

บทที่ ๔

วิจารณ์ และ สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองโดยวิธี TPHA, FTA-ABS และ indirect ELISA กับน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสระยะต่าง ๆ จากตารางที่ ๔ หน้า ๔๓ พบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสระยะแรก (primary syphilis) เมื่อทดลองด้วยวิธี TPHA จะให้ผลบวก ๔๔.๓%, FTA-ABS ๔๗.๔% และ indirect ELISA ๔๖.๔% ถึงแม้ว่าทั้ง ๓ วิธีนี้จะไม่ให้ผลบวกถึง ๑๐๐% ก็ตาม เนื่องจาก antibody ที่สร้างมีจำนวนน้อยมากจนทั้ง ๓ วิธีตรวจไม่พบ แต่ก็จัดได้ว่าทั้ง ๓ วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) ที่สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี indirect ELISA นั้นเป็นวิธีที่มีความไวของปฏิกิริยาสูงกว่า TPHA และ FTA-ABS ในการตรวจน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสระยะแรก ถึงแม้จะไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม ($P > ๐.๐๕$)

สำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสระยะที่สอง (secondary syphilis) และระยะหลัง (late syphilis) นั้น ทั้ง ๓ วิธีจะให้ผลบวก ๑๐๐% ซึ่งแสดงถึงความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) ของวิธี indirect ELISA เท่ากับวิธี TPHA และ FTA-ABS

สำหรับน้ำเหลืองของคนปกติซึ่งเป็น control เมื่อทดลองทั้ง ๓ วิธีจะให้ผลลบทั้งหมด แสดงถึงความจำเพาะ (specificity) ของวิธี indirect ELISA นั้น เท่ากับวิธี TPHA และ FTA-ABS

และจากน้ำเหลืองที่ให้ผล VDRL reactive จำนวน ๑๔ ราย ผลจากการทดลองทั้ง ๓ วิธี จากตารางที่ ๑๑ หน้า ๔๔ พบว่าวิธี FTA-ABS และ indirect ELISA จะให้ผลลบทั้ง ๑๔ ราย ส่วนวิธี TPHA จะให้ผลบวก ๑ ราย (๖.๖๓%) ซึ่งแสดงถึงผลบวกเท็จ (biological false positive) เพราะจากการติดตามผู้ป่วยทั้ง ๑๔ รายนั้นไม่ได้เป็นโรคซิฟิลิส แต่เป็นโรคอื่น ๆ คือ pregnancy ๔ ราย, bacterial pneumonia ๒ ราย, viral pneumonia ๒ ราย, tuberculosis ๑ ราย, malaria ๒ ราย, rheumatoid arthritis ๑ ราย, alcoholic cirrhosis ๑ ราย และ SLE ๒ ราย

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าวิธี indirect ELISA จะมีความจำเพาะ (specificity) เท่ากับวิธี FTA-ABS แต่ดีกว่า TPHA ในการทดลองกับน้ำเหลืองที่ให้ผลบวกเท็จ

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสามารถเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธี TPHA, FTA-ABS และ indirect ELISA ตามหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

๑. ความไวของปฏิกิริยา (Sensitivity)

วิธีการตรวจหา T.pallidum antibody จากน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ตี้นั้นต้องมีความไวของปฏิกิริยาที่สูง เพราะถ้ามีความไวของปฏิกิริยาสูงก็สามารถตรวจหา antibody ปริมาณน้อยมากไว้สำหรับ antibody ที่ตรวจพบในผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสระยะแรกนั้นจะตรวจพบได้หลังจากการเกิดแผลริมแข็ง (Hard chancre) แล้วประมาณ ๗-๑๐ วัน ซึ่งปริมาณของ antibody ในซิฟิลิสระยะแรกนี้อาจจะมีน้อยมากจนตรวจไม่พบ ถ้าวิธีที่ตรวจไม่มีความไวของปฏิกิริยาสูงพอ จากผลการทดลองวิธี indirect ELISA จะให้ผลความไวของปฏิกิริยาสูงกว่าวิธี TPHA และ FTA-ABS ในผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสระยะแรก และจะให้ผลความไวของปฏิกิริยาเท่ากับวิธี TPHA และ FTA-ABS ในผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสระยะที่สอง และระยะสุดท้าย

ความไวของปฏิกิริยาทั้ง ๓ วิธี

ซิฟิลิสระยะแรก : indirect ELISA สูงกว่า TPHA และ FTA-ABS

ซิฟิลิสระยะสองและระยะสุดท้าย : indirect ELISA เท่ากับ TPHA และ FTA-ABS

สรุปได้ว่า วิธี indirect ELISA จะให้ผลความไวของปฏิกิริยาที่สูง คือสามารถตรวจหา antibody ที่มีจำนวนน้อยมากได้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสระยะแรก ซึ่งเหมาะสำหรับเป็นวิธี screening และ confirm สำหรับผู้ป่วยที่เป็นซิฟิลิสระยะแรกโดยไม่ต้องรอให้ antibody เพิ่มจำนวนมาก่อนซึ่งจะช่วยให้การวินิจฉัยและรักษาโรคนี้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว เป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยโดยตรง

๒. ความจำเพาะ (Specificity)

ความจำเพาะในการตรวจเป็นสิ่งจำเป็นและสำคัญมากคือจะต้องให้ผลการตรวจตรงตามความเป็นจริง กล่าวคือ เมื่อนำน้ำเหลืองของคนปกติมาทดลองต้องให้ผลลบ และสำหรับน้ำเหลืองที่เป็นปัญหาเนื่องจาก biological false positive เมื่อนำมาทดลองแล้วจะให้ผลบวกคลาดเคลื่อนมากน้อยขนาดไหนจากการทดลองพบว่าวิธี indirect ELISA จะให้ผลความจำเพาะเท่ากับวิธี TPHA และ FTA-ABS ในการทดลองกับน้ำเหลืองของคนปกติ แต่จะให้ผลความจำเพาะดีกว่าวิธี TPHA ในการทดลองกับน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ให้ผล VDRL reactive โดย TPHA จะให้ผล biological false positive ๖.๖% ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการทดลองของ Blum,^(๒๔) ๑๙๗๓ ๘.๘% และ Vejajiva^(๑๘) ๑๙๗๑ ๘.๒๖%

ความจำเพาะของทั้ง ๓ วิธี

น้ำเหลืองของคนปกติ : indirect ELISA เท่ากับ TPHA และ FTA-ABS

น้ำเหลือง biological false positive : indirect ELISA และ FTA-ABS ดีกว่า TPHA

๓. การเตรียม antigen, conjugate และน้ำยา

๓.๑ วิธี indirect ELISA นั้นเราสามารถเตรียม T.pallidum antigen ได้เอง จากหน้า ๓๘ จากวิธีการเตรียม antigen ดังกล่าว จะเห็นได้ว่าไม่ยุ่งยาก และเมื่อเตรียม protein antigen ได้แล้วก็สามารถหาจำนวนความเข้มข้น (concentration) ที่เหมาะสมของ protein antigen ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาได้โดยการทำให้ checkerboard titration

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นของ protein antigen ที่เหมาะสมแล้วก็นำไป coated กับ polystyrene microhemagglutination plate เพราะสามารถ coated ได้คราวละมาก ๆ เนื่องจากแต่ละ plate นั้นมีถึง ๙๖ หลุม โดยแต่ละหลุมสามารถตรวจน้ำเหลืองของผู้ป่วยได้ ๑ ราย อีกทั้งจำนวน antigen ที่ใช้ coated plate ก็ใช้น้อยจึงทำให้ประหยัดมาก

นอกจากนั้นเรายังสามารถเก็บ plate ที่ coated ด้วย protein antigen แล้ว ไว้ใช้ ได้อย่างน้อย ๑ ปีที่ ๔°C โดยที่ protein antigen จะไม่เสื่อมคุณสมบัติแต่อย่างใด จึงเหมาะสำหรับ ที่จะใช้ในโรงพยาบาลทั่ว ๆ ไปที่มีการตรวจจำนวนมากเพราะเตรียม antigen เพียงครั้งเดียวก็ใช้ได้ ตลอดปี

๓.๒ การเตรียม conjugate สำหรับวิธี indirect ELISA เราสามารถเตรียม conjugate ได้เอง จากหน้า ๔๐ วิธีการเตรียมก็ง่าย เมื่อเตรียมได้แล้วก็สามารถหาค่า working strength ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาได้ และสามารถเก็บ conjugate ที่เตรียมได้ไว้ใช้ได้ อย่างน้อย ๒ ปี เมื่อเก็บไว้ในที่มืดที่ ๔°C โดยไม่เสื่อมคุณสมบัติ ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ในโรงพยาบาล ทั่ว ๆ ไป ที่มีการตรวจจำนวนมาก ๆ เพราะเตรียมเพียงครั้งเดียวก็เก็บไว้ใช้ได้ตลอดปี

๓.๓ การเตรียม antigen และ conjugate สำหรับวิธี TPHA และ FTA-ABS นั้น ในปัจจุบันทั้ง antigen และ conjugate ซื้อสำเร็จรูป

ส่วนน้ำยาต่าง ๆ ที่ใช้ก็หาง่าย และวิธีเตรียมก็ไม่ยุ่งยาก เช่นเดียวกับวิธี indirect ELISA

๔. เครื่องมือ และอุปกรณ์พิเศษ

๔.๑ วิธี indirect ELISA จะไม่ใช้เครื่องมือพิเศษนอกจาก sonicator ซึ่งใช้สำหรับทำให้ตัว T.pallidum แตก แต่อาจจะใช้วิธีอื่นแทนโดยไม่ต้องใช้ sonicator ได้คือใช้วิธี freezing and thawing (D'Alessandro, ๑๙๕๓)^(๔๕) ซึ่งจะให้ผลเช่นเดียวกัน

นอกจากนั้นก็มี spectrophotometer ซึ่งใช้สำหรับวัดค่า Optical density (OD) เพื่อการแปลผล แต่เนื่องจากในปัจจุบัน spectrophotometer นี้มีใช้อยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการจึงอาจกล่าวได้ว่าวิธี indirect ELISA นั้นจะไม่ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์พิเศษ

๔.๒ วิธี TPHA ไม่ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์พิเศษ

๔.๓ วิธี FTA-ABS ต้องใช้เครื่องมือพิเศษคือกล้อง fluorescence

เครื่องมือและอุปกรณ์พิเศษสำหรับ ๓ วิธี

<u>TPHA</u>	<u>FTA-ABS</u>	<u>indirect ELISA</u>
ไม่ใช้เครื่องมือพิเศษ	กล้อง fluorescence	sonicator (ไม่จำเป็น) spectrophotometer

๕. ค่าใช้จ่าย

ค่าใช้จ่ายของการตรวจแต่ละวิธี เป็นสิ่งสำคัญมากที่จะต้องคำนึงถึงโดยเฉพาะสำหรับประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศกำลังพัฒนา เพราะในบิหนึ่ง ๆ นั้น มีการตรวจทางน้ำเหลือง เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคซิฟิลิส เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการตรวจที่มีค่าใช้จ่ายน้อย และต้องให้ผลถูกต้องเชื่อถือได้ จากทั้ง ๓ วิธีนี้จะมีค่าใช้จ่ายของแต่ละวิธีดังนี้คือ

๕.๑ วิธี indirect ELISA

๕.๑.๑ T.pallidum antigen (Beckman, U.S.A.)

• ขวด ราคา ๔๕๐ บาท สามารถตรวจได้ ๓๐๐ ราย

๕.๑.๒ Conjugate ประกอบด้วย

Alkaline phosphatase enzyme (Sigma type VII)

• ขวด ราคา ๑,๓๒๐ บาท

Antihuman γ -globulin (Hyland, England)

• ขวด ราคา ๑,๑๐๐ บาท

Conjugate ที่เตรียมได้สามารถตรวจได้ ๔,๐๐๐ ราย

๔.๑.๓ Disposable microhemagglutination plate

• plate ราคา ๓๐ บาท สามารถตรวจได้ ๕๐ ราย

๔.๑.๔ Substrate และน้ำยาต่าง ๆ ราคา ๔ บาท ต่อการตรวจ • ราย

รวมค่าใช้จ่ายของวิธี indirect ELISA ต่อการตรวจ • ราย = ๑๐ บาท

๔.๒ วิธี TPHA

๔.๒.๑ น้ำยาสำเร็จรูปของ Fujizoki Phamaceutical Co.Ltd.

• กล่อง ราคา ๕๐๐ บาท สามารถตรวจได้ ๖๐ ราย

๔.๒.๒ Disposable microhemagglutination plate

• plate ราคา ๓๐ บาท สามารถตรวจได้ ๔๔ ราย

รวมค่าใช้จ่ายของวิธี TPHA ต่อการตรวจ • ราย = ๑๖ บาท

๔.๓ วิธี FTA-ABS

๔.๓.๑ T.pallidum antigen (Beckman, U.S.A.)

• ขวด ราคา ๔๕๐ บาท สามารถตรวจได้ ๒๕๐ ราย

๔.๓.๒ Conjugate (BBL, U.S.A.)

• ขวด ราคา ๒,๓๐๐ บาท สามารถตรวจได้ ๒๕๐๐ ราย

๔.๓.๓ FTA-ABS test sorbent (BBL, U.S.A.)

• ขวด ราคา ๒๕๐ บาท สามารถตรวจได้ ๒๕ ราย

๔.๓.๔ หลอดไฟกลิ้ง fluorescence และน้ำยาต่าง ๆ ราคา • บาท

ต่อการตรวจ • ราย

รวมค่าใช้จ่ายของวิธี FTA-ABS ต่อการตรวจ • ราย = ๑๔.๕๐ บาท

จากค่าใช้จ่ายของแต่ละวิธีดังกล่าว จะเห็นได้ว่าวิธี indirect ELISA จะมีค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด ซึ่งถ้าใช้วิธีนี้เป็นวิธีตรวจในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป ก็จะทำให้ลดค่าใช้จ่ายได้อย่างมาก เป็นการช่วยประหยัดงบประมาณแผ่นดิน ซึ่งเป็นการช่วยประเทศชาติโดยตรง

๖. เวลาที่ใช้ในการทดลอง

๖.๑ วิธี indirect ELISA ตั้งแต่เริ่มทำการทดลอง จนถึงอ่านผล จะใช้เวลา ๖ ชั่วโมง ๓๐ นาที แต่เนื่องจาก antigen ที่ใช้ coated microhemagglutination plate นั้น เราสามารถเตรียมไว้ได้ก่อนล่วงหน้า จากหน้า ๓๔ ดังนั้นเวลาที่ใช้ทั้งหมดจะใช้เวลา ๓ ชั่วโมง ๓๐ นาที

๖.๒ วิธี TPHA ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนถึงอ่านผลครั้งแรกจะใช้เวลา ๔ ชั่วโมง แต่เนื่องจากต้องอ่านผลครั้งสุดท้ายหลังจากที่ incubate ไว้ ๑๔ ชั่วโมง ดังนั้นจึงทำให้ต้องอ่านผลในวันรุ่งขึ้น

๖.๓ วิธี FTA-ABS ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนถึงอ่านผลจะใช้เวลา ๒ ชั่วโมง

จากเวลาที่ใช้ในการทดลองดังกล่าว จะเห็นได้ว่าถึงแม้ว่าวิธี indirect ELISA จะใช้เวลาในการทดลองมากกว่าวิธี FTA-ABS ก็ตาม แต่ก็ยังนับได้ว่าทำได้รวดเร็วสามารถทำการทดลองและอ่านผลได้ในวันเดียว อีกทั้งยังทำได้สะดวก และสามารถทำการตรวจได้คราวละมาก ๆ โดยทำครั้งเดียวพร้อม ๆ กัน เนื่องจากใช้ microhemagglutination plate ซึ่งแต่ละ plate สามารถตรวจได้ถึง ๔๐ ราย

๗. การแปลผล

๗.๑ วิธี indirect ELISA สามารถทำการแปลผลได้ ๒ วิธีคือ

๗.๑.๑ การอ่านผลด้วยตาเปล่า

โดยดูสีที่เกิดขึ้น สำหรับ alkaline phosphatase enzyme หลังจากใส่ substrate เมื่อเกิดปฏิกิริยา hydrolysis จะให้สีเหลืองเกิดขึ้น (จากไม่มีสี เปลี่ยนเป็นสีเหลือง) ดังนั้นจะแปลผลบวกเมื่อเห็นสีเหลืองเกิดขึ้น และแปลผลลบเมื่อไม่มีสี

๗.๑.๒ การอ่านด้วยเครื่องมือวัด

การอ่านด้วยเครื่องมือวัดเป็นค่าที่แน่นอน จะทำให้ผลที่อ่านได้แน่นอน และแม่นยำสูงกว่าการอ่านด้วยตาเปล่าโดยสามารถใช้เครื่องมือวัด คือ spectrophotometer อ่านค่า Optical density ของสีที่เกิดขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยา hydrolysis ระหว่าง alkaline phosphatase enzyme กับ substrate โดยสามารถแปลผลบวกหรือผลลบเมื่อเปรียบเทียบกับค่า Optical density ที่วัดได้จาก control บวก และ control ลบ

๗.๒ วิธี TPHA อ่านผลโดยดูด้วยตาเปล่า ดูปฏิกิริยาการเกิด agglutination
ดังนั้นจึงต้องอาศัยสายตาของผู้ชำนาญในการอ่านผลพอสมควร

๗.๓ วิธี FTA-ABS อ่านผลโดยดูการเรืองแสง ต้องอาศัยสายตาของผู้ชำนาญในการ
อ่านผล ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะอ่านเป็นมาตรฐานได้เหมือนกันทั้งหมด เนื่องจากขึ้นอยู่กับสายตาของแต่ละ
บุคคล

จากการแปลผลทั้ง ๓ วิธีดังกล่าว จึงสรุปได้ว่าวิธี indirect ELISA นั้น จะให้การแปลผลที่
แน่นอนและแม่นยำกว่าวิธี TPHA และ FTA-ABS เนื่องจากสามารถใช้เครื่องมือวัดเป็นค่าที่แน่นอน
(Objective) ซึ่งผิดกับวิธี TPHA และ FTA-ABS ที่ต้องใช้เฉพาะสายตาของผู้ชำนาญเท่านั้น (Subjective)
และโดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี FTA-ABS นั้นนอกจากจะมีปัญหาเนื่องจากไม่สามารถอ่านเป็นมาตรฐานได้เหมือน
กันทั้งหมดแล้ว ยังมีปัญหาที่สำคัญอีกอันหนึ่งคือ เมื่อผู้อ่านผลด้วยกล้อง fluorescence ประมาณ ๒๐ ราย แล้ว
จะเกิด eye fatigue ขึ้น ทำให้ไม่สามารถอ่านผลคราวละมาก ๆ ได้

โดยสรุปจากข้อดีต่าง ๆ ของวิธี indirect ELISA ดังกล่าว จึงสมควรนำวิธีนี้มาใช้เป็นวิธีหลัก
ในการตรวจน้ำเหลือง เพื่อวินิจฉัยโรคซิฟิลิสระยะต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย