

บทความทั่วไป

การตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับซิฟิลิส (Laboratories Testing for Syphilis)

ไพโรจิตร ตานัน*

บทนำ

Syphilis เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียรูปปร่างเกลียว ที่เรียกว่า *Treponema pallidum* เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์¹ การติดต่อที่สำคัญและเป็นข้อควรระวังอีกปัญหาหนึ่ง คือการติดต่อจากแม่ไปสู่ลูก โดยเชื้อสามารถติดต่อจากแม่ไปสู่ลูกขณะตั้งครรภ์และขณะคลอดได้ นอกจากนั้น การรับโลหิตหรือผลิตภัณฑ์จากโลหิตที่มีการติดเชื้อเข้าไป² ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดต่อโรคซิฟิลิสได้ โรคนี้แบ่งออกได้หลายระยะ³ และเนื่องจากเชื้อ *T. pallidum* ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และไม่สามารถย้อมด้วยสีย้อมธรรมดาในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้⁴ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจเพื่อหาการติดเชื้อและติดตามผลการรักษาขึ้น

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยโรคซิฟิลิสทางห้องปฏิบัติการมีอยู่หลายวิธี การตรวจหาตัวเชื้อ การตรวจ DNA และการตรวจหาแอนติบอดี

การตรวจหาตัวเชื้อ *T. pallidum* โดยตรงประกอบด้วย

Darkfield (DF) microscopy

จัดได้ว่าเป็นวิธีที่ใช้มานาน ทำได้ง่าย และเป็นที่ยอมรับในการแยกเชื้อ *T. pallidum* แต่ผู้ตรวจต้องอาศัยประสบการณ์ในการแยกเชื้อจากรอยแผล โดยดูลักษณะรูปร่างและการเคลื่อนไหวของเชื้อ วิธีนี้มีความสำคัญกรณีที่ในระยะแรกของการติดเชื้อซึ่งแอนติบอดียังไม่ถูกสร้างขึ้น หรือกรณีผู้ป่วยเป็นโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องอย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีความไวต่ำเมื่อเทียบกับวิธีอื่น⁵

Direct fluorescent antibody test for *T. pallidum* (DFA-TP)

เป็นการตรวจโดยใช้แอนติบอดีต่อเชื้อ *T. pallidum* ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescein isothiocyanate, FITC) เพื่อตรวจหาเชื้อในของเหลวจากร่างกาย และเนื้อเยื่อ เนื่องจากเชื้อในกลุ่ม Treponemes จะมีลักษณะแอนติเจนที่มีส่วนคล้ายคลึงกับ *T. pallidum* จึงใช้แอนติบอดีแยกเชื้อ *T. pallidum* ออกจากเชื้อกลุ่ม Treponemes อื่น⁶ การตรวจด้วยวิธีนี้มีความไวมากกว่าวิธี Darkfield (DF) microscopy เล็กน้อย แต่มีประโยชน์ในกรณีใช้ตรวจสารคัดหลั่งจากแผลหรือตรวจเนื้อเยื่อที่สดหรือได้รับการ fix ด้วยฟอร์มาลิน⁷

วิธี Polymerase chain reaction (PCR)

การตรวจหาเชื้อ *T. pallidum* ในสารคัดหลั่งและเนื้อเยื่อโดยเทคนิค PCR ถูกนำมาใช้เพียงในกลุ่มผู้คัดค้านถึงแม้เทคนิคนี้จะสามารถใช้งานได้จริง ความไวและความจำเพาะอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ แต่ยังไม่ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน และถึงแม้แต่ละห้องปฏิบัติการจะใช้ primer และมีวิธีการ extract DNA แตกต่างกัน แต่ความไวของวิธีนี้จะอยู่ที่จำนวนเชื้อ 1-5 ตัวต่อตัวอย่างตรวจ^{7, 8}

วิธี Multiplex PCR (M-PCR)

นอกจากเชื้อ *T. pallidum* จะเป็นสาเหตุให้เกิดแผลบริเวณอวัยวะเพศแล้ว ยังพบว่าอาจเกิดจากเชื้ออื่นได้ เช่น herpes simplex virus (HSV) หรือ *Haemophilus ducreyi* จึงมีการพัฒนาชุดตรวจที่สามารถตรวจหาเชื้อ *T. pallidum*, herpes simplex virus (HSV) type 1 และ 2

*งานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่

และ *H. ducreyi* โดยการใช้ primer ของเชื้อทั้ง 3 ชนิดมา รวมกันเพื่อตรวจหาเชื้อในคราวเดียวกัน ในสิ่งส่งตรวจ เดียว⁹ โดยพบว่าความไวของชุดทดสอบจะอยู่ที่ 10 ตัว ต่อตัวอย่างตรวจ

Rabbit infectivity test (RIT)

วิธีนี้เป็นเครื่องมือในการวิจัย เพื่อใช้ศึกษาความ รุนแรงของเชื้อในการก่อโรคมกกว่าจะเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไป เนื่องจากต้องการสัตว์ทดลอง และใช้เวลาในการทดสอบ การติดเชื้อนาน (อาจจะนานหลายสัปดาห์ถึงหลายเดือน) และมีความหลากหลายในการตอบสนองต่อการติดเชื้อของ กระจายแต่ละตัว ความไวในการทดสอบด้วยวิธีนี้ เทียบเท่ากับวิธี DNA PCR^{7, 10}

การตรวจทางอ้อมสำหรับการติดเชื้อซิฟิลิส (Indirect examination)

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *T. pallidum* ที่ก่อให้เกิดซิฟิลิสจะมี 2 แบบ คือ nontreponemal antibodies และ treponemal antibodies¹¹ โดย nontreponemal antibodies คือแอนติบอดีต่อ phospholipids หรือ แอนติบอดีต่อ cardiolipin (VDRL) เนื่องจาก antiphospholipid antibodies ไม่ได้จำเพาะต่อการ ติดเชื้อซิฟิลิส เนื่องจากอาจมีเชื้อในกลุ่ม treponemes อื่นหรือเชื้อชนิดอื่นที่ให้ผลบวกต่อ antiphospholipid antibodies ได้ จึงมีการใช้คำว่า “nonspecific” ในการ ทดสอบหา antiphospholipid antibodies ในผู้ที่เป็ นซิฟิลิส⁷

Nontreponemal Tests

การตรวจแบบ nontreponemal tests สะดวกและ ราคาถูก จึงนิยมใช้สำหรับการตรวจกรองผู้ป่วย จำนวนมาก นอกจากนี้ยังตรวจได้ทั้งแบบคุณภาพ และปริมาณได้ ทำให้แพทย์ใช้ค่า titer ของการทดสอบ เป็นตัวบ่งชี้และติดตามการรักษา นอกจาก VDRL และ RPR แล้ว การตรวจหา nontreponemal tests อาจใช้วิธี enzyme-link-immunosorbent assay (ELISA) แต่ไม่เป็นที่นิยมนักในห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัย⁷

VDRL test

โดยใช้แอนติเจนคือ cardiolipin-lecithin-cholesterol ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี จะเกิดการเกาะกลุ่ม ที่มองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (100X) วิธีนี้ตรวจหาได้ทั้งแอนติบอดีชนิด IgG และ IgM และสามารถตรวจได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณเพื่อติดตาม การรักษา ผลลบปลอมอาจจะเกิดได้ถ้าเทคนิคการทำไม่ดี พอหรือมีปรากฏการณ์ prozone ซึ่งมีแอนติบอดีมาก เกินพอ อย่างไรก็ตามปรากฏการณ์ prozone พบได้ ไม่บ่อยนัก (ร้อยละ 1-2) และอาจจะแก้ไขได้โดยการเจือจาง ซีรัม นอกจากนี้ VDRL ยังเป็นการทดสอบที่ใช้ตรวจ น้ำไขสันหลังในกรณีที่สงสัย neurosyphilis ซึ่งจะต้อง มีวิธีการเตรียมแอนติเจนเพิ่มเติมบ้าง การทดสอบ VDRL ซีรัมที่ใช้ทดสอบต้องนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 องศา เซลเซียส (°C) นาน 30 นาที^{4, 7} เพื่อลดการเสริมปฏิกิริยา ของคอมพลีเมนต์ การหาค่า titer คือการทดสอบเชิง ปริมาณเพื่อหาค่าเจือจางสูงสุดที่ยังให้ผลบวกโดยวิธี VDRL

RPR test

วิธีนี้เป็นการประยุกต์วิธี VDRL โดยใช้แอนติเจน cardiolipin เคลือบไว้บนผงถ่าน และเพิ่ม choline chloride และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เพื่อลดขั้นตอนการทำลายคอมพลีเมนต์ และยังช่วยเพิ่ม ความคงตัวของแอนติเจนที่แขวนลอยอยู่ เมื่อทำปฏิกิริยา กับแอนติบอดีจะเกิดการเกาะกลุ่มขึ้น ทำให้อ่านผลได้ ด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์^{4, 7} สามารถ ตรวจได้ทั้งซีรัม และพลาสมา ไม่ต้อง inactivate และสามารถตรวจได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ การ ทดสอบ nontreponemal tests ทั้งแบบ VDRL และ RPR จะมีความไวและความจำเพาะแตกต่างกันไป ขึ้นกับ ระยะของการติดเชื้อซิฟิลิส วิธี RPR จะมีความไวสูงกว่าวิธี VDRL เล็กน้อย โดยเฉพาะในระยะ primary syphilis แต่ VDRL มีความจำเพาะสูงกว่า RPR การหาค่า titer ของ RPR test ก็เช่นเดียวกับ VDRL คือเป็นการทดสอบ เชิงปริมาณเพื่อหาค่าเจือจางสูงสุดที่ยังให้ผลบวกโดยวิธี RPR

วิธี Enzyme immunoassay เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อ cardiolipin (EIA-VDRL)

ในช่วงทศวรรษ 1970 วิธี enzyme immunoassay (EIA) หรือ enzyme link-immunosorbent assay (ELISA) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันเพื่อการวินิจฉัยโรคซิฟิลิส หลักการของวิธีนี้อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนที่ยึดติด (fix) กับ solid phase ซึ่งอาจจะเป็นแผ่นแก้วหรือหลุมเพลทหรือ strip เมื่อแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับแอนติเจนสามารถวัดการเกิด ปฏิกิริยาโดยการเติม antiglobulin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วเติมสับสเตรท วัดการดูดกลืนแสง ความเข้มของแสงที่วัดได้จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นที่เกิดขึ้น การใช้แอนติเจน VDRL จะสามารถตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG และ IgM^{12, 13} ชุดตรวจที่ผลิตออกมาจำหน่าย เช่น **Spirotek Reagin II test**^{4, 7} เป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อ phospholipids โดยเทคนิค EIA เพื่อใช้ในการตรวจกรอง เป็นวิธีที่สามารถใช้กับเครื่องอัตโนมัติและรายงานผลผ่านทางคอมพิวเตอร์ได้ นอกจากนี้ยังมีวิธี **Capture-S Cardiolipin test**¹⁴ ซึ่งใช้เม็ดเลือดแดงเป็น solid phase โดยถูกออกแบบมาเพื่อใช้ในการตรวจกรองเลือดผู้ป่วยโรคโลหิตความไวและความจำเพาะของการทดสอบเทียบกับวิธี RPR

ปฏิกิริยา Biological false-positive (BFP)¹⁵

แอนติบอดีต่อ phospholipids ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ *T. pallidum* เท่านั้น แต่ยังเกิดจากการติดเชื้ออื่นๆได้ ในบางโรค เช่น มาลาเรีย, วัณโรค, โรคภูมิแพ้ ช่วงตั้งครรภ์ อาจเป็นสาเหตุที่ร่างกายสร้างแอนติบอดีต่อ phospholipids ขึ้นได้ ทำให้การตรวจหา แอนติบอดีต่อ phospholipids ให้ผลบวกด้วยวิธี VDRL หรือ RPR จึงมีนิยามคำว่าปฏิกิริยา Biological false-positive (BFP)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Treponema pallidum*

เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. pallidum* ที่สร้างขึ้นตอบสนองการติดเชื้อ การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะนี้ เป็นการตรวจยืนยันเพื่อวินิจฉัยการเป็นซิฟิลิส

ปัจจุบันมีด้วยกันหลายวิธี แต่จะกล่าวถึงเฉพาะวิธีที่ได้มีการพัฒนาขึ้นจากวิธีเดิม แต่อย่างไรก็ตาม พึงระลึกเสมอว่าไม่มีการทดสอบใดให้ผลดีที่สุดสำหรับการตรวจซิฟิลิสได้ทุกระยะของการติดเชื้อ

วิธี Fluorescent Treponemal Antibody Absorption (FTA-ABS)

ใช้หลักการ indirect fluorescent-antibody technique โดยแอนติเจนที่ใช้คือ *T. pallidum* subsp. *pallidum* (Nichols strain) ซึ่งเคลือบบนแผ่นแก้ว เจือจางซีรัมที่จะตรวจด้วย sorbent ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการสกัดกลุ่ม nonpathogenic Reiter treponemes ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 เพื่อกำจัดแอนติบอดีต่อเชื้อกลุ่ม nonpathogenic treponemes อื่น นำซีรัมที่เหลือบนแผ่นแก้วให้ทั่วแอนติเจนที่เคลือบไว้ ถ้าซีรัมมีแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. pallidum* ก็จะจับกับแอนติเจนของ *T. pallidum* subsp. *pallidum* บนแผ่นแก้ว จากนั้นล้างเอาส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก แล้วย้อมด้วย anti-human immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วย FITC ซึ่งจะไปจับแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจน *T. pallidum* บนแผ่นแก้ว แล้วอ่านผลด้วยกล้อง fluorescent microscope^{4, 7, 16} กรณีการตรวจซิฟิลิสทางซีโรโลยีในทารกแรกคลอดพบว่ามีความไวและความจำเพาะต่ำ เนื่องจากมีการรบกวนของ IgG จากแม่ที่มีระดับสูง วิธี 19S (IgM) FTA-ABS จึงเป็นวิธีแรกที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. pallidum* ชนิด IgM โดยใช้หลักการเดียวกับวิธี FTA-ABS แต่ตรวจแยกชนิดแอนติบอดีโดยใช้คอนจูเกตที่เป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IgM¹⁷

วิธี *Treponema pallidum* hemagglutination (TPHA) หรือ Microhemagglutination-*Treponema pallidum* test (MHA)

หลักการคือนำแอนติเจนของเชื้อ *T. pallidum* subsp. *pallidum* (Nichols strain) มาเคลือบบนเม็ดเลือดแดง เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรัม จะเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง วิธีนี้เหมาะสำหรับงานตรวจปริมาณมาก TPHA เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ไม่ไวพอสำหรับการตรวจวินิจฉัยในช่วง primary syphilis เม็ดเลือดแดงของ

สัตว์ที่ใช้ในการทดสอบนี้อาจจะเป็นสาเหตุให้เกิดเกาะกลุ่มแบบไม่จำเพาะ (nonspecific agglutination) เนื่องจาก heterophile antibodies^{4,7} การทดสอบวิธีนี้อาจเกิดผลผิดพลาดจากการดูด-ปล่อยสารด้วย pipette, เพลทสกรปรก หรือพื้นที่วางเพลทที่มีการสั่นไหว นอกจากนี้โรค Lyme disease, Leptospirosis, Leprosy, มาลาเรีย และ systemic lupus erythematosus (SLE) อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ ปัจจุบันได้มีการปรับใช้กับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ เช่น **Olympus PK-TP** โดยบริษัทฟูจิโรโบ โอ อาศัยหลักการที่เม็ดเลือดแดงเกาะเคลือบด้วยแอนติเจนของเชื้อ *T. pallidum* ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีของเชื้อ *T. pallidum* ในซีรัมจะเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงให้เห็น พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจกรองสำหรับธนาคารเลือด โดยใช้เครื่อง PK7100 ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ตรวจหมู่เลือดและตรวจหาชนิดของแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงที่ใช้ ณ American Red Cross โดยเมื่อให้ผลบวก ให้ทำการทดสอบ RPR เพื่อดูว่าเป็น reactive syphilis หรือไม่¹⁸

นอกจากวิธี TPHA และ MHA แล้ว ปัจจุบันมีการผลิตน้ำยาวิธีใหม่ขึ้น คือ SERODIA-TPPA¹⁹ ผลิตโดย บริษัท ฟูจิโรโบ โอ ประเทศญี่ปุ่น (Fujirebio Inc., Japan) โดยหลักการของการทดสอบจะคล้ายกับ TPHA และ MHA แต่เปลี่ยนจากการเคลือบแอนติเจนของ *T. pallidum* บนเม็ดเลือดแดง เป็นเม็ดเจลาตินที่มีสีแทนความไวและความจำเพาะของวิธีนี้เทียบเท่ากับวิธี TPHA และ FTA-ABS ยกเว้นในระยะ primary syphilis ที่ไม่ได้รับการรักษา ที่มีความไวและความจำเพาะต่ำกว่า FTA-ABS

วิธีทดสอบหาแอนติบอดีต่อ Treponemal โดยใช้แอนติเจน *T. pallidum* หรือ EIA-TmpA

ในช่วงทศวรรษ 1990 ได้มีการนำหลักการ EIA มาใช้เพื่อตรวจหา *T. pallidum* โดยมีหลักการแตกต่างกันไป เช่น BioElisa Syphilis²⁰ ใช้หลักการ Competitive EIA วิธี *Captia™ syphilis G*²¹ ใช้หลักการ indirect EIA อาจใช้สำหรับการตรวจกรองหรือการตรวจยืนยัน และวิธี *Captia™ syphilis M* ใช้ตรวจหาแอนติบอดี *T. pallidum*

ชนิด IgM^{22, 23} ในเด็กแรกคลอดที่สงสัยจะติดเชื้อขณะอยู่ในครรภ์มารดา

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจทางซีโรโลยีเพื่อวินิจฉัยโรคซิฟิลิส โดยใช้โปรตีนของเชื้อ *T. pallidum* ที่อยู่บนบริเวณผนังเซลล์ หรือ *T. pallidum* membrane protein (TnpA) จากการประเมินคุณภาพชุดตรวจ EIA-TnpA พบว่ามีความไวและความจำเพาะเทียบเท่ากับวิธี FTA-ABS ในปัจจุบันมีผู้ผลิตและจำหน่ายหลายบริษัท เช่น Abbott Murex ICE Syphilis, Dade Behring Enzygnost Syphilis, Bio-Rad Syphilis Total, Biokit Bioelisa 3.0, Trepanostika TP Recombinant, Diesse Enzywell Syphilis, Microgen Bioproduct Mercia Syphilis, Newmarket Laboratories Syphilis EIA II, Omega Pathozyne Syphilis Competition และ Trinity Biotec Captia Syphilis²⁴⁻²⁸ เป็นต้น สามารถตรวจหาได้ทั้ง IgG และ/หรือ IgM ขึ้นอยู่กับน้ำยาแต่ละชนิด ความไวและความจำเพาะแตกต่างกันไป

เพื่อเพิ่มความไวในการทดสอบ ปัจจุบันจึงมีการผลิตชุดน้ำยาเพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อ *T. pallidum* ขึ้นโดยอาศัยหลักการ chemiluminescence immunoassay (CLIA) เช่น ชุดทดสอบ LIAISON Treponema Screen โดย DiaSorin ประเทศอิตาลี²⁹ และ ARCHITECT Syphilis TP โดยบริษัท Abbott สหรัฐอเมริกา³⁰ ซึ่งจะมีเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติที่จะใช้กับน้ำยาโดยเฉพาะ พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง เมื่อเทียบกับวิธี EIA และ TPHA นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาใช้หลักการ Particle gel immunoassays (PaGIAs) ขึ้นโดยบริษัท DiaMed ประเทศ Switzerland^{31, 32} โดยเคลือบผิวเม็ด bead ด้วยแอนติเจนของเชื้อ *T. pallidum* ส่วน Tpn15 Tpn17 และ Tpn47 ที่ได้จากเทคนิค recombinant เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมหรือพลาสมาที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที อาศัยการปั่นนาน 10 นาที ด้วยเครื่องปั่นเฉพาะ จะเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ด bead บนชั้นเจลใน gel card ในขณะที่ถ้าไม่เกิดการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน เม็ด bead จะตกลงอยู่ที่ก้นหลุมเจลใน gel card

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Treponemal* โดยใช้วิธี *Western blot (immunoblot, IB)*

วิธีนี้เป็นการตรวจหาแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างตอบสนองต่อแอนติเจนต่างๆ จากการติดเชื้อ *T. pallidum* โดยใช้เทคนิค gel-electrophoresis แยกโปรตีนของเชื้อออกตามน้ำหนักโมเลกุล โปรตีนที่แยกได้จะถูกถ่าย (transfer) ลงในแผ่น nitrocellulose เพื่อทำการทดสอบกับซีรัม วิธี IB สามารถตรวจแยก IgG และ IgM ได้ มีประโยชน์สำหรับการวินิจฉัย congenital syphilis เนื่องจากพบว่าแอนติบอดีใน congenital syphilis จะทำปฏิกิริยากับ peptides ของเชื้อได้ผลดีแต่ต้องอาศัยการอ่านผลที่แม่นยำ^{33, 34} เนื่องจากวิธีนี้อาจจะเกิดผลบวกปลอมได้จากปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction) กับเชื้อกลุ่ม spirochetes อื่น โดยเฉพาะในเขตที่มีการระบาดของโรค Lyme disease

Rapid tests

นอกจากชุดตรวจดังได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว ปัจจุบันมีผู้ผลิตชุดตรวจที่ให้ผลเร็ว หรือ Rapid Test ขึ้นเพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. pallidum* ซึ่งอ่านผล 15 นาทีหลังหยดซีรัม และวิธีการทำสะดวก ไม่ซับซ้อนเพิ่มเติมหรือใช้น้อย แต่ความไวและความจำเพาะต่ำกว่าวิธีมาตรฐานโดยทั่วไป ส่วนมากจะนำมาใช้กรณีต้องการผลด่วน หรือเพื่อสนับสนุนวิธีการตรวจอื่น ชุดทดสอบมีด้วยกันหลายบริษัท แต่ที่นิยมแพร่หลายคือ Determine Syphilis TP (Abbott Diagnostics) ซึ่งใช้หลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟี^{35, 36} โดยแอนติบอดี *T. pallidum* ในซีรัมหรือพลาสมา จะทำปฏิกิริยากับแอนติเจน *T. pallidum* ที่คอนจูเกตกับ selenium colloid แล้วเคลื่อนตัวผ่านแถบทดสอบไปยังบริเวณ "patient window" ซึ่งมีแอนติเจน *T. pallidum* อยู่ จะเห็นการเกิดปฏิกิริยาเป็นเส้นสีแดง วิธีนี้อ่านผลหลังหยดตัวอย่างทดสอบ 15 นาที จนถึง 24 ชั่วโมง สิ่งส่งตรวจที่ให้ผลไวสูงสุดคือซีรัม ในขณะที่พลาสมาจะมีความไวต่ำกว่า

ในการตรวจกรองอาจใช้ RPR แล้วตรวจยืนยันผลด้วยวิธีที่จำเพาะต่อเชื้อ *T. pallidum* โดยปกติจะเป็น TP-passive agglutination หรือ FTA-ABS ซึ่งแนวทางนี้

คำนึงถึงในด้านค่าใช้จ่าย ความสะดวก แต่ในบางห้องปฏิบัติการอาจทำการตรวจกรองควบคู่กัน เช่นวิธี RPR ร่วมกับวิธีที่จำเพาะต่อ เชื้อ *T. pallidum* อย่างไรก็ดีตามปัจจุบันห้องปฏิบัติการหลายแห่งใช้วิธี EIA เป็นวิธีตรวจกรองเนื่องจากมีความไวสูง โดยเฉพาะในระยะแรกของการติดเชื้อ (early stage)^{4, 7, 37}

การตรวจกรองซีฟิลิสทางซีโรโลยีสำหรับธนาคารเลือด

นอกจากซีฟิลิสจะสามารถติดต่อทางเพศสัมพันธ์ มารดาสู่ทารกแล้ว ยังสามารถติดต่อทางการรับเลือด หรือผลิตภัณฑ์จากเลือดได้ เมื่อมีการตรวจกรองซีฟิลิสในเลือดผู้บริจาค พบว่ามีอัตราการติดเชื้อซีฟิลิสจากการรับเลือดลดลง ในระยะแรกการตรวจกรองซีฟิลิสใช้วิธี VDRL ซึ่งต้องทำการ inactivate ซีรัมก่อนทำการทดสอบ และอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่ด้วยปริมาณงานที่เพิ่มมากขึ้น ประกอบกับการผลิตชุดตรวจได้พัฒนาเป็น RPR ทำให้ธนาคารเลือดได้เปลี่ยนมาใช้วิธี RPR เพื่อตรวจกรองซีฟิลิสในผู้บริจาคโลหิต เนื่องจากพบว่ามี ความไวสูงในช่วง primary syphilis^{4, 7, 24} และบอกได้ว่าเป็น active syphilis หรือไม่ เมื่อมียารักษาที่ได้ผลดีขึ้น ซีฟิลิสมีความสำคัญลดลง จนกระทั่งในยุคที่โรคเอดส์ระบาด โดยเฉพาะในประเทศไทยที่มีรายงานความชุกของโรคเอดส์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว³⁸ ทั้งผู้ป่วยเอดส์ และผู้ที่ติดเชื้อ HIV จากปี พ.ศ.2527 ถึง พ.ศ. 2541 และถึงแม้จะลดลงนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 เป็นต้นมา พบว่าซีฟิลิสได้กลับมาเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขอีกครั้ง ทั้งนี้เพราะการติดต่อของซีฟิลิสและโรคเอดส์จะคล้ายคลึงกัน คือติดต่อทางเพศสัมพันธ์เป็นหลัก ประกอบกับซีฟิลิสเป็นโรคที่ก่อให้เกิดแผลตามอวัยวะเพศ ทำให้โอกาสที่จะมีการติดเชื้อ HIV ร่วมกันได้สูงขึ้น³⁹⁻⁴²

เนื่องจากการตรวจกรองซีฟิลิสแบบ nontreponemal test ทั้ง VDRL และ RPR มีความจำเพาะต่ำ เมื่อชุดตรวจแบบ treponemal test เช่น TPHA และ EIA ได้รับการพัฒนาให้มีความไวสูงกว่าการตรวจแบบ VDRL และ RPR ดังกล่าวมาข้างต้น ดังนั้นธนาคารเลือดหลายแห่งจึงเปลี่ยนวิธีทดสอบเป็น treponemal test เนื่องจากให้ผลบวกทุกระยะของการติดเชื้อ ทำให้เลือดที่ได้รับ

จากการบริจาคมีความปลอดภัยมากขึ้น ปริมาณการตรวจจำนวนมาก คืออีกเหตุผลที่ธนาคารเลือดส่วนใหญ่ได้หันมาใช้ treponemal test โดยเฉพาะ EIA ซึ่งนอกจากจะสามารถปรับใช้กับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติได้แล้ว การอ่านผลยังอ่านด้วยเครื่องอ่าน ทำให้ได้ค่าที่แน่นอน การรายงานผลเชื่อถือได้ สามารถเก็บข้อมูลหรือเชื่อมต่อข้อมูลทางระบบคอมพิวเตอร์ได้^{4, 7, 25-27}

อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจกรองเลือดผู้บริจาคด้วยชุดตรวจแบบ treponemal test แล้ว เมื่อให้ผลบวกควรตรวจซ้ำโดยใช้พลาสมาจากสายถุงเลือดมาตรวจอีกครั้งด้วยวิธีให้ผลเร็ว (rapid test) เพื่อความถูกต้องว่าไม่เกิดการสลับหลอดเลือดที่ตรวจ และทำ TPHA จากหลอดเลือด เมื่อผลตรงกันควรทำการทดสอบด้วย nontreponemal test ซึ่งอาจเป็น VDRL หรือ RPR เพื่อตรวจดูว่าผู้บริจาคเป็น active syphilis หรือไม่ และหาค่าไตเตอร์ เพื่อการให้คำปรึกษาและทำการรักษาที่ถูกต้องต่อไป

สรุป

การตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับซิฟิลิสโดยการตรวจหาตัวเชื้อ *Treponema pallidum* โดยตรง ไม่เป็นที่นิยมมากนัก เนื่องจากความสลับซับซ้อนของวิธี ดังนั้นวิธีการตรวจในปัจจุบัน จึงนิยมการตรวจทางอ้อม โดยตรวจการตอบสนองของภูมิคุ้มกันซึ่งมี 2 แบบ คือ nontreponemal antibodies ที่นิยมคือ VDRL และ RPR และ treponemal antibodies เช่น TPHA และ EIA สำหรับการตรวจวินิจฉัยซิฟิลิส ยังมีความจำเป็นต้องทำการตรวจกรองทั้ง 2 แบบควบคู่กัน แต่สำหรับการตรวจกรองเลือดผู้บริจาคที่มีปริมาณงานจำนวนมากและมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ HIV ร่วมด้วย ได้มีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนการทดสอบด้วยวิธีเดิมคือ nontreponemal antibodies เช่น VDRL หรือ RPR เป็น treponemal antibodies เช่น TPHA หรือ EIA แทน เนื่องจากคุณภาพชุดตรวจที่ได้พัฒนาให้มีความไว ความจำเพาะสูงและสามารถใช้กับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติได้ ทำให้ลดความผิดพลาดจาก human error ได้ แต่เมื่อให้ผลบวกด้วย treponemal test ควรทำการทดสอบ nontreponemal test อีกครั้งในผู้บริจาคเลือด เพื่อตรวจดูว่าเป็น

active syphilis หรือไม่ และหาค่าไตเตอร์ เพื่อการให้คำปรึกษาและทำการรักษาที่ถูกต้องต่อไป และผู้บริจาคจะได้ไม่กลับมาบริจาคเลือดอีก

เอกสารอ้างอิง

1. Hook EW, Marra CM. Acquired syphilis in adults. N Engl J Med 1992; 26: 1060-9.
2. Risseuw-Appel I M, Kothe PC. Transfusion syphilis; a case report. Sex Transm Dis 1983; 10: 200-1.
3. Zeltser R, Kurban AK. Syphilis. Clin Dermatol 2004; 22: 461-8.
4. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin. Microbiol Review 1995; 8: 1-21.
5. Kennedy Jr E.J., Creighton ET. Darkfield microscopy for the detection and identification of *T. pallidum*, in: Larsen SA, Pope V, Johnson R, Kennedy Jr E.J. (Eds.). A manual of tests for syphilis. 9th edition. American Public Health Association Washington DC. 1998. 120-34.
6. Wos SM, Wicher K. Extensive cross reactivity between *Treponema pallidum* and cultivable treponemes demonstrated by sequential immunoadsorption. Int. Archs Allergy Apl Immun 1986; 79: 282-5.
7. Wicher K, Horowitz HW, Wicher V. Laboratory methods of diagnosis of syphilis for the beginning of the third millennium. Microbes Infect 1999; 1: 1035-49.
8. Wicher K, Abbruscato F, Wicher V, Collins DN, Auger I., Horowitz HW. Identification of persistent infection in experimental syphilis by PCR. Infect Immun 1998; 66: 2509-13.
9. Orle KA, Gates CA, Martin DH, Body BA, Weiss JB. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum* and herpes simplex virus type 1 and 2 from genital ulcers. J Clin

- Microbiol 1996; 34: 49–54.
10. Sanchez PJ, Wendel Jr GD, Grimpel E, *et al.* Evaluation of molecular methodologies and rabbit infectivity testing for the diagnosis of congenital syphilis and neonatal central nervous system invasion by *Treponema pallidum*. J Infect Dis 1993; 167: 148–57.
 11. Peeling RW and Ye H. Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis: an overview. Bulletin of the World Health Organization 2004; 82: 439–46.
 12. Pedersen NS, Ørum O, Mouritsen S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to venereal disease research laboratory (VDRL) antigen in syphilis. J Clin Microbiol 1987; 25: 1711–6.
 13. White TJ, Fuller SA. Visuwell reagent antitreponemal enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of syphilis. J Clin Microbiol 1989; 27: 2300–4.
 14. Stone DL, Moheng MC, Rolih S, Sinor LT. Capture-S a nontreponemal solid-phase erythrocyte adherence assay for serological detection of syphilis. J Clin Microbiol 1997; 35: 217–22.
 15. Pierangeli SS, Goldsmith GH, Krnic S, Harris EN. Differences in functional activity of anticardiolipin antibodies from patients with syphilis and those with antiphospholipid syndrome. Infect Immun 1994; 62: 4081–4.
 16. George RW, Hunter EF, Fears MB. Fluorescent treponemal antibody- absorption (FTA-ABS) test, in: Larsen S.A, Pope V, Johnson R, Kennedy Jr E.J. (Eds.). A manual of tests for syphilis, 9th edition, American Public Health Association Washington DC. 1998, pp. 223–45.
 17. Wendel G, Sanchez P, Peters M, *et al.* Identification of *Treponema pallidum* in amniotic fluid and fetal blood from pregnancies complicated by congenital syphilis. Obstet Gynecol 1991; 78: 890–5.
 18. Orton SL, Dodd RY., Williams AE. Absence of risk factors for false-positive test results in blood donors with a reactive test result in an automated treponemal test (PK-TP) for syphilis. Transfusion 2001; 41: 744–50.
 19. Anonymous SERODIA-TP-PA Reagents for detection and titration of antibodies to *Treponema pallidum*, Reagents kit insert. Fujirebio Inc., Japan. 1998.
 20. Ebel A, Bachelart L, Alonso JM. Evaluation of a new competitive immunoassay (Bio ELISA syphilis) for screening for *Treponema pallidum* antibodies at various stages of syphilis. J Clin Microbiol 1998; 36: 358–61.
 21. Silletti RP. Comparison of Captia syphilis G enzyme immunoassay with rapid plasma reagin test for detection of syphilis. J Clin Microbiol 1995; 33: 1829–31.
 22. Leferve JC, Bertrand MA., Bauriaud R. Evaluation of the CAPTIA enzyme immunoassays for detection of IgG and IgM to *Treponema pallidum* in syphilis. J Clin Microbiol 1990; 28: 1704–7.
 23. Ijsselmuiden OE, VanDer Sluis JJ, Mulder A, *et al.* An IgM capture enzyme linked immunosorbent assay to detect IgM antibodies to treponemes in patients with syphilis. Genitourin. Med 1989; 65: 79–83.
 24. Clyne B, Jerrard DA. Syphilis testing. J Emerg Med 2000; 18: 361–7.
 25. Young H, Moyes A, Seagar L, McMillan A. Novel recombinant-antigen enzyme immunoassay for serological diagnosis of syphilis. J Clin Microbiol 1998; 36: 913–7.

26. Schmidt BL, Edjlalipour M, Luger A. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. J Clin Microb 2000; 38:1279–82.
27. Castro R, Prieto ES, Santo I, Azevedo J, Exposto Fda L. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum*. J Clin Microbiol 2003; 41: 250-3.
28. Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA). 2004. Ten syphilis EIAs. (online). Available [http://www.hpa-midas.org.uk/documents/reports/Syphilis/ MHRA 04109 \(Ten syphilis EIAs\).pdf](http://www.hpa-midas.org.uk/documents/reports/Syphilis/ MHRA 04109 (Ten syphilis EIAs).pdf). (25 November 2005).
29. Marangoni A, Sambri V, Accardo S, *et al*. Evaluation of LIAISON Treponema Screen, a novel recombinant antigen-based chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis. Clin Diagn Lab Immunol. 2005; 12: 1231-4.
30. Kumagai YK. An automated chemiluminescent assay for the detection of antibodies to *Treponema pallidum* using the ARCHITECT® SYSTEM. Abstract from XVIth Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Asia, Bangkok, Thailand, 12-15 November, 2005. 5P-100.
31. Rabello A, Luquetti AO, Moreira EF, *et al*. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay-ID-PaGIA Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: 77–82.
32. Schmidt BL. Evaluation of a New Particle Gel Immunoassay for Determination of Antibodies against *Treponema pallidum*. J Clin Microbiol 2004; 42: 2833–5.
33. Byrne RE, Laska S, Bell M, Larson D, Phillips J, Todd J. Evaluation of *Treponema pallidum* western immunoblot assay as a confirmatory test for syphilis. J Clin Microbiol 1992; 30: 115–22.
34. Meyer MP, Eddy T, Baughn RE. Analysis of Western blotting (immunoblotting) technique in diagnosis of congenital syphilis. J Clin Microbiol. 1994; 32: 629–33.
35. Diaz T, Almeida MG, Georg I, Maia SC, De Souza RV, Markowitz LE. Evaluation of the Determine Rapid Syphilis TP assay using sera. Clin Diagn Lab Immunol. 2004 11: 98-101.
36. Lien TX, Tien NT, Chanpong GF, *et al*. Evaluation of rapid diagnostic tests for the detection of human immunodeficiency virus types 1 and 2, hepatitis B surface antigen, and syphilis in Ho Chi Minh City, Vietnam. Am J Trop Med Hyg 2000; 62: 301–9.
37. Young H. Guidelines for serological testing for syphilis. Sex Transm Inf 2000; 76: 403-5.
38. ศูนย์ข้อมูลทางระบาดวิทยา. สำนักโรคติดต่อ กรมควบคุมโรค. (2005). Available <http://203.157.19.193> (27 November 2005).
39. Butt AM, Johnman C, Nandwani R. Sexually transmitted infections in people with HIV infection. BMJ 2001; 322: 796.
40. Ramsey G, Soltis F, Bowman R, McNamee J, Hahn LF, Dixon BW. Syphilis serology in blood donors: a possible surrogate marker for human immunodeficiency virus risk. Vox Sang. 1991; 60: 165-8.
41. Karumudi UR, Augenbraun M. Syphilis and HIV: a dangerous duo. Expert Rev Anti Infect Ther 2005; 3: 825-31.
42. Check WA. Preventing AIDS transmission: should blood donors be screened? JAMA 1983; 249: 567-70.[* | In-line.WMF *]