Positive	35.20
Mix negative samples	Negative	N/A	Negative	N/A	Negative	N/A	Negative	N/A	Negative	N/A

รูปที่ 2 กราฟแสดง Amplification curve ของสัญญาณสี Cy5 ในการตรวจหา ยีน Human Beta-globin  
ในตัวอย่างส่งตรวจที่ให้ผลบวกและลบต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae*



ตารางที่ 5 ผลการตรวจหาตัวควบคุมภายใน  
 ในตำแหน่งยีน Human Beta-globin ที่ความเข้มข้น 200-500 nM แบบ Singleplex in-house real time PCR

ชนิดตัวอย่างส่งตรวจ	ผลเดิมด้วยวิธีเพาะเชื้อและชุดน้ำยา Anyplex™ CT/NG Real-time Detection		ผลการทดสอบสำหรับ ยีน Human Beta-globin (Singleplex in-house real time PCR)							
			ความเข้มข้น 200 nM		ความเข้มข้น 300 nM		ความเข้มข้น 400 nM		ความเข้มข้น 500 nM	
			แปลผล	Mean Ct	แปลผล	Mean Ct	แปลผล	Mean Ct	แปลผล	Mean Ct
Urethral swab	Positive	24.95	Positive	23.62	Positive	26.14	Positive	26.01	Positive	27.40
Urine	Positive	21.83	Positive	21.82	Positive	23.05	Positive	21.93	Positive	21.92
Cervical swab	Positive	24.64	Positive	25.33	Positive	24.12	Positive	24.37	Positive	24.41
Rectal swab	Positive	23.00	Positive	24.30	Positive	24.08	Positive	23.57	Positive	23.61
Pharyngeal swab	Positive	34.91	Positive	35.66	Positive	35.81	Positive	35.95	Positive	35.01
Mix negative samples	Negative	32.91	Negative	33.34	Negative	33.26	Negative	32.67	Negative	31.23

การทดสอบแบบแยกหลอดปฏิกิริยา (Singleplex in-house real time PCR) ในการตรวจหายีน *PorA* และยีน Human Beta-globin พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบตรวจหายีนทั้งสองชนิดอยู่ที่ 200-300 nM เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของปฏิกิริยาที่น้อยแต่ก็ยังสามารถตรวจหายีนเป้าหมายได้ด้วยค่า Ct ที่ใกล้เคียงกับวิธีอ้างอิง ผู้วิจัยทำการทดสอบตรวจหายีนทั้งสองชนิดใน

หลอดเดียวกัน (Duplex in-house real time PCR) โดยกำหนดความเข้มข้นทดสอบ 4 สภาวะ ได้แก่ ความเข้มข้น *PorA*/Human Beta-globin gene ที่ 200/200 nM, 200/300 nM, 300/300 nM, 300/200 nM โดยมีสัดส่วนน้ำยา in-house real time PCR ในแต่ละความเข้มข้นปฏิกิริยาสำหรับตรวจหายีน *Por* และยีน Human Beta-globin ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน (ตารางที่ 6)

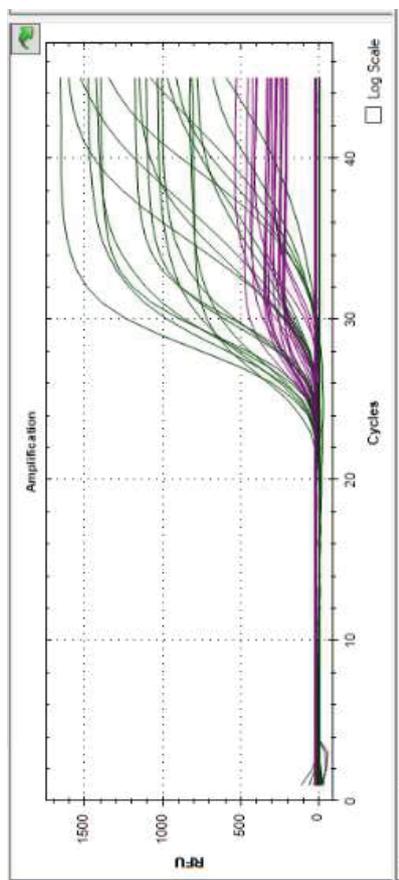
ตารางที่ 6 สัดส่วนน้ำยา in-house real time PCR ใน 4 สภาวะความเข้มข้นปฏิกิริยา สำหรับตรวจหายีน *PorA* และยีน Human Beta-globin ร่วมกัน (Duplex in-house real time PCR)

น้ำยา in-house real time PCR	ความเข้มข้นปฏิกิริยา <i>PorA</i> gene/Human Beta-globin gene			
	200/200 nM	200/300 nM	300/300 nM	300/200 nM
LightCycler® Multiplex DNA Master	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
Rnase free water	10 µl	9.5 µl	9 µl	9.5 µl
10 µm <i>PorA</i> Forward primer	0.4 µl	0.4 µl	0.6 µl	0.6 µl
10 µm <i>PorA</i> Reverse primer	0.4 µl	0.4 µl	0.6 µl	0.6 µl
10 µm <i>PorA</i> probe	0.2 µl	0.2 µl	0.3 µl	0.3 µl
10 µm Human Beta-globin gene Forward primer	0.4 µl	0.6 µl	0.6 µl	0.4 µl
10 µm Human Beta-globin gene Reverse primer	0.4 µl	0.6 µl	0.6 µl	0.4 µl
10 µm Human Beta-globin gene probe	0.2 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.2 µl
Reagent volume	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Sample volume	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นปฏิกิริยา ทั้ง 4 สภาวะสามารถตรวจหายีน *PorA* และยีน Human Beta-globin ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันในตัวอย่างส่งตรวจทุกชนิดที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* และมีค่า Ct เฉลี่ยใกล้เคียงกับค่า Ct ที่ตรวจด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection และ

ในตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ก็สามารถตรวจพบสัญญาณสีฟลูออเรสเซนต์ของยีน Human Beta-globin ได้ ซึ่งความเข้มข้นของปฏิกิริยาที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจหายีนทั้ง 2 ชนิดได้ คือ 200/200 nM (รูปที่ 3 และตารางที่ 7)

รูปที่ 3 กราฟแสดง Amplification curve ของสัญญาณสี HEX และ Cy5 ในการตรวจหา ยีน PorA และ ยีน Human Beta-globin ในหลอดปฏิบัติการเดียวกัน



ตารางที่ 7 ผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในตำแหน่งยีน PorA และตัวควบคุม  
ภายในตำแหน่งยีน Human Beta-globin ที่ความเข้มข้น 200-300 nM แบบ Duplex in-house real time PCR

ชนิดตัวอย่างส่งตรวจ	ผลการทดสอบสำหรับยีน PorA และยีน Human Beta-globin (Duplex in-house real time PCR)											
	CT/NG Real-time Detection			ความเข้มข้น 200/200 nM			ความเข้มข้น 300/300 nM			ความเข้มข้น 300/200 nM		
	แปลผล	Ct (PorA/Beta-globin)	Mean Ct (PorA/Beta-globin)	แปลผล	Mean Ct (PorA/Beta-globin)	แปลผล	Mean Ct (PorA/Beta-globin)	แปลผล	Mean Ct (PorA/Beta-globin)	แปลผล	Mean Ct (PorA/Beta-globin)	
Urethral swab	Positive	21.32/24.95	23.51/23.19	Positive	22.14/25.48	Positive	22.07/26.87	Positive	21.11/26.05	Positive	21.11/26.05	
Urine	Positive	27.83/21.83	28.10/22.25	Positive	26.95/22.83	Positive	27.46/20.81	Positive	26.19/21.64	Positive	26.19/21.64	
Cervical swab	Positive	30.84/24.64	32.47/24.12	Positive	31.87/24.06	Positive	29.92/23.33	Positive	29.77/23.79	Positive	29.77/23.79	
Rectal swab	Positive	21.27/23.00	21.81/23.01	Positive	21.34/23.82	Positive	22.84/22.95	Positive	22.61/23.21	Positive	22.61/23.21	
Pharyngeal swab	Positive	36.02/34.91	37.26/35.49	Positive	37.48/35.51	Positive	36.94/35.20	Positive	36.57/34.86	Positive	36.57/34.86	
Mix negative samples	Negative	NA/32.91	NA/32.94	Negative	NA/32.87	Negative	NA/32.11	Negative	NA/32.05	Negative	NA/32.05	

ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยนี้สรุปได้ว่า ความเข้มข้นน้อยที่สุดของปฏิกิริยา real time PCR สำหรับตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ร่วมกับตัวควบคุมภายใน คือ ความเข้มข้นที่ 200 nM สำหรับยีน PorA และความเข้มข้นที่ 200 nM สำหรับยีน Human Beta-globin (200/200 nM) โดยใช้สัดส่วนของน้ำยา in-house real time PCR ดังนี้

- LightCycler® Multiplex DNA Master 3 µl
- Rnase free water 10 µl
- 10 µm PorA Forward primer 0.4 µl
- 10 µm PorA Reverse primer 0.4 µl
- 10 µm PorA probe 0.2 µl
- 10 µm Human Beta-globin gene Forward primer 0.4 µl
- 10 µm Human Beta-globin gene Reverse primer 0.4 µl

-10 µm Human Beta-globin gene probe  
0.2 µl

ในการวิเคราะห์ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของชุดน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อให้ผลการทดสอบตามประเภทของตัวอย่างทดสอบ ดังนี้ ตัวอย่างทอปปัสสาวะหรือปัสสาวะและตัวอย่างปากมดลูกให้ค่าการทดสอบทุกค่า คิดเป็นร้อยละ 100 ขณะที่ประสิทธิภาพของน้ำยา in-house real time PCR ในตัวอย่างช่องทางทวารหนักมีค่าความไว ร้อยละ 100 ความจำเพาะ ร้อยละ 86.67 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 88.24 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 และในตัวอย่างช่องคอ ค่าความไว ร้อยละ 100 ความจำเพาะ ร้อยละ 96.67 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 96.77 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพน้ำยา in-house real time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ ในตัวอย่างทอปปัสสาวะหรือปัสสาวะ ตัวอย่างจากปากมดลูก ตัวอย่างจากทวารหนัก และตัวอย่างจากช่องคอ

In-house real time PCR	Culture		Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
	Positive	Negative				
ตัวอย่างทอปปัสสาวะหรือปัสสาวะ	Positive	Negative	100	100	100	100
Positive	30	0				
Negative	0	30				
ตัวอย่างจากปากมดลูก	Positive	Negative	100	100	100	100
Positive	30	0				
Negative	0	30				
ตัวอย่างจากทวารหนัก	Positive	Negative	100	86.67	88.24	100
Positive	30	4				
Negative	0	26				
ตัวอย่างจากช่องคอ	Positive	Negative	100	96.67	96.77	100
Positive	30	1				
Negative	0	29				

ตัวอย่างทดสอบที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน ระหว่างการทดสอบด้วยน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อ ถูกนำมาทำการทดสอบต่อด้วยน้ำยาเพิ่ม ปริมาณสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection ผลการทดสอบพบว่า

ตัวอย่างทดสอบจากช่องทางทวารหนักและช่องคอ จำนวน 5 ตัวอย่างให้ผลการทดสอบด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ CT/NG Real-time Detection สอดคล้องกับการทดสอบด้วยน้ำยา in-house real time PCR (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบในตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน

Sample No.	Sample site	Culture method	Tested result			
			In-house real time PCR	Ct value	Anyplex™ CT/NG Real-time	Ct value
004R	Rectal	Negative	Positive	26.15	Positive	25.55
008R	Rectal	Negative	Positive	31.08	Positive	29.12
021R	Rectal	Negative	Positive	33.57	Positive	33.55
029R	Rectal	Negative	Positive	28.71	Positive	29.87
012P	Pharyngeal	Negative	Positive	36.70	Positive	35.43

Cycle threshold (Ct) value คือ ค่าจำนวนรอบ ของการทำงานของ real time PCR ที่ให้ค่าแสงฟลูออเรสเซนส์ตัดกับเส้น Threshold เป็นค่าที่บ่งชี้ความเข้มข้นของเชื้อเป้าหมายที่ต้องการทดสอบ โดยมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับความเข้มข้นเชื้อ

การติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยชุดน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อ พบว่าค่าใช้จ่ายต้นทุนของน้ำยา In-house real time PCR อยู่ที่ 165 บาท ต่อหนึ่งการทดสอบในขณะที่ต้นทุนของวิธีเพาะเชื้ออยู่ที่ 76 บาทต่อหนึ่งการทดสอบ ทั้งนี้การคิดความคุ้มค่า คิดเฉพาะน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์เท่านั้น (ตารางที่ 10)

การศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนของชุดตรวจหา

ตารางที่ 10 ต้นทุนน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์ชุดน้ำยา in-house real time PCR และวิธีเพาะเชื้อ

ต้นทุนน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์น้ำยา In-house real time PCR		ต้นทุนน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์วิธีเพาะเชื้อ	
รายการ	ราคาต่อหน่วย (บาท)	รายการ	ราคาต่อหน่วย (บาท)
1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง (MEM transport media)	20	1. Bangrak I media สำหรับเก็บตัวอย่าง	13
2. ชุดสกัดสารพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้น	50	2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด Chocolate agar	23
3. Forward/Reverse Primer (2 ชุด; <i>PorA</i> , <i>Beta-globin</i> gene)	6	3. ย้อมสีแกรม	23
4. Probe (2 ชุด; <i>PorA</i> , <i>Beta-globin</i> gene)	43	4. Oxidase test	1
5. LightCycler® Multiplex DNA Master	37	5. Superoxol test	1
6. PCR tube with cap	5	6. น้ำตาล Glucose	2
7. Filter tip	2	7. น้ำตาล Maltose	2
8. Microcentrifuge tube	2	8. น้ำตาล Sucrose	2
		9. น้ำตาล Lactose	2
		10. Cefinase	7
<b>รวม</b>	<b>165</b>	<b>รวม</b>	<b>76</b>

## อภิปรายและสรุป

การศึกษาวิจัยนี้มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer และประยุกต์ใช้ Probe จากการศึกษาของ Hopkins MJ และคณะ<sup>(6)</sup> ในการพัฒนาชุดน้ำยาตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* สัดส่วนขององค์ประกอบต่างๆ ในน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพด้านความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบเทียบเท่ากับวิธีเพาะเชื้อในตัวอย่างที่มาจากอวัยวะสืบพันธุ์ ขณะที่ในตัวอย่างอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ ได้แก่ ตัวอย่างทวารหนัก และตัวอย่างจากช่องคอ ชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตัวอย่างทวารหนักมีค่าความไว ร้อยละ 100 ความจำเพาะ ร้อยละ 86.67 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 88.24 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 และมีตัวอย่างในช่องคอ มีค่าความไว ร้อยละ 100 ความจำเพาะ ร้อยละ 96.67 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 96.77 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Hopkins MJ ซึ่งได้เปรียบเทียบกับน้ำยา real time PCR ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีเพาะเชื้อในตัวอย่างส่งตรวจปัสสาวะ โดยน้ำยา real time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไว ร้อยละ 96.90 ความจำเพาะ ร้อยละ 99.80<sup>(6)</sup> และสอดคล้องกับการศึกษาจากตัวอย่างทดสอบปากมดลูก (Cervical swab) ของ KEHL SC และคณะซึ่งประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Abbott LCx Neisseria gonorrhoeae assay เทียบกับวิธีเพาะเชื้อ โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Abbott LCx Neisseria gonorrhoeae assay ให้ค่าการประเมินประสิทธิภาพที่สูงเช่นเดียวกันโดยมีความไว ร้อยละ 94.30 และความจำเพาะ ร้อยละ 99.40<sup>(12)</sup>

ขณะที่ผลการประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้นในตัวอย่างทดสอบอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งได้แก่ ทวารหนักและช่องคอให้ผลไม่สอดคล้องกับวิธีเพาะเชื้อในทุกตัวอย่างทดสอบ และเมื่อนำตัวอย่างเหล่านั้นมาทดสอบด้วยน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำเร็จรูป ผลการทดสอบให้ผลตรงกันในทุกตัวอย่างสอดคล้องกับการศึกษาของ

Ewa Skulska และคณะ ซึ่งได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของวิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Real-Time PCR DUPLICON® Real-Time เทียบกับวิธีเพาะเชื้อในตัวอย่างทดสอบจากท่อปัสสาวะ (Urethral swab) ตัวอย่างจากปากมดลูก (Cervical swab) ตัวอย่างจากทวารหนัก (Rectal swab) และตัวอย่างจากช่องคอ (Pharyngeal swab) จำนวน 93 ตัวอย่าง พบว่าทั้งสองวิธีสามารถตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ได้สอดคล้องกันถึงร้อยละ 85.90 ขณะที่ร้อยละ 14.10 ของผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพาะเชื้อให้เป็นลบแต่ด้วยวิธี real time PCR ให้ผลบวก แสดงให้เห็นว่าวิธี real time PCR มีความไวมากกว่าวิธีเพาะเชื้อ<sup>(13)</sup> เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Boyadzhyan B และคณะซึ่งทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาสำเร็จรูปที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม น้ำยา APTIMA GC Assays เปรียบเทียบกับน้ำยา APTIMA Combo 2 Assay และวิธีเพาะเชื้อ พบว่าน้ำยาสำเร็จรูปทั้ง 2 ชนิดให้ผลการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ตรงกันทุกรายขณะที่วิธีเพาะเชื้อไม่สามารถตรวจหาเชื้อจำนวน 3 ตัวอย่างจากตัวอย่างทดสอบปัสสาวะและ swab 4 ตัวอย่าง จากการศึกษาที่สะท้อนให้เห็นว่าวิธีเพาะเชื้อมีความไวต่ำอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากไม่สามารถตรวจหาเชื้อได้โดยมีอัตราการพลาดการตรวจหาเชื้อร้อยละ 28.00<sup>(4)</sup> ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่างอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์จำนวน 5 ตัวอย่างให้ผลลบด้วยวิธีเพาะเชื้อแต่ให้ผลบวกด้วยวิธี Real-time PCR เมื่อดูผลการตรวจหาเชื้อในช่องทางอื่นที่อาสาสมัครใช้ในการมีเพศสัมพันธ์ พบว่าตัวอย่าง 4 รายจาก 5 รายมีผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในช่องทางอวัยวะสืบพันธุ์ (ท่อปัสสาวะ) และผลการทดสอบทั้ง 5 ตัวอย่างนี้ด้วยน้ำยา Real-time PCR สำเร็จรูปก็ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยเช่นกัน วิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อด้วยความไวและความจำเพาะที่สูง

แม้ว่าวิธีเพาะเชื้อจะเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยหาการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* และผลการศึกษาเปรียบเทียบความคุ้มค่าของน้ำยาและวัสดุ

วิทยาศาสตร์ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและวิธีเพาะเชื้อ พบว่าชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้น มีราคาต้นทุนสูงกว่าวิธีเพาะเชื้อประมาณ 2.2 เท่า แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูปแล้วยังมีราคาต้นทุนที่ต่ำกว่า 2.8 เท่า เช่นเดียวกัน<sup>(11)</sup> และถึงแม้ว่าชุดน้ำยา in-house real time PCR ที่พัฒนาขึ้นจะมีราคาต้นทุนที่สูงกว่าวิธีเพาะเชื้อ แต่จากผลการศึกษาวิจัยมากมาย พบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสม วิธีเพาะเชื้อมีความไวอยู่ในช่วงร้อยละ 85-95 สำหรับการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและอาจมีความไวแค่อ้อยู่ 50 ในผู้หญิงที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง นอกจากนี้ชนิดและคุณภาพของตัวอย่างทดสอบและสภาวะในการขนส่งตัวอย่างเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อวิธีเพาะเชื้อเนื่องจาก *N. gonorrhoeae* เป็นเชื้อที่มีความเปราะบางและตายง่าย<sup>(14)</sup> และวิธี Nucleic acid amplification test (NAATs) หรือการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อมีประโยชน์และมีข้อดีกว่าหลาย ๆ วิธี เนื่องจากมีความไว ความจำเพาะสูงและยังสามารถตรวจหาเชื้อได้ในตัวอย่างส่งตรวจที่หลากหลาย โดยเฉพาะในตัวอย่างอื่นนอกเหนือจากอวัยวะสืบพันธุ์ อีกทั้งวิธีเพาะเชื้อใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์มากกว่า 48 ชั่วโมง ขั้นตอนการตรวจยุ่งยาก เจ้าหน้าที่ต้องมีทักษะมีความชำนาญในการเลี้ยงเชื้อและต้องมีความระมัดระวังในการขนส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการ<sup>(3)</sup> ขณะที่วิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ได้ภายในระยะเวลา 3-4 ชั่วโมง การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี real-time PCR สามารถตรวจพบเชื้อจากสารพันธุกรรมถึงแม้ว่าเชื้อจะไม่มีชีวิตแล้ว ขณะที่วิธีเพาะเชื้อตรวจหาได้เฉพาะเชื้อที่มีชีวิตเท่านั้นซึ่งแสดงถึงการติดเชื้อในขณะนั้น ดังนั้นการนำวิธี real-time PCR มาตรวจวินิจฉัยว่ามีเชื้อติดเชื่อควรดูประวัติของผู้ป่วยร่วมด้วย หากเป็นผู้ป่วยใหม่และไม่เคยตรวจพบเชื้อมาก่อน สามารถใช้วิธี real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อได้ แต่หากผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าตรวจพบเชื้อ *N. gonorrhoeae* มาก่อนและกำลังได้รับการรักษาควรเว้นช่วงระยะเวลาไว้ 3 สัปดาห์หลังจากได้รับการรักษา ถึงจะ

สามารถใช้วิธี real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อ เนื่องจากอาจจะมีสารพันธุกรรมของเชื้อหลงเหลืออยู่ในช่วงระยะเวลาการรักษาถึงแม้ว่าเชื้อจะตายไปแล้ว<sup>(15)</sup>

คณะผู้วิจัยวางแผนการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคตเพื่อพัฒนาชุดน้ำยาที่สามารถตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และเชื้อ *C. trachomatis* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่มีความสำคัญมากที่สุดในรูปแบบการตรวจในหลอดปฏิบัติการเดียวกัน สามารถตรวจได้พร้อมกัน (in-house multiplex real-time PCR) ซึ่งจะสามารถลดค่าใช้จ่ายด้านน้ำยาลงไปได้และยังเป็นการเพิ่มขีดความสามารถการตรวจหาเชื้อทั้งสองชนิดทางห้องปฏิบัติการด้วยชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นเอง

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการกองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ หัวหน้าศูนย์การแพทย์บางรัก ด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านสำหรับข้อมูลในการนำมาใช้ประโยชน์

### เอกสารอ้างอิง

1. HIV info hub. Division of AIDS and STIs [Internet]. [cited 2021 Oct 12]. Available from: <https://hivhub.ddc.moph.go.th/epidemic.php> (in Thai)
2. Wilawan Thipmontree, Chenchit Chayachinda, Rossaphorn Kittiyowamarn. STI surveillance and prevention: gonorrhoea. *Siriraj Med Bull* 2020; 13(3): 196-204. (in Thai)
3. Stephanie N. Taylor, Oliver Liesenfeld, Rebecca A. Lillis, Barbara A. Body, Melinda Nye, James Williams, et al. Evaluation of the Roche cobas® CT/NG test for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in male urine. *Sex Transm Dis.* 2012; 39(7): 543-9. doi: 10.1097/OLQ.0b013e31824e26ff



