






แผนกพยาธิวิทยา  
โรงพยาบาลค่ายกษณีสีวะรา


วิธีปฏิบัติงาน  
เรื่อง การตรวจ Treponema pullidum Ab (Anti-TP)  
WI-LAB-060  
แก้ไขครั้งที่ 5

ผู้จัดทำ ร.ต.   
(ศาสตรศิลป์ ไชยพงศ์)  
ผู้จัดการวิชาการสาขาภูมิคุ้มกันวิทยา  
1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้ทบทวน ร.ท.หญิง   
(อรกัญญา ทรงทอง)  
ผู้จัดการคุณภาพ  
1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้อนุมัติ พ.อ.   
(ฉัตรมงคล คนขยัน)  
หัวหน้าห้องปฏิบัติการ  
1 กุมภาพันธ์ 2566

วันที่ประกาศใช้: 1 กุมภาพันธ์ 2566

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สุวรา		
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ Treponema pallidum Ab (Anti-TP)		
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-060	หน้า 1 จาก 7 หน้า	
	แก้ไขครั้งที่ : 5	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566	

### 1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ

เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Treponema pallidum* (Anti-TP) ชนิด IgG และ IgM ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วย ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบหนึ่งในหลายวิธีที่ช่วยในวินิจฉัยการติดเชื้อซิฟิลิส

### 2. หลักการและวิธีการของขั้นตอนที่ใช้สำหรับการทดสอบ

ชุดทดสอบ Bioline Syphilis 3.0 (Abbott) เป็น Qualitative membrane strip ใช้หลักการทาง immunoassay เพื่อตรวจหา *Treponema pallidum* antibodies (IgG ,IgA & IgM) ใน whole blood, serum หรือ plasma โดยการทดสอบ จะใช้เส้นแสดงปฏิกิริยา 2 เส้น โดยเส้นที่อยู่ด้านใกล้จุดที่หยดตัวอย่าง จะเป็นเส้นทดสอบ และอีกเส้นถัดไปด้านปลายจะเป็นเส้นควบคุม โดยจุดที่จุ่มตัวอย่างจะเคลือบไว้ด้วย Syphilis antigen ถ้าในตัวอย่างมี TP antibodies (IgG ,IgA & IgM) จะเกิดปฏิกิริยากับ Syphilis antigen และเคลื่อนที่ต่อไปถึงเส้นทดสอบซึ่งเคลือบไว้ด้วย recombinant Syphilis antigen เช่นเดียวกัน เกิดเป็นโมเลกุลของ complex ตรึงอยู่กับที่ สังเกตเห็นเป็นเส้นสี ในขณะที่เดียวกัน Syphilis antigen-particle ส่วนหนึ่งก็จะเคลื่อนที่ไปถึงแถบควบคุมซึ่งเคลือบด้วย anti-mouse antigen ซึ่งจะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับ Syphilis antigen ถ้าในตัวอย่างตรวจมี TP antibodies (IgG ,IgA & IgM) จะปรากฏเส้นสีทดสอบ 2 แถบ แสดงว่าเป็นผลบวก ถ้าในตัวอย่างตรวจไม่มี TP antibodies (IgG ,IgA & IgM) จะเกิดเส้นสี 1 เส้น ที่แถบควบคุมแสดงว่าเป็นผลลบ ถ้าไม่มีแถบสีหรือเกิดแถบเดียวที่แถบทดสอบ แสดงว่าไม่สามารถแปลผลการทดสอบได้

### 3. ลักษณะทางประสิทธิภาพ


คุณลักษณะและความสามารถของแถบทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยใช้กลุ่มตัวอย่างทั้งสิ้น 363 ตัวอย่าง ได้ผล คือ ความจำเพาะ (specificity) 99.5% และความไว (sensitivity) 99.3%

Reference		Bioline Syphilis 3.0		Total Results
Method	Results	Positive	Negative	
TPHA Results	Positive	152	1	153
	Negative	1	209	210
Sensitivity (95% CI)		99.3% (96.4-99.9%)		
Specificity (95% CI)		99.5% (97.4-99.9%)		

\*Relative sensitivity : 99.3% (152/153) \*Relative specificity : 99.5 (209/210)

