หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ ๑

บทนำ

ปัจจุบันจำนวนผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสในโลก และในประเทศไทย ยังมีจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยมีการเพิ่มจำนวนอย่างมากมายในระยะเวลา ๒๐ ปีที่แล้วมา[๑] ทั้งนี้เกิดเนื่องมาจากการวินิจฉัยโรคซิฟิลิสมีความยุ่งยากขึ้นหลายประการ มีการใช้ยาปฏิชีวนะในโรคต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย ทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากได้รับยาในขนาดที่ไม่เพียงพอในการรักษา ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการแสดงอาการของโรค หรือบางครั้งผู้ป่วยมีอาการที่แสดงออกในระยะต่าง ๆ และประวัติที่ไม่แน่นอน ทำให้ยากลำบากในการวินิจฉัย และรักษาได้อย่างถูกต้อง ทำให้เกิดผลเสียต่อผู้ป่วยและต่อสังคมเป็นส่วนรวม

นอกจากเหตุดังกล่าวแล้ว ยังมีปัญหาของการเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยโรคนี้เกิดเนื่องมาจากปัญหาของสังคม ขนบธรรมเนียม ประเพณี ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว ทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อโรคนี้มีมากขึ้น

ดังนั้นในวิทยานิพนธ์นี้จึงได้พยายามหาวิธีการวินิจฉัยโรคซิฟิลิสทางน้ำเหลือง เพื่อช่วยในการวินิจฉัย และเพื่อเป็นแนวทางในการตัดสินใจที่ถูกต้องในการรักษาโรคนี้ โดยคำนึงถึงความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensitivity) ความง่าย, ความรวดเร็ว และความสิ้นเปลืองน้อยที่สุดเป็นสำคัญ

จากสถิติของกองกามโรค กรมควบคุมโรคติดต่อกระทรวงสาธารณสุข[๒] ตาราง ๑-๓ หน้า ๒-๔ และจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตารางที่ ๔ หน้า ๔ แสดงถึงจำนวนผู้ป่วยที่เป็นกามโรคชนิดต่าง ๆ และโรคซิฟิลิส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑

แสดงจำนวนผู้ป่วยกามโรคจำแนกตามชนิดของกามโรค

ชนิดของกามโรค	ปีงบประมาณ ๒๕๒๒						ปีงบประมาณ ๒๕๒๓					
	รวม		ชาย		หญิง		รวม		ชาย		หญิง	
	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
จำนวนผู้ป่วยกามโรค	344,987	100.00	248,122	01.92	96,865	28.08	362,660	100.00	260,323	71.78	102,337	28.22
ซิฟิลิส	9,439	2.74	6,167	1.79	3,272	0.95	8,988	2.48	6,007	1.66	2,981	0.82
- ระยะที่ 1	434	0.13	372	0.11	62	0.02	640	0.18	590	0.16	50	0.02
- ระยะที่ 2	1,016	0.29	707	0.21	309	0.08	921	0.25	702	0.19	219	0.06
-ระยะแฝง	7,823	2.27	4,950	1.43	2,873	0.84	7,297	2.01	4,592	1.26	2,705	0.75
-ระยะหลัง	164	0.05	138	0.04	26	0.01	137	0.04	122	0.03	5	0.02
-กรรมพันธุ์	2	-	-	-	2	-	3	-	1	-	2	-
หนองใน	177,853	51.55	123,115	35.68	54,738	15.87	195,691	53.96	135,344	37.32	60,347	16.64
- ไม่มีอาการแทรก	163,128	47.26	112,798	32.69	50,330	14.59	181,846	50.14	124,686	34.38	57,160	15.76
-มีอาการแทรก	14,725	4.27	10,317	2.99	4,408	1.28	13,845	3.82	10,658	2.94	1,187	0.88
แผลริมอ่อน	57,822	16.76	51,934	15.05	5,888	1.71	55,266	15.24	49,598	13.68	5,668	1.56
กามโรคของต่อมและท่อน้ำเหลือง	17,843	5.17	16,533	4.08	1,290	0.37	19,420	5.35	17,644	4.86	1.776	0.49
แผลกามโรคเรื้อรังบริเวณขาหนีบ	-	-	-.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
หนองในเทียม	82,030	23.78	50,353	14.60	31,667	9.18	83,295	22.97	51,730	14.26	31,565	8.21

ตารางที่ ๒ Incidence Rates of Early Syphilis in Thaialand 1957-1980

(Collected from V.D. Units and Cooperative Medical Units)

Fiscal Year	New Cases of Early Syphilis (Primary & Secondary)		Total Population fo Thailand (Source: National Statistical Office)	Estimated Population 15 Years and Over (57% Of Total Population)
	Number	Rate per 100,000 Pop.		
1957	7,391	53.08	24,428,000	13,924,000
1958	6,232	43.52	25,123,000	14,320,000
1959	5,900	40.03	25,859,000	14,740,000
1960	5,745	37.84	26,634,000	15,181,000
1961	1,292	8.26	27,445,000	15,644,000
1962	1,451	9.00	28,293,000	16,127,000
1963	1,866	11.22	29,173,000	16,629,000
1964	3,603	21.01	30,082,000	17,147,000
1965	4,136	23.39	31,025,000	17,684,000
1966	2,059	11.29	31,995,000	18,237,000
1967	1,706	9.07	32,996,000	18,808,000
1968	1,635	8.43	34,035,000	19,400,000
1969	3,251	16.25	35,109,000	20,012,000
1970	1,959	9.49	36,215,000	20,643,000
1971	1,278	6.00	37,383,000	21,308,000
1972	1,820	8.28	38,577,000	21,989,000
1973	2,266	9.99	39,787,000	22,679,000
1974	2,295	9.81	41,023,000	23,383,000
1975	1,945	8.07	42,277,000	24,098,000
1976	2,201	8.86	43,569,000	24,834,000
1977	2,461	9.62	44,882,000	25,583,000
1978	2,021	7.67	46,199,000	26,333,000
1979	1,450	5.35	47,530,000	27,092,000
1980	1,561	5.60	48,868,000	27,855,000

Remark : Rate per 100,000 Population = $\frac{\text{Number of New Cases}}{\text{Estimated Population 15 Years and Over}} \times 100{,}000$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๓

แสดงจำนวนผู้ป่วยกามโรคจำแนกตามกลุ่มอายุ

กลุ่มอายุ (ปี)	ปีงบประมาณ ๒๕๒๒						ปีงบประมาณ ๒๕๒๓					
	รวม		ชาย		หญิง		รวม		ชาย		หญิง	
	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
จำนวนผู้ป่วยกามโรค	344,987	100.00	248,122	71.92	96,865	28.08	362,660	100.00	260,323	71.78	102,337	28.22
0-4	152	0.04	33	0.01	119	0.03	139	0.04	27	0.01	112	0.03
5-9	135	0.04	14	0.01	121	0.03	110	0.03	8	0.00	102	0.03
10-14	294	0.09	107	0.03	187	0.06	300	0.08	67	0.02	233	0.06
15-19	77,134	22.36	48,529	14.07	28,605	8.29	78,910	21.76	47,885	13.20	31,025	8.55
20-24	142,909	41.43	106,771	30.95	36,138	10.48	149,949	41.35	111,885	30,85	38,064	10.50
25-29	70,826	20.53	52,774	15.30	18,052	5.23	75,436	20.80	56,705	15.64	18,731	5.16
30-34	29,372	8.51	21,988	6.37	7,384	2.14	32,312	8.91	24,538	6.77	7,774	2.14
35-39	13,558	3.93	10,134	2.94	3,424	0.99	13,882	3.83	10,384	2.86	3,498	0.97
40-44	5,980	1.73	4,364	1.26	1,616	0.47	6,624	1.83	5,008	1.38	1,616	0.45
45-49	2,629	0.76	1,888	0.54	741	0.22	2,817	0.78	2,091	0.58	726	0.20
50-54	1,215	0.35	899	0.26	316	0.09	1,298	0.36	996	0.27	302	0.09
55 ขึ้นไป	783	0.23	621	0.18	162	0.05	883	0.24	729	0.20	154	0.04

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๔

แสดง จำนวนการตรวจทางน้ำเหลืองสำหรับโรคซิฟิลิสจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

Serological test	ปี พ.ศ. 2525	
	Total	Positive
VDRL	26,359	1,695
TPHA	2,238	1,631
FTA (C.S.F.)	1,380	285
FTA-ABS	790	210
FTA-ABS (IgM)	729	20

จากสถิติดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าโรคซิฟิลิสนั้นยังเป็นโรคที่มีอยู่มากมายในคนไทย ดังนั้นจึงควรรู้ถึงสาเหตุของโรค ตลอดจนวิธีการวินิจฉัยโรคนี้เพื่อเป็นแนวทางในการตัดสินใจที่ถูกต้องในการรักษาโรคนี้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

