

การวิจัยทางน้ำเหลืองของโรคซิฟิลิส ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนท์ แอสเส



นาย นิพนธ์ อุดมสันติสุข

ศูนย์วิทยพัทยากร
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๒๖

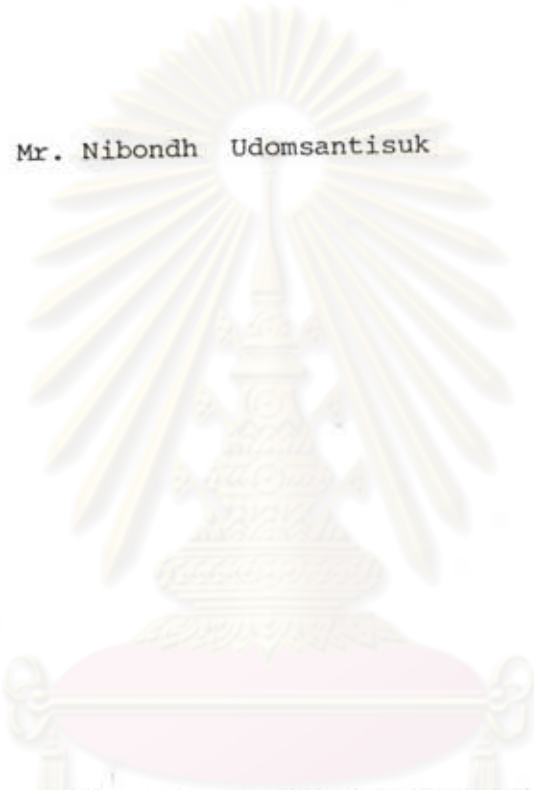
ISBN 974-562-507-8

011272

I15974079

SERODIAGNOSIS OF SYPHILIS BY THE ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY

Mr. Nibondh Udomsantisuk



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University

1983

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การวินิจฉัยทางน้ำเหลืองของโรคซิฟิลิสด้วยวิธี เอนไซม์ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนท์
แอสเส

โดย นายนิพนธ์ ฤกษ์สันติสุข

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สดใส เวชชาชีวะ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ ฤกษ์สุวรรณ



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

สุเมธ ฤกษ์สันติสุข
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประคิษฐ์ บุณนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ดร. วีรพัฒน์
..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สารี วิรุฬหผล)

อ.ณัฐ ฤกษ์สันติสุข
..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรพิน ฤกษ์สันติสุข)

อ.ณัฐ ฤกษ์สันติสุข
..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ ฤกษ์สุวรรณ)

อ.ณัฐ ฤกษ์สันติสุข
..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สดใส เวชชาชีวะ)

ศูนย์วิทยุทันตวิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวินิจฉัยทางน้ำเหลืองของโรคซิฟิลิสด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนท์ แอสเส
ชื่อ	นาย นิพนธ์ อุดมสันติสุข
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสทไล เวชชาชีวะ
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ อุดมสุวรรณ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	๒๕๒๔



บทคัดย่อ

แพทย์ใช้อาการทางคลินิก ประวัติผู้ป่วย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นหลักในการวินิจฉัยโรคซิฟิลิสระยะต่าง ๆ แต่เนื่องจากผู้ป่วยจะมีอาการแตกต่างกันมากในโรคซิฟิลิสระยะแรก (primary syphilis), ระยะหลัง (late syphilis) รวมทั้งระยะแฝง (latent syphilis) คือเมื่อเกิดเป็นแผลแล้วแผลสามารถหายได้เอง หรือการไม่เกิดเป็นแผลแสดงให้เห็น ทำให้เป็นการยากสำหรับแพทย์ที่จะวินิจฉัยโรคนี้ได้อย่างถูกต้อง การตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะการตรวจทางน้ำเหลืองเพื่อหา แอนติบอดีต่อเชื้อ Treponema pallidum นับว่าเป็นวิธีที่สำคัญมากที่จะช่วยในการวินิจฉัยโรคนี้ ในปัจจุบันใช้วิธี fluorescent treponemal antibody —absorption (FTA-ABS) และวิธี Treponema pallidum hemagglutination (TPHA) เพราะเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยาสูง แต่ทั้งสองวิธีนี้ก็ยังมีข้อเสียอยู่บางประการ อาทิเช่น ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ, ใช้เวลานาน และต้องใช้ผู้ชำนาญในการทำ Veldkamp และคณะ (1975, Brit.J.Vener.Dis., 51,227) ได้รายงานผลการทดลองโดยใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าจะให้ผลความจำเพาะและความไวของปฏิกิริยาเท่ากับวิธี FTA-ABS

ดังนั้นในวิทยานิพนธ์นี้จึงได้นำวิธี indirect ELISA ซึ่งทำตามวิธีของ Voller และคณะ (1976, Bull.Wld.Hlth.Org., 53,55) มาทดลองกับน้ำเหลืองของผู้ป่วยจำนวน ๑๐๐ ราย ที่เก็บจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เพื่อเปรียบเทียบกับวิธี FTA-ABS และ TPHA

ผลการทดลองพบว่าวิธี indirect ELISA นี้จะให้ผลของความจำเพาะและความไวของปฏิกิริยาดีกว่าวิธี FTA-ABS และ TPHA ในโรคซิฟิลิสระยะแรก และให้ผลเท่ากับวิธี FTA-ABS และ TPHA ในโรคซิฟิลิสระยะที่สอง และระยะหลังโดยให้ผลสัมพันธ์กับอาการทางคลินิกอย่างดียิ่ง ดังนั้นจึงเห็นสมควรที่จะนำวิธีนี้มาใช้เป็นวิธีการตรวจเป็นประจำตามห้องปฏิบัติการทั่วไป เพราะนอกจากจะให้ผลถูกต้องดังกล่าวแล้ว วิธีการทำง่าย ไม่ต้องใช้ผู้ชำนาญและเครื่องมือพิเศษแต่อย่างใด

Thesis Titla Serodiagnosis of syphilis by the enzyme-linked
 immunosorbent assay

Name Mr. Nibondh Udomsantisuk

Thesis Advisor Professor Sodsai Vejajiva, M.D.
 Assistant professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.

Department Microbiology

Academic Year 1982



ABSTRACT

Clinical manifestations, patients' history and laboratory testing have long been used in the diagnosis of syphilis in various stages. Despite the diversity in clinical sign of patient in primary, late including latent stage of syphilis, the recovery without treatment or no clinical sign of patient, had caused the difficulty for physician to diagnose it accurately. In laboratory testing especially serologic test to find the antibody against Treponema pallidum is the very important method in the diagnosis of this disease.

Though Fluorescent treponemal antibody —absorption test (FTA-ABS) and Treponema pallidum hemagglutination test (TPHA) are the widely used methods nowadays due to their high sensitivity and specificity, both methods have some disadvantages and limitations such as performer skill, time - consuming and sophisticated equipments. Veldkamp et al., reported that the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was as sensitive and specific for syphilis as FTA-ABS (1975, Brit. J. Vener. Dis. 51,227)

The present thesis have performed Inderect ELISA in the diagnosis of syphilis compared with FTA-ABS and TPHA.

One hundred serum samples from patients, clinically proved to have syphilis, were collected from Chulalongkorn hospital. Indirect ELISA was performed according to the method described by Voller et al., (1976, Bull. Wld. Hlth. Org., 53,54).

Experimental results showed that indirect ELISA gave excellent and good co-relation with patient symptom and same sensitivity and specificity in secondary and late stages; but better than in primary stage when compared with both FTA-ABS and TPHA. The method's simplicity, less performer skill and instrumentation, is recommended for routine diagnosis of syphilis in any laboratories.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ



วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยความกรุณาอย่างดียิ่งของศาสตราจารย์แพทย์หญิงสทิส เวชชาชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ อุงสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรพิน ฤกษ์ชื่น ที่ได้ให้คำแนะนำปรึกษาต่าง ๆ จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ ข้าพเจ้าขอความขอบพระคุณ มา ณ.ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณ อาจารย์ผกาทิพย์ อุดมสันติสุข อาจารย์วิศมยะ พันธุ์ม่วง คุณศนัย พรเจริญ คุณวรัญชัย ชูดีวรรณวงศ์ และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ได้ให้กำลังใจ และมีส่วนในการช่วยเหลืออย่างมาก

ขอขอบคุณ หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาต ให้ใช้ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ ในการทดลองตลอดจนผู้ร่วมงานในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความร่วมมืออย่างดียิ่ง

และขอขอบคุณ คุณวัลภา แก้วโมรา ที่ช่วยพิมพ์วิทยานิพนธ์นี้จนสำเร็จเรียบร้อย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ข
รายการตารางประกอบ.....	ฉ
รายการรูปประกอบ.....	ฉ
อธิบายคำย่อ.....	สี
บทที่	
๑. บทนำ.....	๑
๒. วัสดุ, อุปกรณ์ และวิธีการ.....	๓๔
๓. ผลการทดลอง.....	๔๔
๔. วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง.....	๕๕
เอกสารอ้างอิง.....	๖๒
ประวัติ.....	๖๗

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
๑	แสดงจำนวนผู้ป่วยกามโรคจำแนกตามชนิดของกามโรค..... ๒
๒	แสดง incidence rate of early syphilis in Thailand 1957-1980 ๓
๓.	แสดงจำนวนผู้ป่วยกามโรคจำแนกตามกลุ่มอายุ..... ๔
๔	แสดงจำนวนการตรวจทางน้ำเหลืองสำหรับโรคซิฟิลิสจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์.. ๔
๕	แสดงวิธีการอ่านผลโดยใช้ photometer ด้วยวิธี indirect ELISA..... ๒๘
๖	แสดงผลการทำ checkerboard titration ระหว่าง treponemal antigen และ reference sera โดยอ่านค่า OD ที่ ๔๐๕ nm..... ๔๓
๗	แสดงผลการวัด OD จากน้ำเหลืองของผู้ป่วยในระยะต่าง ๆ ของโรค และจาก น้ำเหลืองของคนปกติ..... ๔๘
๘	แสดงผลการทดลองโดยวิธี indirect ELISA..... ๕๑
๙	แสดงผลการทดลองการวินิจฉัยโรคซิฟิลิสระยะต่าง ๆ จากน้ำเหลืองของผู้ป่วย ด้วยวิธี TPHA,FTA-ABS และ indirect ELISA..... ๕๓
๑๐	แสดงผลการวัด OD จากน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการของโรคซิฟิลิสแต่ ให้ผล VDRL reactive ด้วยวิธี indirect ELISA..... ๕๔
๑๑	แสดงผลการทดลองจากน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการของโรคซิฟิลิส แต่ให้ผล VDRL reactive ด้วยวิธี TPHA,FTA-ABS และ indirect ELISA..... ๕๔

คู่มือวิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
๑	แสดงรูป <u>T.pallidum</u> จาก dark field microscope..... ๖
๒.	แสดงรูป primary syphilis..... ๘
๓	แสดงรูป secondary syphilis..... ๑๐
๔	แสดงรูป late syphilis..... ๑๒
๕	แสดงรูป early และ late congenital syphilis..... ๑๓
๖	แสดงขั้นตอนการทดสอบทางน้ำเหลืองของโรคซิฟิลิสด้วยวิธี non-treponemal และ treponemal..... ๑๗
๗	แสดงจำนวนความเข้มข้นของ conjugate ที่มีผลต่อเวลา ที่ใช้ incubate..... ๒๖
๘	แสดงวิธีหา antigen ด้วยวิธี double antibody sandwich ELISA..... ๒๘
๙	แสดงวิธีหา antibody ด้วยวิธี indirect ELISA ๓๐
๑๐	แสดงวิธีหา antigen ด้วยวิธี competitive method of ELISA..... ๓๑
๑๑	แสดงวิธีหา antigen ด้วยวิธี modified method of ELISA..... ๓๒
๑๒	แสดงผลการวัด OD ในการหา working strength ของ conjugate..... ๔๑
๑๓	แสดงผลการวัด OD ในการทำ checkerboard titration ระหว่าง treponemal antigen และ reference sera..... ๔๓
๑๔	แสดงผลการทดลองโดยวิธี indirect ELISA โดยใช้ microhemagglutination plate..... ๔๔
๑๕	แสดง <u>T.pallidum</u> ที่เรืองแสงเมื่อดูด้วยกล้อง fluorescent ด้วยวิธี FTA-ABS... ๔๗
๑๖	แสดงการเกิด agglutination ของ sheep RBC ด้วยวิธี TPHA ๔๘
๑๗	แสดงผลการวัด OD จากน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสระยะต่าง ๆ และ จากน้ำเหลืองของคนปกติ ๕๐

อธิบายคำย่อ

ART	=	automated reagin test
CSF	=	cerebro spinal fluid
°C	=	degree celcius
D.W.	=	distill water
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
FTA-ABS	=	fluorescent treponemal antibody-absorption
g	=	gram
G	=	force of gravity
IgG	=	immunoglobulin G
IgM	=	immunoglobulin M
KH _z	=	kilohertz
M	=	molarity
mg	=	milligram (10 ⁻³ gram)
ml	=	milliliter
ug	=	microgram (10 ⁻⁶ gram)
um	=	micrometer (10 ⁻⁶ meter)
ng	=	nanogram (10 ⁻⁹ gram)
nm	=	nanometer (10 ⁻⁹ meter)
O.D.	=	optical density
PBS	=	phosphate buffer saline
%	=	percent
RPR	=	rapid plasma reagin
RBC	=	red blood cell
RPCF	=	reiter protein complement fixation
rpm	=	round per minute
TPHA	=	<u>Treponema pallidum</u> hemagglutination
TPI	=	<u>Treponema pallidum</u> immobilization
w	=	watt

