A Comparative Study of *Treponema pallidum* Antibodies Test by Electrochemiluminescence Immunoassay and *Treponema pallidum* Particle Agglutination Assay

Nanthisa Kemawichanurat, Arisara Samutpong, Chavachol Setthaudom and Siraporn Pitak*

Clinical Immunology Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Analysis of *Treponema pallidum* antibodies (treponemal antibodies) in serum is a laboratory test for diagnosing syphilis and confirming infections in patients, whether current or previous. The traditional assay for treponemal antibody testing is *Treponema pallidum* particle agglutination (TPPA) assay. However, this assay requires expertise as the results must be observed by the naked eye and has a long assay duration, making it unsuitable for labs with a high sample volume. Currently, the automated-based electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) using Elecsys Syphilis reagent has been developed as an alternative option for treponemal antibody detection. This study aimed to compare the consistency of the ECLIA with the TPPA assay for treponemal antibody detection using 299 samples. The precision testing of the ECLIA showed good precision within acceptable criteria. The concordance of both methods was a strong 99.33% (Cohen's kappa 0.985), indicating consistent results. The ECLIA could distinguish the nonreactive group from the reactive titer 1:160 and reactive titer ≥ 1:320 groups ($p < 0.001$). However, it could not separate between the reactive titer 1:160 group and the reactive titer ≥ 1:320 group ($p = 0.172$). In conclusion, the ECLIA could be used for preliminary screening to separate patients into nonreactive and reactive groups. It might help to reduce the number of samples needing the TPPA assay. Decreasing the assay period increases the efficiency of patient treatment.

Keywords: *Treponema pallidum* antibodies, Syphilis, *Treponema pallidum* particle agglutination, TPPA, ECLIA

***Corresponding author E-mail address:** kungfumail@yahoo.com

Received: 25 March 2024 Revised: 10 July 2024 Accepted: 15 August 2024

160-68 #in □.□□□□□□□□□□□□□□ □□□□□□ □□ 53-1 p.6.indd 9324 28/4/2568 BE 10:16

การเปรียบเทียบการตรวจหา *Treponema pallidum* Antibodies ด้วยวิธี Electrochemiluminescence Immunoassay และวิธี *Treponema pallidum* Particle Agglutination Assay

นันทิศา เขมะวิชานุรัตน์ อริสรา สมุทรผ่อง ชวชล เศรษฐอุดม และ ศิราภรณ์ พิทักษ์*

ห้องปฏิบัติการหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ *Treponema pallidum* antibodies (treponemal antibodies) ในซีรัม เป็นการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อวินิจฉัยโรคซิฟิลิส (syphilis) และยืนยันผลการทดสอบของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ ณ ปัจจุบัน หรือเคยติดเชื้อมาแล้ว วิธีดั้งเดิมของการตรวจ treponemal antibodies คือวิธี *Treponema pallidum* particle agglutination (TPPA) เป็นวิธีที่ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ทำการทดสอบเนื่องจากต้องอ่านผลการทดสอบด้วยสายตามนุษย์ และใช้ระยะเวลาทำการทดสอบค่อนข้างนาน อาจไม่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการที่มีตัวอย่างจำนวนมาก ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบด้วยเครื่องอัตโนมัติหลักการ electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) ที่อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจหา treponemal antibodies การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความสอดคล้องของการตรวจวิเคราะห์ treponemal antibodies ด้วยวิธี ECLIA โดยใช้น้ำยา Elecsys Syphilis กับวิธี TPPA จากกลุ่มตัวอย่าง 299 ราย โดยผลการทดสอบความแม่นยำของเครื่องอัตโนมัติวิธี ECLIA พบว่ามีค่าความแม่นยำที่ดีและอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ การศึกษาความสอดคล้องพบว่าทั้งสองวิธีมีผลรวมความสอดคล้องอยู่ที่ร้อยละ 99.33 มีค่าความสอดคล้องอยู่ในระดับดีมาก (Cohen's kappa เท่ากับ 0.985) แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบของทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน เมื่อศึกษาเพิ่มเติมพบว่าหลักการ ECLIA สามารถนำมาใช้จำแนกกลุ่ม nonreactive ออกจากกลุ่ม reactive titer 1:160 และ reactive titer ≥ 1:320 ($p < 0.001$) ได้ แต่ไม่สามารถแยกกลุ่ม reactive titer 1:160 และกลุ่ม reactive titer ≥ 1:320 ออกจากกันได้ ($p = 0.172$) สรุปได้ว่าวิธี ECLIA สามารถใช้คัดกรองเบื้องต้นในการจำแนกผู้ป่วยกลุ่ม nonreactive ออกจากกลุ่ม reactive เพื่อลดจำนวนตัวอย่างที่ต้องทดสอบด้วยวิธี TPPA การย่นระยะเวลาการทดสอบจะช่วยเพิ่มความรวดเร็วและประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงที

คำสำคัญ: *Treponema pallidum* antibodies, Syphilis, *Treponema pallidum* particle agglutination, TPPA, ECLIA

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** kungfumail@yahoo.com

รับบทความ: 25 มีนาคม 2567 แก้ไขบทความ: 10 กรกฎาคม 2567 รับตีพิมพ์บทความ: 15 สิงหาคม 2567

160-68 #in □.□□□□□□□□□□□□□□ □□□□□□ □□ 53-1 p.6.indd 9325 28/4/2568 BE 10:16

บทนำ

โรคซิฟิลิสเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิด *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อผ่านทางเพศสัมพันธ์ (sexually transmitted infection: STI) นอกจากนี้ยังมีการติดเชื้อผ่านการตั้งครรภ์จากแม่สู่ลูก (congenital syphilis) การติดเชื้อผ่านทางบาดแผล (lesion) และการติดเชื้อผ่านการรับเลือด (blood transfusion)[1,2] ปัจจุบันแนวโน้มการระบาดของโรคซิฟิลิสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากรายงานของ World Health Organization (WHO) ในปี พ.ศ. 2563 โรคซิฟิลิสติดอันดับ 1 ใน 4 ของโรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ที่พบการติดเชื้อใหม่มากที่สุด โดยพบว่ามีผู้ติดเชื้อซิฟิลิสรายใหม่ทั่วโลกราว 7.1 ล้านคน[3]

สถานการณ์โรคซิฟิลิสในประเทศไทย จากรายงานประจำปี พ.ศ. 2564 กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่าโรคซิฟิลิสเป็นโรคที่ได้รับรายงานเข้ามาในระบบเฝ้าระวังโรคมากที่สุด โดยมีอัตราการป่วยเท่ากับ 15.7 รายต่อประชากรแสนคน เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดจากอัตราการป่วย 7.6 ราย ต่อประชากรแสนคนในปี พ.ศ. 2560 นอกจากนี้ยังพบแนวโน้มการเกิดโรคซิฟิลิสแต่กำเนิดเพิ่มสูงขึ้นเป็น 51.8 รายต่อประชากรเด็กเกิดมีชีพแสนคนในปี พ.ศ. 2563 จาก 25.2 รายในปี พ.ศ. 2561[4]

โรคซิฟิลิสประกอบด้วยการติดเชื้อ 4 ระยะ ได้แก่ ระยะที่หนึ่ง (primary stage) ระยะที่สอง (secondary stage) ระยะแฝง (latent stage) และระยะที่สาม (tertiary stage) โดยแต่ละระยะจะมีลักษณะอาการที่แตกต่างกันไป ได้แก่ การเกิดแผลริมแข็ง (chancre) มีผื่นขึ้นตามลำตัว (skin rash) หรืออาจไม่พบอาการแสดงในระยะแฝง แต่หากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาจะทำให้การดำเนินโรคเข้าสู่ระยะที่สามซึ่งทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงตามมา ทั้งในระบบประสาท หัวใจ สมอง รวมถึงอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกาย และอาจส่งผลรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ ภาวะแทรกซ้อนของการติดเชื้อซิฟิลิส ได้แก่ ซิฟิลิสระบบประสาท (neurosyphilis) ซิฟิลิสที่ดวงตา (ocular syphilis) และซิฟิลิสที่หู (otosyphilis) เป็นต้น[5] จากรายงานการศึกษาผู้ป่วยที่เกิดภาวะแทรกซ้อนในประเทศจีนช่วงปี พ.ศ. 2552-2564 จากทั้งหมด 284 รายงาน พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยซิฟิลิสทางระบบประสาทมากกว่า 7,486 ราย และมากกว่าครึ่งหนึ่งเป็นการติดเชื้อซิฟิลิสระบบประสาทในระยะท้าย ๆ[6]

การตรวจหาโรคซิฟิลิสเพื่อวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน แบ่งเป็น 2 กลุ่มวิธีหลัก คือ 1) การตรวจหาตัวเชื้อซิฟิลิสหรือชิ้นส่วนทางพันธุกรรมของเชื้อซิฟิลิสจากแผลริมแข็งหรือผื่น (direct test) และ 2) การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา (indirect test) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ nontreponemal test และ treponemal test โดย nontreponemal test ประกอบด้วยการทดสอบ VDRL (venereal disease research laboratory) และการทดสอบ RPR card test (rapid plasma reagin card test) หลักการทดสอบ nontreponemal test เป็นการตรวจหา antilipoidal antibody (reagin) ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตัวเชื้อ *T. pallidum* โดยใช้ lipoidal antigen เช่น cardiolipin ที่หลั่งออกมาจากเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายในขณะที่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อ เนื่องจากหลักการนี้ไม่ได้เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อตัวเชื้อ *T. pallidum* โดยตรง จึงเป็นประโยชน์ในแง่ของการตรวจคัดกรองผู้ป่วยในระยะแรกและใช้ในการติดตามการรักษาโรคซิฟิลิส ซึ่งแตกต่างจากวิธี treponemal test ที่เป็นการตรวจวิเคราะห์หา *Treponema pallidum* antibodies (treponemal

160-68 #in □.□□□□□□□□□□□□□□ □□□□□□ □□ 53-1 p.6.indd 9326 28/4/2568 BE 10:16

antibodies) ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนจากเชื้อ *T. pallidum* โดยตรง ซึ่งระดับแอนติบอดีจะอยู่ในเลือดตลอดชีวิต แม้จะได้รับการรักษาหายแล้วก็ตาม จึงเป็นประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคซิฟิลิส การทดสอบ treponemal test ได้แก่ fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-ABS) test, *Treponema pallidum* hemagglutination (TPHA) test และ *Treponema pallidum* particle agglutination test (TPPA)[7]

วิธีการทดสอบ TPPA ใช้หลักการ agglutination test โดย treponemal antigen ที่ถูกนำมา sensitized ไว้บนอนุภาคเจลาติน (gelatin particles) จะเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับ treponemal antibodies ในซีรัมผู้ป่วย หลักการนี้มีความไวและความจำเพาะสูง[8-9] เป็นการทดสอบที่ใช้เครื่องมือไม่ยุ่งยากและราคาไม่แพง แต่มีข้อจำกัดเรื่องของเวลาบ่ม (incubation time) ที่ใช้เวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงขึ้นไปในการอ่านผล และไม่เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่มีตัวอย่างจำนวนมาก รวมถึงเป็นวิธีการที่ใช้มนุษย์ในการอ่านผลและแปลผลการทดสอบ (manual test) จึงอาจทำให้มีปัญหาในกรณีที่ผลการทดสอบไม่ชัดเจน จากการศึกษาการทดสอบ TPPA titer พบว่าเมื่อใช้แปลผลการทดสอบร่วมกับ RPR titer สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการวินิจฉัยโรคซิฟิลิสในระยะแรก ๆ ได้ดียิ่งขึ้น[10] นอกจากนี้ยังพบว่า TPPA titer สามารถช่วยในการทำนายการติดเชื้อผ่านการตั้งครรภ์จากแม่สู่ลูกในเด็กแรกเกิดได้อีกด้วย[11]

การตรวจหา treponemal antibodies โดยเครื่องอัตโนมัติได้ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อช่วยย่นระยะเวลาการทดสอบ ลดความคลาดเคลื่อนของการอ่านผลการทดสอบที่ไม่ชัดเจน ได้แก่ วิธี enzyme immunoassays (EIA), chemiluminescent microparticle immunoassays (CMIA), electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)[12], recombinant immunoblot assay และ multiplex flow immunoassay[8] เครื่องอัตโนมัติ Roche Cobas e801 (Elecsys Syphilis) อาศัยหลักการ ECLIA ในการตรวจวิเคราะห์ โดย treponemal antibodies ในซีรัมจะจับกับ biotinylated TP-specific recombinant antigens และ TP-specific recombinant antigens ที่ติดฉลากด้วย ruthenium complex เกิดเป็น sandwich complex หลังจากนั้นจะจับกับไมโครพาร์ติเคิลที่เคลือบด้วย streptavidin (streptavidin-coated microparticles) ก่อนนำไปวัดปฏิกิริยา chemiluminescence ภายในเครื่องอัตโนมัติ วิธีนี้ค่อนข้างสะดวกและรวดเร็ว ช่วยย่นระยะเวลาการทดสอบ โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 18 นาทีในการตรวจวิเคราะห์[13]

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสอดคล้องและเปรียบเทียบผลการทดสอบในการตรวจวิเคราะห์ treponemal antibodies ด้วยวิธี ECLIA โดยใช้น้ำยา Elecsys Syphilis กับวิธี TPPA เพื่อใช้เป็นการทดสอบทางเลือก สำหรับตรวจหา treponemal antibodies ในงานประจำ ทั้งนี้การศึกษาวิจัยนี้ปราศจากการได้รับผลประโยชน์ใด ๆ ทั้งสิ้นจากบริษัทผู้ผลิตชุดการทดสอบ

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในงานวิจัย คือ ผู้ป่วยใน ผู้ป่วยนอก และผู้ตรวจสุขภาพของโรงพยาบาลรามาธิบดีที่ส่งตรวจ TPPA มายังห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2563 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2564 โดยตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือ ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เป็นซีรัม ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส และ

มีเกณฑ์การคัดเข้าคือ มีปริมาตรของซีรัมเหลือมากกว่า 300 ไมโครลิตร ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ซีรัมเหลือง (icteric) และซีรัมขุ่นมีไขมัน (lipemic) โดยนำตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์คัดเข้าจำนวน 299 รายมาระบุหมายเลขตัวอย่าง (study no.) ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบหา treponemal antibodies การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติโดยคณะกรรมการสิทธิมนุษยชนที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยเกี่ยวกับมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

2. การวิเคราะห์หาค่า treponemal antibodies

นำตัวอย่างซีรัมมาตรวจวิเคราะห์หา treponemal antibodies ด้วยวิธี TPPA โดยชุดทดสอบ Serodia®TP·PA หลังจากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี ECLIA ใช้น้ำยา Elecsys Syphilis โดยเครื่องอัตโนมัติ Roche Cobas e801 คุณสมบัติของทั้งสองวิธีแสดงใน Table 1

Table 1 Characteristics of Serodia®TP·PA and Elecsys Syphilis.

Reagent	Serodia®TP·PA	Elecsys Syphilis
Assay principle	PA	ECLIA
System	Manual	Automation
Antigen	Purified pathogenic *T. Pallidum*	Recombinant TpN15, TpN17 and TpN47
Sample type	Serum/plasma	Serum, Li-heparin, K2-EDTA-, K3-EDTA-, ACD, CPD, CP2D, CPD and Na-citrate plasma.
Sample volume (µL)	25	6
Assay duration	2 hours	18 mins
Unit	Titer	COI
Cut-off value	1:80	COI ≥ 1.00
Reagent stability	7 days after lyophilized particles reconstitution	16 weeks on analyzers
Interferences	Erythrocytes	Bilirubin > 66 mg/dL Hemoglobin > 500 mg/dL Intralipid > 2000 mg/dL Biotin > 1200 ng/mL Rheumatoid factors > 1500 IU/mL IgG > 3.2 g/dL IgA > 2.8 g/dL IgM > 1.0 g/dL Human serum albumin > 10 g/dL

160-68 #in □.□□□□□□□□□□□□□□ □□□□□□ □□ 53-1 p.6.indd 9328 28/4/2568 BE 10:16

หลักการ agglutination โดยวิธี TPPA โดยใช้ชุดทดสอบ Serodia®TP·PA ของ Fujirebio Inc. ซึ่งใช้ purified pathogenic *T. pallidum* (Nichols Strain) มาเคลือบบนอนุภาคเจลาติน (gelatin particle) เมื่อ treponemal antibodies ในซีรัมผู้ป่วยจับกับแอนติเจนบนอนุภาคเจลาติน จะทำให้เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม และใช้การอ่านผลด้วยตาเปล่า โดยเริ่มทำการทดสอบจากวิธีเชิงคุณภาพ (qualitative) ซึ่งมีขั้นตอนคือ เจือจางซีรัมด้วยน้ำยาเจือจางตัวอย่าง (sample diluent) ในไมโครเพลทรูปทรงตัว U จำนวน 4 หลุม ในอัตราส่วนการเจือจาง 1:5 1:10 1:20 และ 1:40 ตามลำดับ โดยใส่น้ำยาเจือจางตัวอย่าง ในหลุมแรก 100 ไมโครลิตร และ 25 ไมโครลิตร ในหลุมที่ 2 ถึง 4 จากนั้นใส่ซีรัม 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 ผสมให้เข้ากันดี แล้วดูดซีรัมที่เจือจางแล้วจากหลุมที่ 1 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่ 2 ผสมให้เข้ากัน แล้วทำซ้ำไปจนถึงหลุมที่ 4 จากนั้นหยด unsensitized particle 1 หยด (25 ไมโครลิตร) ลงในหลุมที่ 3 และหยด sensitized particle 1 หยด (25 ไมโครลิตร) ลงในหลุมที่ 4 เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมงแล้วอ่านผล หากพบว่าซีรัมรายใดให้ผลบวก (reactive) ให้ทำการทดสอบเพื่อยืนยันอีกครั้งด้วยวิธีเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) โดยเจือจางซีรัมจำนวน 6 หลุม ในอัตราส่วนการเจือจาง 1:5 1:10 1:20 1:40 1:80 และ 1:160 ตามลำดับ จากนั้นหยด unsensitized particle ลงในหลุมที่ 3 และหยด sensitized particle ลงในหลุมที่ 4 ถึง 6 ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมงแล้วอ่านผลการทดสอบในหลุมสุดท้ายที่เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม เมื่อหยด sensitized particle ลงในหลุมที่ 4 ถึง 6 จะทำให้ซีรัมถูกเจือจางลงเป็น 1:80 1:160 และ 1:320 ตามลำดับ โดยการอ่าน titer จะรายงานผลเป็นบวก (reactive) เมื่อเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มที่ titer 1:80 เป็นต้นไป และรายงานผลเป็นลบ (nonreactive) เมื่อไม่เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม

หลักการ ECLIA โดยน้ำยา Elecsys Syphilis ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ Roche Cobas e801 ขั้นตอนแรกจะมีการบ่มซีรัมด้วย biotinylated TP-specific recombinant antigens และ TP-specific recombinant antigens ที่ติดฉลากด้วย ruthenium complex โดย treponemal antibodies จะจับกับแอนติเจนดังกล่าวเกิดเป็น sandwich complex หลังจากนั้นบ่มปฏิกิริยาด้วยการเติมไมโครพาร์ติเคิลที่เคลือบด้วย streptavidin (streptavidin-coated microparticles) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการจับบริเวณเฟสของแข็ง (solid phase) ระหว่าง biotin และ streptavidin ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะถูกดูดไปยัง measuring cell ซึ่งมีไมโครพาร์ติเคิลติดอยู่บนพื้นผิว หลังจากนั้นปฏิกิริยาส่วนเกินจะถูกชะล้างออกโดย ProCell II M ความต่างศักย์ของอิเล็กโทรดจะกระตุ้นให้มีการปล่อย chemiluminescence ซึ่งตรวจวัดได้โดย photomultiplier ผลที่วัดได้นำไปคำนวณค่า treponemal antibodies จากกราฟมาตรฐาน (calibration curve) รายงานผลแบบเชิงคุณภาพเป็นค่า COI โดย COI ≥ 1.00 แปลผลเป็นบวก (reactive) และรายงานผลเป็นลบ (nonreactive) เมื่อค่า COI < 1.00

3. การทดสอบความแม่นยำ (precision)

ทดสอบโดยการทำ between run precision และ within run precision เพื่อดูความแม่นยำของ Elecsys Syphilis โดยใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ 2 ระดับ ได้แก่ SYPH1 และ SYPH2 ค่าความเข้มข้น treponemal antibodies ในแต่ละ

160-68 #in □.□□□□□□□□□□□□□□ □□□□□□ □□ 53-1 p.6.indd 9329 28/4/2568 BE 10:16

ตัวอย่างควบคุมคุณภาพแสดงใน Table 2 โดยตัวอย่างควบคุมคุณภาพนำมาทดสอบซ้ำ 5 ครั้ง วันละ 2 รอบ เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำผลการทดสอบของตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV)

Table 2 Concentration of treponemal antibodies internal quality control from manufacturer's package insert.

Internal quality control		Concentration of treponemal antibodies (COI)
Treponemal antibodies	SYPH1	0.30
	SYPH2	5.17

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถิติทั้งหมดที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบ treponemal antibodies ระหว่างสองวิธี ใช้โปรแกรม Statistics Package for the Social Sciences (SPSS) v 18.0 และ MedCalc โดยสถิติที่ใช้เปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการทดสอบ คือ Cohen's kappa coefficient (Kappa : *k*) โดยค่า Cohen's kappa coefficient เท่ากับ <0.00, 0.00-0.20, 0.21-0.40, 0.41-0.60, 0.61-0.80 และ 0.81-1.00 บ่งชี้ระดับความสอดคล้อง ไม่มีความสอดคล้อง ความสอดคล้องเล็กน้อย ความสอดคล้องพอใช้ ความสอดคล้องปานกลาง ความสอดคล้องดี และความสอดคล้องดีมาก[14] ตามลำดับ (Table 3) ใช้ Box and Whisker plot เพื่อดูแนวโน้มการกระจายตัวของข้อมูล และใช้สถิติ Kruskal-Wallis test เพื่อหาความแตกต่างระหว่างค่า COI ที่ได้จาก Elecsys Syphilis เปรียบเทียบกับค่า titer ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี TPPA

Table 3 Interpretation Cohen's kappa coefficient.

Cohen's kappa	Interpretation
<0.00	Agreement equivalent to the chance
0.00 - 0.20	Slight agreement
0.21 - 0.40	Fair agreement
0.41 - 0.60	Moderate agreement
0.61 - 0.80	Substantial agreement
0.81 - <1.00	Near perfect agreement
1.00	Perfect agreement

160-68 #in □.□□□□□□□□□□□□□□ □□□□□□ □□ 53-1 p.6.indd 9330 28/4/2568 BE 10:16

ผลการศึกษา

1. การทดสอบความแม่นยำ (precision) ของ Elecsys Syphilis

จากการทดสอบ between run precision และ within-run precision ของ Elecsys Syphilis ในตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิด SYPH1 และ SYPH2 พบว่า between run precision ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เท่ากับ 1.3 และ 1.3 ตามลำดับ และ within-run precision ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เท่ากับ 1.4 และ 2.0 ตามลำดับ (Table 4) ซึ่งผลการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนดังกล่าวอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ของบริษัทผู้ผลิต แสดงว่า Elecsys Syphilis มีความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

Table 4 Coefficient of Variations (%) obtained using Elecsys Syphilis.

Test	Elecsys Syphilis							
	SYPH1				SYPH2			
	Mean (COI)	SD	CV (%)	Target CV (%)	Mean (COI)	SD	CV (%)	Target CV (%)
Between run precision	0.089	0.001	1.3	≤ 5.5	4.80	0.0646	1.3	≤ 5.5
Within-run precision	0.089	0.001	1.4	≤ 5.5	4.80	0.097	2.0	≤ 5.5

2. การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ treponemal antibodies ระหว่างวิธี Elecsys Syphilis และ TPPA

ในกลุ่มตัวอย่าง 299 ราย ผลการทดสอบ treponemal antibodies ด้วยวิธี TPPA พบว่าให้ผลเป็นลบ 200 ราย และให้ผลเป็นบวก 99 ราย ในขณะที่ Elecsys Syphilis ให้ผลเป็นลบ 198 ราย และให้ผลเป็นบวก 101 ราย เมื่อคำนวณผลรวมความสอดคล้อง (concordance rate) ของทั้งสองวิธีพบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 99.3 (297/299) โดยผลบวกมีความสอดคล้องร้อยละ 100 (99/99) ทั้งสองวิธีให้ผลบวกตรงกัน 99 ราย ผลลบมีความสอดคล้องร้อยละ 99 (198/200) ทั้งสองวิธีให้ผลลบตรงกัน 198 ราย (Table 5) โดยมีตัวอย่างจำนวน 2 ราย ที่ให้ผลการทดสอบไม่ตรงกันระหว่างสองวิธี โดย Elecsys Syphilis ได้ผล COI เท่ากับ 1.87 และ 3.19 แปลผลการทดสอบเป็นบวก ส่วนวิธี TPPA ได้ผลเป็นลบทั้งสองตัวอย่าง (Table 6) และผลการวิเคราะห์ความสอดคล้องด้วยสถิติ Cohen's kappa coefficient ของทั้งสองวิธีเท่ากับ 0.985 ($p < 0.001$) (Table 5) ผลการทดสอบถูกนำมาจัดกลุ่มตามค่า titer ด้วยวิธี TPPA โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ NR, R 1:160 และ R ≥ 1:320 เพื่อดูการกระจายตัวของข้อมูลเทียบกับค่า COI ที่ได้จาก Elecsys Syphilis ดังแสดงใน Box and Whisker plot (Fig. 1 และ Table 7) และเมื่อนำผลการทดสอบมาเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test พบว่าค่า COI จาก Elecsys Syphilis มีความแตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม nonreactive (n = 200) กับกลุ่ม reactive titer 1:160 (n = 10) ($p < 0.001$) และ reactive titer ≥ 1:320 (n = 87) ($p < 0.001$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม reactive titer 1:160 กับกลุ่ม reactive titer ≥ 1:320 ($p = 0.172$) (Fig. 1)

Table 5 Comparison of treponemal antibodies results by Elecsys Syphilis and TPPA assay.

TPPA	Elecsys Syphilis			Concordance rate (%)	Kappa coefficient	*p* value
	Reactive	Nonreactive	Total			
Reactive	99	0	99			
Nonreactive	2	198	200			
Total	101	198	299	99.3	0.985	$p < 0.001$

Table 6 Discordant results of Elecsys Syphilis versus TPPA assay.

No.	TPPA	Elecsys Syphilis	
	Results	Treponemal antibodies (COI)	Results
1	Nonreactive	1.87	Reactive
2	Nonreactive	3.19	Reactive

Table 7 Statistics of Box and Whisker plot.

Statistics	Nonreactive (NR)	Reactive 1:160	Reactive ≥ 1:320
Min	0.07	5.57	3.28
Max	0.14	29.4	317
Median	0.08	13.3	150.5
Lower quartile (Q1)	0.08	8.13	59.9
Upper quartile (Q3)	0.11	26.9	245.5

160-68 #in □.□□□□□□□□□□□□□□ □□□□□□ □□ 53-1 p.6.indd 9332 28/4/2568 BE 10:16

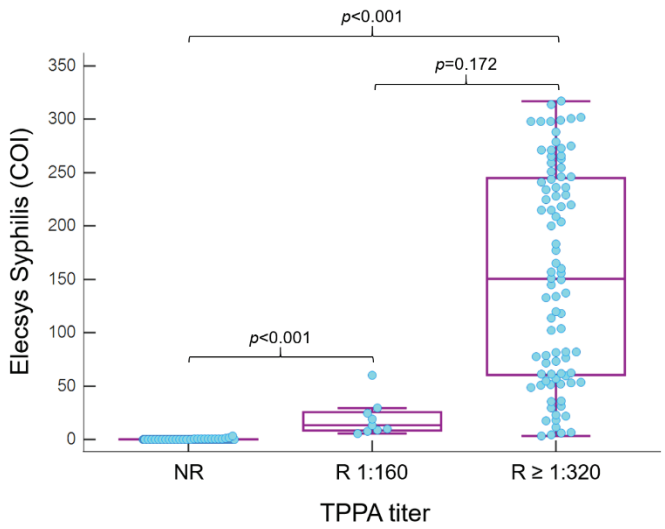


Fig. 1 Box and Whisker plot of TPPA titer and COI by Elecsys Syphilis test. The blue dot represented treponemal antibodies of each serum that measured using Elecsys Syphilis and TPPA assay as shown in the inner lines, upper and lower ends of boxes indicate median values, and upper and lower quartiles, respectively. Whiskers denote maximum and minimum values. Kruskal-Wallis test was performed statistical analysis. NR = nonreactive; R = reactive.

วิจารณ์

งานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาผลการตรวจวิเคราะห์ treponemal antibodies โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่าง Elecsys Syphilis และวิธี TPPA โดยทำการทดสอบความแม่นยำของ Elecsys Syphilis ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของตัวอย่างควบคุมคุณภาพในแต่ละชนิดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (target %CV) การทดสอบ between run precision ได้ค่า SYPH 1 เท่ากับ 1.3 (target %CV ≤ 5.5) และ SYPH 2 เท่ากับ 1.3 (target %CV ≤ 5.5) และการทดสอบ within-run precision ได้ค่า SYPH 1 เท่ากับ 1.4 (target %CV ≤ 5.5) และ SYPH 2 เท่ากับ 2.0 (target %CV ≤ 5.5) (Table 4) แสดงให้เห็นได้ว่า Elecsys Syphilis เป็นวิธีการทดสอบที่มีความแม่นยำสำหรับการตรวจวิเคราะห์ treponemal antibodies หลังจากนั้นได้เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธี Elecsys Syphilis และวิธี TPPA จากผลการศึกษาตัวอย่างจำนวน 299 ราย พบว่าทั้งสองวิธีมีค่าความสอดคล้องอยู่ในระดับดีมาก (Kappa = 0.985) ($p < 0.001$) และมีผลรวมความสอดคล้องอยู่ที่ร้อยละ 99.33 แสดงให้เห็นถึงผลการทดสอบของทั้งสองวิธีเป็นไปในทิศทางเดียวกันและมีความสอดคล้องที่ดีมาก สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบไม่ตรงกันจำนวน 2 ราย อาจเกิดจากปัจจัยทางชีวภาพของผู้ป่วย (biological factors) จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่เคยมีประวัติเป็น malignant tumor หรือ gastric carcinoma มาก่อนสามารถส่งผลให้เกิดผลบวกปลอมได้ง่าย[15,16] หรือในกรณีที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อ HIV สามารถส่งผลรบกวนการตอบสนองทาง serology ต่อเชื้อซิฟิลิส โดยผู้ป่วยโรคซิฟิลิสมักพบการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นร่วมด้วย โดยเฉพาะการติดเชื้อ HIV เนื่องจากเชื้อ

T. pallidum จะทำให้เกิดรอยโรคแบบเปิด (open lesions) ส่งผลให้ผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อ HIV ที่มากขึ้น ทั้งนี้จึงอาจส่งผลรบกวนการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อซิฟิลิสได้[16,17] หรืออาจเกิดจากสาเหตุทางคลินิกอื่น ๆ ของผู้ป่วย ซึ่งการศึกษานี้มีข้อจำกัดในการสืบค้นข้อมูลทางคลินิกจึงทำให้ไม่สามารถยืนยันการแปลผลการทดสอบที่ชัดเจนได้ นอกจากนี้อาจเกิดจากการใช้ตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสมาละลายที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำการทดสอบใหม่ ในสภาวะแวดล้อมและวันเวลาที่แตกต่างกัน อาจส่งผลให้สภาพของตัวอย่างเปลี่ยนแปลงไป จึงควรนำผลการตรวจวิเคราะห์ treponemal antibodies พิจารณาร่วมกับการทดสอบวิธี treponemal test เช่น FTA-Abs เพื่อช่วยในการยืนยันผลการทดสอบ

ผลการทดสอบสถิติ Kruskal-Wallis test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม titer ของวิธี TPPA และค่า COI ของวิธี Elecsys Syphilis พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม nonreactive กับกลุ่ม reactive titer 1:160 ($p < 0.001$) และ reactive titer ≥ 1:320 ($p < 0.001$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม reactive titer 1:160 กับกลุ่ม reactive titer ≥ 1:320 ($p = 0.172$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่า COI จากวิธี Elecsys Syphilis สามารถนำมาใช้จำแนกกลุ่ม nonreactive ออกจากกลุ่ม reactive titer 1:160 และ reactive titer ≥ 1:320 ได้ แต่ไม่สามารถใช้แยกกลุ่ม reactive titer 1:160 ออกจากกลุ่ม reactive titer ≥ 1:320 ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของชนิดแอนติเจนของทั้งสองวิธี เนื่องจาก Serodia®TP·PA ใช้ purified pathogenic *T. pallidum* antigen แต่ Elecsys Syphilis ใช้ TpN15, TpN17 และ TpN47 ซึ่งเป็น recombinant antigen ดังนั้น antigenicity ของแอนติเจนแต่ละชนิดอาจส่งผลต่อการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีได้แตกต่างกัน รวมทั้งน้ำยา Elecsys Syphilis เป็นน้ำยาที่ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ[9] จึงไม่สามารถนำค่า COI มาใช้แปลผลการทดสอบในเชิงกึ่งปริมาณได้ (กลุ่ม reactive titer 1:80 ไม่ได้นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ Kruskal-Wallis test เนื่องจากจำนวนประชากรที่น้อยเกินไป (n = 2))

สรุป

ผลจากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าวิธี ECLIA โดยน้ำยา Elecsys Syphilis สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ treponemal antibodies ในแง่ของการทดสอบเชิงคุณภาพได้ โดยสามารถแยกกลุ่มที่ให้ผลลบออกจากกลุ่มที่ให้ผลบวก reactive titer 1:160 และ reactive titer ≥ 1:320 ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี TPPA และทั้งสองวิธียังมีค่าความสอดคล้องอยู่ในระดับที่ดีมาก แต่วิธี ECLIA ไม่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ผลแบบกึ่งปริมาณ เนื่องจากค่า COI ระหว่างกลุ่ม reactive titer 1:160 และ reactive titer ≥ 1:320 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผลจากการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์สำหรับห้องปฏิบัติการ สามารถช่วยเพิ่มทางเลือกสำหรับการตรวจวิเคราะห์ treponemal antibodies โดยสามารถนำวิธี ECLIA มาใช้คัดกรองเบื้องต้นเพื่อจำแนกกลุ่มผู้ป่วยที่ให้ผลลบ ออกจากกลุ่มผู้ป่วยที่ให้ผลบวก เป็นการลดจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยที่ต้องทำการทดสอบด้วยวิธี TPPA เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่มีตัวอย่างจำนวนมากและต้องการผลการทดสอบที่รวดเร็ว เมื่อผลการทดสอบของวิธี ECLIA ให้ผลเป็นบวก ทางห้องปฏิบัติการจึงสามารถนำตัวอย่างการทดสอบนั้นมาทดสอบด้วยวิธี TPPA titer เพื่อช่วยในการยืนยันผลการทดสอบ การตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวนี้สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความรวดเร็วในการรักษา

160-68 #in □.□□□□□□□□□□□□□□ □□□□□□ □□ 53-1 p.6.indd 9334 28/4/2568 BE 10:16

ผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงที ลดความคลาดเคลื่อนจากการอ่านผลด้วยสายตา (human error) และเพิ่มทางเลือกให้ห้องปฏิบัติการสามารถมีแนวทางการตรวจวิเคราะห์ที่ดีและเหมาะสมสำหรับแต่ละห้องปฏิบัติการยิ่งขึ้นไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ. นพ.มงคล คุณากร และผู้ปฏิบัติการหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอบคุณบริษัท โรช ไดแอกโนสติกส์ (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องตรวจวิเคราะห์ Cobas e801 และชุดการทดสอบ Elecsys Syphilis ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Zhou S, Chanderraj R. What is syphilis?. JAMA 2023; 329: 1710.
2. Pradhan M, Jain S. Syphilis in pregnancy. J Fetal Med 2020; 07: 57-63.
3. World Health Organization. Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022-2030 [internet]. 2022 [cited 2024 January 10]. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/9789240053779.
4. Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Annual report of division of AIDS and STI 2021 [internet]. 2021 [cited 2024 January 10]. Available from: https://ddc.moph.go.th/uploads/publish/1413920230411071439.pdf. (in Thai)
5. Centers for Disease Control and Prevention. About syphilis [Internet]. 2023 [cited 2024 January 10]. Available from: https://www.cdc.gov/syphilis/about/index.html.
6. Du FZ, Zhang HN, Li JJ, *et al*. Neurosyphilis in China: a systematic review of cases from 2009-2021. Front Med 2022; 9: 1-14.
7. Bangrak STI Center. National guideline for syphilis testing: Laboratory manual for diagnosis and monitoring. Bangkok, Thailand: Bangrak STI Center; 2021. (in Thai)
8. Satyaputra F, Hendry S, Braddick M, Sivabalan P, Norton R. The laboratory diagnosis of syphilis. J Clin Microbiol 2021; 59: 1-11.
9. Fujirebio Inc. SERODIA-TP-PA package insert. Japan; 2023.
10. Hu YT, Wu JB, Zhuang MH, *et al.* A 4-fold or greater decrease in TPPA titers may indicate effective BPG treatment in primary syphilis. Int Immunopharmacol 2024; 127: 1-9.
11. Wang HM, Li YY, He LP, Cao YK, Dong TX, Kuang YQ. TPPA titer as a new adaptation for early diagnosis of congenital syphilis: a retrospective analysis of observation over three years in Yunnan, China. Eur J Med Res 2019; 24: 1-7.

12. Association of Public Health Laboratories. Suggested reporting language for syphilis serological testing [internet]. 2020 [cited 2024 January 10]. Available from: https://www.aphl.org/programs/infectious_disease/std/Documents/ID-2020Aug-Syphilis-Reporting-Language.pdf.
13. Roche Diagnosis. Elecsys Syphilis package insert. Germany; 2021.
14. Tang W, Hu J, Zhang H, Wu P, He H. Kappa coefficient: a popular measure of rater agreement. Shanghai Arch Psychiatry 2015; 27: 62-7.
15. Zhou J, Liang Y, Zhang J, Cui L. The analyzation and clinical evaluation of ECLIA and CMIA in the detection of *Treponema pallidum*. Medicine 2017; 96: 1-4.
16. Li D, An J, Wang T, Tao C, Wang L. Clinical evaluation of fully automated Elecsys(®) syphilis assay for the detection of antibodies of *Treponema pallidum*. J Clin Lab Anal 2016; 30: 1164-8.
17. Enders M, Hunjet A, Gleich M, *et al*. Performance evaluation of the Elecsys syphilis assay for the detection of total antibodies to *Treponema pallidum*. Clin Vaccine Immunol 2015; 22: 17-26.