



TREPONEMA PALLIDUM HEMAGGLUTINATION (TPHA)

จิราพร ยววิทยาพานิช วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
กัมพล พันธ์อำพล พ.บ.*

ย่อเรื่อง

จากการศึกษาการตรวจน้ำเหลืองเพื่อวินิจฉัยโรค Syphilis โดยใช้วิธี VDRL ซึ่งใช้ Cardiolipin เป็น non-specific antigen เปรียบเทียบกับวิธี Treponema pallidum Hemagglutination (TPHA) โดยทำแบบ micro-qualitative โดยใช้ Component ของ T. pallidum ซึ่งเป็น specific antigen coat บนเม็ดเลือดแดงของแกะ แล้วใช้หา specific T. pallidum antibody พบว่า VDRL weakly reactive จะให้ผล TPHA negative มากที่สุดคือ 40 % พวก VDRL titer 1:1-1:4 ให้ TPHA negative 15.71%, VDRL titer 1:8-1:32 ให้ TPHA negative 3.45% ส่วน VDRL titer 1:64-1:128 จะไม่ให้ TPHA negative เลย คือ ให้ผล positive โดยวิธี TPHA หมด เมื่อ

ทำการศึกษา serum ทั้งหมด 150 ตัวอย่างพบว่าให้ผล TPHA positive 133 ราย ซึ่งเท่ากับ 88.67 % อีก 17 ราย (11.33%) ให้ผล TPHA negative

บทนำ

การวินิจฉัยโรคซิฟิลิส มักจะอาศัยการซักประวัติ, การดูอาการและลักษณะแผลของผู้ป่วย การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมักจะอาศัยการตรวจน้ำเหลือง (serum) ของผู้ป่วย Serological test สำหรับทดสอบโรคซิฟิลิส มักจะมีวิธีทดสอบอยู่ 2 กลุ่มใหญ่ๆ ด้วยกัน คือ

1. พวก non-specific test กลุ่มนี้มักจะใช้ antigen ที่มีได้จากตัวเชื้อ T. pallidum antigen ที่ใช้ มักจะเป็น lipoidal fraction จาก normal heart muscle การทดสอบในกลุ่มนี้ก็มี Kahn test, Rapid

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

plasma reagin test, VDRL test, Kolmar Complement fixation test. etc.

2. พวก Specific test สำหรับโรคซิฟิลิส กลุ่มนี้ใช้ antigen จากตัวเชื้อ Treponema pallidum จึงทำให้การทดสอบค่อนข้าง specific การทดสอบในกลุ่มนี้ก็มี Treponema pallidum Immobilization Test (TPI), Reiter protein Complement fixation test (RPCFT), Fluorescent Treponema antibodies absorption test (FTA-ABS) และ Treponema pallidum hemagglutination test (TPHA)

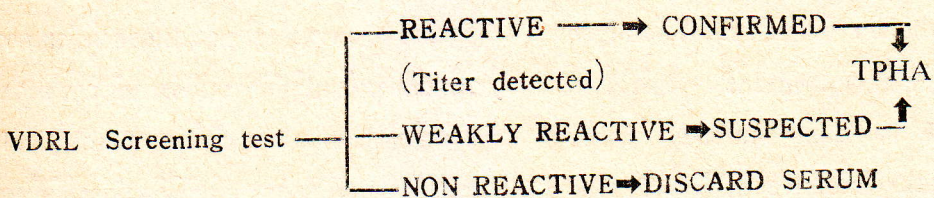
ในการวินิจฉัยโรคซิฟิลิสโดยการตรวจน้ำเหลืองนี้ ส่วนมากมักจะตรวจโดยวิธี non-specific test ก่อน ถ้าสงสัยว่ารายไหนอาจจะให้ผล biological false positive จึงต้อง

ทำการทดสอบใหม่โดยวิธี specific test

จุดประสงค์ของงานอันนี้เพื่อที่จะดูว่า serum ที่ให้ผล reactive กับ VDRL จะให้ผล positive โดย TPHA หรือไม่ และพวก weakly reactive ตลอดจนพวก reactive ที่มี titer ระดับต่างๆ จะมีความสัมพันธ์กับ positive TPHA หรือไม่ และ TPHA เหมาะที่จะใช้เป็น Routine diagnostic method ในโรงพยาบาลหรือไม่

วัสดุและวิธีการ

1. Serum samples: Serum ที่ใช้ศึกษาได้จากห้องปฏิบัติการ serology ของ ร.พ. นครเชียงใหม่ และหน่วยควบคุมการโรคของ จังหวัดเชียงใหม่ การเลือก serum และดำเนินการทดสอบเป็นไปตามแผนภาพดังต่อไปนี้



2. VDRL Qualitative Slide test: หยด inactivated serum 1 หยด (0.05ml.) ลงในหลุมของแผ่น slide เติม 1 หยด (1/60 ml.) ของ VDRL antigen ลงบน serum โดยใช้เข็ม No. 22 แล้ว rotate ด้วย rotating machine โดยใช้ความเร็ว 180 rpm. นาน 4 นาที นำมาอ่านผลทันทีด้วย micro-

scope โดยใช้ low power objective ถ้าไม่พบตะกอนหรือพบตะกอนน้อยมาก ก็อ่านผลเป็น non-reactive ถ้าพบตะกอนก้อนเล็กๆ แสดงว่าเป็น weakly reactive ถ้าพบตะกอนก้อนใหญ่แสดงว่าเป็น reactive

3. VDRL Quantitative Tube Test: นำ serum ที่ให้ผล reactive หรือ

weakly reactive มาหา titer โดยวิธี Quantitative tube test โดยใช้ serum dilution 1:2, 1:4 1:8, 1:16 เรื่อยไป จนถึง 1:128 Tube ละ 0.25 ml. เติม diluting antigen ลงทุก tube tube ละ 0.25 ml. เขย่าด้วย shaking machine นาน 5 นาที centrifuge 1,500 rpm. นาน 10 นาที แล้วเขย่าด้วย shaking machine อีก 1 นาที จึงอ่านผล titer คือ dilution สูง

สุดของ serum ที่ยังให้ผล reactive อยู่ (tube ที่ให้ผล reactive จะเห็นตะกอนเป็นเม็ดเล็กๆ สีขาวลอยอยู่ในน้ำใสๆ เห็นได้ชัดเจน) (1)

4. Micro-Hemagglutination Qualitative Test

1 Dilute serum ด้วย microdiluters (0.025 ml.) ใน Disposable plastic tray ด้วย Absorbing diluent ดังตารางต่อไปนี้

Cup No.	Test Serum (ml.)	Absorbing Diluent (ml.)	Serum Dilution	Diluted Unsensitized Cells (ml.)	Diluted Sensitized Cells (ml.)	Final Serum Dilution
1	0.025	0.025	1 : 2	0.075		
2	0.025	0.1	1 : 10			
3	0.025	0.025	1 : 20			1 : 80
4	0.025	0.025	1 : 20		0.075	1 : 80
5	0.025	0.025	1 : 40		0.075	1 : 160

ผล

Serum ที่ทำการทดสอบโดยวิธี VDRL มี 150 ราย ให้ผล Weakly reactive 10 ราย, Titer 1:1-1:4 มี 70 ราย, Titer 1:8-1:32 มี 58 ราย และ Titer 1:64-1:128 มี 12 ราย เมื่อทำ THPA พบว่าพวก weakly reactive ให้ positive 6 ราย (negative 4 ราย) พวกที่มี titer 1:1-1:4 ให้ผล positive 59 ราย (negative

11 ราย) พวก titer 1:8-1:32 ให้ผล positive 56 ราย (negative 2 ราย) และพวก titer 1:64-1:128 ให้ผล positive 12 ราย (negative ไม่มี) ผลการทดลองได้แสดงไว้ใน Table 1 และ 2

วิจารณ์ผลการทดลอง

เป็นที่ทราบกันแล้วว่า พวก non-specific test สำหรับโรคซิฟิลิส เช่น VDRL test อาจจะให้ Biological false positive

(BFP) ได้จากโรคอื่น เช่น โรคมาเลเรีย, โรคเรื้อน, typhus, relapsing fever, leptospirosis etc. นอกจากนั้น BFP ยังเกิดจากพวก disinfectant ได้ เช่น cetylceide

Scotti และผู้ร่วมงาน (2) พบว่าคนไข้โรคเรื้อน 206 คน ให้ผล VDRL test reactive 82 คน (40%) แต่เมื่อทำ TPI และ FTA-ABS พบว่าให้ผล positive 33 คน จาก 82 คน (40%) แสดงว่า คนไข้โรคเรื้อนเหล่านี้จะมี 16% ที่เคยมีหรือกำลังมี treponemal infection

สมัยก่อนมักจะใช้ Specific test คือ FTA-ABS หรือ TPI กัน แต่วิธีดังกล่าวค่อนข้างยุ่งยากจึงมีผู้พยายามทำวิธี Treponema pallidum hemagglutination (TPHA) ขึ้น Coffey และผู้ร่วมงาน (3) พบว่าการใช้ Microhemagglutination ในการหา antibody ต่อ T. pallidum (MHA-TP) จะให้ผล negative 98.8% ใน BFP Sera และ serum ทุกอันที่ให้ผล MHA-TP positive จะให้ผล FTA-ABS positive ด้วย

Logan และผู้ร่วมงาน (4) พบว่า Automated Microhemagglutination Assay for Antibody to T. pallidum (AMHA-TP) เมื่อเปรียบเทียบกับ FTA-ABS ได้ผลว่า AMHA-TP ให้ผล positive 96.4% และ FTA-ABS positive 95.9% ในคนไข้ซิฟิลิสทั่วไป ในคนไข้พวก untreated primary disease ของโรคนี้ วิธี AMHA-TP detect ได้ 89.6% ในขณะที่ FTA-ABS detect ได้ 100%

จากการทดลองครั้งนี้พบว่า serum ที่ให้ผล VDRL weakly reactive และ reactive 150 ราย จะให้ผล TPHA negative 17 ราย (11.33%) จากการแยกรายละเอียดพบว่าพวก weakly reactive ให้ผล TPHA negative มากที่สุด 40% ส่วน serum ที่ให้ titer 1:1-1:4 ให้ TPHA negative 15.71% จะเห็นว่า serum ที่ให้ VDRL reactive ใน titer ต่ำๆ จะมีโอกาสเกิดจาก BFP ได้มาก ส่วนพวก titer สูงๆ จะให้ BFP น้อยลงตามลำดับ พบว่า titer 1:64-1:128 ให้ TPHA positive หมด

ตารางที่ 1 แสดงผลของ VDRL-Screening test และ Treponema pallidum Hemagglutination (TPHA)

VDRL - Test	จำนวน Serum	TPHA Positive	% TPHA Positive	TPHA Negative	% TPHA Negative
Weakly Reactive	10	6	4	4	2.67
Titer 1:1-1:4	70	59	39.34	11	7.33
Titer 1:8-1:32	58	56	37.33	2	1.33
Titer 1:64-1:128	12	12	8	0	0
TOTAL	150	133	88.67	17	11.33

ตารางที่ 2 แสดงผลของ TPHA positive และ negative ใน VDRL test แต่ละกลุ่ม

VDRL - Test	จำนวน Serum	TPHA Positive	% TPHA Positive	TPHA Negative	% TPHA Negative
Weakly Reactive	10	6	60	4	40
Titer 1:1-1:4	70	59	84.29	11	15.71
Titer 1:8-1:32	58	56	96.55	2	3.45
Titer 1:64-1:128	12	12	100	0	0

ABSTRACT :

Serological studies of syphilis using *Treponema pallidum* Hemagglutination (TPHA) test on VDRL positive sera shows that VDRL weakly reactive will give TPHA positive for 60 percent. VDRL titer 1:1-1:4 will give TPHA positive for 84.29 per cent.

VDRL titer 1:8-1:32 will give TPHA positive for 96.55 per cent and VDRL titer 1:64-1:128 are all positive for TPHA test. A total of 150 positive VDRL sera will give TPHA positive for 133 sera (88.67%) and TPHA negative for 17 sera (11.33%).

REFERENCES

1. Walfgang K. Joklik, David T. Smith. : Microbiology 15th edition 1972 Meredith Corporation Chapter 57 page 647.
2. Wasserman A. Neisser A, Bruck C, (1906) Quoted by Wilkin Son: The Positive Wasserman Reaction Investigation and Interpretation Brit. J. Hosp. Med. 4:47, 1970.
3. Pangborn MC: New Serologically Active Phospholipid from Beef Heart Proc. Soc. Exper. Biol Med. 48:484, 1941.
4. สกใส เวชชาชีวะ, ฤทัย สกฤตธรรมรุ่ง, เสาวลักษณ์ ชูศิลป์ ขจร ประณีต, จุฬา
5. lngกรณเวชสาร ปีที่ 17 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม หน้า 1-14, 2515.
5. Nicholas L : Serodiagnosis of Syphilis Arch. Derm. 96:327, 1967.
6. Dan H. Campbell, Justine S. Harvey, Natalie E. Cremer Deiter H. Sussdorf: Methods in Immunology 2nd edition 1970 W.A. Benjamin, Inc. New York "Passive Technique with Tanned Erythrocytes" 279-283.
7. Serologic test for Syphilis : US Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service, Revised 1959. VDRL 119-133.

8. George W. Sciple, G.W. Montgomery. CH, and Knox, J.M. : Diagnostic Problems related to a "Biological False Positive" serologic test for Syphilis. *New Eng. J. Med.* 263:84, 1960.
9. Miller JL, Meyer PG, Parrott NA and Hill JH: A Study of the biologic falsely positive reactions for syphilis in children. *J. Pediat.* 57:548-52, Oct. 1960.
10. Wuepper KD, et al: False positive reaction to VDRL test with zone phenomena association with lymphosarcoma. *JAMA* 195:860-9, 7 Mar. 1966.
11. Stevens RW, et al: False positive serologic reactions induced by disinfectant. *Am. J. Clin. Pathol.* 53:110: 1970.
12. Mackey DM, et al: Syphilis and Biologic False Positive Reactors among Leprosy Patients. *Arch. Derm.* 101:328-330, 1970.
13. Hughes MK. et al: Positive Fluorescent treponemal antibody reactions in diabetes. *Appl. Microbiol.* 19:425-8, Mar. 1970.
14. Mustakallio KK. et al: Cryoglobulins and Rheumatoid factor in sera from chronic false positive seroreactor for syphilis, *Acta Dermatovener (Stockholm)* 47:249-54, 1967.
15. Boak RA, Carpenter CM. Miller JN: Biologic Falsely Positive reactions for syphilis among narcotic addicts, A report on the incidence of biologic falsely positive reactions as measured by Treponema Pallidum Immobilization test. *JAMA* 175:326, 28 Jan. 1961,
16. Tuffanelli DL: Narcotic addiction with false positive reaction for syphilis: immunologic studies. *ACTA Dermatovener (Stockholm)* 48:542-546, 1968.
17. Harvey AM: Auto-Immune Disease and the Chronic Biological False positive test for Syphilis. *JAMA* 182:513-518 (Nov. 3), 1962.
18. Tuffanelli DL, Wuepper KD, Bradford LL, et al: Fluorescent treponema-antibody absorption test: Studies a false positive reactions to tests for syphilis, *New Eng. J. Med.* 276:258-262, 1967.
19. Coffey EM, et al: Evaluation of the qualitative and automated quantitative microhemagglutination assay for antibodies to Treponema pallidum. *Appl. Microbiol.* 24:26-30, 1972.

20. Logan LC, Cox, PM: Evaluation of a quantitative automated micro-hemagglutination assay for antibodies to *Treponema pallidum* Am. J. Clin. Pathol. 53:163-166, 1970.
21. Ronald A. Le Clair, Evaluation of a Qualitative Hemagglutination test for Antibodies to *Treponema Pallidum*. J. Infect. Dis. 123:667-670, June 1971.
22. Ronald N. Shore. Hemagglutination tests and related advances in serodiagnosis for syphilis. Arch. Dermatol. 109:854-7, June, 1974.
- 23 Scotti, A.T., Mackey, D.M. and Trautman, J.R.: Syphilis and Biologic False Positive Reactors Among Leprosy Patients Arch. Derm. 101:328-330, 1970.