Thesis Title Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by Using In-House Multiplex Single-Tube Nested Polymerase Chain Reaction

Author Mr. Channat Promping

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai

ABSTRACT

Background: *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* are the most frequently bacteria encountered sexually transmitted infections worldwide. Clinical symptoms are ranging from subclinical to severe diseases with complications. Diagnosis of infections cause by these two organisms is largely dependent to the traditional assays; direct staining and cultivation which have been limited in their sensitivity, specificity and time consuming in some assays.

Objectives: To evaluate the diagnostic performance of in-house multiplex single-tube nested PCR (M-SN PCR) and specimen sources for detection of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*.

Methods: In-house M-SN PCR employed 3 *C. trachomatis* and 3 *N. gonorrhoeae* specific outer and inner primers to produced products of 108 and 152 bp respectively. The ß-globin gene primer was added as an internal control of amplification. Diagnostic performance of the assay was evaluated by comparing with Roche Multiplex AMPLICOR CT/NG PCR using urine samples. The sensitivity of using non-invasive collected urine and self-collected dry vaginal swab for diagnosis of infections was evaluated by comparing with standard urethral and endocervical swabs.

Results: The sensitivity of M-SN PCR for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* with the background of cellular DNA was 10 pg and 1 ng respectively. When compared with

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

commercial test kit, M-SN PCR had sensitivity at 97% and 94% for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* respectively, while specificity was 100% for both organisms. For diagnosis of infections, in men, sensitivity of using urine sample for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* infections was higher than those using standard urethral swab (89% vs. 83% and 98% vs.93% respectively) but specificity was 100% for both. However, in women, using self-collected dry vaginal swab had lower sensitivity than standard endocervical swab (89% vs. 100% and 92% vs.100% respectively) while specificity was 100% for both. When the assay cost was analyzed, it was at least 8 times less than the commercial test kit.

Conclusion: Our cost saving in-house M-SN PCR had sensitivity, specificity, positive and negative predictive values comparable to those obtained from Roche Multiplex AMPLICOR CT/NG PCR. When the infection was to be diagnosed, urine sample was benefit in both sensitivity and less invasiveness compared to the standard urethral swab. Despite the slightly lower sensitivity, self-collected dry vaginal swab should be considered alternative to standard swab as it has collection and transportation advantages.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจหาเชื้อ คลาไมเดีย ทราโคมาติส และ ไนซีเรีย โกโนเรีย โดยวิธีมัลติเพลก ซิงเกิล-ทิ้ว เนสเต็ด โพลีเมอร์เรสเชน รีแอ็คชัน ที่พัฒนาขึ้นเอง

ผู้เขียน **นายชาญณัฏฐ์ พรมพิงค์**

ปริญญา **วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)**

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ **ผศ. ดร. ปราณี ลี้ชนะชัย**

บทคัดย่อ

ที่มาและปัญหา: เชื้อ *Chlamydia trachomatis* และ *Neisseria gonorrhoeae* เป็นสาเหตุโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่พบได้บ่อยทั่วโลก อาการของโรคพบได้ตั้งแต่ไม่แสดงอาการถึงอาการที่รุนแรงร่วมกับโรคแทรกซ้อน การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อส่วนใหญ่ใช้การย้อมสี และการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความไวและความจำเพาะต่ำ และใช้เวลานาน

วัตถุประสงค์: เพื่อประเมินประสิทธิภาพวิธี Multiplex single-tube nested PCR (M-SN PCR) ที่พัฒนาขึ้นเอง และชนิดสิ่งส่งตรวจในการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae*

วิธีการ: Multiplex Single-tube nested PCR (M-SN PCR) ที่พัฒนาขึ้นเองใช้ primer ที่จำเพาะต่อ *C. trachomatis* 3 ตำแหน่ง และ จำเพาะต่อ *N. gonorrhoeae* 3 ตำแหน่ง โดยจะได้ ดีเอ็นเอผลผลิต ขนาด 108 และ 152 bp ตามลำดับ และใช้ primer ที่จำเพาะต่อ ß–globin gene เป็นตัวควบคุมภายใน และประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบโดยเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Roche Multiplex AMPLICOR CT/NG PCR พร้อมกับประเมินความไวของ สิ่งส่งตรวจที่เก็บโดยไม่ทำให้เจ็บปวดได้แก่ ปัสสาวะและ ไม้ป้ายช่องคลอดที่เก็บเอง เปรียบเทียบกับสิ่งส่งตรวจมาตรฐานที่ใช้ทั่วไปเช่น ไม้ป้ายท่อปัสสาวะ และไม้ป้ายปากช่องคลอด

ผลการทดลอง: วิธี M-SN PCR ที่พัฒนาขึ้นเองมีความไวในการตรวจหาเชื้อ *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* 10 pg และ 1 ng ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูปพบว่า วิธี M-SN PCRที่พัฒนาขึ้นเองมีความไวในการตรวจหา *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* เท่ากับ 97% และ 94%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตามลำดับ ขณะที่มีความจำเพาะต่อเชื้อทั้งสอง 100% ในการประเมินความไวการใช้สิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ เพื่อตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ พบว่าปัสสาวะมีความไวในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อทั้งสองชนิดดีกว่าการใช้ไม้ป้ายท่อปัสสาวะ (89% เทียบกับ 83% และ 98% เทียบกับ 93% ตามลำดับ) และทีความจำเพาะเท่ากับ 100% อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ไม้ป้ายช่องคลอดมีความไวต่ำกว่าการใช้ไม้ป้ายปากมดลูก (89% เทียบกับ 100% และ 92% เทียบกับ 100% ตามลำดับ) ความจำเพาะเท่ากับ 100% เช่นกัน ในการวิเคราะห์ค่าใช้จ่ายของวิธีทดสอบจากราคาวัสดุวิทยาศาสตร์พบว่ามีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าชุดน้ำยาสำเร็จรูปอย่างน้อย 8 เท่า

สรุปผลการทดลอง: วิธี M-SN PCR ที่พัฒนาขึ้นเองมีราคาประหยัด ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบในการตรวจหา *C. trachomatis* และ *N. gonorrhoeae* เทียบเท่าได้กับชุดน้ำยาสำเร็จรูป การใช้ปัสสาวะมีข้อดีทั้งในเรื่องความไวในการตรวจและไม่ทำให้เกิดความเจ็บปวดขณะเก็บเมื่อเทียบกับไม้ป้ายท่อปัสสาวะ และเนื่องจากไม้ป้ายช่องคลอดด้วยตัวเองมีความไวต่ำกว่าไม้ป้ายปากมดลูก เพียงเล็กน้อยแต่มีข้อดีที่สามารถเก็บตัวอย่างได้เองและสะดวกในการนำส่งตรวจ จึงน่าจะใช้เป็นทาง เลือกหนึ่งในการตรวจคัดกรองการติดเชื้อทั้งสองชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved