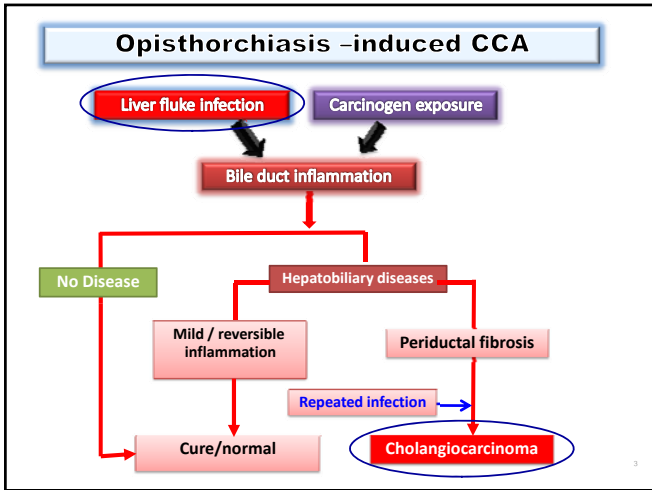
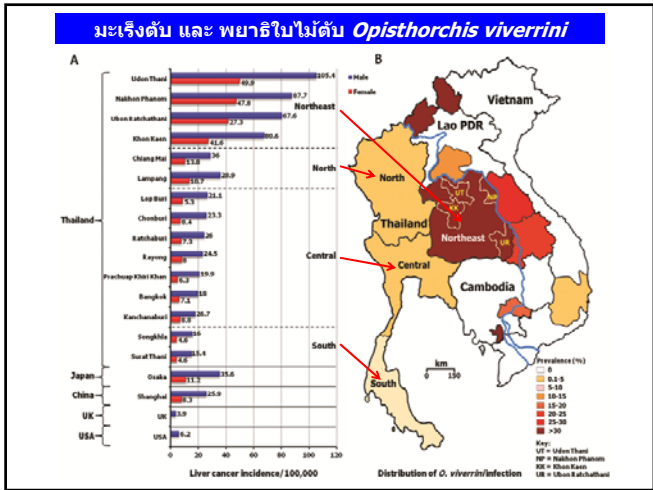


พยาธิใบไม้ตับ ความก้าวหน้าในการวินิจฉัยปรสิตและการจัดการโรค

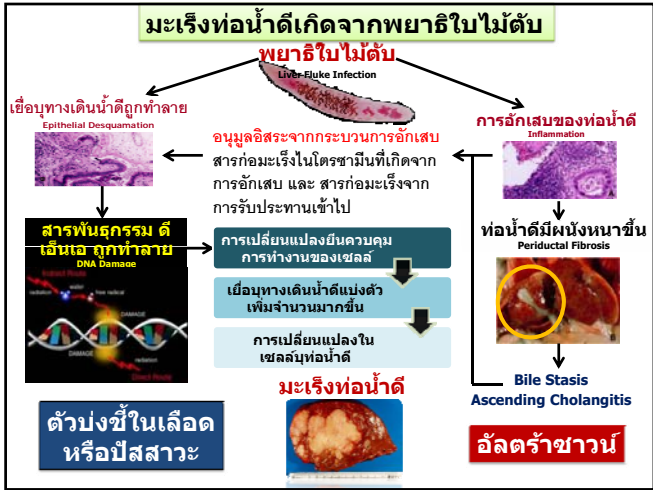
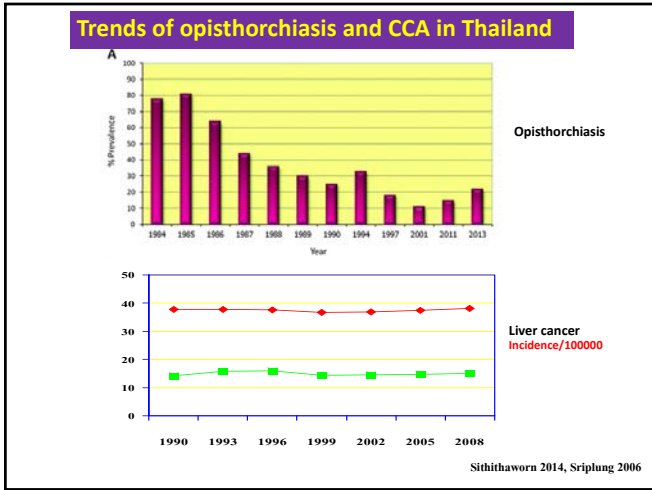
ศาสตราจารย์ไพบูรณ์ สิทธิถาวร
 ภาควิชาปรสิตวิทยา
 ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี
 โครงการแก้ปัญหาพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี
 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

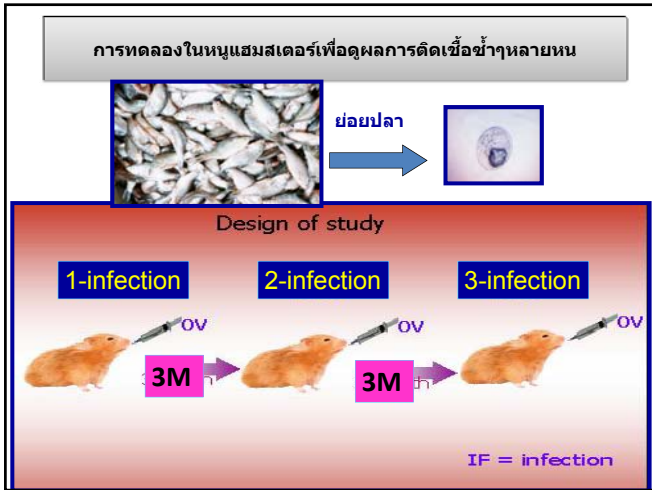


Infection & cancer (IARC 2012)

Parasite	Evidence		Carcinogenic group
	Human	Animal	
<i>Schistosoma haematobium</i>	S	L	1. carcinogenic
<i>S.japonicum</i>	L	L	2B. Possibly carcinogenic
<i>S. mansoni</i>	I	L	3. non carcinogenic
<i>Opisthorchis Viverrini</i>	S	S	1. carcinogenic
<i>O. felineus</i>	I	I	3. non carcinogenic
<i>Clonorchis sinensis</i>	S	S	1. carcinogenic

I : inadequate evidence L : Limited evidence S : sufficient evidence





กลไกการเกิดมะเร็ง

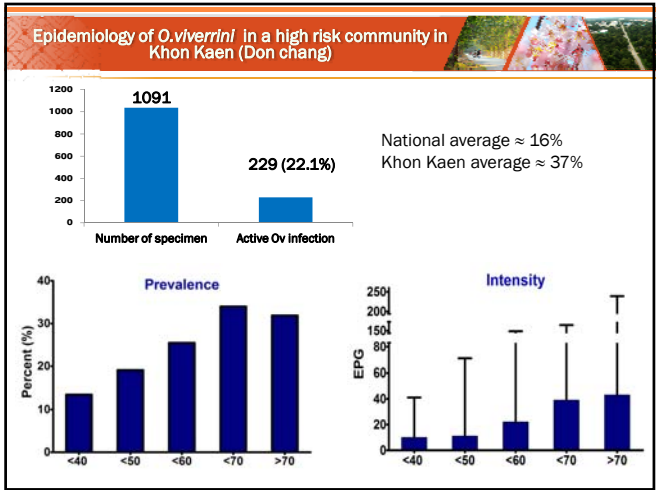
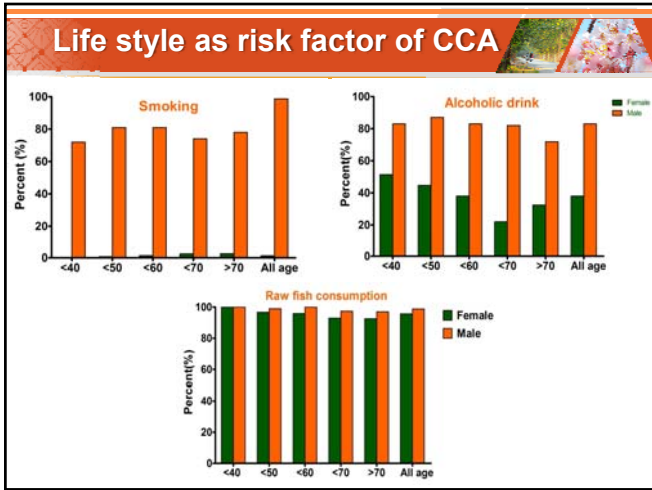
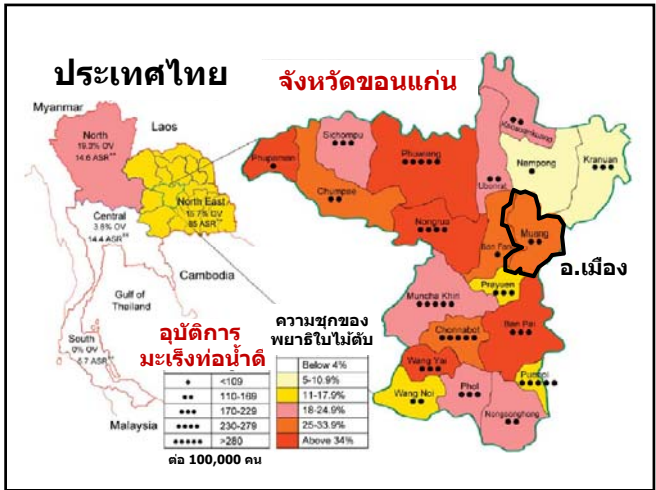
- มีการทำลายดีเอ็นเอโดยกระบวนการอักเสบของเนื้อเยื่อเมื่อได้รับพยาธิ
- ตรวจพบเบสที่ผิดปกติได้มากที่สุดที่เซลล์เยื่อผิวท่อน้ำดีเป็นจำนวนมากในระยะแรกๆของการติดเชื้อ
- มีการทำลายดีเอ็นเอใหม่ทุกครั้งที่มีการติดเชื้อซ้ำและความรุนแรงของการทำลายเกิดได้เร็วยิ่งขึ้น
- การได้รับพยาธิซ้ำๆเป็นการเพิ่มความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อมะเร็ง

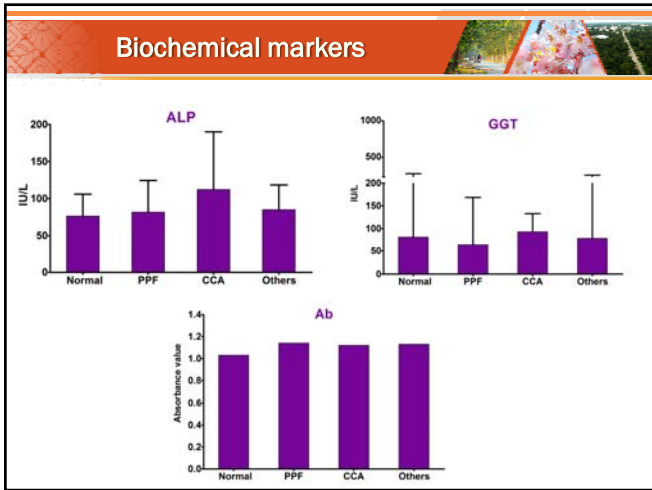
การควบคุมโรคพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดีมี 3 ระดับ

ตติยภูมิ : การรักษาให้หาย & ดูแลคุณภาพชีวิตผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ทุติยภูมิ : การค้นหาความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี & ฝ้าระวังติดตาม

ปฐมภูมิ : ตรวจวินิจฉัยให้ยา รักษา และให้ความรู้แก่นักเรียน & การดูแลระบบนิเวศน์





Ultrasound result

	N	Male	Female
	817	335 (41%)	482 (58%)
Normal US	455 (54 %)	197 (43.3%)	258 (56.7%)
IPE	149 (18%)	63 (42.2%)	86 (57.7%)
FATTY LIVER	129 (16 %)	33 (25.5%)	96 (74.4%)
Dilated duct	8 (1%)	7 (87.5%)	1 (12.5%)

ปัจจัยเสี่ยงโรคมะเร็งท่อน้ำดี

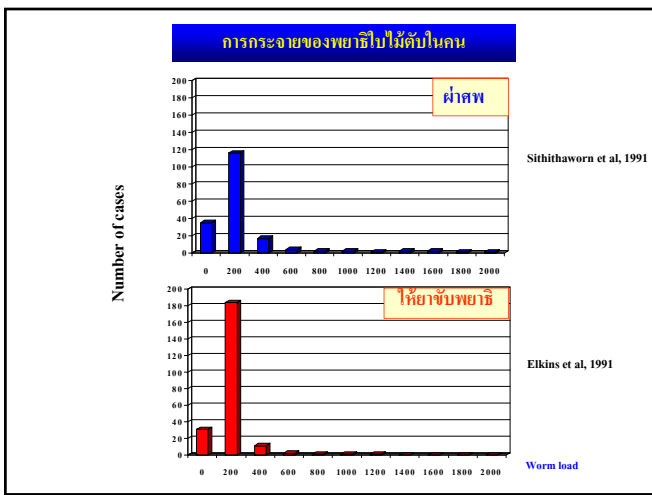
Risk factors	Odd ratio	References
OV infection intensity-related	3 - 14.08	1
Sex (Male : female)	3	1
Age (years)	1- 9.2	1
History of praziquantel/treatment	3.4 - 4.6	2
Anti-OV antibody	3 - 27.9	2, 3, 4
Alcoholic drink (dose-related)	2.2 - 4.3	4
Raw fish consumption	2.7 - 2.9	4
Gene polymorphism in OV ab+ve GSTM1 wild : deletion	10 : 23	4

1. Haswell-Elkins 1994, 2. Chernrunroj (2000), 3. Parkins et al 1991, 4. Honjo et al 2005

Towards disease eradication

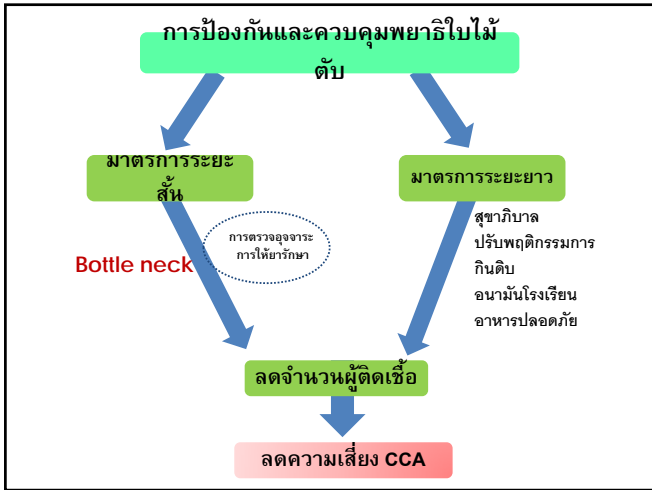
- Control** : a reduction in incidence prevalence, morbidity or mortality of an infectious disease to a acceptable level
- Elimination** : reduction to zero of the incidence of disease or infection in a defined geographical area
- Eradication** : permanent reduction to zero of the worldwide incidence of infection

David L Heymann 2014



Current diagnostic methods for opisthorchiasis

- Parasitological methods**
Worm recovery/egg detection
Not sensitive for light infection
- Molecular method**
DNA detection
PCR inhibitor / Sophisticated / high cost
- Immunological method**
Antibody-cross Rx, long lasting
Antigen detection- current/active infection



ข้อดีของการตรวจอุจจาระ

- เป็นวิธีมาตรฐานที่ยอมรับ
- มีความจำเพาะสูง ไม่มีข้อสงสัย
- มีวิธีการตรวจที่ง่าย และประหยัด
- เป็นวิธีการตรวจที่คุ้นเคยที่มีการปฏิบัติมานาน

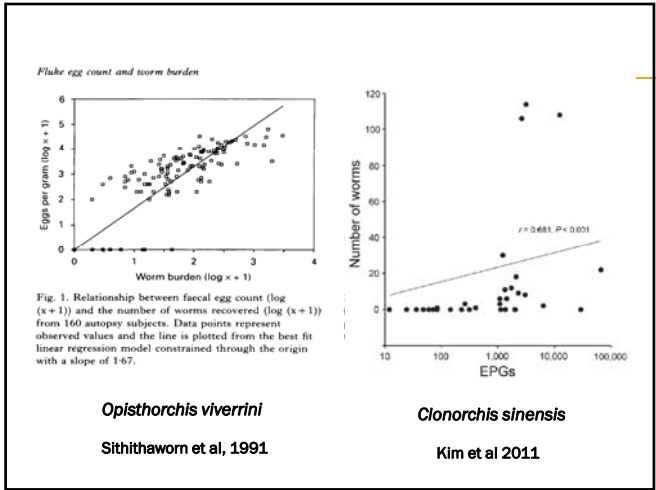
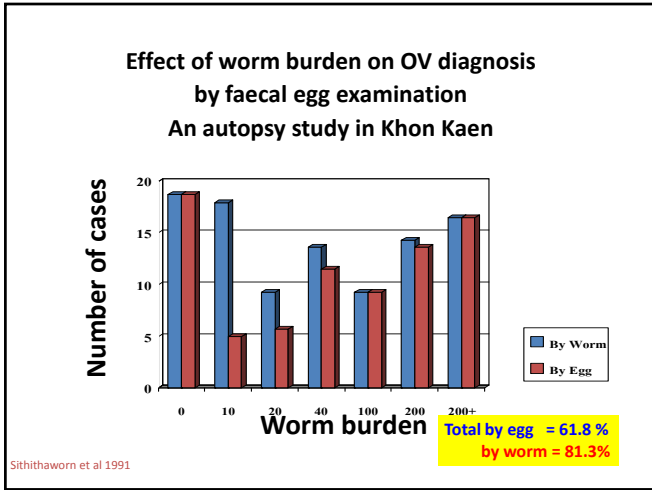
ข้อเสียของการตรวจอุจจาระ

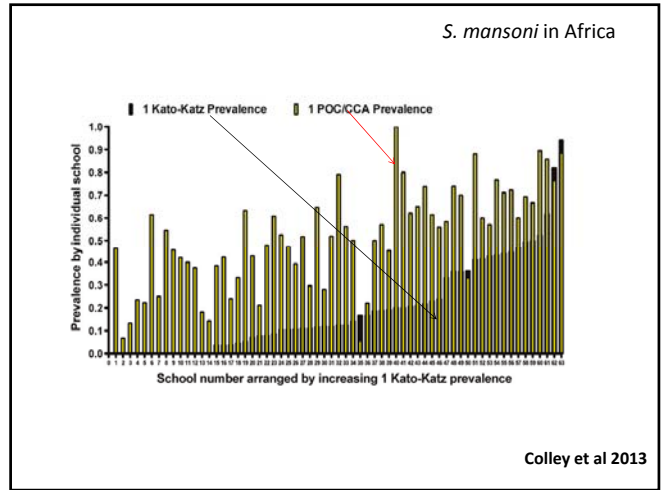
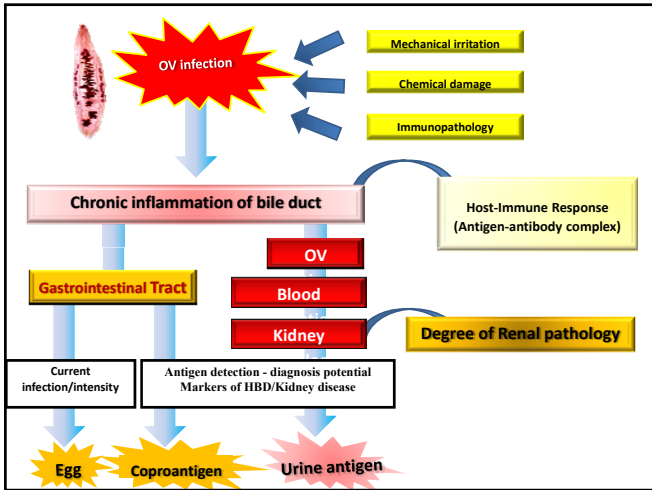
- ความไวต่ำ
- มีปัญหาในการหา cure rate/re-infection/ incidence of infection
- ต้องตรวจซ้ำ และ ตรวจหลายครั้ง
- วิธีการตรวจเข้มขันต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือ
- ต้องมีประสบการณ์และความชำนาญ
- เป็นที่รังเกียจและหลีกเลี่ยง

การตรวจวินิจฉัยที่พึงประสงค์

ASSURED criteria by WHO

- ราคาถูก
- ความไวสูง ความจำเพาะสูง ไม่มีผลบวกปลอม
- ปฏิบัติได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก
- มีความยืดหยุ่นสูงปฏิบัติในสถานะใดก็ได้
- ไม่ต้องการเครื่องมือและอุปกรณ์เฉพาะ
- ส่งต่อผู้ใช้งานได้ง่าย





Colley et al 2013

New choice for fecal examination

- Simple smear
- Kato thick smear
- Formalin-Ethyl acetate concentration technique (FECT)
- Parasep Kit

Mini Parasep® SF : Procedure

1. Sample Preparation
2. Emulsification
3. Centrifugation
4. Examination

Parasite infections determined by three different diagnostic methods

Parasites	(+ve (%))			Comparisons		
	Simple smear	FECT	Kit	Simple smear vs FECT	Simple smear vs Kit	FECT vs Kit
<i>Opisthorchis viverrini</i>	2 (1.5)	12 (9.2)	7 (5.4)	*P = 0.011	*P = 0.172	χ² = 1.420 P = 0.233
<i>Strongyloides stercoralis</i>	9 (6.9)	14 (10.8)	11 (8.5)	χ² = 1.192 P = 0.275	χ² = 0.217 P = 0.641	χ² = 0.398 P = 0.528
Hookworm eggs	1 (0.8)	1 (0.8)	1 (0.8)	*P = 0.334	*P = 0.071	χ² = 0.071 P = 0.790
Minute intestinal fluke	0 (0)	1 (0.8)	1 (0.8)			
<i>Taenia</i> sp.	0 (0)	0 (0)	3 (2.3)			
<i>Capillaria philippinensis</i>	2 (1.5)	4 (3.1)	3 (2.3)			
<i>Trichuris trichiura</i>	0 (0)	1 (0.8)	0 (0)	χ² = 8.053 P = 0.005	χ² = 3.813 P = 0.051	χ² = 0.841 P = 0.359
Total	13 (10.0)	30 (23.1)	24 (18.5)			

n = 130; *Fisher's exact test

Efficacy of simple smear, FECT and Kit

Using combination as the gold standard

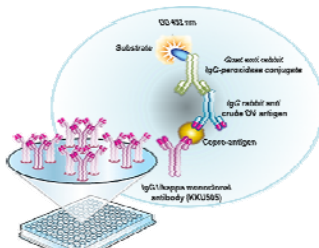
Methods	% (95% CI)			
	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Simple smear	31.7 (18.6-48.2)	100 (94.8-100)	100 (71.7-100)	76.1 (67.1-83.3)
FECT	73.2 (56.8-85.2)	100 (94.8-100)	100 (85.9-100)	89.0 (80.8-94.1)
KIT	58.5 (42.2-73.3)	100 (94.8-100)	100 (82.2-100)	82.8 (75.3-90.1)

n = 130

Contents lists available at ScienceDirect
Acta Tropica
 Journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Improved performance and quantitative detection of copro-antigens by a monoclonal antibody based ELISA to diagnose human opisthorchiasis

Nattaya Watwiengkam^{a,b}, Jiraporn Sithithaworn^c, Kunyarat Duengngai^d, Banchob Sripan^{a,c}, Thewarach Laha^a, Maria Vang Johansen^e, Paiboon Sithithaworn^{a,b,h}



Watwiengkam et al., 2013

Previous reports for copro antigen detection in opisthorchiasis

	Sensitivity	Specificity
Sirisinha et al. (1991 & 1995*)	57.1%	70.5%
Chaicumpa et al. (1992)	31%	100%
Duengngai (2012)	73.1%	40%

* Recover egg-negative cases

Reports for Mab-ELISA development for copro antigen detection in opisthorchiasis

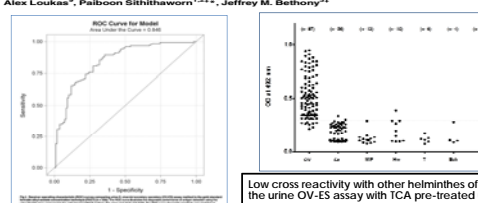
	Sensitivity	Specificity
Sirisinha et al. (1991 & 1995*)	57.1%	70.5%
Chaicumpa et al. (1992)	31%	100%
Duengngai et al (2012)	73.1%	40%
Watwiengkam et (2013*)	97.9%	54.2%

* Recover egg-negative cases

RESEARCH ARTICLE PlosNTD 2015

Advances in the Diagnosis of Human Opisthorchiasis: Development of *Opisthorchis viverrini* Antigen Detection in Urine

Chanika Worawith^{1,2*}, Christine Kamamia^{3,4}, Anna Yakovleva^{5,6}, Kunyarat Duengngai^{1*}, Chompoonat Wangboon^{7,8}, Jiraporn Sithithaworn⁹, Nattaya Watwiengkam¹, Nianna Namwat¹⁰, Anchalee Techasen¹¹, Watcharin Lollom¹², Puangrat Yongvanit¹³, Alex Loukas¹⁴, Paiboon Sithithaworn^{15,16}, Jeffrey M. Bethony¹⁷



Low cross reactivity with other helminths of using the urine OV-ES assay with TCA pre-treated urine.


Table 4. Diagnostic performance of antigen detection by the urine *O. viverrini* Excretory Secretory (OV-ES) assay compared with the gold standard formalin-ethyl alcohol concentration technique (FECT) in field-collected samples (n = 235) and the odds on predicting opisthorchiasis by urinary antigen detection using urine OV-ES assay.

Comparator	AUC*	Cut-off	Sensitivity	Specificity	NPV	PPV	LR+	LR-
FECT	0.848	36.5	0.81	0.70	0.76	0.89	2.69	0.27

*AUC refers to the area under the Receiver operating characteristic (ROC) curve.
 †Positive Predictive Value (PPV), Negative Predictive Value (NPV) and Likelihood Ratio (LR) were estimated using 50% prevalence rate of OV.
 ‡The term LR+ refers to the likelihood of observing a positive test result in patients with OV.
 §LR- refers to the likelihood of observing a negative test result with individuals without OV infection.

Urine antigen detection (mAb-ELISA)

7 hours



Activity	Optimal condition
1. Plate coating	5 µg/ml of mAb specific for <i>O. viverrini</i> ES-antigen
2. Plate blocking	5% Skimmed milk
3. Human sample	4% TCA urine or fecal samples
4. Capture antibody	10 µg/ml of pAb (rabbit IgG anti-crude <i>O. viverrini</i> antigen)
5. Conjugate	1:4000 biotin-goat anti rabbit IgG 1:10000 streptavidin-HRP
6. Substrate	1 mg/ml OPD
7. Stop reaction	2 M H ₂ SO ₄

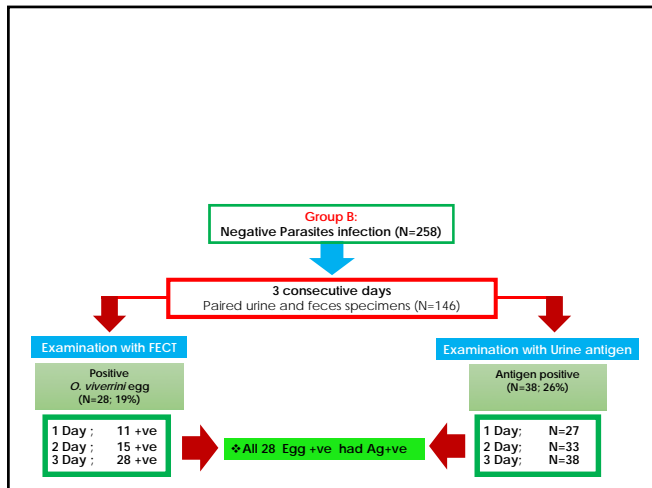
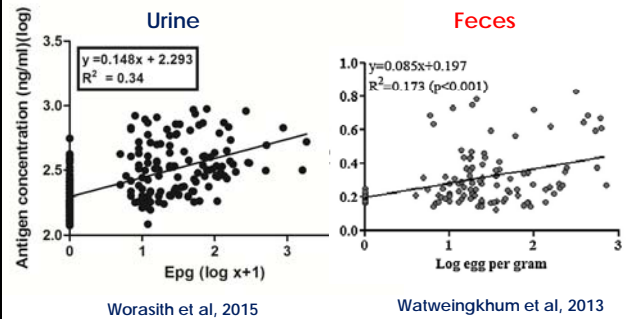
Comparison between antigen detection by Mab-ELISA Coproantigen (n=141) and urine antigen (n=235) and FECT (Watwiengkam et al., 2013, Worawith et al., 2015)

Egg count	n	Copro Ag (%)	n	Urine Ag (%)
0	40	19(47.5)	101	40(39.6)
<50	70	42(60)	81	69(85.1)
<100	13	8(61.5)	19	17(89.4)
>100	18	17(94.4)	25	24(96.4)
Total	141	86	235	152
%+ve	71.1%	61%	53.1%	64.6%

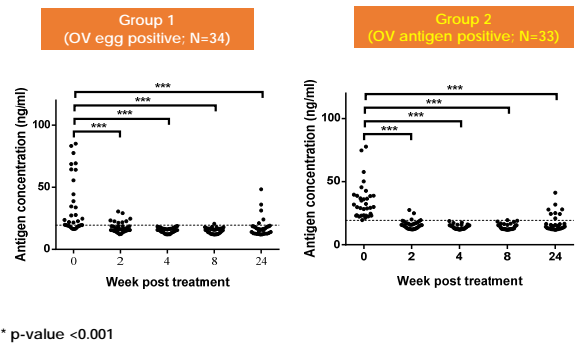
Diagnostic accuracy With reference to FECT

ELISA Method	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Predictive value(%) (95% CI)	
			Positive	Negative
Copro-antigen	66.3	52.5	77.9	38.2
Urinary antigen	81	70	75	76

Relationship between urinary and copro antigen of *O. viverrini* and intensity of infection (egg/gram feces)



Antigen profile post praziquantel treatment

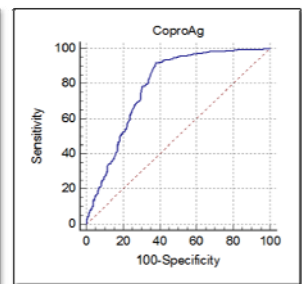
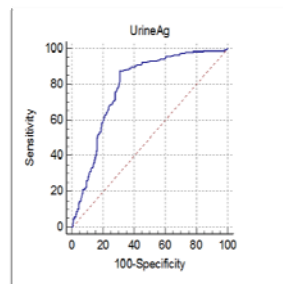


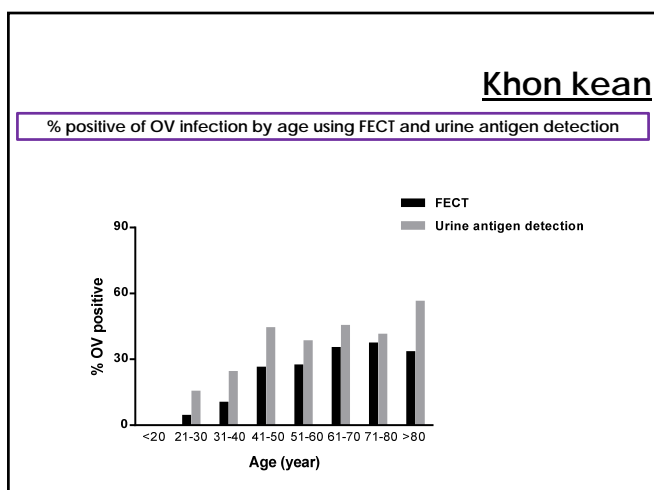
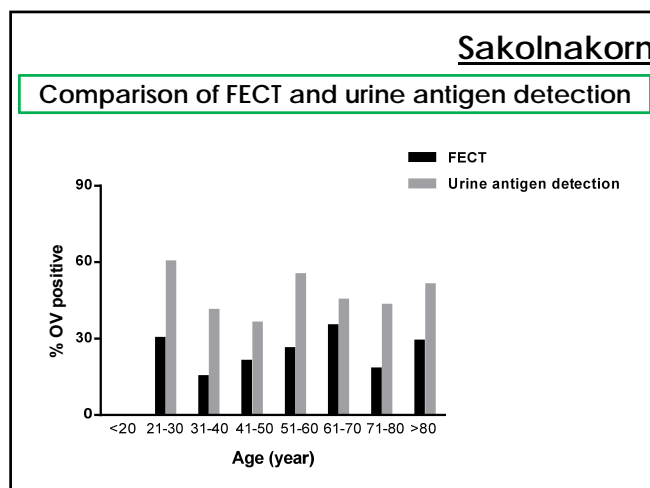
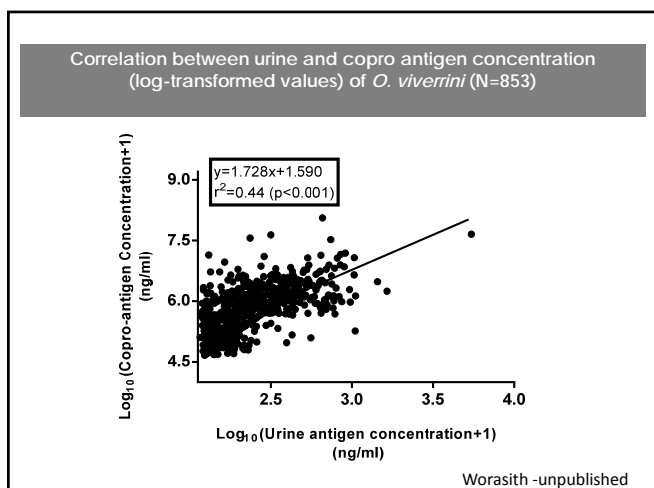
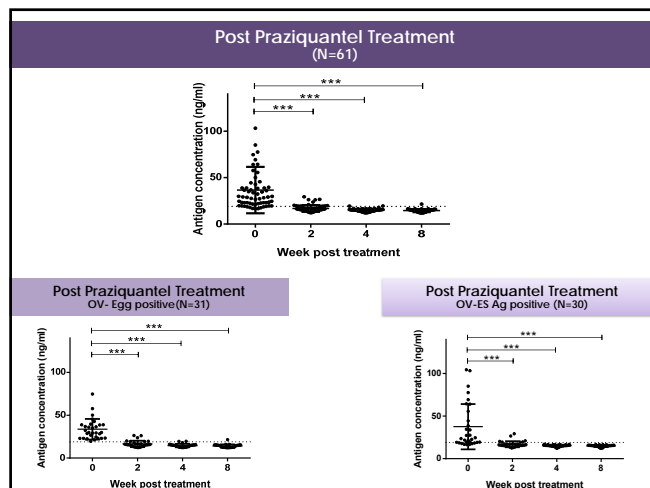
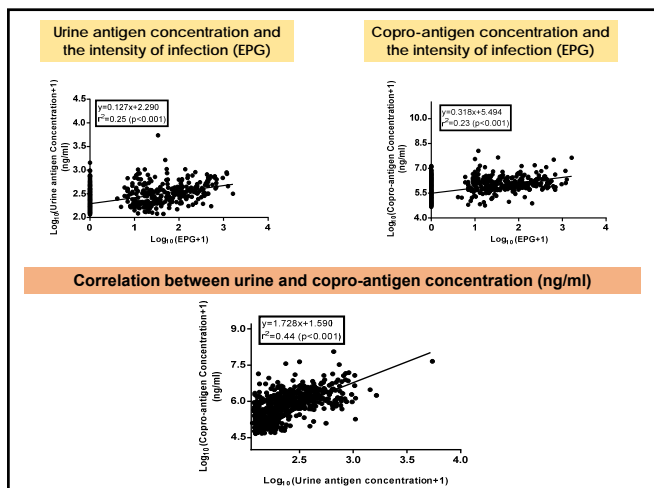
Cure rate and Re-infection using urine antigen detection (N=67)

Method	Cure rate n (%)			
	2 wk	4 wk	8 wk	24 wk
FECT	59 (88%)	67 (100%)	64 (96%)	58(87%)
Urine antigen detection	53 (79%)	67 (100%)	66 (99%)	54(80%)

Method	Re-infection n (%)	
	8 wk	24 wk
FECT	3 (4%)	9 (13%)
Urine antigen detection	1 (1%)	13 (20%)

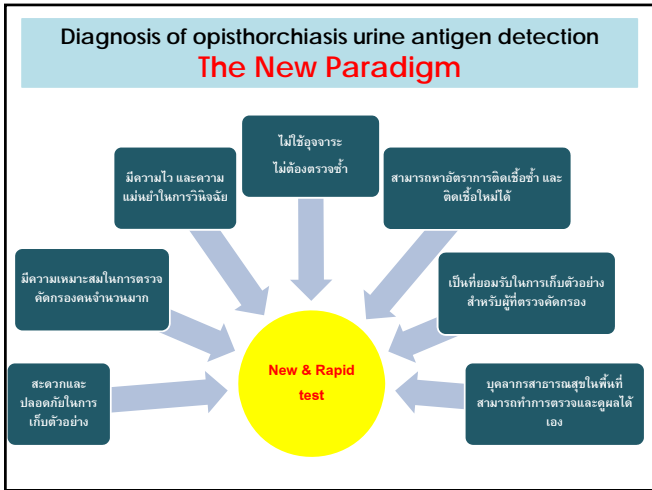
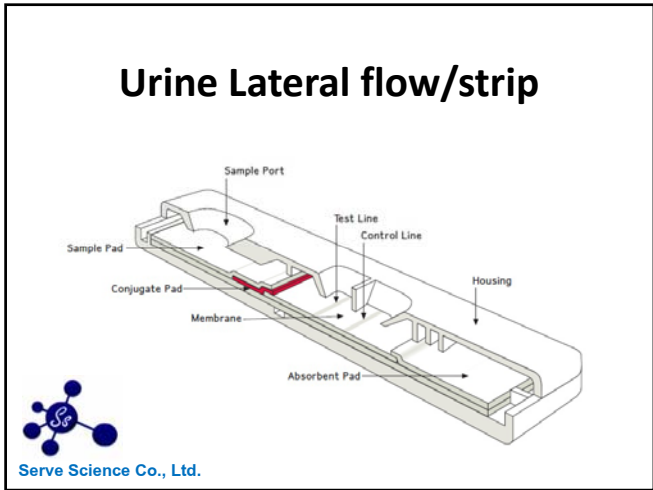
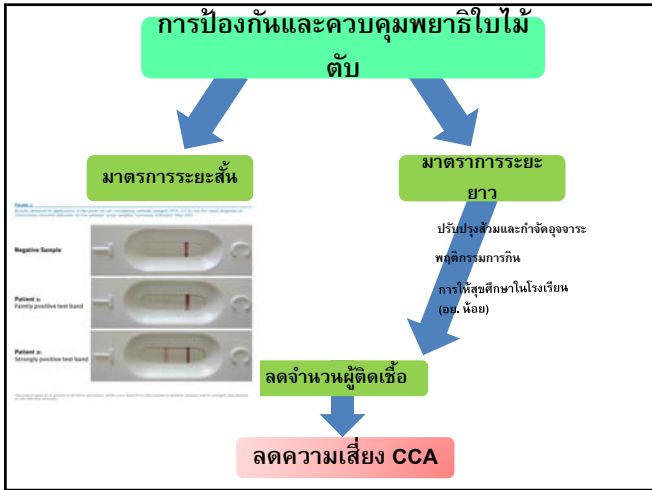
Gold standard	Method	AUC *	Cutoff	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
FECT	Urine antigen	0.789	0.297	87.4	69.0	91.9	57.8
	Copro antigen	0.788	0.448	88.8	63.3	92.1	54.1



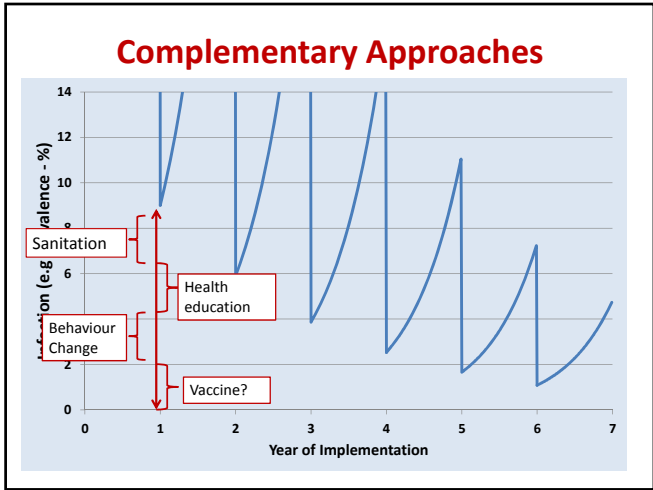
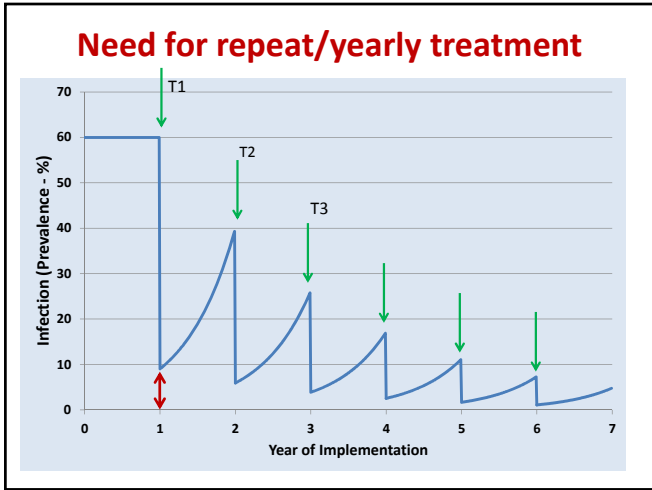


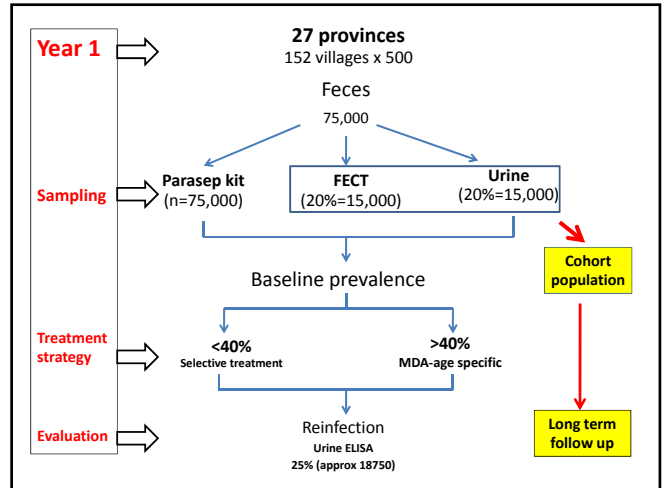
OV prevalence in 3 localities by diagnostic methods

Locality	Number of participants	OV positive (%)		
		FECT (%)	Urine antigen (%)	Copro antigen (%)
Sakolnakorn	177	35 (19.7)	70 (39.5)	79 (44.6)
Khon Kaen	558	160 (28.7)	249 (44.7)	270 (48.4)
Chaiyaphum	118	85 (72)	82 (69.4)	88 (74.5)
Total	853	280 (32.8)	401 (47.0)	437 (51.2)



- ### Aims
- Application of new urine antigen detection for PZQ treatment
 - Prevalence mapping
 - Geographical locations
 - Age-sex profiles
 - Reinfection after curative treatment
 - New infection (incidence rate)
 - Cohort population for long term control program
 - OV data entry into cascap/Isan cohort : **reliable data base**





Conclusion

Method	Sensitivity	Sample storage
Simple smear	31.7	no
Kato-thick smear	52.1	no
Parasep Kit	58.8-61	yes
FECT	70-82.5	yes