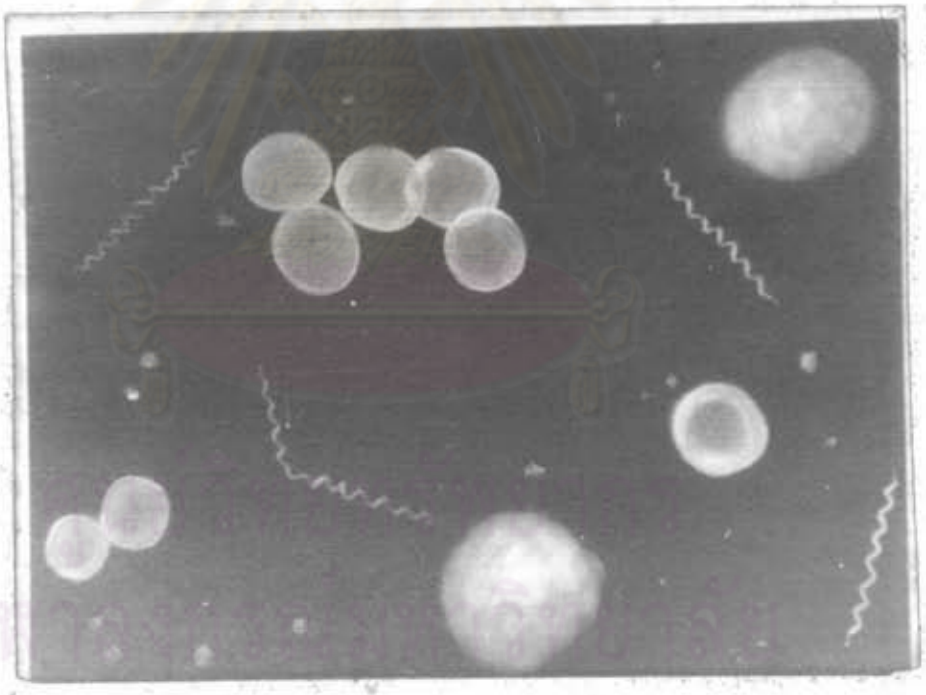
โรคซิฟิลิส (Syphilis)[๓,๔,๕]

เป็นกามโรคชนิดหนึ่งที่เกิดโดย Treponema pallidum ตามธรรมชาติทำให้เกิดโรคเฉพาะในคนเท่านั้น ติดต่อกันได้โดยการสัมผัสทาง sexual contact

รูปร่างลักษณะของ Treponema pallidum ลำตัวบาง ขนาด ๐.๑-๐.๒ μm ยาว ๕-๒๐ μm ลักษณะเป็นเกลียว มีเกลียวสม่ำเสมอ เรียงกันเป็นระเบียบ ๔-๑๔ เกลียว แต่ละเกลียวห่างกันประมาณ ๑ μm การเคลื่อนที่หมุนไป แบบเกลียวสว่าน มีการแบ่งตัวแบบ transverse fission

การติดสีจะไม่ติดสี gram หรือ methylene blue และเนื่องจากลำตัวบางมาก จึงทำให้เห็นได้ยาก เมื่อดูด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดา แต่เมื่อย้อมด้วย silver impregnation จะสามารถเห็นได้ เนื่องจากตัวมันสามารถ reduce เกลือเงิน ไนเตรท ทำให้โลหะเงิน deposit ลงบนตัวมันทำให้ cell หนาขึ้นและติดสีน้ำตาลเข้ม

นอกจากนี้อาจใช้วิธี immunofluorescence หรือดูด้วยกล้องจุลทัศน์พิเศษ คือ dark field microscope ก็จะเห็น bacteria นี้ได้โดยไม่ต้องย้อมสี



รูปที่๑แสดงรูป T. pallidum จาก dark field microscope

การเพาะเลี้ยง ไม่สามารถเลี้ยง T.pallidum ที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ใน media ในไข่ฟัก และใน tissue culture แต่สำหรับพวก saprophytic เช่น พวก Reiter strain สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเพาะเชื้อได้

T.pallidum เมื่ออยู่ใน medium ที่เหมาะสมคือประกอบด้วย serum albumin,pyruvate, cystine ในสภาวะไม่มี O_2 อุณหภูมิ ๒๔°C จะอยู่ได้นาน ๔-๗ วัน,ที่ ๓๗°C อยู่ได้นาน ๑-๒ วัน ใน whole blood หรือ plasma ที่ ๔°C จะอยู่นานถึง ๒๔ ชั่วโมง แต่ไม่เกิน ๔๘ ชั่วโมง ถ้าอุณหภูมิ ๔๑-๔๒°C เชื้อจะตายเร็วมาก

การทำให้เกิดโรค

ซิฟิลิสระยะแรก (Primary syphilis)

การติดต่อโดยการสัมผัสทาง sexual contact อาการแสดงออกของโรคที่พบในระยะแรกคือที่อวัยวะเพศ โดยในระหว่างร่วมเพศ เชื้อ T.pallidum สามารถไชผ่าน mucous membrane ได้ ถ้าเป็นผิวหนังต้องมีแผลหรือรอยแตกของ epidermis บริเวณ ano-genital region ในเพศชายจะเป็นที่บริเวณ glans penis,prepuce และ shaft of penis ในเพศหญิงจะเป็นที่บริเวณปากช่องคลอด, ในช่องคลอด,ปากมดลูก สำหรับอวัยวะอื่นก็อาจจะติดเชื้อนี้ได้ประมาณ ๑๐% ได้แก่บริเวณปาก,นิ้วมือ nipple และ anus ตรงตำแหน่งที่เชื้อเข้าไปจะเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากมาย ภายใน ๒-๑๐ สัปดาห์ก็จะมีตุ่มแข็ง (papule) เกิดขึ้นบริเวณที่เชื้อเข้าไป ตุ่มนี้จะโตขึ้นและแตกเป็นแผลมีลักษณะนูนแข็ง (firm) กลมหรือรูปไข่ เรียกว่า แผลริมแข็ง (hard chancre) ที่บริเวณตุ่มแข็งนั้นเพราะว่ามี lymphocytes และ plasma cells อยู่ในบริเวณนี้มาก เรียกระยะนี้ว่า primary syphilis จากรูปที่ ๒ หน้า ๙ แผลนี้มักจะไม่เจ็บที่บริเวณก้นแผลมีเชื้อมาก แผลจะหายเองหลังจากที่เป็นอยู่ ๒-๓ สัปดาห์ เชื้อจะเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณโดยรอบแผล และบริเวณขาหนีบ ทำให้ต่อมน้ำเหลืองโตแข็ง เรียกว่า sattellite buboes และจากต่อมน้ำเหลองเชื้อก็เข้าสู่กระแสโลหิต

ซิฟิลิสระยะที่สอง (Secondary syphilis)

๒-๑๒ สัปดาห์ หลังจากเริ่มเป็นซิฟิลิสระยะแรกแล้ว ผู้ป่วยจะมีผื่นแดง (maculopapular rash) ขึ้นตามตัว รวมทั้ง mucous membrane ด้วย เรียกระยะนี้ว่า secondary syphilis จากรูปที่ ๓ หน้า ๑๐ ที่ผื่นโดยเฉพาะที่ mucous membrane จะมี T.pallidum มากมาย จึงเป็นระยะติดต่อโรคได้ง่าย และจะพบเชื้อในกระแสโลหิตด้วย อาจจะทำให้เกิด transplacental transmission ได้ อาการเช่นนี้จะมีอยู่ราว ๓-๔ สัปดาห์ จนถึงหลายเดือน อาการของโรคค่อยสงบไปเอง T.pallidum จะค่อย ๆ หมดไปจาก lesion ต่าง ๆ ซิฟิลิสระยะที่สองนี้อาจเกิดซ้ำได้อีกภายในเวลา ๔ ปี

ซิฟิลิสระยะแฝง (Latent syphilis)

ส่วนมาก ๗๕% ของผู้ป่วยจะคงอยู่ในลักษณะ latent infection คือไม่มีอาการ ตรวจหาเชื้อไม่พบ แต่ยังมี positive serological test

ซิฟิลิสระยะหลัง (Late syphilis)

๕๐% ของผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษา จะเกิดอาการขึ้นอีก late manifestation (tertiary syphilis) พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในระยะสุดท้ายนี้เกิด lesion ที่เรียกว่า gumma ที่ผิวหนัง และอวัยวะภายใน เช่นกระดูก,สมอง เส้นเลือดใหญ่ เกิดที่สมองจะเป็น general paresis เกิดที่ไขสันหลังจะเป็น tabes dorsalis จากรูปที่ ๔ หน้า ๑๒ ถ้าเป็นที่ระบบหมุนเวียนโลหิตมีผลทำให้เป็น aotic anerurysm ถ้าเป็นที่ตาทำให้ตาบอดได้ ระยะนี้พบเชื้อน้อยมาก ประมาณ ๒๕% จะไม่แสดงอาการ พบแต่ antibody ในน้ำเหลือง ๒๕% จะรักษาหายได้จนระดับ serological test ให้ผลลบ

ซิฟิลิสโดยกำเนิด (Congenital syphilis)

มารดาเป็นโรคซิฟิลิส สามารถแพร่กระจายเชื้อ T.pallidum ไปยังลูกในครรภ์ได้โดยผ่านรก (placenta) ทำให้ทารกในครรภ์เป็นโรคนี้ได้ ในระยะที่มารดาเป็นซิฟิลิสระยะที่สอง และตอนต้นของระยะแฝง ถ้าทารกไม่ตายในครรภ์หรือแท้งเสียก่อน ก็จะเป็นโรคซิฟิลิสในระยะต่าง ๆ คล้ายกันในผู้ใหญ่ ในรายที่รอดชีวิตจะมีอาการ เช่น Hutchinson's teeth, saddle nose keratitis มี inflame of cornea จากรูปที่ ๔ หน้า ๑๓ ถ้ามารดาได้รับการรักษาอย่างดีระหว่างตั้งครรภ์จะป้องกันการเกิด congenital syphilis ได้

จากพยาธิสภาพของโรคดังกล่าวทำให้แพทย์ประสบปัญหาในการวินิจฉัยโรคซิฟิลิส เนื่องจากอาการทางคลินิคแตกต่างกันมากแผลที่เกิดขึ้นในซิฟิลิสระยะแรกแล้วแผลหายเอง หรืออาจจะไม่เกิดแผลขึ้น รวมทั้งผู้ป่วยมีประวัติของการเป็นโรคไม่แน่นอน ดังนั้นการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะการตรวจทางน้ำเหลืองมีความสำคัญอย่างมากที่จะช่วยในการวินิจฉัยโรคนี้ได้อย่างถูกต้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพแสดงโรคซิฟิลิสระยะต่าง ๆ

