

นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อซิฟิลิสในผู้บริจาคเลือดที่มีผลตรวจกรองทางน้ำเหลืองวิทยาเป็นบวก

ธารินทร์ ภัคดี¹ ปาริชาติ เพิ่มพิกุล¹ ศศิจิต เวชแพศย์¹ และ อังคณา เจริญวัฒนาโชคชัย²

¹ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ²โรงพยาบาลบางรัก กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

วัตถุประสงค์ เชื้อซิฟิลิสติดต่อผ่านการรับเลือดได้ จึงตรวจคัดกรองในโลหิตบริจาคมาตั้งแต่ทศวรรษที่ 1940 หลังจาก ค.ศ. 1983 ไม่มีรายงานการติดต่อผ่านการรับเลือดอีก ในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งวิธีการให้เลือดและการตรวจกรองการติดเชื้อซิฟิลิส จึงมีข้อสงสัยว่าเลือดจากผู้บริจาคเลือดที่ผลการคัดกรองการติดเชื้อซิฟิลิสเป็นบวกมีเชื้อซิฟิลิสหรือไม่ **วิธีการศึกษา** ทำการตรวจหา DNA ของเชื้อ *T. pallidum* ด้วยเทคนิค *polA* PCR ซึ่งมีความไว 3 เชื้อต่อโลหิต 100 microliter ในเลือดของผู้บริจาคโลหิต 25 รายที่ผลการตรวจคัดกรองเชื้อซิฟิลิสเป็นบวก และตรวจตัวอย่างโลหิตจากผู้ป่วยซิฟิลิสระยะต่างๆ 8 ราย ที่ยังไม่ได้รักษาเป็นกลุ่มควบคุม **ผลการศึกษา** การตรวจ *polA* PCR สำหรับเชื้อ *T. pallidum* ในตัวอย่างโลหิตจากผู้บริจาคโลหิตทั้ง 25 คน ให้ผลเป็นลบ ในผู้ป่วยซิฟิลิส 8 ราย การตรวจให้ผลบวก 5 ราย และให้ผลลบใน primary syphilis, possible secondary syphilis และ latent syphilis อย่างละ 1 ราย **สรุป** การตรวจ DNA ของ *T. pallidum* ด้วยวิธี *polA* PCR ในเลือดผู้บริจาคโลหิต ให้ผลลบทั้งหมด การศึกษานี้แม้มีความไวไม่สูงแต่ก็เป็นข้อมูลแก่ผู้อื่นเพื่อศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อซิฟิลิสจากการรับเลือดต่อไป

Key Words : ● *polA* PCR ● *Treponema pallidum* ● *Treponemal* DNA

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2556;23:15-22.

บทนำ

ซิฟิลิสเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ชนิดหนึ่ง เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม spirochete สายพันธุ์ *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) ซิฟิลิสสามารถถ่ายทอดจากผู้ติดเชื้อไปสู่ผู้รับเลือดผ่านการให้เลือด ดังที่มีรายงาน ผู้ป่วยติดเชื้อซิฟิลิสจากการรับโลหิตมากกว่า 100 ราย¹ ก่อนที่จะมีการกำหนดให้ตรวจคัดกรองการติดเชื้อซิฟิลิสในโลหิตบริจาคตั้งแต่ทศวรรษที่ 1940² และยังคงทำการคัดกรองในโลหิตบริจาคทุกจนถึงปัจจุบัน มีการรายงานผู้ป่วยติดเชื้อซิฟิลิสผ่านการให้เลือดครั้งสุดท้ายเมื่อปี ค.ศ. 1983³ แต่หลังจากนั้นไม่พบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อซิฟิลิสจากการรับโลหิตเลย¹ ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างที่มีการเปลี่ยนแปลงไป และอาจมีผลทำให้การติดเชื้อซิฟิลิสจากการรับโลหิตลดลงหรือไม่พบเลย เช่น วิธีการให้โลหิตเปลี่ยนจากการให้โดยตรงจากผู้บริจาคไปยังผู้ป่วย (direct transfusion) ในอดีต มาเป็นการเจาะเก็บโลหิต

ใส่ขวดหรือถุงแล้วแช่เย็นไว้ก่อนให้กับผู้ป่วยในภายหลัง¹ การที่อุบัติการณ์การติดเชื้อซิฟิลิสในประชากรลดลง⁴ การรับบริจาคโลหิตจากผู้บริจาคด้วยความสมัครใจไม่หวังสิ่งตอบแทนและไม่มีการซื้อขายโลหิต การงดการบริจาคโลหิตสำหรับผู้ที่มีประวัติเสี่ยงการติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ การตรวจคัดกรองการติดเชื้อซิฟิลิสของโลหิตบริจาคที่ดำเนินการอย่างกว้างขวางและต่อเนื่อง การเข้าถึงบริการทางการแพทย์ได้ง่ายขึ้นรวมทั้ง มีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลาย⁵

ในการตรวจกรองโลหิตบริจาคควมามีการติดเชื้อซิฟิลิสหรือไม่ใช้วิธีการทดสอบทางซีโรโลยีเพื่อหาแอนติบอดี เดิมนั้นใช้วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อสาร cardiolipin ได้แก่ Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) หรือ Rapid Plasma Reagin (RPR) หากผลการตรวจเป็นบวก จะตรวจยืนยันด้วยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อซิฟิลิส (*Treponemal* test) คือการตรวจ *Treponema pallidum* haemagglutination test (TPHA), *Treponema pallidum* particle agglutination assay (TPPA) และหากมีปัญหาล้างตรวจด้วยวิธี The fluorescent treponemal antibody absorbed test for syphilis (FTA ABS) เมื่อมีการพัฒนาระบบการตรวจกรองการติดเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติ ซึ่งรองรับระบบการอ่าน barcode จากตัวอย่างตรวจ เพื่อระบุสิ่ง

ได้รับต้นฉบับ 4 กันยายน 2555 รับลงตีพิมพ์ 12 มกราคม 2556

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ร.อ. ผศ.พญ.ปาริชาติ เพิ่มพิกุล ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ 2 ถนนพหลโยธิน แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

e-mail : parichart.per@mahidol.ac.th

ส่งตรวจ และส่งต่อข้อมูลจากเครื่องตรวจ เข้าสู่ระบบสารสนเทศ ทำให้มีการเชื่อมโยงข้อมูลโดยไม่ต้องมีการลอกผล ระบบการตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติจึงได้รับความนิยมเพราะสะดวก ลดความเสี่ยงต่อการลอกผลผิดพลาดและข้อมูลมีการสอบทานได้ตลอด ๒๔ ชั่วโมง การเลือกโรงพยาบาลศิริราชก็ได้ปรับเปลี่ยนวิธีการตรวจ จากการตรวจการติดเชื้อซีฟิลิส จากการใช้ VDRL test ซึ่งต้องทำการตรวจตัวอย่างตรวจวันละนับร้อยราย มาเป็นการทดสอบโดยใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติตรวจหา Treponema antibody และในที่สุดใช้ระบบการตรวจการติดเชื้อทางซีโรโลยีที่สามารถตรวจกรองทางซีโรโลยีโลหิตบริจาคนั้นได้ครบถ้วนด้วยเครื่องมืออัตโนมัติเครื่องเดียวกัน สำหรับการตรวจการติดเชื้อซีฟิลิสนั้นใช้เทคนิค chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) เพื่อการตรวจหา Treponema antibody ถ้าได้ผลบวกหรือผลไม่ชัดเจนจะตรวจยืนยันด้วยวิธี immunochromatographic test และส่งตรวจยืนยันด้วยวิธี VDRL และวิธี TPHA กรณีที่ผลการตรวจด้วยวิธี VDRL และ TPHA ไม่ชัดเจนหรือไม่สอดคล้องกัน จะทำการตรวจยืนยันซ้ำด้วยวิธี TPPA⁶ ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก อัตราการตรวจพบการติดเชื้อซีฟิลิส ขณะที่ทำการศึกษามีอัตราที่สูงถึง 0.8% เพราะตรวจพบทั้งผู้ที่กำลังติดเชื้อและผู้ที่เคยติดเชื้อมาในอดีต แม้จะเคยหรือไม่เคยได้รับการมาก่อน ผู้บริจาคโลหิตจำนวนหนึ่ง เคยบริจาคโลหิตเป็นประจำมาเป็นเวลานาน หรือเคยบริจาคที่อื่นมาแล้ว เมื่อตรวจว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. pallidum* มีหลายรายที่กังวลว่าผู้ป่วยที่เคยได้รับโลหิตของตนไปจะได้เชื้อไปหรือไม่ จึงได้เริ่มการศึกษาโครงการนี้เพื่อตรวจหาเชื้อซีฟิลิสในโลหิตของผู้บริจาคที่การตรวจการติดเชื้อให้ผลบวก

วิธีการตรวจหาเชื้อซีฟิลิส ที่ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) คือ วิธี Rabbit Infectivity Test (RIT) ซึ่งเป็นการเพาะเชื้อ *T. pallidum* ในอวัยวะกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ มีความไวสูง แต่ต้องใช้กระต่าย 1 ตัว ต่อ การตรวจ 1 ตัวอย่างจึงมีต้นทุนสูง และใช้เวลานานประมาณ 2-4 สัปดาห์จึงสามารถแปลผลได้⁷ ในขณะที่การตรวจหาเชื้อต่างๆ วิธี polymerase chain reaction หรือ PCR ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางเพราะมีความไวของการตรวจสูง PCR จะเพิ่มจำนวน gene ของเชื้ออย่างจำเพาะได้มากกว่า 1 ล้านเท่า จากการศึกษาของ Grimpel และคณะ ในปี ค.ศ.1991⁸ พบว่า การตรวจ PCR ของการตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อซีฟิลิสมีความจำเพาะสูงถึง 100% ขณะที่ความไวในการตรวจสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ มีค่าแตกต่างกันไป โดยที่ใน amniotic fluid มีค่าสูงสุดคือ 100% และในสิ่งส่งตรวจต่างๆ โดยรวมมีค่า ประมาณ 78% ในสถานการณ์ปัจจุบันการตรวจหา DNA ของเชื้อ *T. pallidum* น่าจะเป็นการตรวจหาเชื้อโดยตรงที่ดีที่สุดที่สามารถทำได้ จึงต้อง

การทำการศึกษานำร่องว่าในเลือดผู้บริจาคโลหิตที่ผลการตรวจการติดเชื้อซีฟิลิสเป็นบวกจะมี DNA ของ *T. pallidum* หรือไม่ เพื่อนำมาประกอบกับประวัติทางคลินิกเพื่อการแปลผลและการรักษาต่อไป รวมทั้งบอกความเสี่ยงของผู้ป่วยที่ได้รับโลหิตด้วย

วัตถุประสงค์

เป็นการศึกษาวิจัยนำร่องเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมหรือ DNA ของเชื้อ *T. pallidum* ในโลหิตบริจาคนั้นที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองการติดเชื้อซีฟิลิสด้วยวิธี serology เทคนิค PCR ที่เลือกใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นเทคนิคที่เลือกใช้แบบพริเมอร์ (primers) จากส่วน (region) polymerase I gene (polA) ของเชื้อ *T. pallidum* หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเทคนิค polA PCR ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าเป็นเทคนิคที่มีความโดดเด่น ทั้งความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ต่อเชื้อ *T. pallidum*^{9, 10}

วัสดุและวิธีการ

ประชากรและตัวอย่างในการวิจัย

ผู้บริจาคโลหิต: ผู้บริจาคโลหิตที่มีผลบวกจากการตรวจคัดกรองการติดเชื้อซีฟิลิสด้วยวิธี serology ได้แก่ CMIA test (ARCHITECT Syphilis TP, Abbott Diagnostics Division, Japan) และ immunochromatographic test (Determine™ Syphilis TP, Alere Medical, Japan) จำนวน 25 คน ได้เจาะเลือด ผู้บริจาคโลหิตเหล่านี้ เพื่อตรวจ Treponema antibody ซ้ำด้วยวิธี CMIA ตรวจ VDRL TPHA ในกรณีที่ผลการตรวจ TPHA เป็นลบหรือมีปัญหาในการอ่านผล จะทำการตรวจ TPPA เพิ่มเติม และเก็บตัวอย่าง EDTA blood ของผู้บริจาคจำนวน 3 mL เพื่อใช้ในการสกัด DNA เพื่อนำไปตรวจ polA PCR ของ *T. pallidum* ประวัติของผู้บริจาคโลหิต 25 คน พร้อมผลการตรวจคัดกรองและตรวจยืนยันการติดเชื้อซีฟิลิส แสดงใน Table 1

ผู้ป่วยซีฟิลิส: เจาะเลือดผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อซีฟิลิสที่โรงพยาบาลบางรัก จำนวน 8 คน ซึ่งเป็น primary syphilis 1 คน secondary syphilis 5 คน และ early latent syphilis 2 คน เพื่อมาตรวจ polA PCR ของ *T. pallidum* ก่อนที่จะได้รับการรักษา ใช้เป็นกลุ่มควบคุม ทั้งนี้การวินิจฉัยซีฟิลิส ใช้ผลการตรวจทางซีโรโลยีร่วมกับอาการทางคลินิก มีได้กำหนดให้ต้องพบเชื้อจาก skin lesion

วิธีการ

การทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค polA PCR: นำเชื้อ *T. pallidum* จากการเพาะเลี้ยงในอวัยวะกระต่ายมาเจือจางด้วยโลหิตที่ให้ผลลบต่อการตรวจ serology และ PCR ที่

Table 1 Demographic and laboratory test results of 25 blood donors

No	Age	Sex	Syphilis serological test					Clinical data
			Chemilumi- nescent test	Immunochro- matographic test	VDRL	TPHA	TPPA	
1	41	male	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	genital ulcer 20 years ago, ever treat
2	18	female	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	no symptom
3	49	male	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	genital ulcer 21 years, ever treat
4	45	male	reactive	reactive	non-reactive	non-reactive	not done	no symptom
5	42	male	reactive	reactive	non-reactive	non-reactive	not done	genital ulcer 2 years, ever treat
6	39	female	reactive	reactive	weakly reactive	> 1:80	not done	skin rash 3 years, never treat
7	43	male	reactive	reactive	non-reactive	borderline	> 1:80	genital ulcer 1 year, ever treat
8	34	female	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	skin rash 5 years, never treat
9	41	female	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	no symptom
10	46	male	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	genital ulcer 16 years, ever treat
11	39	male	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	genital ulcer 19 years, ever treat
12	47	male	reactive	reactive	1:1	> 1:80	not done	no symptom
13	50	male	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	no symptom
14	53	male	reactive	reactive	non-reactive	borderline	> 1:80	genital ulcer 20 years, ever treat
15	49	male	reactive	reactive	non-reactive	borderline	> 1:80	skin rash 10 years, ever treat
16	46	male	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	genital ulcer 10 years, ever treat
17	43	male	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	skin rash 5 years, ever treat
18	54	male	reactive	reactive	non-reactive	borderline	> 1:80	genital ulcer 15 years, ever treat
19	44	male	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	genital ulcer 16 years, ever treat
20	51	male	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	genital ulcer 20 years, ever
21	44	male	reactive	reactive	non-reactive	borderline	> 1:80	genital ulcer 3 years, never treat
22	46	male	reactive	reactive	weakly reactive	weakly reactive	> 1:80	skin rash 2 years, never treat
23	55	male	reactive	reactive	non-reactive	borderline	> 1:80	skin rash 27 years, ever treat
24	47	male	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	no symptom
25	39	male	reactive	reactive	non-reactive	> 1:80	not done	no symptom

เข้มข้น 1, 2, 3, 5, 10, 20 และ 40 เชื้อต่อโลहित 100 μ L ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อซิฟิลิส ด้วยเทคนิค polA PCR เพื่อประเมินความไว

ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค polA PCR: พบว่า lane ที่ 6 ซึ่งมีความเข้มข้น 3 เชื้อต่อโลहित 100 μ L เห็น weak reaction ขณะที่ lane 7, 8, 9, 10 ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อซิฟิลิส 5, 10, 20 และ 40 เชื้อต่อโลहित 100 μ L เห็น reaction ชัดเจนขึ้น (Figure 1) จึงสรุปได้ว่าความไวของเทคนิค polA PCR คือ 3 เชื้อต่อโลहित 100 μ L

การสกัดสารพันธุกรรมในสิ่งส่งตรวจ: ใช้หลักการ guanidine extraction method¹¹ มีขั้นตอนโดยสังเขป คือ ผสมตัวอย่างโลहित 3 mL กับสารละลาย A 30 mL เพื่อให้เม็ดโลहितแตก แยกไปปั่นที่ 2,000 x g อุณหภูมิ 22°C 10 นาที แยกตะกอนออก ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก แล้วเติม 10% sodium dodecyl sulfate 40 μ L เพื่อทำให้เม็ดโลहितขาวแตก เติม 7.5 M guanidine

hydrochloric acid 300 μ L ตกตะกอน DNA โดยเติม ethanol ปริมาตร 4 mL แยกตะกอนของ DNA ที่ได้ออกและละลายใน TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA) ปริมาตร 200 μ L เก็บ DNA ที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อต่อไป

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อซิฟิลิส: นำ DNA ที่สกัดจากตัวอย่างโลहित มาเพิ่มจำนวน (DNA amplification) ด้วยเทคนิค polA PCR และอ่านผลโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis แม่พิมพ์สารพันธุกรรมของเชื้อซิฟิลิส (primer) ที่เลือกใช้อยู่ที่ตำแหน่ง 377 base-pair⁹ ประกอบด้วย 24 ตำแหน่งของ forward primer (Primer polA-F): [5' - TGC GCG TGT GCG AAT GGT GTG GTC - 3'] และ 25 ตำแหน่งของ reverse primer (Primer polA-R): [5' - CAC AGT GCT CAA AAA CGC CTG CAC G - 3'] DNA amplification ทำโดยใช้ส่วนผสมซึ่งประกอบด้วยน้ำยาสำเร็จรูปดังนี้ ReddyMixTH PCR Master

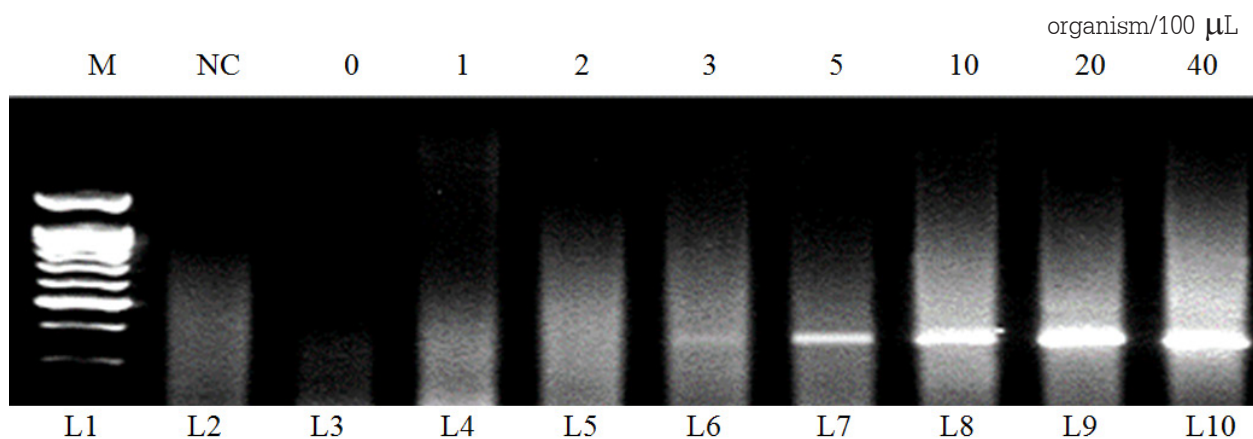


Figure 1 The results of the *polA* gene assay from blood samples with various concentrations of *T. pallidum* from 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, and 40 organisms/100 μL of blood samples. The DNA marker (M) and the negative control (NC) are shown in lane 1 and lane 2, respectively.

Mix 12.5 μL Primer PolA-F 50 pmols/ μL 0.5 μL Primer PolA-R 50 pmols/ μL 0.5 μL sterile ddH₂O 6.5 μL และตัวอย่าง DNA ที่สกัดไว้ 5 μL รวมปริมาตรทั้งหมด 25 μL ในการทำ DNA amplification ทุกครั้งมีการควบคุมคุณภาพโดยสารควบคุมคุณภาพ 3 ชนิด ได้แก่ positive control ใช้ตัวอย่าง DNA ที่สกัดมาจากโลหิตที่มีเชื้อ *T. pallidum* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอั้นทะกระต่าย negative control ได้จากตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากตัวอย่างโลหิตที่ไม่มีเชื้อ *T. pallidum* และมี reagent control โดยใช้ น้ำกลั่น ใช้เครื่อง Gene AMP[®] PCR system 9700 ที่ตั้งรอบอุณหภูมิ (thermocycle) ไว้ โดยรอบแรกประกอบด้วย อุณหภูมิ 96 °ซ. 5 นาที 68 °ซ. 30 วินาที และ 72 °ซ. 45 วินาที และรอบถัดมาประกอบด้วย 96 °ซ. 1 นาที 68 °ซ. 30 วินาที และ 72 °ซ. 45 วินาที จำนวน 45 รอบ เมื่อสิ้นสุดรอบสุดท้าย ส่วนผสมถูกอุ่นที่อุณหภูมิ 72 °ซ. เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยา DNA amplification รอบสุดท้ายดำเนินไปจนสมบูรณ์ ผลผลิตที่ได้ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. จนกว่าจะถูกตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค electrophoresis ผลผลิตที่ได้จากการทำ DNA amplification ถูกตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gels ในสนามไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และอ่านผลด้วยเครื่อง UV transilluminator

ผลการศึกษา

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อซิฟิลิสในผู้บริจาคโลหิต: ตัวอย่างโลหิตที่ได้จากผู้บริจาคโลหิตที่ให้ผลบวกจากการตรวจคัดกรองเชื้อซิฟิลิสด้วยวิธี serology ทั้ง 25 คน ให้ผลเป็นลบต่อการตรวจ *polA* PCR ของ *T. pallidum* (Figure 2)

การตรวจหา DNA ของเชื้อซิฟิลิสในผู้ป่วย: ตัวอย่างโลหิตจาก

ผู้ป่วยซิฟิลิส 8 คน ที่นำมาทดสอบตรวจ *polA* PCR ของ *T. pallidum* พบว่าให้ผลบวกจำนวน 5 คน (ร้อยละ 62.5) ประกอบด้วยผู้ป่วยระยะ secondary syphilis จำนวน 5 คน ให้ผลบวก 4 คน (ร้อยละ 80) ผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ early latent syphilis 2 คน ให้ผลบวก 1 คน (ร้อยละ 50) ขณะที่ผู้ป่วยระยะ primary syphilis 1 คน ให้ผลเป็นลบ (Figure 3)

วิจารณ์

การตรวจ Rabbit infectivity test (RIT) เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อซิฟิลิส เพราะสามารถแสดงถึง infectivity ของเชื้อซิฟิลิสได้อย่างชัดเจน การตรวจ DNA ของเชื้อซิฟิลิสด้วยวิธี PCR ก็มีความสอดคล้องกับผลของ RIT⁸ โดยเฉพาะในสิ่งส่งตรวจที่เป็น swab/scrape จาก skin lesion ความไวในการตรวจ DNA ของเชื้อซิฟิลิสในโลหิตด้วยเทคนิค *polA* PCR ของการศึกษานี้อยู่ที่ 3 เชื้อต่อโลหิต 100 μL ซึ่งมีความไวใกล้เคียงกับการศึกษาของ Grange และ คณะ¹² ซึ่งมีความไวของการทำ PCR อยู่ที่ 20 เชื้อ/mL หรือ 2 เชื้อต่อโลหิต 100 μL ถึงแม้จะมีข้อมูลว่า ในโลหิตนั้นมียาต้านการพบ *T. pallidum* DNA ต่ำ แต่เนื่องจากการวิจัยนี้เป็น pilot study มีประเด็นมุ่งหาเชื้อที่มีในโลหิตบริจาคจึงทำการตรวจหา DNA ของเชื้อใน whole blood ซึ่งมีอัตราการตรวจพบสูงที่สุดมากกว่าการตรวจใน peripheral blood mononuclear cell, serum หรือ plasma¹² การศึกษารังนี้ทำการศึกษาในโลหิตของผู้บริจาคโลหิตที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองเชื้อซิฟิลิสด้วยวิธี serology จำนวน 25 ราย แต่ไม่พบ *T. pallidum* DNA ในโลหิตเลย ทั้งที่การตรวจมีความไวอยู่ที่ 3 เชื้อต่อโลหิต 100 μL แม้การศึกษานี้ทำในผู้บริจาคโลหิตเพียง 25 ราย เพราะเป็นเพียงการศึกษานำร่อง แต่ก็สอดคล้องกับหลักฐานทางคลินิกที่ยังไม่เคย

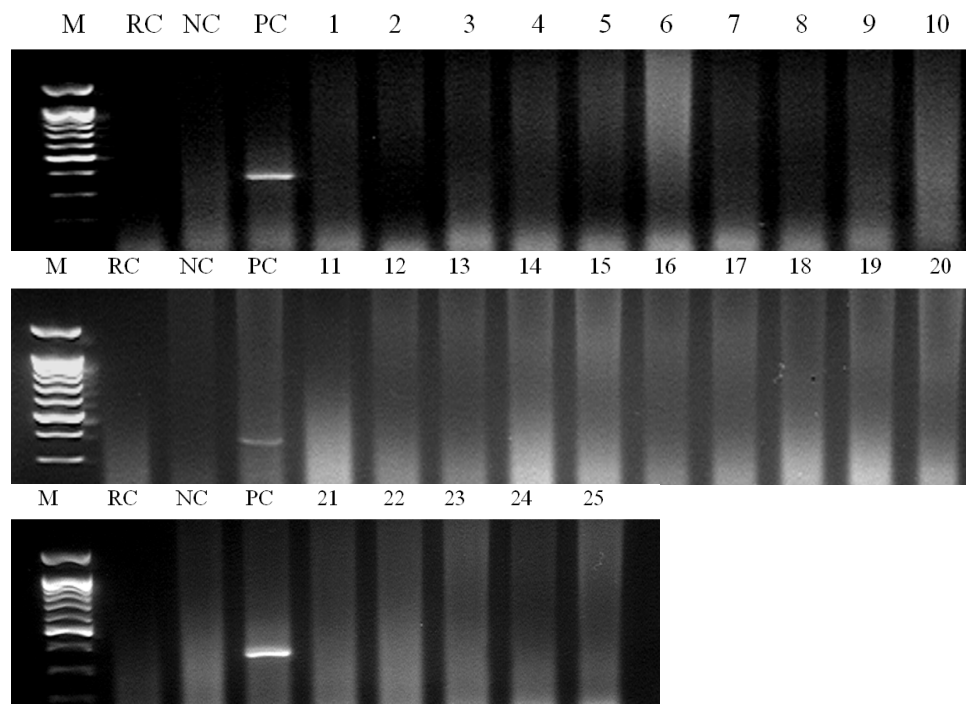


Figure 2 The results of the *polA* gene of *T. pallidum* from blood samples of 25 blood donors (No. 1 – 25). Ladder standard DNA marker (M), reagent control (RC), negative control (NC), positive control (PC) are shown in first 1-4 lane of each gel.

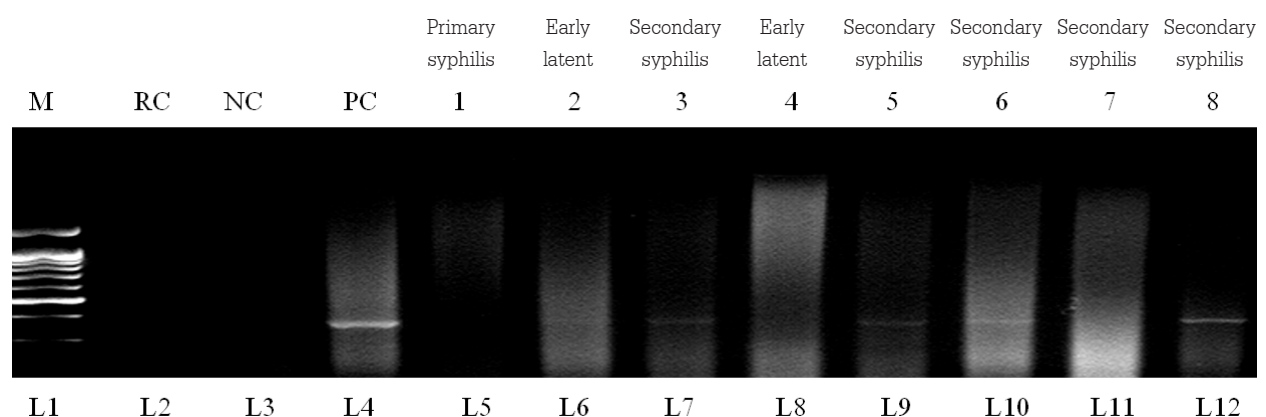


Figure 3 The results of *polA* gene assay of *T. pallidum* from blood samples of 8 syphilis patients (lane 5-12). The Ladder standard DNA marker (M), the reagent control (RC), the negative control (NC) and the positive control (PC) (contain syphilis 10 organism/100 microliter) are shown in lane 1, 2, 3 and 4, respectively.

พบผู้ป่วยที่มีรายงานการติดเชื้อซิฟิลิส จากการรับโลหิตในระยะหลายสิบปีที่ผ่านมา

จาก Table 1 ผู้บริจาคโลหิต 2 ราย (No 4 No 5) มี ผลการตรวจ VDRL และ TPHA ให้ผลลบ แต่จากประวัติพบว่ามีความเสี่ยงในอดีต 1 ราย (No 5) และอีก 23 ราย มีผลการตรวจที่เป็นบวก ทั้ง Treponema antibody /immunochromatography และ TPHA หรือ TPPA ให้ผลบวกที่ titer > 1:80, ผลบวกอย่างอ่อน (weakly reactive) หรือให้ผลแบบก้ำกึ่ง (borderline) ซึ่งจากการทบทวนดูประวัติมีผู้บริจาคโลหิตจำนวน 14 ราย ที่ทราบว่าตน

เองเป็นโรคซิฟิลิสและเคยได้รับการรักษามาแล้ว จึงเห็นได้ว่าไม่น่ามีความเสี่ยงในการถ่ายทอดเชื้อให้ผู้ป่วยที่รับโลหิต ส่วนอีก 4 ราย (No 6, 8, 21, 22) มีประวัติความเสี่ยงแต่ไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน เมื่ออาการจะเข้ากันได้กับ latent syphilis แต่ก็มีอัตราการถ่ายทอดเชื้อไปสู่ผู้อื่นต่ำ ผู้บริจาคโลหิตเหล่านี้แม้ตรวจไม่พบ DNA ของเชื้อซิฟิลิส ก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าจะไม่มีการถ่ายทอดเชื้อไปสู่ผู้รับโลหิต เพราะอาจมีโอกาสดังกล่าวแพร่กระจายเป็นบางครั้ง ดังที่ได้มีการศึกษาในผู้ป่วยจำนวนมากและใช้การตรวจที่มีความไวสูง¹² การศึกษานี้ จึงเป็นหลักฐานหนึ่งที่จะนำไปประกอบ

Table 2 Clinical data and laboratory test results of 8 diagnosed syphilis patients

No	Age	Sex	Syphilis serological test			Stage of syphilis	Clinical data	T. pallidum polA PCR
			VDRL	TPHA	FTA-ABS			
1	25	male	1:8	reactive	reactive	primary	genital ulcer	negative
2	44	male	1:32	reactive	reactive	early latent	genital Skin lesion 6 months	positive
3	36	male	1:32	reactive	reactive	secondary	diffuse rash	positive
4	32	male	1:32	reactive	reactive	early latent	no symptom	negative
5	33	male	1:32	reactive	reactive	secondary	genital ulcer 2 months, rash 1 month	positive
6	20	male	1:32	reactive	reactive	secondary	rash at palm and sole, genital ulcer 1 month	positive
7	31	male	1:16	reactive	reactive	secondary	rash at palm and sole 1 month	negative
8	22	male	1:64	reactive	reactive	secondary	diffuse rash 1 month	positive

การพิจารณาหรือตอบข้อกังวลกับผู้ที่เคยบริจาคโลหิตมาเป็นเวลานาน แล้วจึงมาตรวจพบ Treponema antibody ที่เป็นบวก หลังจากที่เคยตรวจกรองด้วย VDRL/RPR และผ่านการคัดกรองมาตลอดหลายสิบครั้ง

ในการศึกษาครั้งนี้ ผลการตรวจ polA PCR ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อซิฟิลิส ทั้ง 8 ราย แม้ไม่ได้ผลบวกทุกราย แต่ก็เข้าไปในแนวทางเดียวกับผลจากการศึกษาอื่น^{12,13} ที่มีอัตราการตรวจพบต่ำใน primary syphilis และใน latent syphilis เพียง 13-14% และในผู้ป่วย secondary syphilis ให้ผลบวกเพียง 38% ในขณะที่ผลการศึกษานี้ที่ polA PCR ของเชื้อ *T. pallidum* ให้ผลบวกจำนวน 4 คน จาก 5 คนหรือร้อยละ 80 ผู้ป่วยเหล่านี้ที่มีค่า VDRL > 1:32 (Table 3) ซึ่งแสดงถึง active disease และรายที่ผลการตรวจ DNA เป็นลบ มีประวัติเคยเป็นซิฟิลิสมาก่อน มีผื่นขึ้นที่มือและเท้า แต่ไม่ได้ตรวจหาเชื้อซิฟิลิสใน skin lesion ดังที่กำหนดในเกณฑ์การวินิจฉัยของต่างประเทศ¹⁴ จึงเป็นเพียง possible secondary syphilis สำหรับ latent syphilis มีการตรวจพบ DNA ของเชื้อ *T. pallidum* ในอัตราต่ำเพราะ มีเชื้ออยู่ในกระแสโลหิตเป็นครั้งคราวเท่านั้น¹⁵ จากการศึกษาในผู้ป่วยแสดงว่าวิธีนี้มีความไวไม่สูงนัก

สำหรับการศึกษาในอนาคต ที่จะช่วยตอบคำถามว่าผู้บริจาคโลหิตที่มีผลการตรวจกรองการติดเชื้อซิฟิลิสเป็นบวก มีเชื้อซิฟิลิสในโลหิตบริจาคหรือไม่ อาจใช้วิธีการที่มีความไวมากขึ้น เช่น การทำ real time PCR¹⁶ การปั่นเพื่อ concentrate เชื้อก่อนการทำ extraction หรือ การทำการศึกษาในจำนวนที่มากขึ้น¹² รวมทั้งการพัฒนาเทคนิคให้มีความมั่นใจว่าไม่มี inhibitor ในการทำ PCR

สรุป

การตรวจหาสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อ *T. pallidum* ในผู้บริจาคโลหิตที่มีผลการตรวจคัดกรองการติดเชื้อซิฟิลิสด้วยวิธี serology เป็นบวกจำนวน 25 ราย โดยใช้เทคนิค polA PCR

ให้ผลเป็นลบ ทั้ง 25 ราย ซึ่งเทคนิค polA PCR มีความไวในการตรวจเชื้อระดับตั้งแต่ 3 เชื้อต่อโลหิต 100 μ L และถึงแม้ว่าการตรวจในผู้ป่วยที่ติดเชื้อซิฟิลิสจะแสดงให้เห็นว่าการตรวจนี้มีความไวไม่สูงนัก แต่ก็สรุปได้ว่า การศึกษาเบื้องต้นนี้ ยังไม่พบหลักฐานที่สนับสนุนว่า โลหิตเหล่านี้จะถ่ายทอดเชื้อซิฟิลิสไปสู่ผู้รับโลหิต แต่นับว่าเป็นจุดเริ่มต้นนำไปสู่การศึกษาที่ลึกซึ้งโดยการใช้วิธีการ เคื่องมือ เทคนิคที่ดีขึ้น รวมทั้งมีตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวนมากขึ้นจะทำให้มีน้ำหนักในการแปลผลได้ดียิ่งขึ้น สำหรับเป็นข้อมูลในการพัฒนาหรือสรรหาเทคนิคในการตรวจคัดกรองเชื้อซิฟิลิสในโลหิตบริจาคที่เหมาะสมที่สุดต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนวิทยานิพนธ์บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล คณะผู้ทำการศึกษา ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล และ เจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาลบางรัก ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Schmidt PJ. Syphilis, a disease of direct transfusion. *Transfusion* 2001;41:1069-71.
- Infectious disease testing for blood transfusions. *NIH Consensus Statement* 1995;13:1-27.
- Risseuw-Appel IM, Kothe FC. Transfusion syphilis: a case report. *Sex Transm Dis* 1983;10:200-1.
- Primary and secondary syphilis-United States, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50:113-7.
- Katz LM. A test that won't die: the serologic test for syphilis. *Transfusion* 2009;49:617-9.
- Discordant results from reverse sequence syphilis screening-five laboratories, United States, 2006-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2011;60:133-7.

7. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:1-21.
8. Grimpel E, Sanchez PJ, Wendel GD, et al. Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect *Treponema pallidum* in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1991;29:1711-8.
9. Liu H, Rodes B, Chen CY and Steiner B. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *J Clin Microbiol* 2001;39:1941-6.
10. Marfin AA, Lui H, Sutton MY, Steiner B, Pillay A, Markowitz LE. Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;40:163-6.
11. Dyer DW, Iandolo JJ. Rapid isolation of DNA from *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:283-5.
12. Grange PA, Gressier L, Dion PL, et al. Evaluation of a PCR test for detection of *treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol* 2012;50:546-52.
13. Heymans R, Helm JJ, Vries HJ, Fennema HS, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol* 2010;48:497-502.
14. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 1997;46(RR-10):1-55.
15. Martin IE, Tsanq RS, Sutherland K, et al. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. *J Clin Microbiol* 2009;47:1668-73.
16. Peng RR, Wang AL, Li J, Tucker JD, Yin YP, Chen XS. Molecular typing of *Treponema pallidum*: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1273.

Detection of *Treponema pallidum* DNA in Blood Donors Who Had Positive Serological Syphilis Screening Test

Tharin Pakdee¹, Parichart Permpikul¹, Sasijit Vejbaesya¹ and Angkana Charoenwatanachokchai²

¹Department of Transfusion Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University; ²Bang Rak Hospital

Introduction: Syphilis can transmit via transfusion. Screening test to detect syphilis infection in donated blood have been implemented since 1940s. There was no reported case of transfusion-transmitted syphilis since 1983. Several factors have been changed such as the transfusion practice and screening tests for syphilis. Anyway, the infectivity of donated blood was still doubted. Therefore, we did this pilot study to test for *T.pallidum* DNA in blood from donors who had positive syphilis screening test. **Materials and Methods:** We recruited 25 blood donors who had positive syphilis screening tests to be tested for *polA* PCR of *T.pallidum* which had the detection sensitivity of 3 organisms per 100 microliters of blood. We also did this test in 8 diagnosed syphilis cases as control. **Results:** All 25 specimens from blood donors in this study gave negative *polA* PCR for *T.pallidum* results. In 8 syphilis diagnosed patients, we could detect *Treponemal* DNA in 5 patients (4 secondary syphilis and 1 latent syphilis cases) but could not detect *Treponemal* DNA in one primary syphilis, one possible secondary syphilis and one latent syphilis patient. **Conclusion:** This study could not demonstrate any positive *T.pallidum* DNA in blood from 25 blood donors who had positive syphilis screening test results. Even though this technique is not sensitive but at least can provide some insight for others to investigate the infectivity of donated blood.

Key Words : ● *polA* PCR ● *Treponema pallidum* ● *Treponemal* DNA

J Hematol Transfus Med 2013;23:15-22.