4. Boyadzhyan B, Yashina T, Yatabe JH, Patnaik M, Hill CS. Comparison of the APTIMA CT and GC assays with the APTIMA combo 2 assay, the Abbott LCx assay, and direct fluorescent-antibody and culture assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(7): 3089-93. doi: 10.1128/JCM.42.7.3089-3093.2004
5. C. A. Gaydos, T. C. Quinn, D. Willis, A. Weissfeld, E. W. Hook, D. H. Martin, et al. Performance of the APTIMA combo 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 304-9. doi: 10.1128/JCM.41.1.304-309. 2003
6. Mark J Hopkins, Lynne J Ashton, Fath Alloba, Anura Alawattagama, Ian J Hart. Validation of a laboratory-developed real-time PCR protocol for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine. *Sex Transm Infect*. 2010; 86(3): 207-11. doi: 10.1136/sti.2009.040634
7. Johanna M E Venter, Precious M Mahlangu, Etienne E Müller, David A Lewis, Kevin Rebe, Helen Struthers, et al. Comparison of an in-house real-time duplex PCR assay with commercial HOLOGIC<sup>®</sup> APTIMA assays for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in urine and extra-genital specimens. *BMC Infect Dis* 2019, 19: 1-7. doi: 10.1186/s12879-018-3629-0
8. Arifin WN. Sample size calculator [Internet]. Wan Nor Arifin c2017-2021 [cited 2021 October 1]. Available from: <https://wnarifin.github.io/ssc/ssnsp.html>
9. National AIDS Management Center Bureau of AIDS, TB and STIs. 2017 Thailand Progress Report Prevention and Control of AIDS. Nonthaburi: National AIDS Management Center, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. 2017. (in Thai)
10. Busara Bamrungsak, Siwimol Phoomniyom, Rungnapa Luengprasit. Development and validation of an in-house real-time PCR assay for the detection of *Chlamydia trachomatis* in sexually transmitted infections clinic. *Thai AIDS Journal*. 2020; 32: 28-41. (in Thai)
11. Siwimol Phoomniyom, Busara Bamrungsak, Kornsiri Boonprathueng, Pongsathorn Sangprasert, Rungnapa Luengprasit, Nattapon Ngarmjiratam, et al. Efficiency evaluation of an in-house real-time PCR assay for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens. *Thai AIDS Journal*. 2020; 33: 9-20. (in Thai)
12. Kehl SC, Georgakas K, Swain GR, Sedmak G, Gradus S, Singh A, et al. Evaluation of the Abbott LCx Assay for Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Endocervical Swab Specimens from Females. *J. CLIN. MICROBIOL*. 1998; 36(12): 3549-51.
13. Ewa Skulska, Beata Młynarczyk-Bonikowska, Szymon Walter de Walthoffen, Grażyna Młynarczyk, Magdalena Malejczyk, Sławomir Majewski. The Comparison of Real-Time PCR and bacterial culture in laboratory diagnostics of gonorrhoea in patients of Department of Dermatology and Venereology Medical University of Warsaw. *MED. DOŚW. MIKROBIOL*. 2015; 67(1): 29-38. (in Polish)

14. David M Whiley, John W Tapsall, Theo P Sloots. Nucleic Acid Amplification Testing for *Neisseria gonorrhoeae* an Ongoing Challenge. *J Mol Diagn.* 2006; 8(1): 3-15. doi: 10.2353/jmoldx.2006.050045
15. John R. Papp, Julius Schachter, Charlotte A. Gaydos, Barbara Van Der Pol. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* -2014. *MMWR Recomm Rep.* 2014; 63(2): 1-19.