### 4. ประเภทของกลุ่มตัวอย่าง

- 4.1. ตัวอย่างเริ่มต้น (primary sample) ได้แก่ เลือด (Blood)
- 4.2. ชนิดตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ (analytical sample) คือ Serum หรือ Plasma ที่ไม่มี Hemolysis และไม่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย
- 4.3. Serum หรือ Plasma ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C คงสภาพได้นาน 3 วัน หากเกินกว่านี้ไม่ควรนำมาตรวจวิเคราะห์ ถ้าจะเก็บไว้ให้คงสภาพนานเกิน 2 สัปดาห์ ให้เก็บแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สุวรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ Treponema pullidum Ab (Anti-TP)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-060	หน้า 2 จาก 7 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 5	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

4.4. Serum หรือ Plasma ที่มีการแช่แข็งจะต้องนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง และต้องให้ละลายและทำการ mix ให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนทำการทดสอบและหำนำไปแช่แข็งซ้ำ

## 5. การเตรียมผู้ป่วย

การตรวจ Anti-TP ไม่จำเป็นต้องอดอาหารก่อนเจาะเก็บตัวอย่างเลือด แต่ถึงแม้ว่าเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดหรืออาหารที่รับประทานจะไม่มีผลกระทบต่อผลการตรวจ Anti-TP แต่ความชุ่มชื้นของไขมัน (chylomicrons) ในอาหารมีผลกระทบต่อวิธีที่ใช้วิเคราะห์รายการทดสอบอื่นๆ ที่ใช้ตัวอย่างตรวจร่วมกันกับ Anti-TP การอดอาหาร 8-16 ชั่วโมง จะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้องน่าเชื่อถือกว่า

## 6. ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่ง

- 6.1 หลอดบรรจุเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง (Serum tube : จุกแดง) ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างเลือดของคนไข้ที่ส่งมาจากแผนกตรวจโรคผู้ป่วยนอก,ห้องฉุกเฉิน,หอผู้ป่วยใน,ห้องไตเทียมและห้องตรวจสุขภาพ
- 6.2 หลอดบรรจุเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง (Serum Gel tube : จุกเหลือง) ใช้ในกรณีที่ไม่ได้เก็บตัวอย่างเลือดจาก ข้อ 6.1
- 6.3 Lithium heparin Blood collection tube ใช้ในกรณีที่ไม่ได้เก็บตัวอย่างเลือดจาก ข้อ 6.1
- 6.4 EDTA Blood collection tube ใช้ในกรณีที่ไม่ได้เก็บตัวอย่างเลือดจาก ข้อ 6.1
- 6.5 Sodium Citrate Blood collection tube ใช้ในกรณีที่ไม่ได้เก็บตัวอย่างเลือดจาก ข้อ 6.1


## 7. เครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นและสารเคมี

- 7.1. อุปกรณ์ที่มาพร้อมกับชุดทดสอบ Biotec Syphilis 3.0 (Abbott) Syphilis Anti-TP Test ประกอบไปด้วย
  - 7.1.1 แลบทดสอบ ประกอบด้วย Syphilis antigen coated particles และ Syphilis antigen ที่เคลือบอยู่
  - 7.1.2 สารละลายบัฟเฟอร์
  - 7.1.3 หลอดหยด
  - 7.1.4 เอกสารกำกับการใช้งาน
- 7.2. Auto pipette 10 ul และ Pipette tip
- 7.3. นาฬิกาจับเวลา

## 8. สิ่งแวดล้อมและการควบคุมความปลอดภัย

- 8.1. ต้องสวมถุงมือยางและเสื้อคลุมขณะปฏิบัติงานเพื่อป้องกันการติดเชื้อบางชนิดที่อาจปนเปื้อนมากับตัวอย่างตรวจ
- 8.2. ชุดทดสอบเก็บที่อุณหภูมิ 2-30 องศาเซลเซียส ในที่แห้ง ห้ามใช้แลบทดสอบที่หมดอายุ และห้ามเก็บใน Freezer เด็ดขาด
- 8.3. อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบ ใช้ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขล่าสุด

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ Treponema pullidum Ab (Anti-TP)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-060	หน้า 3 จาก 7 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 5	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

## 9. ขั้นตอนการสอบเทียบ

ไม่มี

## 10. ขั้นตอนของกระบวนการนำ

10.1 ชุดทดสอบและสิ่งอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องมาตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อน นำทดสอบออกจากช่องกันความชื้น (ควรทดสอบทันทีหลังเปิดซอง)

10.2 เปิดซีรัม หรือ พลาสมาหรือ whole blood ด้วย Autopipette หยดลงไปในบริเวณพื้นที่หยดตัวอย่าง 10 uL

10.3 หยด Diluent 4 หยด (ประมาณ 120 uL) ลงในพื้นที่หยดตัวอย่างเดียวกัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

10.4 อ่านผลการทดสอบภายใน 5-15 นาที โดยห้ามอ่านผลหลังจาก 20 นาที

## 11. ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ

11.1 การควบคุมคุณภาพภายใน

11.1.1 ทำ IQC ทุกเดือนหรือทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนน้ำยากล่องใหม่หรือขึ้น Lot ใหม่ แล้วแต่อย่างใดอย่างหนึ่งถึงก่อน โดยใช้สารควบคุมคุณภาพ 2 แหล่ง คือ 1. ชุดน้ำยาควบคุมคุณภาพภายใน สำหรับชุดตรวจ Bioline Syphilis 3.0 (สนับสนุนโดยบริษัท Mp group) และ ชุดน้ำยาควบคุมคุณภาพ Serogens Control Syphilis ประกอบด้วย 2 ระดับ คือ Negative และ Positive ก่อนทำการทดสอบกับ serum หรือ plasma ของผู้ป่วยหรืออาจทำไปพร้อมกันก็ได้

11.2 การควบคุมคุณภาพจากองค์กรภายนอก

11.2.1 เข้าร่วมโครงการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ สาขาภูมิคุ้มกันวิทยา โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีละ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ตัวอย่าง รวม 6 ตัวอย่าง

## 12. สิ่งรบกวน


12.1 Serum Hemolysis ไม่ควรใช้ ทำให้อ่านผลผิดพลาด

## 13. หลักการของขั้นตอนการคำนวณเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ รวมทั้งที่เกี่ยวข้องอาทิความไม่แน่นอนของการวัด

ไม่มี

## 14. ช่วงอ้างอิงทางชีวภาพหรือค่าการตัดสินใจทางคลินิก

ค่าอ้างอิงของคนที่ไม่ติดเชื้อ/ไม่เคยติดเชื้อซิฟิลิส Treponemal Ab = Negative

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา		
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ Treponema pullidum Ab (Anti-TP)		
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-060	หน้า 4 จาก 7 หน้า	
	แก้ไขครั้งที่ : 5	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566	

### 15. ช่วงที่รายงานผลการทดสอบได้

รายงานผลทางระบบ LIS/HIS พร้อมกับพิมพ์ใบรายงานผลส่งมอบให้กับหน่วยงานที่ส่งตรวจ โดยข้อความที่ใช้คือ Negative และ Positive

Test	การอ่านผล		
	Test line	Control line	ผลการตรวจ
Anti -TP	ไม่มี	มี	Negative
	มี	มี	Positive

### 16. คำแนะนำสำหรับการพิจารณาผลเชิงปริมาณเมื่อผลไม่ได้อยู่ในช่วงการวัด

ไม่มี

### 17. ค่าวิกฤติ/ค่าแจ้งเตือน/ที่เหมาะสม

ไม่มี

### 18. การแปลผลทางคลินิกของห้องปฏิบัติการ


ผล Negative : คนที่ไม่ติดเชื้อ/ไม่เคยติดเชื้อซิฟิลิส

ผล Positive : คนที่ติดเชื้อ/เคยติดเชื้อซิฟิลิส

ผลการตรวจต้องได้รับการแปลผลด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากปัญหาในด้านความไวและความจำเพาะของวิธีการทดสอบ ในการวินิจฉัยหรือติดตามการรักษาการติดเชื้อซิฟิลิส ต้องตรวจด้วยวิธีอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น TPHA, FTA-ABS IgG/IgM เป็นต้น

การตรวจคัดกรองหรือการตรวจวินิจฉัย โรคซิฟิลิสด้วยการตรวจหาแอนติบอดีนั้น จำเป็นต้องใช้วิธีการตรวจทั้งในกลุ่ม Non treponemal test (NTT) และ Treponemal test (TT) ร่วมกัน โดยตรวจตามลำดับขั้นตอนเพื่อคัดกรอง และยืนยันหรือสนับสนุนผลตรวจคัดกรอง ปัจจุบันทำได้ 2 แบบ คือ ลำดับขั้นตอนการตรวจแบบดั้งเดิม (traditional algorithm) และลำดับขั้นตอนการตรวจแบบย้อนทาง (reverse algorithm)

การพิจารณาว่าจะเลือกใช้ลำดับขั้นตอนการตรวจแบบใดนั้น ต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายด้าน เช่น ความชุกในประชากรกลุ่มที่จะตรวจ ต้นทุนการตรวจและการดูแล รักษาต่อเนื่องต่อราย รวมไปถึงประสิทธิภาพในการตรวจ แต่สำหรับในประเทศไทยที่ตั้งเป้าหมายไว้ว่าจะลดการแพร่ระบาดของโรคซิฟิลิสลงให้ได้มากที่สุด และลดจำนวนผู้ป่วยโรคซิฟิลิสแต่กำเนิด (congenital syphilis) ลงจนหมด จึงให้ความสำคัญกับปัจจัยด้านประสิทธิภาพเป็นหลัก สนับสนุนให้ห้องปฏิบัติการเลือกใช้ลำดับขั้นตอน การตรวจแบบย้อนทาง และได้กำหนดลำดับขั้นตอนสำหรับการตรวจหาแอนติบอดี ต่อโรคซิฟิลิสในกลุ่มบุคคลต่างๆ

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ Treponema pullidum Ab (Anti-TP)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-060	หน้า 5 จาก 7 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 5	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

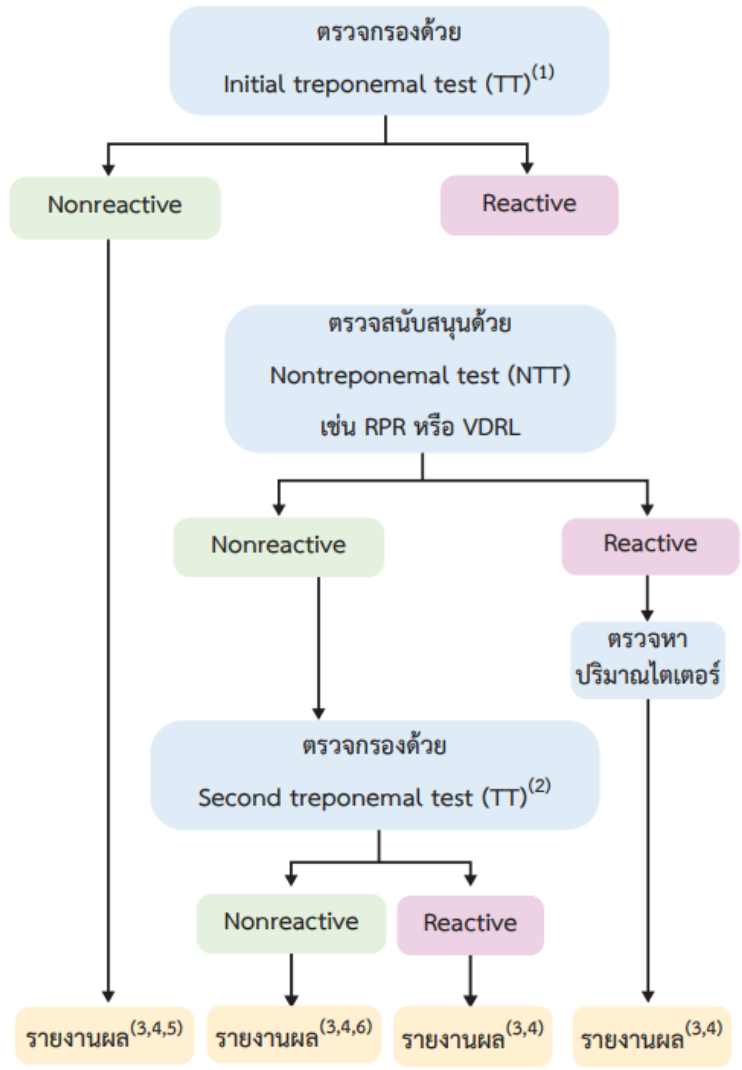
ลำดับขั้นตอนการตรวจแบบย้อนทาง (Reverse algorithm) ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีตรวจ TT ด้วยเครื่องอัตโนมัติ (automated immunoassay) หลักการ เช่น chemiluminescent immunoassay (CLIA) หรือ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) รวมไปถึงวิธีการตรวจที่ให้ผลรวดเร็ว (rapid diagnostic test, RDT) ที่ใช้หลักการ immunochromatographic assay (ICA) ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูง ทั้งยังทำงานและสะดวกสบายกว่าวิธี TT แบบเดิม (conventional TT) เช่น TPHA หรือ TPPA หรือ FTA-ABS จึงมีการดัดแปลงลำดับขั้นตอนการตรวจใหม่ที่เริ่มต้นตรวจด้วย TT ซึ่งย้อนทางจากลำดับขั้นตอนแบบดั้งเดิมที่เริ่มต้นตรวจด้วย NTT

เริ่มต้นตรวจกรองด้วย TT ชนิดแรก (initial TT) ก่อน ตามลำดับ ขั้นตอนในแผนภูมิที่ 4.2

- ถ้าตรวจกรองด้วย initial TT แล้วไม่เกิดปฏิกิริยา (nonreactive) จะถือว่า ตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อโรซิฟิลิสและรายงานผลได้ แต่
- ถ้าตรวจกรองด้วย initial TT แล้วเกิดปฏิกิริยา (reactive) ให้ตรวจ NTT สนับสนุนเพิ่มเติมเพื่อประเมินระยะโรคประกอบ
  - o ถ้า NTT เกิดปฏิกิริยา (reactive) ต้องตรวจหาปริมาณไตเตอร์ต่อ แล้วรายงานผลได้ แต่
  - o ถ้า NTT ไม่เกิดปฏิกิริยา (nonreactive) จะต้องตรวจ TT ชนิดที่ 2 เพื่อเติม (second TT) ด้วยวิธี conventional TT เพื่อยืนยันผลก่อนรายงาน ผล เนื่องจาก initial TT มีความไวสูงอาจให้ผลบวกปลอมได้



**แผนภูมิที่ 4.2**  
**ลำดับขั้นตอนการตรวจแบบย้อนทาง (Reverse Algorithm)**




**19. แหล่งที่มาของค่าแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้น**

19.1 Reagent

- ความชื้นและอุณหภูมิมีผลต่อการทดสอบ
- เสื่อมสภาพหรือหมดอายุ

19.2 การอ่านผลด้วยสายตา

- การอ่านผลไม่ครบเวลาหรือเกินเวลาที่กำหนด

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ Treponema pullidum Ab (Anti-TP)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-060	หน้า 7 จาก 7 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 5	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

## 20. เอกสารอ้างอิง

- 20.1. ใบแทรกน้ำยา Bioline Syphilis 3.0 (Abbott) Syphilis Anti-TP Test (PI-Lab-060)





**ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ**

ชื่อเอกสาร.....WI-LAB-060.: วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจ Treponema pullidum Ab.(Anti-TP)

วัน/เดือน/ ปี	ฉบับแก้ไข ครั้งที่	รายละเอียด	ลงชื่อ
1 ต.ค.60	0	ฉบับแรก	ร.อ.หญิงอนิสา
1 ต.ค. 61	1	ทบทวนแล้วไม่มีการแก้ไข	นายศาสตร์ศิลป์
11 พ.ย. 62	2	ทบทวนแล้วไม่มีการแก้ไข	นายศาสตร์ศิลป์
1 พ.ย. 63	3	แก้ไข ข้อ 11 ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ 11.1.1 เพิ่มตัวอย่างการควบคุมคุณภาพภายในเป็น 2 ชุด ประกอบด้วย 1. ชุดน้ำยาควบคุมคุณภาพ ภายใน สำหรับชุดตรวจ SD Bioline syphilis 3.0 และ 2.ชุดน้ำยาควบคุมคุณภาพ Serogens control syphilis	ร.ต.ศาสตร์ศิลป์
1 ก.ย. 64	4	ทบทวนแล้วไม่มีการแก้ไข	ร.ต.ศาสตร์ศิลป์
1 ก.พ. 66	5	- เปลี่ยนชุดทดสอบเป็น Bioline syphilis 3.0 (Abbott) - ยกเลิกการเข้าร่วมโครงการประเมินคุณภาพ ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาโดยองค์กรภายนอก (EQAI) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปีละ 4 ครั้ง ครั้งละ 4 ตัวอย่าง รวม 16 ตัวอย่าง - เพิ่มแนวทางการตรวจคัดกรองหรือการตรวจ วินิจฉัย โรคซิฟิลิสด้วยการตรวจหาแอนติบอดี ลำดับ ขั้นตอนการตรวจแบบย้อนทาง (Reverse algorithm)	ร.ต.ศาสตร์ศิลป์