



วิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

วิระชัย สายจันทา^{1*}, ชัยรัตน์ ตันกราววัฒน์²

บทคัดย่อ

พยาธิใบไม้ตับในวงศ์ Opisthorchiidae ที่สำคัญทางการแพทย์มีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felinus* และ *Opisthorchis viverrini* โดยมีรายงานการติดเชื้อในประชากรทั่วโลกกว่า 40 ล้านคน และมากกว่า 700 ล้านคน ที่มีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเหล่านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพยาธิ *O. viverrini* นั้นเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี จึงถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็งชนิดที่ 1 ปัจจุบันนี้ยังไม่สามารถที่จะตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเบื้องต้นได้อย่างแม่นยำ ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักมาพบแพทย์หลังจากเป็นมะเร็งระยะรุนแรงแล้ว และมักจะเสียชีวิตหลังจากนั้นภายใน 3 ถึง 6 เดือน พยาธิ *O. viverrini* นี้ระบาดอยู่ในประเทศแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศไทยพบมีการติดเชื้อสูงกว่า 9 ล้านคน จึงทำให้ประเทศไทยสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาและควบคุมป้องกันโรคพยาธิใบไม้ตับนี้กว่า 120 ล้านบาทหรือยุทธศาสตร์ต่อปี วิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่มีความถูกต้องและความไวสูงจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการควบคุม ป้องกัน และรักษาโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีอยู่ 3 วิธี โดยวิธีที่ถือเป็นมาตรฐานคือวิธีการทางปรสิตวิทยา ซึ่งอาศัยหลักการตรวจหาระยะวินิจฉัย เช่น ไข่พยาธิในอุจจาระผู้ติดเชื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์เป็นหลัก แต่เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะต่ำ เนื่องจากมีข้อจำกัดของทักษะและความชำนาญในการจำแนกลักษณะของไข่พยาธิ ดังนั้นวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันและวิธีการตรวจทางอณูชีววิทยาจึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อช่วยตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ให้มีความไวและความจำเพาะมากขึ้น บทความฉบับนี้ได้รวบรวมข้อมูลการตรวจวินิจฉัยพยาธิใบไม้ตับโดยวิธีทางปรสิตวิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยา และอณูชีววิทยา เพื่อเป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: โรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*, วิธีการตรวจวินิจฉัย

¹สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

²สาขาเซลล์วิทยา สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*ผู้รับผิดชอบบทความ



Diagnostic tools for human opisthorchiasis

Weerachai Saijuntha^{1*}, Chairat Tantrawatpan²

Abstract

Liver flukes of the family Opisthorchiidae consist of three medically important species, namely *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini*. These liver flukes infect at least 40 million people and estimated 700 million people worldwide are at risk of being infected. Of the three currently recognized species, only *O. viverrini* is classified as a type 1 carcinogen because of its role as an initiator of chronic inflammation leading to subsequent development of cholangiocarcinoma (CCA). At present, there is no early diagnosis of CCA, the patients usually come to the doctor with advanced stages and die within 3 - 6 months. Importantly, this species of liver fluke is most commonly found in Southeast Asia. Especially, an estimated 9 million people are infected in Thailand, that the cost of treatment of opisthorchiasis is approximately \$120 million dollars annually for lost wages and medical care. High accuracy and sensitivity diagnostic methods are therefore required for efficient control, prevention and treatment of opisthorchiasis. To date, there are three main methods for opisthorchiasis diagnosis, i.e. parasitological method, which is standard method for microscopy-based identification of diagnosis stage such as egg in fecal sample. However, its sensitivity and specificity are low due to limitations of skill and expert of distinguishing egg morphology. Thus, immunological methods and molecular methods to identify the opisthorchiasis were developed to improve sensitivity and specificity of diagnostic tools. This review article aims to compile all opisthorchiasis diagnostic methods in order to obtain the suitable guideline for the effective diagnosis of opisthorchiasis.

Key words: Opisthorchiasis, *Opisthorchis viverrini*, Diagnostic method

¹Walai Rukhvej Botanical Research Institute (WRBRI), Mahasarakham University

²Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University

* Corresponding author (e-mail: weerachai.s@msu.ac.th)

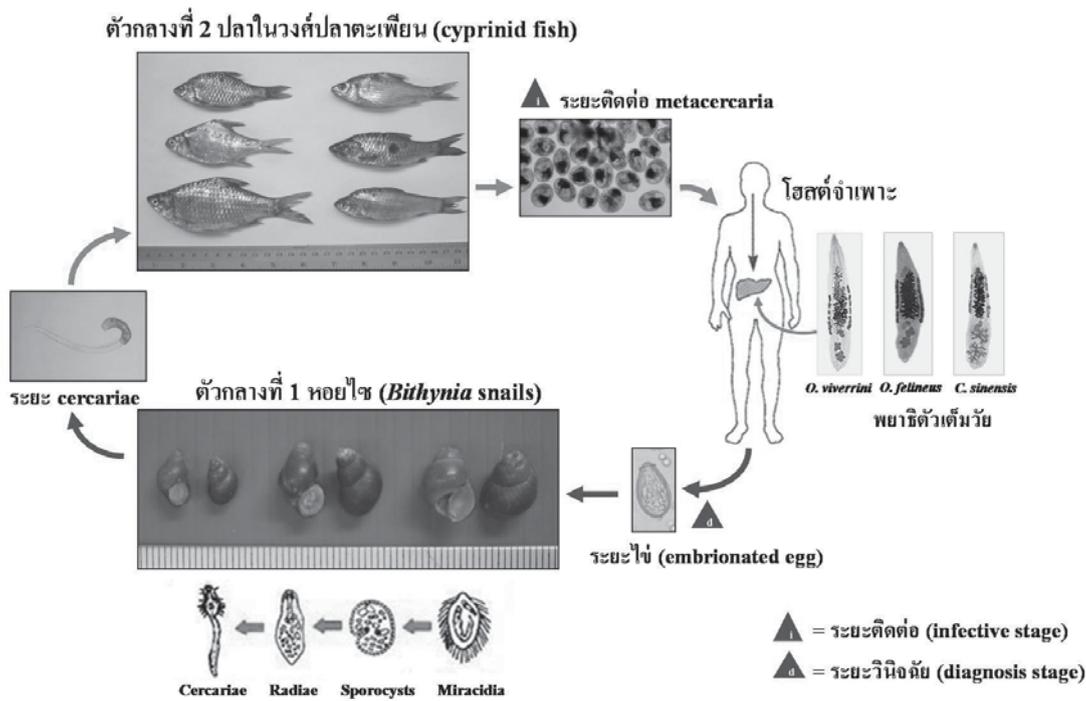
พยาธิใบไม้ตับ

พยาธิใบไม้ตับในวงศ์ Opisthorchiidae ที่สำคัญทางการแพทย์มี 3 ชนิด ได้แก่ พยาธิใบไม้ตับ *Clonorchis sinensis* ระบาดอยู่ในประเทศจีน เกาหลี ไต้หวัน และทางตอนเหนือของเวียดนาม พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis felinus* ระบาดในประเทศแถบทวีปยุโรปตะวันออก และพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ระบาดในประเทศไทย ลาว กัมพูชา และเวียดนามตอนกลาง^(1,2) พยาธิตัวเต็มวัยจะมีสองเพศในตัวเดียวกัน (hermaphrodite) ลำตัวแบนคล้ายใบไม้ วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับเหล่านี้ (รูปที่ 1)⁽³⁾ ต้องอาศัยพาหะตัวกลาง 3 ชนิด โดยหอยไซ (Bithynia spp) เป็นพาหะตัวกลางที่ 1 (first intermediate host) ไข่ของพยาธิที่มีระยะตัวอ่อนอยู่ใน (embryonated egg) ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำ จากนั้นตัวอ่อนจะฟักออกจากไข่ พัฒนาและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศจนกลายเป็นระยะเซอร์คาเรีย (cercariae) และออกจากหอยตัวกลางที่ 1 เข้าสู่ตัวกลางที่ 2 (second intermediate host) เป็นปลาในวงศ์ปลาตะเพียนกว่า 18 ชนิด ได้แก่ ปลาตะเพียน ปลากะสูบ ปลาช่อน⁽¹⁾ เป็นต้น จนพัฒนาไปเป็นระยะติดต่อ metacercariae อยู่ในปลาเหล่านั้น และเมื่อสัตว์มีกระดูกสันหลังเช่น สุนัข แมว รวมทั้งมนุษย์ซึ่งเป็นพาหะสุดท้าย (final host) กินปลาดิบที่ปนเปื้อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับจะพัฒนากลายเป็นพยาธิตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในท่อน้ำดีต่อไป⁽¹⁾ โดยพยาธิตัวแก่จะอาศัยอยู่ในท่อน้ำดีของมนุษย์ได้นานกว่า 25 ปี⁽⁴⁾

โรคพยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchiasis)

โรคพยาธิใบไม้ตับยังมีการระบาดและเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของหลายประเทศ โดยพบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับทั้ง 3 ชนิดนี้รวมกว่า 40 ล้านคน และมีผู้ที่มีความเสี่ยงในการติดเชื้ออีกมากกว่า 700 ล้านคนทั่วโลก^(5,6) การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับอาจไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ ในกรณี

ที่ติดเชื้อในปริมาณน้อย ขณะเดียวกันก็สามารถพบอาการได้หลายระดับขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาของการติดเชื้อ⁽⁷⁾ เช่น ท้องผูก น้ำหนักลด ตัวเหลือง ตาเหลือง เนื่องจากท่อน้ำดีอุดตัน ตับโต ท่อน้ำดีอักเสบ (cholangitis) จนกระทั่งพัฒนากลายไปเป็นมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) อย่างไรก็ตามในจำนวนพยาธิใบไม้ตับทั้ง 3 ชนิด ที่กล่าวข้างต้นมีเพียงพยาธิใบไม้ตับชนิด *O. viverrini* เท่านั้นที่ถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็งชีวภาพในกลุ่มที่ 1⁽⁸⁾ เนื่องจากมีการพิสูจน์แล้วว่าพยาธิ *O. viverrini* เป็นสาเหตุสำคัญของการอักเสบเรื้อรังในท่อน้ำดีและสามารถพัฒนากลายไปเป็นมะเร็งท่อน้ำดีได้ในที่สุด^(9,10) ยิ่งไปกว่านั้น ในประเทศไทยยังคงมีอัตราการติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* ค่อนข้างสูง โดยมีรายงานผู้ติดเชื้อกว่า 9 ล้านคน⁽¹¹⁾ โดยพบว่าภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอุบัติการณ์ของผู้ติดเชื้อสูงสุดเฉลี่ยประมาณร้อยละ 19.3 และ 15.7 ตามลำดับ⁽¹²⁾ จากการสำรวจการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในบริเวณพื้นที่ลุ่มแม่น้ำชี พบอัตราการติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 78⁽¹³⁾ และเฉพาะจังหวัดขอนแก่นเพียงแห่งเดียวพบอัตราการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเฉลี่ยร้อยละ 24.5 รวมทั้งพบอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีโดยเฉลี่ย 118.8 คนในประชากร 1 แสนคน^(10,13) ซึ่งจากปัญหาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับนี้ ประเทศไทยต้องเสียค่าใช้จ่ายในการควบคุม ป้องกัน และรักษา กว่าปีละประมาณ 120 ล้านบาทต่อปี⁽¹⁴⁾ ปัจจุบันนี้ยังไม่สามารถที่จะตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเบื้องต้นได้อย่างแม่นยำ ผู้ป่วยส่วนมากมักจะมาพบแพทย์หลังจากเป็นมะเร็งระยะรุนแรงแล้ว และมักจะเสียชีวิตหลังจากนั้นภายใน 3 ถึง 6 เดือน⁽¹⁵⁾ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่มีความถูกต้องและแม่นยำ จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการควบคุม ป้องกัน และรักษาโรคพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดีให้มีประสิทธิภาพสูงสุด



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ [ดัดแปลงจาก Saijuntha (2007)]

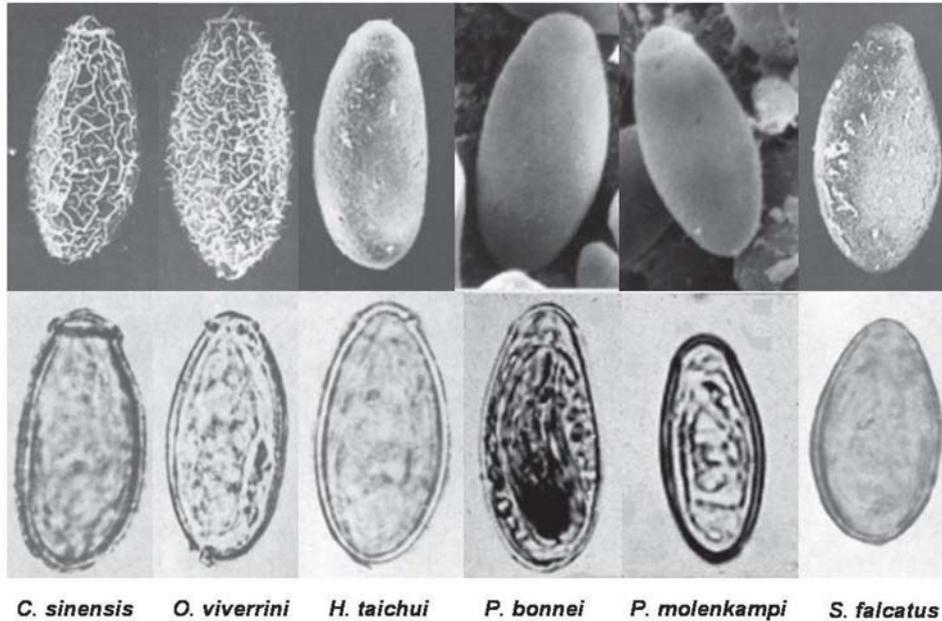
การตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (Diagnosis of human opisthorchiasis)

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* นั้นได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง นับตั้งแต่วิธีการทางปรสิตวิทยาที่ยอมรับว่าเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ ดังนั้นวิธีการตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกัน รวมทั้งวิธีทางอณูชีววิทยา จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อช่วยในการตรวจวินิจฉัยที่มีความถูกต้องแม่นยำ รวมทั้งมีความไวและความจำเพาะที่สูงขึ้น

1. การตรวจวินิจฉัยทางปรสิตวิทยา (Parasitological diagnosis methods)

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* โดยอาศัยวิธีการทางปรสิตวิทยานั้นมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น simple smear, Kato thick smear, formalin ether concentration technique (FECT) อย่างไรก็ตาม วิธีการเหล่านี้ล้วนแล้วแต่ต้องอาศัยทักษะและความชำนาญอย่างมาก โดยเฉพาะการตรวจหาไข่ของพยาธิ *O. viverrini* ด้วยวิธี Kato thick smear เพราะเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี FECT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานแล้ว พบว่าวิธี Kato thick smear ให้ความไวเพียง

ร้อยละ 85 เท่านั้น⁽¹⁶⁾ ยิ่งไปกว่านั้นไข่ของพยาธิ *O. viverrini* มีความคล้ายคลึงกับไข่ของพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก (minute intestinal fluke) หลายชนิด (รูปที่ 2) ที่มีการระบาดอยู่ในพื้นที่เดียวกัน เช่น *Haplorchis sp.*, *Phaneropsolus sp.*, *Stellantchasmus sp.* ทำให้มีโอกาสพบการติดเชื้อพยาธิทั้งสองกลุ่มนี้ร่วมกันได้ ดังนั้นความชำนาญในการจำแนกความแตกต่างของลักษณะไข่ระหว่างพยาธิทั้งสองกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง โดยลักษณะของไข่พยาธิใบไม้ตับมีความแตกต่างจากพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กค่อนข้างชัดเจนคือ ไข่พยาธิ *O. viverrini* มีรอยคอดตรงฝาปิด (operculum) เรียกว่าไหล่ (shoulder) ซึ่งมองเห็นได้ชัดเจน และมีปุ่มเล็กๆ (knob) ตรงส่วนท้าย ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะไม่พบหรือไม่เด่นชัดในไข่ของพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก นอกจากนี้ผิวภายนอกของเปลือกไข่พยาธิ *O. viverrini* จะมีลักษณะขรุขระคล้ายเปลือกของผล melon (musk-melon) ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตาม การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางปรสิตวิทยาอาจเกิดความผิดพลาดได้หากผู้ตรวจไม่มีความชำนาญเพียงพอ



รูปที่ 2 รูปไข่พยาธิใบไม้ตับเทียบกับพยาธิใบไม้ชนิดอื่นที่รูปร่างและลักษณะไข่คล้ายคลึงกัน แถวบนแสดงรูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แถวล่างแสดงรูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา [ดัดแปลงจาก Ditrich และคณะ (1992), Kaewkes (2003)]

ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจทางปรสิตวิทยาเพื่อให้การจำแนกไข่ของพยาธิใบไม้ตับมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น โดยอาศัยการเปรียบเทียบลักษณะความแตกต่างของเปลือกไข่^(17,18) (รูปที่ 2) เช่น การย้อมด้วย potassium permanganate ช่วยให้เห็นลักษณะที่ขรุขระของเปลือกไข่พยาธิใบไม้ตับได้ง่ายและแยกออกจากไข่ของพยาธิ *Haplorchis taichui* และ *Phaneropsolus bonnei* ได้ดียิ่งขึ้น⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานการจำแนกไข่ของพยาธิ *O. viverrini* โดยใช้วิธี FECT แล้วทำการสกัดซ้ำด้วย diethyl ether จะทำให้เศษตะกอนอุจจาระที่ปนเปื้อนมีความใสขึ้น แต่ diethyl ether เป็นสารที่อันตราย ระเหยและติดไฟง่าย ดังนั้นหากต้องการเก็บตะกอนอุจจาระไว้เป็นเวลานานอาจใช้สาร ethyl acetate แทนได้เช่นกัน⁽²⁰⁾ นอกจากนี้ Pasuralertsakul และคณะ (2005) ได้ทำการย้อมตะกอนอุจจาระที่ได้จากวิธี FECT ด้วยสี methylene blue โดยทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสีที่ใช้ย้อม และพบว่าความเข้มข้นของสีที่ร้อยละ 0.032 (w/v) นั้นทำให้เห็นความแตกต่างของไข่พยาธิชัดเจนที่สุด โดยให้ค่าความถูกต้องและแม่นยำสูงถึงร้อยละ 95⁽²¹⁾

แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีการพัฒนาวิธีการตรวจทางปรสิตวิทยาให้มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้นดังที่กล่าวมา

แล้วข้างต้น แต่วิธีการเหล่านี้ก็ยังคงอาศัยความชำนาญในการจำแนกความแตกต่างของลักษณะไข่พยาธิ รวมทั้งความไวในการตรวจวินิจฉัยยังคงค่อนข้างต่ำ โดยเฉพาะในรายที่มีการติดเชื้อปริมาณน้อย (น้อยกว่า 20 ตัว) อาจตรวจไม่พบไข่ในอุจจาระของผู้ติดเชื้อ⁽²²⁾ ทำให้การวินิจฉัยมีข้อจำกัด ดังนั้นวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยหลักการและเทคนิคอื่นๆ จึงมีความจำเป็นและถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อแก้ปัญหาในเรื่องดังกล่าว ซึ่งมีทั้งวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันและวิธีทางอณูชีววิทยา

2. การตรวจวินิจฉัยทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunological diagnosis methods)

โดยการตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกันสามารถตรวจหาแอนติบอดี (antibody; Ab) ของผู้ติดเชื้อที่สร้างขึ้นมา หรือตรวจหาแอนติเจน (antigen; Ag) ที่พยาธิหลังหรือปล่อยออกมาในสิ่งส่งตรวจ ซึ่งวิธีการตรวจวินิจฉัยทางวิทยาภูมิคุ้มกันนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในระยะแรกๆ รวมทั้งใช้เพื่อการศึกษาทางระบาดวิทยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.1 การตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในผู้ติดเชื้อ

จากการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อ

พยาธิใบไม้ตับในสัตว์ทดลองพบมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยเกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation) บริเวณถุงน้ำดีในช่วง 7-14 วันแรกหลังจากติดเชื้อ โดยมี เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ eosinophil แทรกซึม เข้ามาบริเวณที่มีการติดเชื้อและอักเสบ⁽²³⁾ นอกจากนี้ Janechaiwat และคณะ (1980) สามารถตรวจพบแอนติบอดี ได้ในวันที่ 30 หลังจากติดเชื้อ⁽²⁴⁾ และพบว่าในผู้ติดเชื้อที่มี จำนวนไข่พยาธิต่อกรัมอุจจาระ (egg per gram feces; EPG) สูง สามารถตรวจพบแอนติบอดีมากกว่าผู้ติดเชื้อที่มีค่า EPG ปานกลางถึงต่ำ⁽²⁵⁾

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา มีการสกัดโปรตีน จากหลายๆ ส่วนของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เพื่อใช้เป็น แอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมของผู้ติดเชื้อ โดยการศึกษาในช่วงแรกๆ ได้ใช้การแยกส่วนของ somatic extract จากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ด้วยวิธี radio-immunoprecipitation และ polyacrylamide gel electrophoresis พบชิ้นส่วนของโปรตีนขนาดต่างๆ ได้แก่ >116, 89, 78 และ 20 กิโลดาลตัน (kDa) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ พยาธิ *O. viverrini* โดยพบว่าโปรตีนขนาด 89 kDa สามารถ ใช้ตรวจหาแอนติบอดีได้อย่างมีประสิทธิภาพ และพบโปรตีน ดังกล่าวเป็น จำนวนมากในสารขับถ่ายและคัดหลั่ง (excretory-secretory antigen; ES Ag) ของพยาธิตัวเต็มวัย รวมทั้ง ในสารสกัดจากระยะติดต่อ metacercaria⁽²⁶⁾ นอกจากนี้มี รายงานการแยกโปรตีนจากส่วนผิวภายนอก (surface tegument) ของพยาธิตัวเต็มวัย ได้โปรตีนจำเพาะขนาด >116, 108, 64, 38, 34, 20 และ 16-17 kDa โดยพบว่าโปรตีน ขนาด 16-17 kDa มีปริมาณมากถึงร้อยละ 50 ของโปรตีน ที่สกัดได้ทั้งหมด แต่มีความเป็นแอนติเจน (immunogenicity) ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนขนาด 89 kDa⁽²⁷⁾ จากการ นำส่วนของแอนติเจนชนิด tegument และ somatic ไป ทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี filtration chromatography ได้ แอนติเจนออกมาทั้งสิ้น 5 ส่วน ได้แก่ tegument extract, somatic extract, โปรตีนส่วนแยกที่ 1 (P1), ส่วนแยกที่ 2 (P2) และ ส่วนแยกที่ 3 (P3) และนำแอนติเจนทั้ง 5 ส่วนมา ทำการทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วย opisthorchiasis ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่า tegument extract, somatic extract และ P1 ให้ค่าความไว ถึงร้อยละ 100 ในขณะที่ P2 และ P3 ให้ค่าความไวร้อยละ 96.1

และ 83.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ต่อมามีการประยุกต์ใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อแอนติเจนของไข่พยาธิ *O. viverrini* มาแยกแอนติเจนจากไข่เพื่อให้ความบริสุทธิ์ มากขึ้น ก่อนจะนำแอนติเจนนั้นไปตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม ของผู้ติดเชื้อ ซึ่งผลที่ได้พบว่าให้ค่าความไวและความจำเพาะ สูงสุดถึงร้อยละ 100⁽²⁸⁾ (ตารางที่ 1)

ต่อมา Ruangsittichai และคณะ (2006) ได้นำรีคอมบิแนนท์ โปรตีน (recombinant protein) มาใช้เป็นแอนติเจน โดย สังเคราะห์โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 18.6 kDa ซึ่งเป็นโปรตีน ที่ใช้ในการสร้างเปลือกไข่ (OvESP) โดยพบกระจายอยู่บน เปลือกไข่ที่อยู่ทั้งภายในและภายนอกท่อนำไข่ (uterus) ของพยาธิ จากนั้นทดสอบความเป็นแอนติเจนและความจำเพาะ ของโปรตีนสังเคราะห์ (rOvESP) โดยวิธี Western blot พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับซีรัมของหนูทดลองที่ติดเชื้อ พยาธิใบไม้เลือดชนิด *Schistosoma mansoni*, *S. mekongi* และ พยาธิใบไม้ตับวัวควาย *Fasciola gigantica* และจาก การประเมินความสามารถในการเป็นแอนติเจนของโปรตีน rOvESP โดยวิธี ELISA พบว่าให้ค่าความไวต่อซีรัมผู้ป่วยโรค opisthorchiasis ถึงร้อยละ 82 ซึ่งสูงกว่าความไวจากการใช้ ES Ag (ร้อยละ 48) ที่ทำการศึกษาร่วมกัน ในขณะที่ความ จำเพาะของทั้ง rOvESP และ ES Ag มีสูงถึงร้อยละ 97 และ 91 ตามลำดับ⁽²⁹⁾ (ตารางที่ 1)

เนื่องจากการที่จะผลิตแอนติเจนจากตัวพยาธิใบไม้ตับให้ ได้ปริมาณมากๆ นั้นอาจทำได้ลำบาก จึงได้มีการใช้แอนติเจน สกัดจากหอยตัวกลางเพื่อนำมาใช้ตรวจหาแอนติบอดีในผู้ติด เชื้อพยาธิ *O. viverrini* โดยทำการศึกษาแอนติเจนจากหอย ตัวกลางทั้ง 3 ชนิด คือ *Bithynia siamensis siamensis*, *B. s. goniomphalos* และ *B. funiculata* ด้วยวิธี immunoelectrophoresis พบว่าแอนติเจนจากหอยตัวกลางทั้ง 3 ชนิดมีโปรตีน 2 แลบทที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับซีรัมผู้ป่วย opisthorchiasis ได้เหมือนกัน⁽³⁰⁾ จากการประเมินการใช้แอนติเจนชนิด crude ที่เตรียมได้จาก 3 ส่วนของหอยตัวกลาง คือส่วนลำตัว (body) ส่วนหัวและเท้า (head-foot) และส่วนเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน (hepatopancreatic tissue) ของหอย *B. funiculata* เพื่อใช้ ตรวจหาแอนติบอดีของผู้ติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* โดยวิธี ELISA พบว่าแอนติเจนทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถใช้ตรวจหา แอนติบอดีได้อย่างมีประสิทธิภาพเหมือนการใช้แอนติเจนชนิด crude จากพยาธิตัวเต็มวัย โดยให้ค่าความไวและค่าความ

จำเพาะร้อยละ 80.2 และ 81.2 ตามลำดับ แต่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับซีรัมของผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ปอด *Paragonimus* และพยาธิตัวกลม *Strongyloides*⁽³¹⁾ นอกจากนี้มีการแยกส่วนแอนติเจนชนิด crude จากหอย *B. funiculata* โดยเทคนิค gel filtration chromatography Sephacryl S-200 ผลที่ได้พบว่าสามารถแยกส่วนของแอนติเจนได้ทั้งหมด 4 ส่วน ได้แก่ โปรตีนส่วนแยกที่ 1 (P1), 2 (P2), 3 (P3) และ 4 (P4) และประเมินความเป็นแอนติเจนเพื่อตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะในซีรัมผู้ติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* พบว่าแต่ละส่วนของโปรตีนที่แยกได้ ให้ผลค่าความไวและความจำเพาะที่แตกต่างกันไป (ตารางที่ 1) โดยส่วนของ P1 ให้ค่าความไวสูงสุด (ร้อยละ 100) แต่ให้ค่าความจำเพาะต่ำสุด (ร้อยละ 36) ขณะที่ P2 ให้ค่าความไวต่ำสุด (ร้อยละ 27.5) แต่ให้ค่าความจำเพาะสูงสุด (ร้อยละ 96)⁽³²⁾ นอกจากนี้มีการใช้แอนติเจนจากหอยตัวกลางชนิด *B. s. goniomphalos* มาใช้ในการเตรียมเป็น cocktail Ag และ eluted Ag และทดสอบความเป็นแอนติเจนโดยวิธี Western blot พบว่าให้ผลบวกกับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 22 ถึง 94 kDa ในขณะที่แถบโปรตีนขนาด 53 kDa นั้นเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม

กับซีรัมของผู้ติดเชื้อพยาธิอื่นน้อยที่สุด⁽³³⁾ และเมื่อนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับโดยวิธี ELISA ผลการศึกษาพบว่าการใช้ eluted Ag ให้ค่าความไวและความจำเพาะสูงกว่า cocktail Ag (ตารางที่ 1) นอกจากนี้มีการนำ somatic crude extract ของหอยตัวกลางมาปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000, 3,000 และ 4,000 รอบต่อนาที (rpm) และนำตะกอนโปรตีนนั้นมาใช้เป็นแอนติเจนเพื่อตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมของผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ พบว่าให้ค่าความไวตั้งแต่ร้อยละ 69.1 ถึง 84 และค่าความจำเพาะตั้งแต่ร้อยละ 66.2 ถึง 86.2⁽³⁴⁾ (ตารางที่ 1)

ในปัจจุบันมีรายงานการจำแนกและทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนต่างๆ ของพยาธิ *O. viverrini* อีกหลายชนิด แต่ยังไม่มีการนำไปประยุกต์ใช้ในแง่ของการตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้ เช่น โปรตีน glutathione S-transferase⁽³⁵⁾, asparaginyl endopeptidase⁽³⁶⁾, cathepsin L⁽³⁷⁾, cathepsin D-like⁽³⁸⁾, cathepsin F⁽³⁹⁾ เป็นต้น ซึ่งในอนาคตสามารถนำโปรตีนเหล่านี้มาประเมินความเป็นแอนติเจนและนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ได้ต่อไป

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการตรวจหาแอนติบอดีจากผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* โดยใช้แอนติเจน ชนิดต่างๆ

| แอนติเจน (Ag) | วิธีทดสอบ | ตัวอย่าง | % Sensitivity | % Specificity | References |
|-------------------------------------|-----------|----------|---------------|---------------|---------------------------------|
| 1. <i>O. viverrini</i> Ag | | | | | |
| 1.1 Tegument | ELISA | Serum | 100 | 94.9 | Poopyruchpong และคณะ (1990) |
| Somatic crude extract | ELISA | Serum | 100 | 84.0 | |
| P1 ^a | | | 100 | 57.1 | |
| P2 ^a | | | 96.1 | 76.4 | |
| P3 ^a | | | 83.3 | 62.2 | |
| 1.2 Egg ^b | dot-ELISA | Serum | 100 | 100 | Wongsaroj และคณะ (2001) |
| 1.3 Adult crude extract | ELISA | Serum | 80 | 72 | Waikagul และคณะ (2001) |
| 1.4 rOvESP ^c | ELISA | Serum | 82 | 97 | Ruangstittichai และคณะ (2006) |
| ES | | | 48 | 91 | |
| 2. <i>Bithynia</i> snails Ag | | | | | |
| 2.1 Whole body ^d | ELISA | Serum | 80.2 | 81.2 | Watthanakulpanich และคณะ (1997) |
| 2.2 Partial Peak ^e | ELISA | Serum | | | Waikagul และคณะ (2001) |
| P1 | | | 100 | 36 | |
| P2 | | | 27.5 | 96 | |
| P3 | | | 28.8 | 52 | |
| P4 | | | 37.5 | 82 | |
| 2.3 Cocktail Ag ^f | ELISA | Serum | 88.5 | 88.0 | Waikagul และคณะ (2002) |
| Eluted Ag ^f | | | 91.8 | 98.4 | |
| 2.4 Somatic extract ^g | ELISA | Serum | | | Watthanakulpanich และคณะ (2003) |
| 10,000 rpm | | | 69.1 | 66.2 | |
| 20,000 rpm | | | 84.0 | 76.2 | |
| 30,000 rpm | | | 80.2 | 82.5 | |
| 40,000 rpm | | | 84.0 | 86.2 | |
| 50,000 rpm | | | 70.4 | 71.2 | |

^a fraction ที่ 1 (P1), 2 (P2) และ 3 (P3) จากการทำให้ somatic Ag ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Sephadex G-200 column

^b purified จาก Monoclonal Ab

^c recombinant protein ที่สังเคราะห์จากจีนของโปรตีนสร้างเปลือกไข่ (OvESP)

^d สกัดจากหอย *B. funiculata*

^e ส่วนสกัด peak ที่ 1 (P1), ที่ 2 (P2), ที่ 3 (P3) และที่ 4 (P4) จาก somatic crude extract ของหอย *B. funiculata* โดยใช้ Sephacryl S-200 chromatography

^f สกัดจาก *B. s. goniomphalos*

^g ส่วนที่สกัดจากหอย *B. funiculata* และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ (rpm) ต่างๆ เพื่อใช้เป็น Ag

2.2 การตรวจหาแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในผู้ติดเชื้อ

มีการพัฒนา monoclonal antibody หลายชนิดที่จำเพาะกับแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ซึ่งมีทั้งจำเพาะต่อ somatic Ag ขนาด 90 kDa หรือจำเพาะต่อส่วนไกลโคโปรตีนขนาด 89 kDa ของพยาธิตัวเต็มวัย จำเพาะต่อ tegument Ag ขนาด 16 kDa รวมทั้งที่จำเพาะกับแอนติเจนบนไข่พยาธิ⁽²⁵⁾ ซึ่ง monoclonal antibody เหล่านี้สามารถใช้ในการตรวจหาแอนติเจนในอุจจาระของผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้ (ตารางที่ 2) จากการศึกษาโดย Duenngai และคณะ (2007) โดยใช้ monoclonal antibody ต่อส่วนของ ES Ag ในการตรวจหาแอนติเจนที่หลังปนออกมากับอุจจาระของผู้ป่วย

โดยใช้วิธี monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay (MAb-ELISA) พบว่าให้ค่าความไวเท่ากับร้อยละ 69.1 และความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 39.1 เมื่อเทียบกับวิธีทางปรสิตวิทยา (FECT) ถึงแม้จะให้ผลค่าความไวและความจำเพาะที่ต่ำกว่า แต่พบว่าการตรวจวินิจฉัยโดยใช้ monoclonal antibody นั้น สามารถตรวจหาผู้ติดเชื้อในกลุ่มที่ตรวจไม่พบไข่พยาธิโดยวิธี FECT ได้ถึงร้อยละ 60.9⁽⁴⁰⁾ อย่างไรก็ตาม การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับโดยใช้ monoclonal antibody ในการตรวจหาแอนติเจนนั้น ให้ผลดีไม่เท่ากับการตรวจหาแอนติบอดีโดยใช้แอนติเจนจำเพาะ ดังนั้นวิธีการใช้ monoclonal antibody ตรวจหาแอนติเจนจึงไม่เป็นที่นิยม

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการตรวจหาแอนติเจนจากผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* โดยใช้แอนติบอดีต่อส่วนต่างๆ ของพยาธิ

| แอนติบอดี (Ab) | วิธีทดสอบ | ตัวอย่าง (%) | Sensitivity | Specificity (%) | References |
|----------------------------|-----------|--------------|-------------|-----------------|-------------------------|
| Monoclonal Ab ต่อ tegument | ELISA | Stool | 64.2 | 64.7 | Chaicumpa และคณะ (1992) |
| Monoclonal Ab ต่อ 89 kDa | ELISA | Stool | 57.1 | 70.5 | Sirisinha และคณะ (1995) |
| Monoclonal Ab ต่อ ES-Ag | ELISA | Stool | 69.1 | 39.1 | Duenngai และคณะ (2007) |

3. การตรวจวินิจฉัยทางอณูชีววิทยา (Molecular diagnostic methods)

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีทางอณูชีววิทยาขึ้นมากมายเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง โดยเฉพาะวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) ในหลอดทดลองหรือ polymerase chain reaction (PCR) โดยสามารถเลือกออกแบบไพรเมอร์ (primer) ให้มีความจำเพาะต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของพยาธิ ตัวอย่างเช่น การออกแบบไพรเมอร์ให้จับจำเพาะและเพิ่มปริมาณ DNA บางส่วนของยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) บน mitochondrial genome ซึ่งสามารถใช้ตรวจจำแนกพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* จากพยาธิชนิดอื่นที่มีลักษณะรูปร่างของตัวพยาธิหรือลักษณะของไข่ที่ใกล้เคียงกัน เช่น แยกระหว่างพยาธิ *O. viverrini* กับ *C. sinensis*⁽⁴¹⁾ หรือการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบางส่วนของยีน internal transcribed spacer (ITS) บน nuclear

genome เพื่อแยกแยะระหว่าง *O. viverrini* กับ *C. sinensis* รวมทั้งแยกจากพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก *H. pumilio* และ *H. taichui*⁽⁴²⁾ หรือแม้กระทั่งการประยุกต์ใช้วิธี PCR เพื่อตรวจหาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในสัตว์ตัวกลางอื่นๆ เช่น ในปลาวงศ์ปลาตะเพียน^(43,44) และหอย Bithynia⁽⁴⁵⁾

ในระยะแรกได้มีการพัฒนาวิธี PCR เพื่อการตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* ในหนูทดลอง โดยออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะกับพยาธิ *O. viverrini* ซึ่งให้ค่าความไวและความจำเพาะถึงร้อยละ 100 และ 97.8 ตามลำดับ โดยสามารถตรวจการติดเชื้อพยาธิได้แม้จะมีไข่พยาธิปนมาในอุจจาระของหนูเพียงใบเดียว⁽⁴⁶⁾ หลังจากนั้นได้มีการนำวิธี PCR ดังกล่าวไปใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยตัวอย่างอุจจาระของผู้ติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* จากผลการศึกษาพบว่า ให้ผลบวกน้อยกว่าวิธีทางปรสิตวิทยา (FECT และ Kato thick smear) อย่างเห็นได้ชัด^(16,47) แต่อย่างไรก็ตามวิธี PCR สามารถ

ตรวจพบการติดเชื้อในบางรายที่ไม่สามารถตรวจพบไข่พยาธิด้วยวิธีทางปรสิตวิทยาได้⁽¹⁶⁾ ทั้งนี้การที่ผลการศึกษาโดยวิธี PCR ไม่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานทางปรสิตวิทยานั้น อาจเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น การตรวจวินิจฉัยชนิดของไข่พยาธิผิดพลาดวิธีการสกัด DNA จากอุจจาระยังไม่ดีพอ ทำให้มีสารปนเปื้อนที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของ PCR เนื่องจากในอุจจาระมีตัวยับยั้ง (inhibitor) การเกิดปฏิกิริยา PCR อยู่เป็นจำนวนมาก⁽⁴⁸⁾ ดังนั้นขั้นตอนการสกัด DNA จึงเป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR โดย Duengjai และคณะ (2008) ได้พัฒนาวิธีการสกัด DNA จากวิธีการเดิมที่เคยมีการรายงาน⁽¹⁶⁾ แล้วทดสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้กลุ่มตัวอย่างกลุ่มเดิม จากการศึกษาของ Stensvold และคณะ (2006) พบว่าวิธีการดังกล่าวให้ค่าความไวในการตรวจหาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยังถือว่าค่าความไวและความจำเพาะค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางปรสิตวิทยา⁽⁴⁹⁾ หลังจากนั้น Parvathi และคณะ (2008) จึงได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับระยะติดต่อ metacercariae ในปลาตัวกลาง โดยสามารถตรวจความเข้มข้นของดีเอ็นเอของพยาธิได้ต่ำสุดถึง 10^{-12} ng และมีความจำเพาะกับพยาธิ *O. viverrini* สูง โดย Umesha และคณะ (2008) ได้นำไพรเมอร์ดังกล่าวไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* โดยสกัด DNA จากไข่พยาธิในอุจจาระของผู้ติดเชื้อ พบว่าให้ค่าความไวร้อยละ 100, 68.2 และ 50 ในผู้ติดเชื้อมีค่า EPG มากกว่า 1,000, 200-1,000 และน้อยกว่า 200 ตามลำดับ⁽⁵⁰⁾ ซึ่งให้ค่าความไวสูงกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้^(16,47) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธี PCR เพื่อใช้ตรวจจำแนกพยาธิ *O. viverrini* จากพยาธิใบไม้ลำไส้ *H. taichui* ในอุจจาระของผู้ติดเชื้อ โดยสามารถตรวจสอบปริมาณ DNA น้อยที่สุดเพียง 0.75 pg ในผู้ติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* (ค่าความไวเท่ากับร้อยละ 93.7) และ 1.32 ng ในผู้ติดเชื้อพยาธิ *H. taichui* (ค่าความไวเท่ากับร้อยละ 73.3) และยังสามารถตรวจพบการติดเชื้อในรายที่ไม่สามารถตรวจพบไข่พยาธิด้วยวิธีทางปรสิตวิทยาได้ด้วยเช่นกัน⁽⁵¹⁾

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยทั้งสามแบบ Duengjai และคณะ (2007) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* โดยใช้วิธี MAb-ELISA วิธี PCR และใช้การตรวจทางปรสิตวิทยา (FECT) เป็นวิธีมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่าวิธี MAb-ELISA

สามารถตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* ได้ร้อยละ 66.1 ในขณะที่วิธี PCR ใช้ primer ชนิด Trem25-F และ OV25-4R⁽⁵⁰⁾ ที่จำเพาะต่อพยาธิ *O. viverrini* ในการตรวจหาดีเอ็นเอจากไข่พยาธิในอุจจาระโดยใช้ cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) ช่วยในการกำจัดตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR⁽⁴⁹⁾ พบว่าสามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อได้คิดเป็นร้อยละ 78.7 (ให้ค่าความไวและความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 100 และ 59.0 ตามลำดับ) ซึ่งมีค่าสูงกว่าการตรวจทางปรสิตและ MAb-ELISA อย่างมีนัยสำคัญ

บทสรุป

การตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* นั้นยังยึดถือวิธีทางปรสิตวิทยาเป็นวิธีมาตรฐาน แต่วิธีการอื่นๆ ที่พัฒนาขึ้นมาก็สามารถที่จะช่วยให้การตรวจคัดกรองและวินิจฉัยโรคติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* ที่ให้ค่าความไว ความถูกต้องและแม่นยำสูงขึ้น ดังนั้นการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานอย่างเดียวยังไม่เพียงพอ การตรวจยืนยันด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันหรือวิธีทางอณูชีววิทยาจึงยังมีความสำคัญและควรมีการพัฒนาต่อไปเพื่อให้มีค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยสูงสุด ซึ่งจะช่วยในการตรวจวินิจฉัยและจำแนกการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับออกจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ โดยเฉพาะกลุ่มพยาธิที่มีรูปร่างลักษณะของไข่ที่คล้ายคลึงกันยากต่อการจำแนกด้วยวิธีทางปรสิตวิทยา รวมทั้งมีการระบาดอยู่ในพื้นที่เดียวกันซึ่งทำให้มีโอกาสในการพบการติดเชื้อร่วมกันกับพยาธิ *O. viverrini* ความสำคัญในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยให้มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้นนี้ จะเป็นประโยชน์ในแง่ของการรักษา ควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. WHO. Control of food born trematode infections. WHO Tech Rep Ser 1995; 849.
2. Sripa B. Concerted action is needed to tackle liver fluke infections in Asia. PLoS Negl Trop Dis 2008; 2: e232.

3. Saijuntha W. A comprehensive investigation of genetic variation among natural populations of *Opisthorchis viverrini* in Thailand and Lao PDR. [Ph.D. thesis], Khon Kaen University, 2007.
4. Upatham ES, Viyanant V. *Opisthorchis viverrini* and opisthorchiasis: a historical review and future perspective. *Acta Trop* 2003; 88: 171-76.
5. WHO. Food-borne trematode infections in Asia (Ha Noi). 2002;RS/2002/GE/40(VTN).
6. Lun ZR, Gasser RB, Lai DH, Li AX, Zhu XQ, Yu XB, et al. Clonorchiasis: a key foodborne zoonosis in China. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 31-41.
7. Osman M, Lausten SB, El-Sefi T, Boghdadi I, Rashed MY, Jensen SL. Biliary parasites. *Dig Surg* 1998;15: 287-96.
8. IARC. Infection with liver flukes *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*, IARC. *Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 121-75.
9. Honjo S, Srivatanakul P, Sriplung H, Kikukawa H, Hanai S, Uchida K, et al. Genetic and environmental determinants of risk for cholangiocarcinoma via *Opisthorchis viverrini* in a densely infested area in Nakhon Phanom, northeast Thailand. *Int J Cancer* 2005;117: 854-60.
10. Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M, et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med* 2007; 4: e201.
11. Sithithaworn P, Haswell-Elkins M., Epidemiology of *Opisthorchis viverrini*. *Acta Trop* 2003; 88: 187-94.
12. Jongsuksuntigul P, Imsomboon T. Opisthorchiasis control in Thailand. *Acta Trop* 2003; 88: 229-32.
13. Sriamporn S, Pisani P, Pipitgool V, Suwanrungruang K, Kamsa-ard S, Parkin DM. Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 588-94.
14. Muller R. *Worms and Human Disease*. Wallingford, Oxon: CABI publishing, 2002.
15. Uttaravichien T, Bhudhisawasdi V, Pairojkul C, Pugkhem A. Intrahepatic cholangiocarcinoma in Thailand. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6: 128-35.
16. Stensvold CR, Saijuntha W, Sithithaworn P, Wongratanacheewin S, Strandgaard H, Ornbjerg N, et al. Evaluation of PCR based coprodiagnosis of human opisthorchiasis. *Acta Trop* 2006; 97: 26-30.
17. Ditrich O, Giboda M, Scholz T, Beer SA. Comparative morphology of eggs of the Haplorchiinae (Trematoda: Heterophyidae) and some other medically important heterophyid and opisthorchiid flukes. *Folia Parasitol (Praha)* 1992; 39: 123-32.
18. Kaewkes S. Taxonomy and biology of liver flukes. *Acta Trop* 2003; 88: 177-86.
19. Sukontason K, Piangjai S, Sukontason K, Chaithong U. Potassium permanganate staining for differentiation of the surface morphology of *Opisthorchis viverrini*, *Haplorchis taichui* and *Phaneropsolus bonnie* eggs. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30: 371-4.
20. Piangjai S, Sukontason K, Sukontason K, Methanitikorn R. Enhancing identification of *Opisthorchis vierrini* eggs by repeated ether extraction. *J Trop Med Parasitol* 2000; 23: 32-4.
21. Pasuralertsakul S, Ngrenngamlert W, Sriepochang S, Khantiyanan N, Akkara-ngamsiri O. Methylene blue staining method for identification of *Opisthorchis viverrini* egg. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36(Suppl 4): 107-9.
22. Sithithaworn P, Tesana S, Pipitgool V, Kaewkes S, Pairojkul C, Sripa B, et al. Relationship between

- faecal egg count and worm burden of *Opisthorchis viverrini* in human autopsy cases. *Parasitology* 1991; 102(Pt 2): 277-81.
23. Sripa B, Kaewkes S. Relationship between parasite-specific antibody responses and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters. *Parasite Immunol* 2000; 22: 139-45.
 24. Janechaiwat J, Tharavanij S, Vajrasthira S, Chaicumpa W. The immunological diagnosis of human opisthorchiasis and the humoral immune response to opisthorchis infection in the hamster. *J Med Assoc Thai* 1980; 63: 439-47.
 25. Wongratanacheewin S, Sermswan RW, Sirisinha S. Immunology and molecular biology of *Opisthorchis viverrini* infection. *Acta Trop* 2003; 88: 195-207.
 26. Wongratanacheewin S, Chawengkirttikul R, Bunnag D, Sirisinha S. Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens by immunoprecipitation and polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology* 1988; 96(Pt 1): 119-28.
 27. Sirisinha S, Sahassananda D, Bunnag D, Rim HJ. Immunological analysis of *Opisthorchis* and *Clonorchis* antigens. *J Helminthol* 1990; 64: 133-38.
 28. Wongsaroj T, Sakolvaree Y, Chaicumpa W, Maleewong W, Kitikoon V, Tapchaisri P, et al. Affinity purified oval antigen for diagnosis of *Opisthorchiasis viverrini*. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2001; 19: 245-58.
 29. Ruangsittichai J, Viyanant V, Vichasri-Grams S, Sobhon P, Tesana S, Upatham ES, et al. *Opisthorchis viverrini*: identification of a glycine-tyrosine rich eggshell protein and its potential as a diagnostic tool for human opisthorchiasis. *Int J Parasitol* 2006; 36: 1329-39.
 30. Chanawong A, Waikagul J, Thammapalerd N. Detection of shared antigens of human liver flukes *Opisthorchis viverrini* and its snail host, *Bithynia* spp. *Trop Med Parasitol* 1990; 41: 419-21.
 31. Watthanakulpanich D, Waikagul J, Anantaphruti MT, Dekumyoy P. Evaluation of *Bithynia funiculata* snail antigens by ELISA-serodiagnosis of human opisthorchiasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28: 593-8.
 32. Waikagul J, Dekumyoy P, Chaikittisuk N, Anantapruti MT. Evaluation of partially purified *Bithynia* snail antigen in serodiagnosis of human opisthorchiasis. *J Trop Med Parasitol* 2001; 24: 71-8.
 33. Waikagul J, Dekumyoy P, Chaichana K, Thairungroje AM, Komalamisra C, Kitikoon V. Serodiagnosis of human opisthorchiasis using cocktail and electroeluted *Bithynia* snail antigens. *Parasitol Int* 2002; 51: 237-47.
 34. Watthanakulpanich D, Waikagul J, Dekumyoy P, Anantaphruti MT. Studies on concomitant antigens of *Bithynia funiculata* for detection of antibody to *Opisthorchis viverrini*: effect of different centrifugal speeds on antigen preparation. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34 (Suppl 2): 114-20.
 35. Eursitthichai V, Viyanant V, Vichasri-Grams S, Sobhon P, Tesana S, Upatham SE, et al. Molecular cloning and characterization of a glutathione S-transferase encoding gene from *Opisthorchis viverrini*. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2004; 22: 219-28.
 36. Laha T, Sripa J, Sripa B, Pearson M, Tribolet L, Kaewkes S, et al. Asparaginyl endopeptidase from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, and its potential for serodiagnosis. *Int J Infect Dis* 2008; 12: e49-59.
 37. Kaewpitoon N, Laha T, Kaewkes S, Yongvanit P, Brindley PJ, Loukas A, et al. Characterization of cysteine proteases from the carcinogenic liver

- fluke, *Opisthorchis viverrini*. Parasitol Res 2008; 102: 757-64.
38. Suttiwong S, Mulvanna J, Huong NT, Pearson MS, Brindley PJ, Laha T, et al. Ov-APR-1, an aspartic protease from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: functional expression, immunolocalization and subsite specificity. Int J Biochem Cell Biol 2009; 41: 1148-56.
39. Pinlaor P, Kaewpitoon N, Laha T, Sripan B, Kaewkes S, Morales ME, et al. cathepsin F cysteine protease of the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3: e398.
40. Duenngai K. Comparative efficacy of coproantigen detection and polymerase chain reaction for diagnosis of opisthorchiasis. [Ms.C. thesis], Khon Kaen University, 2007.
41. Le TH, Van De N, Blair D, Sithithaworn P, McManus DP. *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination. Exp Parasitol 2006; 112: 109-14.
42. Sato M, Thaenkham U, Dekumyoy P, Waikagul J. Discrimination of *O. viverrini*, *C. sinensis*, *H. pumilio* and *H. taichui* using nuclear DNA-based PCR targeting ribosomal DNA ITS regions. Acta Trop 2009; 109: 81-3.
43. Intapan PM, Thanchomnang T, Lulitanond V, Phongsaskulchoti P, Maleewong W. Real-time fluorescence resonance energy transfer PCR with melting curve analysis for the detection of *Opisthorchis viverrini* in fish intermediate hosts. Vet Parasitol 2008; 157: 65-71.
44. Parvathi A, Umesha KR, Kumar S, Sithithaworn P, Karunasagar I. Development and evaluation of a polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Opisthorchis viverrini* in fish. Acta Trop 2008; 107: 13-6.
45. Intapan PM, Thanchomnang T, Lulitanond V, Phongsaskulchoti P, Maleewong W. Detection of *Opisthorchis viverrini* in infected bithynid snails by real-time fluorescence resonance energy transfer PCR-based method and melting curve analysis. Parasitol Res 2008; 103: 649-55.
46. Wongratanacheewin S, Pumidonming W, Sermswan RW, Maleewong W. Development of a PCR-based method for the detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected hamsters. Parasitology 2001; 122: 175-80.
47. Wongratanacheewin S, Pumidonming W, Sermswan RW, Pipitgool V, Maleewong W. Detection of *Opisthorchis viverrini* in human stool specimens by PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 3879-80.
48. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 3741-51.
49. Duenngai K, Sithithaworn P, Rudrappa UK, Iddya K, Laha T, Stensvold CR, et al. Improvement of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in human stool samples. J Clin Microbiol 2008; 46: 366-8.
50. Umesha KR, Kumar S, Parvathi A, Duenngai K, Sithithaworn P, Karunasagar I. *Opisthorchis viverrini*: detection by polymerase chain reaction (PCR) in human stool samples. Exp Parasitol 2008; 120: 353-6.
51. Lovis L, Mak TK, Phongluxa K, Soukhathammavong P, Sayasone S, Akkhavong K, et al. PCR Diagnosis of *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui* infections in a Lao community in an area of endemicity and comparison of diagnostic methods for parasitological field surveys. J Clin Microbiol 2009; 47: 1517-23.
52. Poopyruchpong N, Viyanant V, Upatham ES, Srivatanakul P. Diagnosis of opisthorchiasis by

- enzyme-linked immunosorbent assay using partially purified antigens. Asian Pac J Allergy Immunol 1990; 8: 27-31.
53. Sirisinha S, Chawengkirttikul R, Haswell-Elkins MR, Elkins DB, Kaewkes S, Sithithaworn, P. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Opisthorchis viverrini* infection in an endemic area. Am J Trop Med Hyg 1995; 52: 521-4.
54. Chaicumpa W, Ybanez L, Kitikoon V, Pungpak S, Ruangkunaporn Y, Chongsa-nguan M, et al. Detection of *Opisthorchis viverrini* antigens in stools using specific monoclonal antibody. Int J Parasitol 1992; 22: 527-31.