รูปที่ ๒ PRIMARY SYPHILIS

Chancre on the prepuce

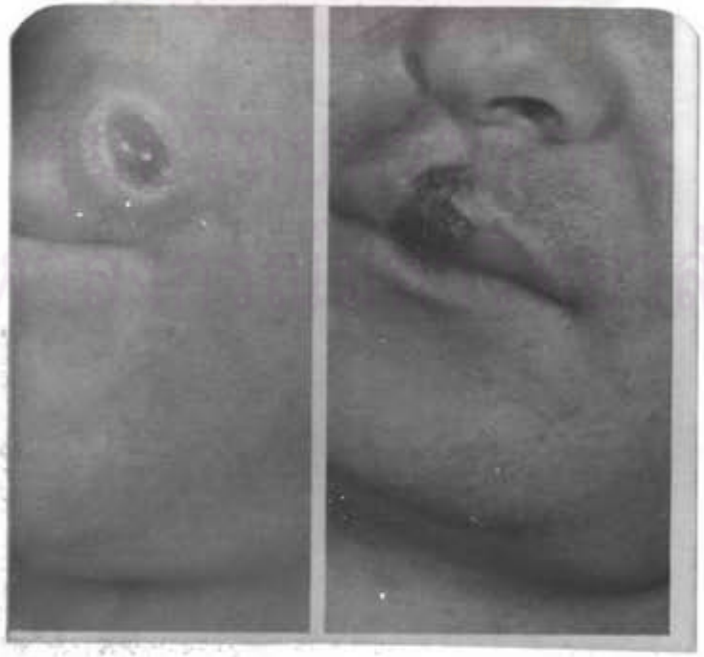
Chancre on the skin

Chancre on the corona of glans penis

Chancre of labium majus

Chancre of the finger

Chancre of the tungue



Chancre of anterior cheek

Chancre of the upper lip

รูปที่ ๓ SECONDARY SYPHILIS

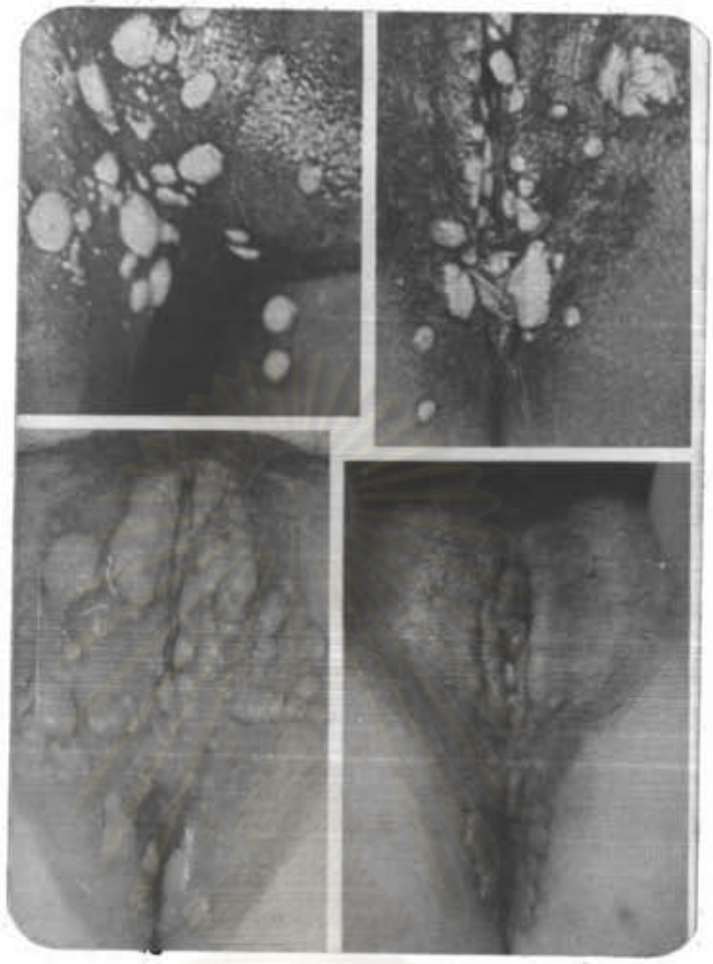
Palmar syphilid,maculopapular with scaling

Papular syphilid of palms and soles

Maculopapular syphilid of palms.

Generalized maculopapular rash with some scaling

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

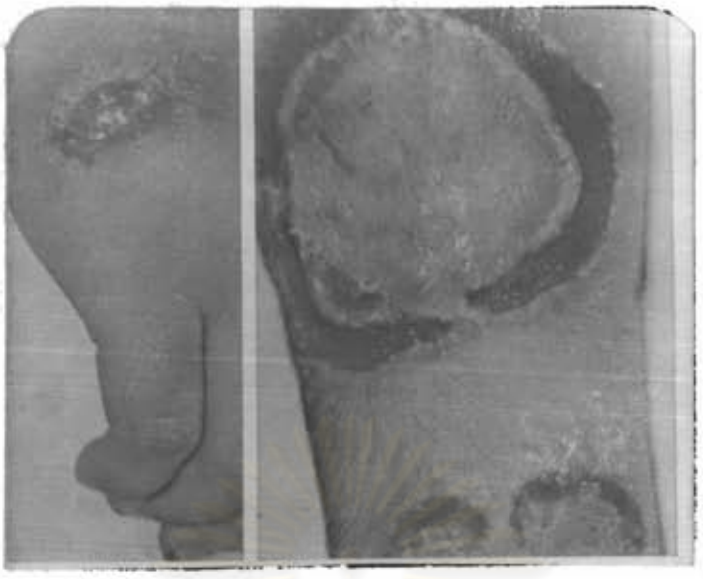


Condylomata lata of the male and the female genitalia

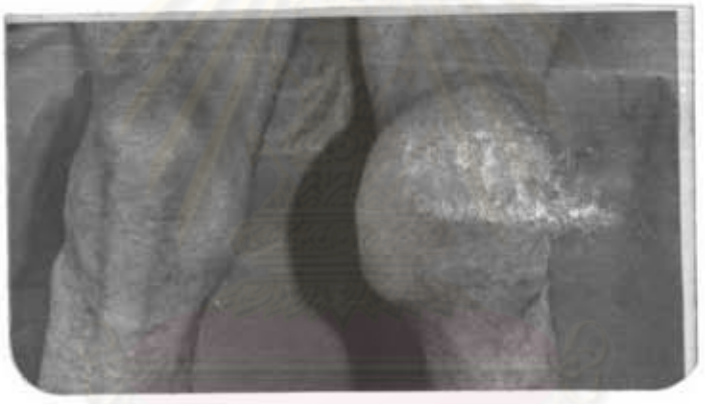
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ๔ LATE SYPHILIS

Solitary ulcerative gumma of the hand



Nodulo-ulcerative late syphilis



Neurosyphilis - tabes dorsalis

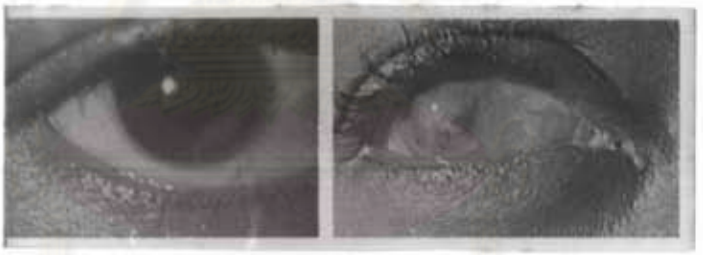
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ๔ EARLY CONGENITAL SYPHILIS

Snuffles in a syphilitic infant

Annular syphilid in an infant

LATE CONGENITAL SYPHILIS



Interstitial keratitis

Typical Hutchinson's teeth

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวินิจฉัยโรคซิฟิลิสทางห้องปฏิบัติการ[๕,๖,๗,๘,๙]

การตรวจหาเชื้อ

จากแผลหรือผื่นใน primary, secondary และ congenital syphilis โดยบริเวณแผลหรือผื่นนั้นต้องทำความสะอาดด้วย physiologic saline ก่อน แล้วใช้นิ้วมือซึ่งสวมถุงมือบีบบริเวณแผลหรือผื่นนั้นให้น้ำเหลืองซึมออกมาหรือดูดน้ำเหลืองจากต่อมน้ำเหลืองนำไปตรวจหาเชื้อ T.pallidum โดยใช้ dark field microscope ดูขนาด, รูปร่าง และการเคลื่อนไหวของเชื้อนี้เพื่อแยกออกจาก non-pathogenic spirochete อื่น ๆ ที่พบได้บ่อยบริเวณ genitalia เช่น T.gracilis, T.refringens และ T.macrodendum

นอกจากจะดูด้วย dark field microscope แล้วยังสามารถนำน้ำเหลืองที่ได้ไปย้อมด้วยวิธี direct fluorescent antibody โดยอาศัย antibody เฉพาะซึ่งถูกทำให้ติดสารเรืองแสง แล้วนำไปดูด้วย fluorescent microscope ก็จะเห็นเชื้อนี้ได้

การตรวจทางน้ำเหลือง[๖,๘,๙]

การตรวจทางน้ำเหลืองเพื่อวินิจฉัยโรคซิฟิลิสได้เริ่มขึ้นในปี พ.ศ.๒๔๔๙ โดย Wassermann, Neisser และ Bruck โดยใช้ saline extract ของ liver จากทารกที่ตายเพราะโรค congenital syphilis เป็น antigen ตรวจหา syphilitic antibodies ในน้ำเหลือง ต่อมาพบว่า antigen ที่สะกัดได้นี้คือ cardiolipin เป็น non-nitrogenous phospholipid ซึ่งเป็นสารที่พบได้เป็นปกติในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของ mammals โดยเฉพาะที่กล้ามเนื้อหัวใจ cardiolipin เมื่อผสมกับ lecithin และ cholesterol ในสัดส่วนที่พอเหมาะแล้วจะทำปฏิกิริยาเร็วขึ้น โดยจะทำให้เกิดปฏิกิริยา flocculation กับ antibody ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ treponemal ได้

ในปัจจุบัน antigen ที่ใช้ทดสอบแบ่งออกเป็น ๒ พวกคือ lipoidal antigen และ syphilitic tissue antigen

๑. Lipoidal antigen ใช้ cardiolipin เป็น antigen ตรวจหา antilipoidal antibody (reagin) วิธีทดสอบโดยใช้ antigen ชนิดนี้ได้แก่

๑.๑ Kahn standard test

๑.๒ Kolmer complement fixation test

๑.๓ Venereal disease research laboratories (VDRL)

๑.๔ Rapid plasma reagin (RPR)

๑.๕ Automated reagin test (ART)

ในกลุ่มนี้เป็นการหา antibody (reagin) ต่อ macromolecule คือ cardiolipin antibody นี้จะไม่ specific ต่อ T.pallidum แต่เป็น antibody ต่อ tissue lipid โดยเมื่อมี infection โดย T.pallidum จะเกิดการทำลาย tissue ของ host และจะ split ให้ lipoidal fraction ออกมา ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น hapten จะรวมกับ protein fraction ของ T.pallidum กระตุ้นให้เกิด antibody ขึ้น

วิธี Kahn flocculation นับว่าล้าสมัย และเลิกใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป และวิธี Kolmer complement fixation นั้นมีการดัดแปลงต่อมาและยังใช้กันอยู่ แต่เป็นวิธีที่ค่อนข้างยาก และใช้เวลามาก ปัจจุบันนิยมใช้วิธี VDRL,RPR หรือ ART เพราะสะดวก รวดเร็ว ใช้เป็นวิธีการตรวจน้ำเหลืองจำนวนมาก ๆ และยังสามารถหา antibody titre ด้วย ซึ่งจะมีประโยชน์ในการติดตามผลการรักษาโดยดู titre ลดลงหลังจากการรักษาหรือไม่ ถ้าสูงขึ้นแสดงว่ามี relapse เนื่องจากการรักษาไม่ได้ผลหรือมี reinfection

เนื่องจากการทดสอบในกลุ่มดังกล่าวนี้ ไม่ได้หา antibody ต่อ T.pallidum โดยตรง จึงทำให้มีผลต่ำทั้ง sensitivity และ specificity และมี biological false positive(BFP) (๑๐,๑๑,๑๒) ในโรคต่าง ๆ มากมาย BFP คือการ low positive reaction (titre < ๑:๑๖) โดยไม่มีอาการของซิฟิลิสหรือ antibody เฉพาะ (TPI,FTA-ABS,TPHA) ให้ผลลบ

๒. Treponema pallidum antigen ใช้นำมาตรวจหา Treponemal antibodyนับว่าเป็น specific test วิธีที่ทดสอบโดยใช้ antigen นี้ได้แก่

๒.๑ Treponema pallidum immobilization test (TPI) (๑๓,๑๔)

๒.๒ Fluorescent treponemal antibody-absorption test (FTA-ABS) (๑๕,๑๖,๑๗,๑๙)

๒.๓ Treponema pallidum hemagglutination test (TPHA) (๑๘,๒๑,๒๒)

๒.๔ Reiter protein complement fixation test (RPCF)

TPI เป็นการทดสอบโดยอาศัย T.pallidum ที่มีชีวิต และเคลื่อนไหวได้จากอัณฑะของกระต่ายที่มีเชื้อนี้ ทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองของผู้ป่วยซึ่งถูก inactivate โดยมี complement อยู่ด้วย จัดเป็นการทดสอบที่เชื่อถือได้ แม้ว่า sensitivity จะน้อยกว่าการทดสอบด้วยวิธี FTA-ABS และ TPHA ปัญหาสำคัญของการทดสอบวิธีนี้คือ ทำยาก และอันตรายจากการติดเชื้อ virulent T.pallidum ต่อผู้ทำการทดลอง เพราะต้องอาศัย T.pallidum ที่มีชีวิตเลี้ยงได้แต่ในอัณฑะของกระต่าย ดังนั้นวิธีนี้จึงทำกันในห้องทดลองเพียงบางแห่งเท่านั้น

011272

FTA-ABS เป็น specific test ที่นิยมทำกันมาก[๑๖,๒๐] แต่ต้องการเครื่องมือพิเศษคือfluorescent microscope นอกจากนั้นยังทำได้ในจำนวนจำกัด เนื่องจากผู้อ่านผลจะมี eye fatique หลังจากอ่านผลด้วยกล้องประมาณ ๒๐ ราย เป็นอย่างมาก

TPHA เป็น specific test ที่ทำง่ายไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษมี sensitivity สูงกว่า[๒๓,๒๔,๒๕] TPI แต่ปัญหาสำคัญคือน้ำยาราคาแพง

ส่วนวิธี Reiter protein complement fixation test ซึ่งใช้ T.pallidum Reiter strain ซึ่งเป็น non-pathogenic strain เนื่องจาก specificity ต่ำ และวิธีทำยุ่งยากจึงไม่นิยมทำกันต่อไป

Reiter strain นี้เราใช้ absorp แยก group หรือ genus specific antibody ออกจากน้ำเหลืองที่ใช้ทดสอบโดยวิธี FTA-ABS และ TPHA เพื่อขจัด antibody ที่เกิดจาก saprophytic treponemes

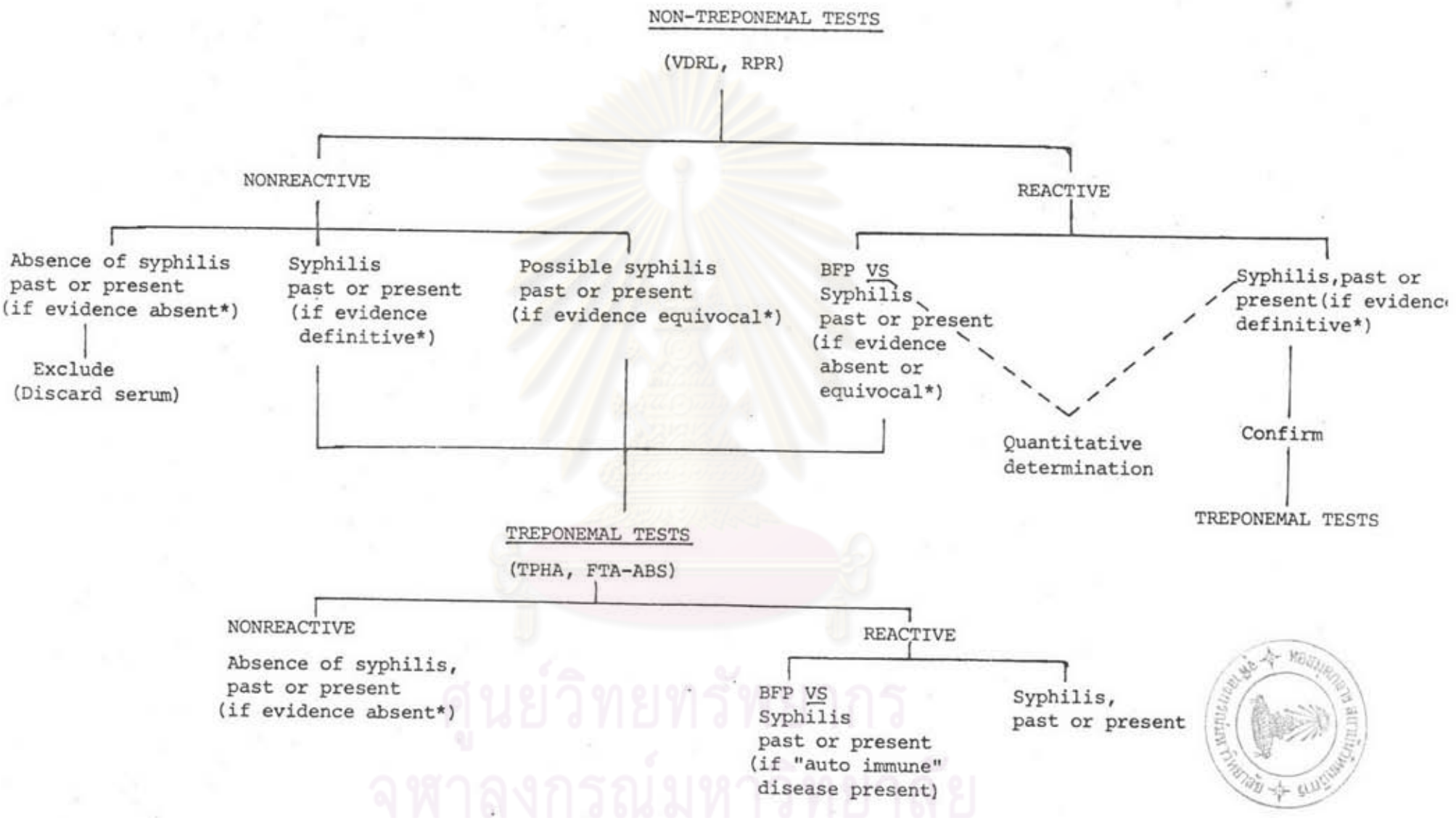
จะเห็นได้ว่าการใช้ T.pallidum เป็น antigen ในการทดสอบกับน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่เป็นซิฟิลิสนั้นสำคัญยิ่ง เพราะใช้แยกซิฟิลิสระยะแฝง จาก biological false positive และช่วยวินิจฉัยซิฟิลิสระยะหลัง ในรายที่ระดับ reagin ลดต่ำลงจนให้ผลลบ (false negative) และในราย seronegative พบได้ ๑๐% ของ late benign syphilis, ๒๐% cardiovascular syphilis และ ๓๓% tabes dorsalis[๖]

จากที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น สรุปได้ว่าการทดสอบต่าง ๆ แม้จะมีมากมาย แต่หลักการใช้และการแปลผลแบ่งออกเป็น ๒ พวก ดังนั้นจึงควรทราบถึงขั้นตอนโดยลำดับที่ใช้ในการทดสอบน้ำเหลืองของผู้ป่วย[๘]

จากรูปที่ ๖ หน้า ๑๗

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ๖ แสดงขั้นตอนการทดสอบทางน้ำเหลืองของโรคซิฟิลิสด้วยวิธี NON-TREPONEMAL และ TREPONEMAL



*Base upon historical, epidemiological, or clinical findings

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Biological False Positive (BFP)

BFP ไม่นับพวกที่ให้ผลบวกในรายที่เป็น Treponemal disease ด้วยกัน ซึ่งเป็น cross reaction มากกว่า และ tests for syphilis ทุก tests ไม่สามารถแยก syphilis จาก treponemal disease อื่น ๆ ได้

BFP มี ๒ แบบคือ

๑. Acute BFP จะให้ผลบวก อยู่ช่วงระยะเวลาสั้นไม่เกิน ๖ เดือน

๑.๑ After recent immunization[๒๖]

๑.๒ การติดเชื้อโดยเฉพาะที่ทำให้เกิดไข้ เช่น bacterial, viral pneumonia upper respiratory tract infection, viral hepatitis infectious mononucleosis, leptospirosis, tuberculosis[๒๗,๒๘]

๑.๓ Pregnancy[๒๘]

๒. Chronic BFP พบว่าให้ผลบวกนานกว่า ๖ เดือน หรืออาจเป็นปี หรือตลอดชีวิต

๒.๑ Leprosy[๓๐]

๒.๒ Connective tissue and autoimmune disease[๒๙]

๒.๓ Haemolytic anemia[๒๘]

๒.๔ Polyarthritis[๒๘]

๒.๕ Drug addicts[๓๑]

False negative เกิดเนื่องจาก

๑. Primary syphilis ปกติหลังจากระยะฟักตัว ๑๐-๙๐ วัน จะเกิด hard chancre และหลังจากเกิดแผลนี้ ๗-๑๐ วัน จึงตรวจพบ antibody ได้ ดังนั้นถ้าเจาะเลือดก่อนที่ antibody ขึ้น ก็จะได้ผล false negative

๒. Late syphilis พบว่าประมาณ ๕๐% ของผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสมานาน ๓๐ ปี reagin จะ detect ไม่ได้ ดังนั้นถ้าตรวจ reagin อย่างเดียวใน late syphilis จะได้ผล false negative

๓. Prozone phenomenon พบได้ในขณะที่มี antibody titer สูง โดยอยู่ในระยะ secondary syphilis

จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการตรวจน้ำเหลืองด้วยวิธีต่าง ๆ ดังได้กล่าวมาแล้ว จะเห็นได้ว่าการหา antibody ที่ทำปฏิกริยาเฉพาะกับT.pallidumซึ่งได้แก่วิธี FTA-ABS และ TPHA นั้นมีประโยชน์อย่างมาก ในการวินิจฉัยโรคซิฟิลิส (๓๒) แต่เนื่องจากทั้ง ๒ วิธีนี้ยังมีข้อเสียต่าง ๆ อยู่ ดังนั้นในวิทยานิพนธ์นี้จึงได้พยายามหาวิธีการตรวจหา antibody ที่ทำปฏิกริยาเฉพาะกับT.pallidumวิธีใหม่เพื่อขจัดข้อเสียต่าง ๆ ของทั้ง ๒ วิธีออกไป โดยคำนึงถึง sensitivity,specificity ราคา,ความง่าย,ความสะดวกรวดเร็วต่าง ๆ เป็นเกณฑ์ เพื่อที่นำผลจากการทดลองนี้มาใช้เป็นวิธีหลักในการทำเป็น routine lab ต่อไป โดยใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ปัจจุบัน immunological reaction ถูกนำไปใช้หา antigens หรือ antibodies โดยใช้ labeled reagent assay เป็นหลักเพื่อวินิจฉัยโรค infectious disease และ autoimmune disease โดยทั่วไปที่นิยมใช้กันมากมี ๒ วิธีคือ immunofluorescence(IF) และ radioimmunoassay (RIA) เพราะทั้ง ๒ วิธีนี้มีทั้ง specificity และ sensitivity สูงมาก

วิธี IF antigens หรือ antibodies จะถูก labeled ด้วย fluorescence dyesส่วน RIA จะ labeled ด้วย isotopic markers

อย่างไรก็ตามแม้ว่าวิธี IF และ RIA จะมีทั้ง specifivity และ sensitivity สูง แต่ก็ยังมีข้อเสียอยู่หลายอย่าง กล่าวคือวิธี IF ยากในการ quantitative และ standardize เนื่องจากขึ้นอยู่กับผู้อ่านผลแต่ละคน เครื่องมือเครื่องใช้ก็ต้องพิเศษคือใช้ fluorescence microscopeและยังทำได้ในจำนวนจำกัด เพราะผู้อ่านผลจะมี eye fatique หลังจากอ่านผลด้วยกล้องประมาณ ๒๐ ราย

ส่วนวิธี RIA นั้นต้องใช้ isotopic markers ซึ่งราคาแพง เสื่อมสลายง่าย เสี่ยงอันตรายต่อผู้ทำ ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ และต้องใช้ผู้ที่ชำนาญในการทำ

จากข้อเสียต่าง ๆ ของทั้ง ๒ วิธีดังกล่าว จึงมีผู้พยายามหลีกเลี่ยงข้อเสียต่าง ๆ นั้นโดยใช้วิธี enzyme immunoassay ซึ่งรวมข้อดีทั้ง IF และ RIA และสามารถขจัดข้อเสียดังกล่าวโดยใช้ enzyme labeled reagent ราคาถูกกว่า มีอายุการใช้งานนานกว่า ใช้เครื่องมือง่าย ๆ สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าหรือใช้ spectrophotometer อีกทั้งให้ผล specificity และ sensitivity สูงเช่นกัน วิธี enzyme immunoassay ได้เริ่มทำมาตั้งแต่ พ.ศ.๒๔๐๔ โดย Avrameus และ NaKane ต่อมาในปี พ.ศ.๒๔๑๔ Engvall และ Perlmann (๓๓,๓๔) ได้พัฒนา enzyme immunoassay โดยนำมา link กับ soluble antigens หรือ antibodies ที่ทำเป็น insoluble solid phase โดยยังคงมี reactivity ของ immunological component เรียกวิธีนี้ว่า enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยขึ้นอยู่กับหลักการ ๒ ประการคือ

๑. antigen หรือ antibody สามารถที่จะ attached กับ solid phase support ได้ และต้อง retain immunological activity

๒. antigen หรือ antibody สามารถ linked กับ enzyme ได้ และต้อง retain enzymatic และ immunological activity

วิธี ELISA นี้เป็น heterogeneous enzyme immunoassay type กล่าวคือ antigen หรือ antibody จะสามารถ linked กับ enzyme และแยกส่วน free labeled reagent ออกจาก bound enzyme labeled reagent โดยการล้าง complex ที่เหลืออยู่จะยังคงมีทั้ง enzymatic และ immunological activity อยู่ วิธีนี้ใช้ assay สารที่มี molecular weight สูง ๆ (> ๑๐,๐๐๐) ในทางปฏิบัติปฏิกริยาของวิธี ELISA นี้จะขึ้นอยู่กับสิ่งต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องคือ[๓๖,๓๗]

I. The solid phase

antigen หรือ antibody จะถูกนำไป attached กับ solid phase support เพื่อให้ง่ายในการแยกส่วนของ immunological unreacted ออกจาก reacted พบว่า antigen และantibody สามารถ attached กับ solid phase support ต่าง ๆ ได้แก่ particles of cellulose,polyacrylamide,cross-linking dextrans,silicons rubber,micro-crystalline,glass,และ plastics โดยเฉพาะ polystyrene หรือ polypropylene ที่ทำเป็น beads,tubes หรือ plates

Engvall & Perlmann ได้ใช้ polystyrene tubes และ polystyrene microhemagglutination plates เหมาะที่สุดที่นำมาใช้ เพราะใช้ reagent จำนวนน้อย ทำให้ประหยัดมาก

polystyrene microhemagglutination plate(Cooke Microtiter M29 AK)Dynatech Laboratories, Billingshurst, Sussex, England นั้นเหมาะที่ใช้ coated สารพวก protein, lipoprotein antigen โดยสามารถผสมได้ใน alkaline solution เป็นแบบ passive adsorption condition ที่เหมาะสมในการ coated เป็น solid phase ขึ้นอยู่กับ

- concentration ของ reactant
- time
- temperature
- pH

condition ทั้งหลายเหล่านี้เราสามารถหาได้โดยใช้ checker board titration ใช้ reference reagents โดยทั่วไป protein และ lipoprotein concentration ๑-๑๐ µg/ml ใน carbonate,bicarbonate buffer pH ๙.๖ จะสามารถ adsorb ได้ดี และเร็วมากที่อุณหภูมิ ๒๐-๒๔^{o}C

ในเวลา ๒ ชั่วโมง หรือที่ ๔°C over night

II. Washing steps

Heterogeneous enzyme immunoassay type ต้องมีขั้นตอนของการล้างดังนี้

๑. หลังจากที่ coated antigen หรือ antibody บน surface ของ microplate หรือ tube

๒. หลังจากที่ incubated กับน้ำเหลือง

๓. หลังจาก incubated กับ conjugate

วิธีการล้างมีอยู่หลายวิธี แล้วแต่ system แต่การล้างนั้นจะต้องดูด reagents ออกให้หมดจาก plate หรือ tube แล้วเติม PBS ซึ่งมี wetting agent (eg.Tween 20) หรืออาจใช้น้ำประปาที่มี pH เป็นกลางและมี chlorine ปริมาณต่ำ ๆ โดยหลังจากเติมลงไปใน plate หรือ tube แล้วทิ้งไว้ประมาณ ๓-๕ นาที ทำเช่นนี้ประมาณ ๓ ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายแล้ว เขย่าให้แห้งแล้วใส่ regent อื่นต่อไปทันที

microplate นั้นสะดวกมากสำหรับขั้นตอนการล้าง เพราะทั้ง ๙๖ หลุม สามารถล้างพร้อมกันทีเดียวในขณะที่ใช้ tube หรือ bead นั้นยุ่งยากกว่า

Automatic ELISA processing apparatus ใช้สำหรับงานที่ทำมาก ๆ หรือในงานที่เกี่ยวกับ infectious antigen เช่น HB antigen

III. The test sample

ELISA test สำหรับพวกที่มี molecular weight สูง ๆ นั้น บ่อยครั้งที่ใน sample ที่เรา assay จะมีพวก nonspecific ที่จะ adsorb ติดกับ solid phase ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้วิธี indirect ELISA test เช่น sample ที่เป็น serum,plasma,CSF และ saliva เพื่อป้องกัน nonspecific จึงต้องนำ sample นั้นมาละลายใน PBS buffer ที่มี wetting agent(eg.Tween 20) หรืออาจ dilute sample และใส่ protein เช่น serum albumin ลงไปเพื่อ reduce background ของ nonspecific ให้ลดจำนวนต่ำลง

อัตราส่วนผลบวกกับผลลบของ sample ที่อ่านโดย absorbance เช่นโดยวิธี indirect ELISA นี้ควรมีอย่างน้อย ๕:๑ เพราะฉะนั้นจึงควรทำให้ sampleมี nonspecific background ให้น้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้

ใน indirect ELISA test serum หรือ plasma sample อาจจะมีสารบางอย่าง เช่น Rheumatoid factor ซึ่งอาจจะทำปฏิกริยากับ serum บางส่วน เช่นกับ specific IgG antibody จะทำให้ถูก fixed กับ sensitized solid phase ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการ assay IgM antibod

เราสามารถเลี่ยงปัญหานี้ได้โดยใช้ chromatographic หรือ centrifuge แยก IgM และ IgG หรือโดยใช้ specific absorbent สำหรับ immunoglobulin เช่น DEAE

การ assay หาปริมาณของ sample โดยปกติ สามารถทำเป็น single dilution การทำเป็น serial dilution นั้นก็สามารถหา end point ได้

สำหรับการ assay antigen เราต้อง set standard curve และอ่านค่า unknowns จาก standard curve นี้ ในบางกรณี antigen นี้มีระดับสูงมาก อาจทำให้มีการอ่านผิดพลาดได้ คือทำให้ผลของการอ่าน absorbence values ได้ค่าต่ำในสภาวะเช่นนี้เราต้องdilute sample

IV. Conjugates[๓๗,๓๘]

enzyme ที่ใช้ในการ labeled antigens หรือ antibodies มีหลายชนิด คุณสมบัติของ enzyme จะต้องมีดังต่อไปนี้

- stable
- high reactive
- หาง่าย ราคาถูก และปลอดภัยในการใช้
- purity สูง
- อ่านผลง่าย

enzymes ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่

- acetyl cholinesterase
- cytochrome C
- β-galactosidase
- glucoamylase
- glucose oxidase
- β - D - glucoromidase
- lactate dehydrogenase
- lactoperoxidase
- ribonuclease
- tyrosinase
- alkaline phosphatase
- horseradish peroxidase

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

sensitivity ของ enzyme immunoassay นั้นขึ้นอยู่กับการเตรียม enzyme-antigen หรือ enzyme-antibody conjugates เป็นสำคัญคือต้องมี enzymatic และ immunological activity สูง

การ coupling enzyme กับ protein ต้องใช้ cross-linking agent ที่มี active groups อย่างน้อย 2 groups ที่สามารถทำปฏิกริยากับ functional groups ของ protein และ enzyme

functional groups ใน protein ประกอบด้วย amino, imio, hydroxylphenolและ thiol groups

functional groups ของ protein และ enzyme เหมือนกัน จึงเชื่อว่าการเลือกวิธีการ coupling ให้ได้ homogeneous enzyme-protein อย่างเดียวกัน ยากที่จะทำได้ ดังนั้นการ coupling จะมี mixture ของ heterogeneous enzyme-protein,enzyme-enzyme หรือ protein-protein conjugates

วิธีการ coupling มีอยู่ ๒ วิธีคือ [๓๗,๓๘]

๑. One-step reaction

๒. Two-step reaction

๑) One step reaction โดยใส่ enzyme,cross-linking agent และ protein รวมกัน ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกริยากัน วิธีนี้ยากที่จะ control เพราะ reaction rate ของ functional groups ของ enzyme และ protein แตกต่างกัน ทำให้มีการเลือก polymerization ของ enzyme หรือ protein ดังนั้นเมื่อเตรียมโดยวิธีนี้จะได้แบบ heterogenesus conjugate

๒) Two step reaction โดยใส่ enzyme ทำปฏิกริยากับ crosslinking agent ก่อน เมื่อได้ activated enzyme แล้ว นำไปทำปฏิกริยากับ antigen หรือ antibody ต่อไป

ในทางทฤษฎีวิธีนี้ง่ายในการ control มากกว่า one step reaction และวิธีนี้จะได้แบบ homogeneous conjugate

<u>วิธีการ coupling</u>

การ coupling enzyme กับ protein นั้นใช้cross-linking agentที่เป็น mono,bi หรือ multifunctional reagent ที่นิยมใช้กันมากคือ glutaraldehyde [๓๘]

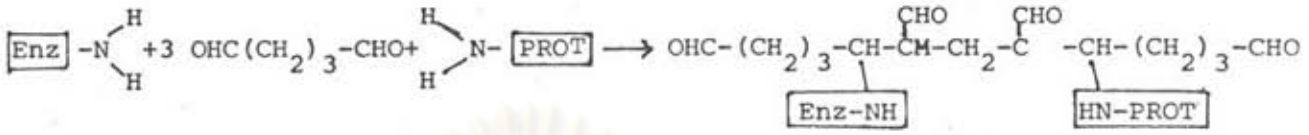
<u>วิธี coupling แบบ one step</u>

ใช้ enzyme mixed กับ antigen หรือ antibody ก่อน แล้วใส่ glutaraldehyde ลงไป ทิ้งให้ทำปฏิกริยาโดย incubate ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไป dialyzed glutaraldehyde จะทำปฏิกริยากับ

amino group ของ lysine ที่มีใน protein

mechanism ที่ glutaraldehyde สามารถ link enzyme-antibody มีอยู่ ๒ แบบคือ

I.

II. 

enzyme ที่ใช้ในการเตรียม conjugates โดยวิธี one step glutaraldehyde ได้แก่

enzyme	Source
Alkaline phosphatase	E.coli
Alkaline phosphatase	Chicken intestine
Alkaline phosphatase	Calf intestine mucosa (๔๑)
Cytochrome C	Horse heart
B-D-galactosidase	E.coli
Glucose oxidase	Aspergillus niger

Conjugates ที่เตรียมได้นำมาศึกษาโดยใช้ gel filtration และ ultracentifugation analyses พบว่าจะประกอบด้วย heterogeneous population ของ high และ low molecular weight enzyme-protein conjugates และจะไม่พบ free antibody หรือถ้าพบก็น้อยมาก โดยขึ้นอยู่กับ enzyme ที่ใช้ด้วย

หลังจาก coupling แล้วพบว่า enzymatic activity จะมีค่า ๖๐-๙๐% ของ initial activity enzyme ที่นิยมใช้ในการเตรียม conjugate โดยวิธี one step glutaraldehyde คือ alkaline phosphatase

วิธีการ coupling แบบ two step[๔๒]

ให้ glutaraldehyde ทำปฏิกิริยากับ free amino groups ที่มีใน peroxidase หลังจากนั้นแยกเอา glutaraldehyde ที่ excess ออกก็จะมี active aldehyde groups เหลืออยู่ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ antigen หรือ antibody ที่เราต้องการต่อไป

conjugates ที่เตรียมได้เมื่อนำมาศึกษาโดยใช้ gel filtration,sodium dodecyl sulphate,polyacrylamide gel electrophoresis และ sucrose density centrifugation พบว่าจะประกอบด้วย homogeneous derivative molecular weight ๔๐,๐๐๐ โดย 1 molecule ของ peroxidase จะจับคู่กับ 1 molecule ของ antibody

หลังจากที่ coupling แล้วจะมี enzymatic activity ๕๐-๗๕% ของ initial activity

นอกจากจะใช้ glutaraldehyde เป็น crosslinking agent แล้วยังสามารถใช้ crosslinking agents อื่น เช่น sodium periodate, N-N-O phenylenedimaleimide, B-Benzoquinone

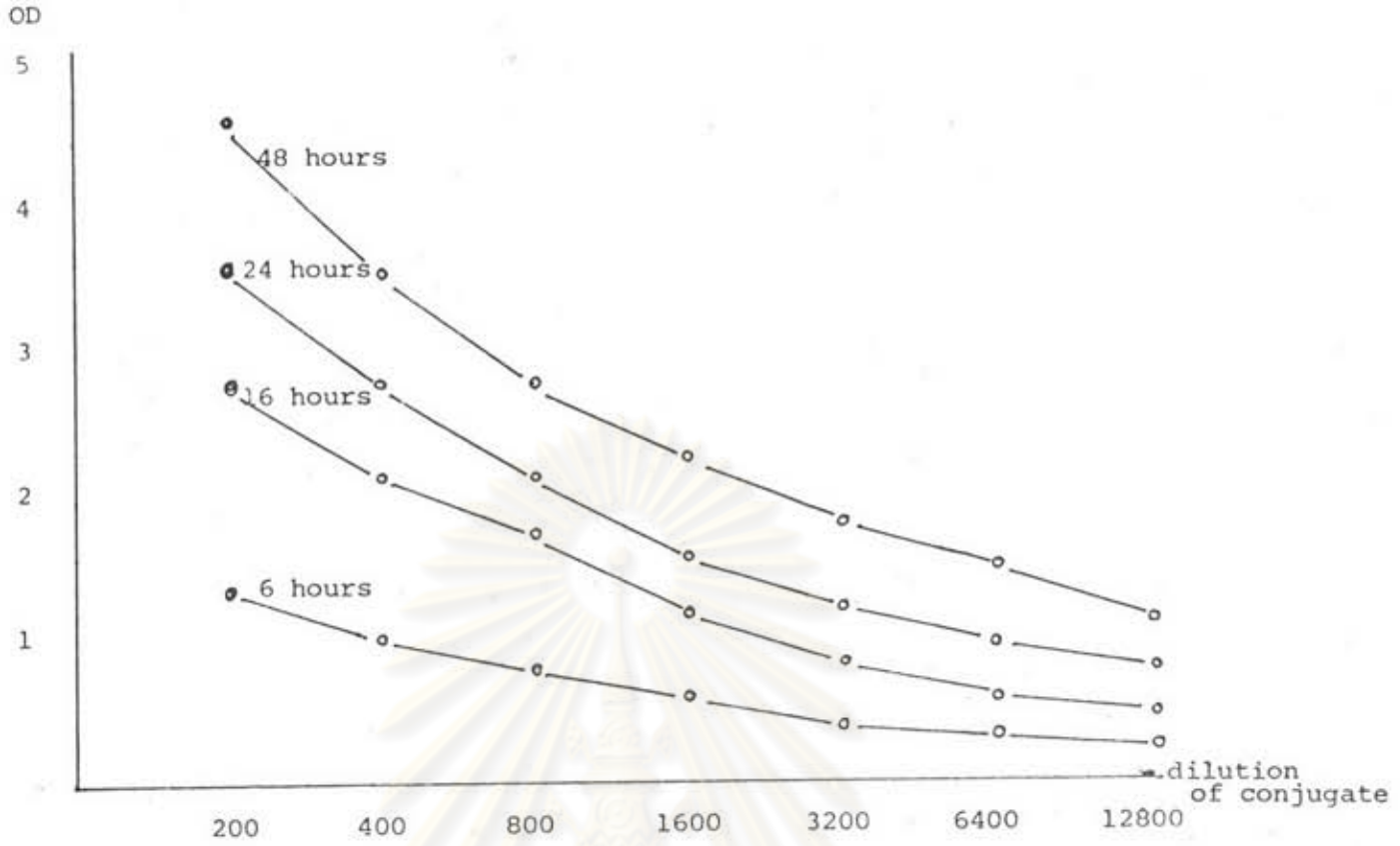
Conjugates ที่ได้หลังจากการ coupling แล้วจะไม่มีเพียง enzyme-protein conjugate เท่านั้น แต่จะมีทั้ง protein derivative และ reagents ด้วย ดังนั้นการ purify เอา enzyme-protein ออกจาก protein derivative และ reagents จะทำให้ conjugates ที่เตรียมได้มี specificity สูงกว่าที่ไม่ได้ purify

การ purify conjugates ทำได้โดยใช้ gel filtration,sephadex,ultragel sepharos หรือ bio-gel column ขึ้นอยู่กับ molecular weight ของ protein และ enzyme นั้น ๆ

conjugates ที่เตรียมได้สามารถเก็บได้ได้ดีที่สุดในรูป concentrated และก่อนนำมาใช้ก็เจือจางด้วย PBS Tween buffer สำหรับ working dilution ของ conjugate ที่ใช้นั้นขึ้นอยู่กับ

- conjugate incubation time
- substrate reaction time

conjugate ที่มี dilution สูง ๆ จะต้องใช้เวลา incubate นานแต่ถ้าใช้ conjugate ที่ concentrated incubation time จะเร็วกว่า



รูปที่ ๗ แสดงจำนวนความเข้มข้นของ conjugate ที่มีผลต่อเวลาที่ใช้ incubate

V. Substrates

สิ่งที่สำคัญสำหรับ substrates คือต้องไวต่อการทำปฏิกิริยากับ enzyme ส่วนมากจะใช้ chromogenic substrates โดยแรกเริ่มจะไม่มีสี เมื่อเกิดมี degradation จะให้สีเกิดขึ้น และ substrates ควรให้ complete soluble product ที่ให้ค่า extrinction coefficient สูง (dense color/unit degraded)

นอกจากนั้น คุณสมบัติโดยทั่วไปของ substrates คือ ราคาถูก, ใช้ง่าย และปลอดภัย

นอกจากจะใช้ chromogenic substrates แล้วยังสามารถใช้ fluorogenic substrates ได้เช่น methylumbelliferin

สำหรับ alkaline phosphatase substrate คือ p-nitrophenyl phosphate (optimal pH 9.6) commercial เป็น tablets form กับ working solution (ไม่ควรเป็น photosensitive) สามารถเตรียมได้รวดเร็ว, ปฏิกิริยาของ enzyme ที่เกิดขึ้นนั้นสามารถ stop ได้ด้วย NaOH ที่เข้มข้น

Peroxidase substrate จะ oxidized โดย H_2O_2 แต่ต้องคำนึงถึงข้อสำคัญคือต้องเป็น soluble เพียงพอ เมื่อใช้ diamino benzidine จะ insoluble และ 5-amino-salicylic acid (5AS) กับ O-diamisidine จะ partial insoluble

O-phenylenediamine (OPD) ใช้เป็น substrate ที่ดีที่สุดของ peroxidase เพราะ product ที่ได้จะ complete soluble และให้ high extrinction coefficient ที่ ๔๙๒ nm และสามารถอ่านผลด้วยตาได้เพราะให้สีส้ม หลังจาก stop ปฏิกริยาด้วย H_2SO_4

แม้ว่า substrate นี้จะไม่เป็น carcinogen แต่เวลาใช้ก็ควรระมัดระวังไม่ให้ถูกผิวหนังหรือตา

VI. The end result

การแปลผลของ ELISA test นั้น ทำได้ ๒ วิธีคือ การอ่านด้วยตาเปล่า หรือนำไปวัดด้วย photometer

๑. การอ่านด้วยตาเปล่า (Visual reading)

อ่านผลเป็นบวก หรือลบ (positive or negative) samplesที่ให้ผลบวกจะเห็นสีเกิดขึ้น เช่น solution ที่มี absorbance 0.1-0.2 จะมีสีเหลืองถึงสีน้ำตาล เมื่อวัดที่ ๔๐๐-๕๐๐ nm ส่วน sample ที่ให้ผลลบจะไม่มีสี นอกจากนั้นยังสามารถหา titre ของ samples ได้โดยการทำเป็น serial dilution dilution สุดท้ายที่ให้สีเกิดขึ้นคือ titre

๒. Photometric reading

การ assay ที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำสูงนั้น ผลที่เกิดขึ้นเราสามารถนำไปอ่านโดยใช้ photometer โดยนำ substrate solution ที่ทำปฏิกริยาแล้วจาก microplote หรือ tube transfer ใส่ cuvette ของ spectrophotometer และอ่าน absorbance ที่ maximum absorption wavelength (๔๐๕ nm สำหรับ p-nitrophenyl phosplate และ ๔๙๒ สำหรับ OPD)

spectrophotometer ที่เหมาะสำหรับการอ่านค่า absorbance มักใช้ microcuvette volumn ๒๐๐-๓๐๐ ul ในปัจจุบัน photometer มีทั้งแบบ manual และ automatic

การแปลผลของ ELISA test ที่อ่านด้วย spectrophotometer มีดังนี้

๒.๑ อ่านผลเป็นบวกหรือลบ (positive or negative)

ผลบวกนั้นเราพิจารณาจากค่า samples ที่ให้ผล absorbance valueมากกว่าค่า threshold level โดยค่า threshold level นี้ได้มาจากการ test ด้วย negative samples จำนวนมาก ๆ และค่า threshold level คือค่าสูงสุดของ negative samples

๒.๒ อ่านเป็นค่า absorbance value (เช่น ๐.๒,๐.๘,๑.๒) ค่าต่าง ๆ เหล่านี้ได้มาจากการทำ ELISA test โดยใช้ reference samples (บวกและลบ) ภายใต้ condition เดียวกันกับ test samples ดังนั้นค่า absorbance value นี้สามารถใช้วัดโดยตรงต่อ sample reactivity

๒.๓ อ่านเป็นอัตราส่วน ระหว่าง absorbance value ของ sample ต่อ mean ของ group negative samples โดยถือว่าอัตราส่วนของค่าที่สูงกว่า เช่น ๒ เท่าของ negative หรือ ๓ เท่าของ negative ให้ถือว่าเป็นบวก

๒.๔ อ่านค่า end point titre โดยทำ serial dilution ของ samples โดย ELISA test dilution สุดท้ายที่ให้ผลสูงกว่า group neative samples ให้ถือเป็น end point titre

Sample	Visual reading	Photometric reading			
		Absorbance Threshold at 0.2	Absorbance value	Ratio	End point titre
Negative	-	-	0.15	1	1/10
Weak positive	+	+	0.5	3.3	1/1000
Strong positive	++	+	3.2	21	1/600,000

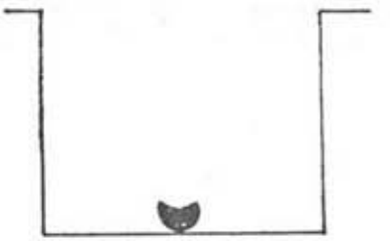
ตารางที่ ๔ แสดง วิธีการอ่านผลโดยใช้ Photometer โดยวิธี indirect ELISA test

จากที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมดนี้เป็นหลักในการทำ ELISA test ซึ่งจากหลักดังกล่าว สามารถนำวิธี ELISA มา test หา antibodies หรือ antigens ต่าง ๆ ได้ โดยมี types ต่าง ๆ ของการ assay เพื่อความเหมาะสมดังนี้[๓๕,๓๖] ตามรูปที่ ๘-๑๑

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

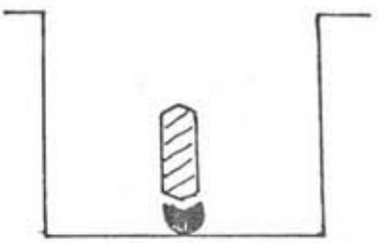
รูปที่ ๔ The double antibody sandwich ELISA for measuring antigen

1. Antibody adsorbed to plate



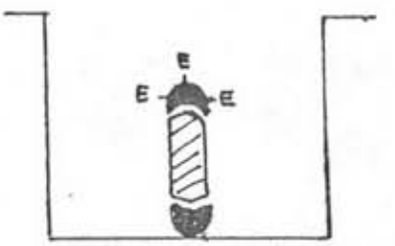
Wash

2. Test solution containing antigen added



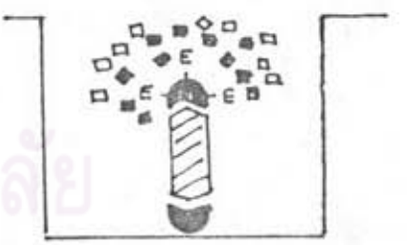
Wash

3. Add enzyme labelled specific antibody



Wash

4. Add enzyme substrate



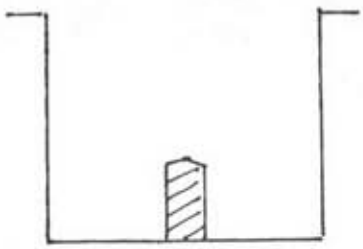
Wash

Amount hydrolysis = amount antigen present

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

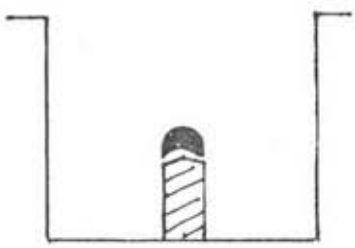
รูปที่ ๔ The indirect method for assay of antibody

1. Antigen adsorbed to plate



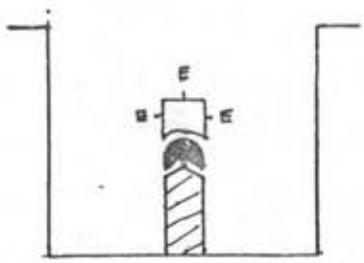
Wash

2. Add serum any specific antibody attaches to antigen



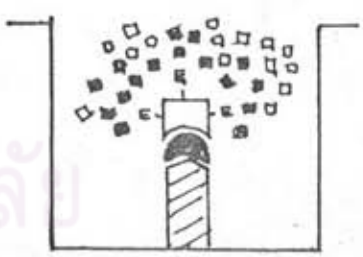
Wash

3. Add enzyme labelled antiglobulin which attaches to antibody



Wash

4. Add substrate

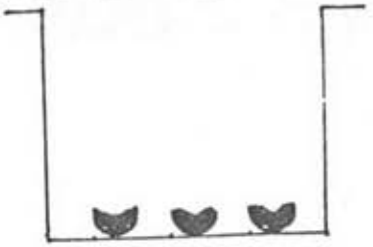


Amount hydrolysed = amount antibody present

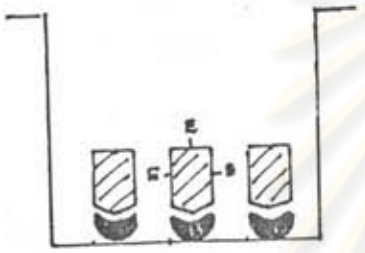
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ๑๐ The competitive method of ELISA for assaying antigen

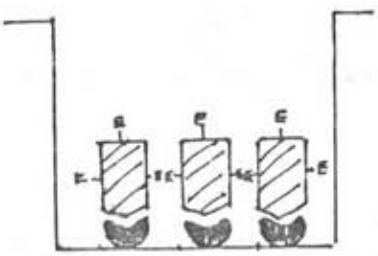
1 Adsorb antibody to surface



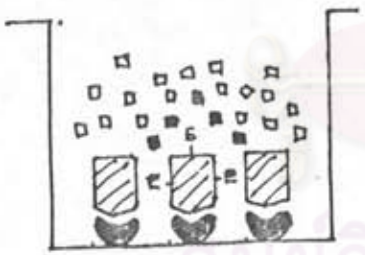
2a. Add enzyme-labelled antigen + "unknown"antigen



2b. Add enzyme-labelled antig

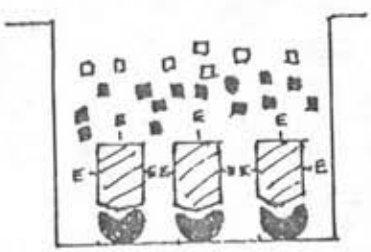


3a.



Add enzyme substrate

3b.

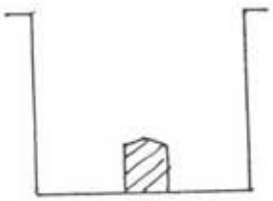


Substrate hydrolysis = labelled (antigen)

Difference between 3a & 3b ="unknown" (antigen)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ๑๑ Modification of the indirect ELISA for assay of antigen



1. Plate coated with antigen

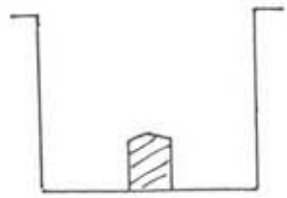
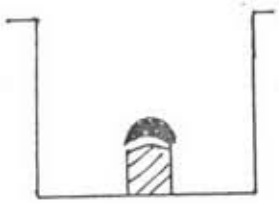
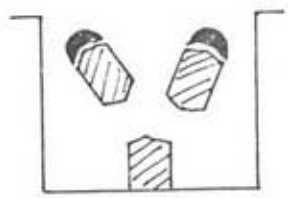


Plate washed



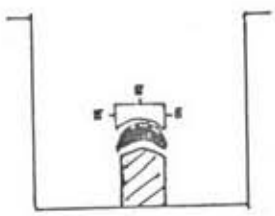
2. Test sample thought to contain antigen mixed together with reference antibody



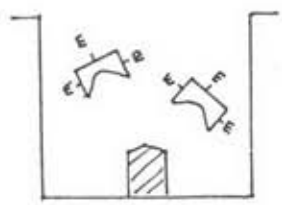
No antigen in test sample

Antigen in test sample reacts with antibody in solution

Plate washed



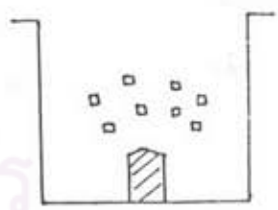
3. Enzyme antiglobulin conjugate added



Conjugate becomes fixed to immobilized antibody

Plate washed

4. Enzyme substrate added



Substrate degradation indicates test sample 2 contains no antigen

No substrate degradation indicates test sample 2 contains antigen

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากหลักการต่าง ๆ ดังกล่าว Veldkamp และคณะ[๓๔] ได้นำวิธี indirect ELISA test มาใช้ในการวินิจฉัยโรคซิฟิลิสจากน้ำเหลืองของผู้ป่วย พบว่าวิธีนี้จะให้ผล specificity และ sensitivity เท่ากับวิธี FTA-ABS test

ดังนั้นในวิทยานิพนธ์นี้จึงได้นำวิธี indirect ELISA test ตามวิธี Veldkamp และคณะ กับวิธีของ Voller และคณะ[๓๔,๔๐] มาใช้ในการวินิจฉัยโรคซิฟิลิสจากน้ำเหลืองของผู้ป่วย โดยเปรียบเทียบกับวิธี FTA-ABS และ TPHA test ถึงข้อดี ข้อเสียต่าง ๆ เพื่อที่จะนำผลการทดสอบและการเปรียบเทียบนี้มาเป็นเกณฑ์ในการตัดสินว่าวิธี indirect ELISA test สมควรที่จะนำมาใช้เป็น confirm test สำหรับวินิจฉัยโรคซิฟิลิสทางห้องปฏิบัติการต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย