

รายงานโครงการวิจัย  
ทุนโครงการวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน  
ปีงบประมาณ 2545  
รหัสโครงการวิจัยเลขที่ 0745/001

ชื่อโครงการวิจัย

การวิเคราะห์ยีนที่สร้างไรโบโซมสับยูนิตเล็กและยีนที่สร้างทรอมโบสปอนดินรีเรท แอทฮีสิฟ  
โปรตีนของคริปโตสปอริเดียม พาร์วุม จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอดส์ในประเทศไทย

Analysis of genes encoding small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) and  
thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Cryptosporidium parvum* from  
HIV-infected patients in Thailand

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์

[Somchai Jongwutiwes M.D., Ph.D. (Molecular Protozoology)]

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมวิจัย รองศาสตราจารย์ ณัฐรส จันทชุม

[Nutaros Chantachum M.Sc., D.A.P.&E.]

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย

[Prasert Sittichareonchai M.D., M.Sc., Thai Board of Internal Medicine]

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทคัดย่อ

*Cryptosporidium* เป็น โปรโตซัวในกลุ่ม coccidia ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากเป็นสาเหตุหนึ่งของภาวะท้องเสียเรื้อรังในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอดส์ เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มียาที่มีประสิทธิภาพสำหรับรักษาผู้ติดเชื้อ *Cryptosporidium* ดังนั้น การเฝ้าระวังตลอดจนการป้องกันการติดเชื้อและการแพร่กระจายของเชื้อจึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมโรค เนื่องจาก *Cryptosporidium* ที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์มีหลาย species โดยแต่ละ species จะมีรังโรคแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการตรวจหา oocyst ของ *Cryptosporidium* ในอุจจาระไม่สามารถแยก species ได้ ทั้งนี้ข้อมูลเกี่ยวกับ species ของ *Cryptosporidium* ที่ก่อโรคในผู้ป่วยโรคเอดส์ยังไม่มีการศึกษามาก่อนในประเทศไทย ดังนั้นจึงทำการรวบรวมตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอดส์และมีอาการท้องเสียจากการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างปี ค.ศ. 1996 ถึง ค.ศ. 2000 ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนที่สร้างไรโบโซมหน่วยย่อยเล็ก (small subunit ribosomal RNA, SSUrRNA) และยีนที่สร้างธรมโบสปอนดีนรีเทอเทอซีฟโปรตีน (thrombospondin-related adhesive protein, TRAP-C1) พบว่าสามารถแยก species ของ *Cryptosporidium* ได้ผลสอดคล้องกัน โดยพบ *Cryptosporidium parvum* ชนิด human genotype 17 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบ *Cryptosporidium felis* ซึ่งพบในสัตว์จำพวกแมว *Cryptosporidium muris* พบในหนู และ *Cryptosporidium meleagridis* ซึ่งพบในสัตว์ปีกอย่างละ 1 ตัวอย่าง ดังนั้นแหล่งที่มาของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์ส่วนใหญ่เกิดจากการติดต่อกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยเอง ส่วนน้อยเกิดจากการติดต่อกันจากสัตว์สู่มนุษย์ ผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังและควบคุมโรคต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทนำ

ภาวะท้องเสียในผู้ป่วยโรคเอดส์นั้น มีผู้ประมาณว่าจะเกิดขึ้นอย่างน้อยหนึ่งครั้งในผู้ป่วย ร้อยละ 30 ถึง 80 ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และปรสิต (Smith et al, 1988) หรืออาจเกิดจากผลข้างเคียงของยาบางชนิด ตลอดจนภาวะท้องเสียเรื้อรังที่ไม่ทราบสาเหตุชัดเจน ในผู้ป่วยโรคเอดส์ (AIDS enteropathy) (Greenson et al, 1991) อุบัติการณ์การตรวจพบสาเหตุของจุลชีพที่ทำให้เกิดภาวะท้องเสียเรื้อรัง ในผู้ป่วยโรคเอดส์ แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษา ภูมิภาคที่ศึกษา ตลอดจนวิธีการตรวจวินิจฉัย และประสบการณ์ของผู้ตรวจทางห้องปฏิบัติการ (Gerberding, 1989) อย่างไรก็ตามสาเหตุของอาการท้องเสียที่สำคัญประการหนึ่งและยังไม่มียาที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้คือ การติดเชื้อที่เกิดจาก *Cryptosporidium* spp. จากการศึกษาทางระบาดวิทยาในยุโรปและสหรัฐอเมริกาพบว่าผู้ป่วยโรคเอดส์ร้อยละ 3-4 พบการติดเชื้อดังกล่าวและ อัตราการตรวจพบจะเพิ่มขึ้นเท่าตัว เมื่ออาการของโรคเอดส์ดำเนินไปมากขึ้น (Sorvillo et al, 1994; Pedersen et al, 1996) ส่วนในประเทศกำลังพัฒนาอาจพบได้มากถึงร้อยละ 38-40 ของผู้ป่วยโรคเอดส์เช่นในประเทศ คิวบา มาลี และเอธิโอเปีย เป็นต้น (Griffiths, 1998) สำหรับในประเทศไทย อุบัติการณ์การตรวจพบ *Cryptosporidium parvum* ในผู้ป่วยดังกล่าวพบประมาณร้อยละ 8.8-11.6 (Moolasart et al, 1995; Wanke et al, 1999)

แม้ว่าการติดเชื้อ *Cryptosporidium* เป็นสาเหตุสำคัญของภาวะทุพโภชนาการจากอาการท้องเสียในผู้ที่ติดเชื้อเอดส์แล้ว ยังพบว่าการติดเชื้อดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในเด็กที่มีภาวะทุพโภชนาการ โดยพบอัตราการติดเชื้อสูงกว่าในเด็กที่มีภาวะโภชนาการปกติ (Sarabia-Arce et al, 1990) อัตราการตรวจพบ *Cryptosporidium* ในกลุ่มเด็กที่มีภาวะทุพโภชนาการอาจสูงถึงร้อยละ 31.8 โดยอาการท้องเสียที่เกิดขึ้นในเด็กอาจมีลักษณะเฉียบพลัน หรือเรื้อรังและมักทำให้กลุ่มเด็กที่มีภาวะทุพโภชนาการเกิดอาการของโรครุนแรง ในประเทศอินเดียพบว่าเด็กมีอาการท้องเสียเรื้อรังที่เกิดจากการติดเชื้อ *Cryptosporidium* มีภาวะทุพโภชนาการร่วมด้วยมากถึงร้อยละ 85 (Jaggi et al, 1994) ในประเทศไทยอุบัติการณ์การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในเด็กสถานสงเคราะห์พบมากถึงร้อยละ 7.3 (Jongwutiwes et al, 1990) และเด็กดังกล่าวล้วนมีภาวะทุพโภชนาการร่วมด้วย โดยผู้ป่วยเด็กบางรายมีอาการท้องเสียรุนแรงซึ่งอาจถึงแก่ชีวิตได้ถ้าไม่ได้รับการรักษาแบบประคับประคองที่ถูกต้อง (Jongwutiwes et al, 1990)

ความสำคัญของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* นอกจากจะพบในภาวะที่มีความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยและกลุ่มเด็กที่มีภาวะทุพโภชนาการแล้ว ยังพบได้ในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติ ซึ่งการติดเชื้ออาจเกิดจากน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนของอุจจาระจากคนหรือสัตว์ที่มีเชื้อ การอยู่ใกล้ชิดคลุกคลีกับผู้ที่ติดเชื้อ การติดต่อทางเพศสัมพันธ์ การติดต่อจากสัตว์สู่คน ตลอดจน

ความเป็นไปได้ที่จะเกิดจากการหายใจเอาระยะติดต่อก้าวเข้าไป (Griffiths, 1998) โดยทั่วไปการระบาดของโรคในคนกลุ่มใหญ่มักเกิดขึ้นในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ใน Milwaukee และ Las Vegas สหรัฐอเมริกา (MacKenzie et al, 1994; Goldstein et al, 1996) การระบาดดังกล่าวทำให้ผู้ป่วยที่เป็นโรคเอดส์เสียชีวิตเป็นจำนวนมาก

### ประวัติการค้นพบ *Cryptosporidium*

cryptosporidiosis เป็นโรคที่เกิดจากโปรโตซัวชนิดหนึ่งในกลุ่ม coccidia ใน genus *Cryptosporidium* ทำให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด โดยในปี ค.ศ. 1907 Tyzzer รายงานการตรวจพบโปรโตซัวชนิดนี้เป็นครั้งแรกจากการตรวจเยื่อกระเพาะอาหาร (gastric crypt) ของหนูทดลอง และตั้งชื่อว่า *Cryptosporidium muris* (Tzipori & Griffiths, 1998) และต่อมามีรายงานการตรวจพบ *Cryptosporidium* ในอวัยวะต่างๆของสัตว์หลายชนิด เช่น เยื่อกระเพาะอาหารของหนู งู และลูกม้า เยื่อระบบทางเดินหายใจของลูกไก่และไก่วง เยื่อทางเดินน้ำดีของลูกม้า และลิง โดยที่สัตว์เหล่านี้มีการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในลักษณะที่ไม่ปรากฏอาการ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1955 มีรายงานว่าเชื้อ *Cryptosporidium* ที่พบในลำไส้ ของไก่วงทำให้เกิดพยาธิสภาพ และอาการของอุจจาระร่วง อย่างรุนแรงจนถึงเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุสำคัญของการระบาดของโรคอุจจาระร่วงระบาดในลูกวัวอีกด้วย (Panciera & Thamassen, 1971) หลังจากที่มีการศึกษามากขึ้น ทำให้ทราบว่า การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ทำให้เกิดพยาธิสภาพอย่างเฉียบพลัน หรืออย่างเรื้อรังได้ ทั้งในสัตว์เลี้ยง และในสัตว์ป่า เช่น การพบเชื้อในสัตว์เลี้ยงคลาน ได้แก่ งู ในสัตว์ปีก ได้แก่ ไก่ ไก่วง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ หนู หนูตะเภา หม่าป่า แมว ลูกวัว แกะ รวมทั้งถึงในห้อยทดลอง ดังนั้นการติดเชื้อ *Cryptosporidium* จึงมีบทบาทที่สำคัญมากในทางสัตวแพทย์

การตรวจพบโปรโตซัวชนิดนี้ในคนมีรายงานเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 โดย Nime และคณะ ตรวจพบเชื้อดังกล่าวในผู้ป่วยเด็กหญิง อายุ 3 ปี มีอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำอย่างรุนแรง แม้ว่าการตรวจอุจจาระไม่พบเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียดังกล่าว แต่ผลการตรวจชิ้นเนื้อจากเซลล์เยื่อลำไส้ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบเชื้อ *Cryptosporidium* อาศัยอยู่ภายในของเซลล์เยื่อแต่จะอยู่ภายนอกของไซโตพลาสซึม (Nime et al, 1976) และในปีเดียวกัน Meisel และคณะ รายงานการตรวจพบการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในผู้ป่วยอายุ 39 ปี ที่กำลังได้รับยากดภูมิคุ้มกันมีอาการท้องเสียอย่างรุนแรงเช่นเดียวกัน (Meisel et al, 1976) หลังจากนั้นรายงานการติดเชื้อนี้มีประปราย ซึ่งส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเอดส์ (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) ทำให้เกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรงจนถึงเสียชีวิตได้ ดังนั้นการติดเชื้อ *Cryptosporidium* จึงเป็นจุลชีพก่อโรคประเภทฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ที่มีความสำคัญมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HIV (human immunodeficiency virus) (Ma & Soave, 1983) ในระยะแรก ๆ การตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium*

ต้องอาศัยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจากตัวอย่างเยื่อผนังลำไส้ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว ทำให้ไม่สามารถใช้สำหรับวินิจฉัยโรคได้โดยทั่วไปเนื่องจากมีความยุ่งยากในขั้นตอน ต่อมาในปี ค.ศ. 1978 มีการพัฒนาวิธีการตรวจอุจจาระเพื่อหา oocyst ของเชื้อ โดยการย้อมสี giemsa แต่การติดสีของ oocyst นั้นยังไม่ค่อยดีนัก (Pohlenz et al, 1978) จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1980 เป็นต้นมา มีการตรวจหา oocyst ของ *Cryptosporidium* ในอุจจาระด้วยวิธีการย้อมสีต่างๆ มากขึ้นจึงทำให้การวินิจฉัยโรค cryptosporidiosis สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ดังนั้นการศึกษาระบาดวิทยาของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* จึงเพิ่มมากขึ้น โดยลำดับ อย่างไรก็ตามการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ไม่ได้จำกัดเฉพาะผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือผู้ที่ติดเชื้อ HIV เท่านั้น แต่พบว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติทั้งผู้ใหญ่และเด็กมีอาการท้องเสียอย่างเฉียบพลันได้เช่นกันแต่อุบัติการณ์ของการติดเชื้อจะต่ำกว่า (Current et al, 1983; Jokipii et al, 1983)

ในปี ค.ศ. 1995 มีผู้จำแนก species ของเชื้อ *Cryptosporidium* โดยอาศัยความจำเพาะต่อ host ไว้หลาย species ได้แก่ *C. parvum* พบในบริเวณเยื่อบุลำไส้เล็กของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม *C. muris* พบในสัตว์จำพวกฟันแทะโดยเฉพาะอย่างยิ่งจำพวกหนู โดยพบเชื้อในบริเวณเยื่อบุกระเพาะอาหาร *C. meleagridis* และ *C. baileyi* พบเชื้อบริเวณ cloaca bursa ลำไส้และหลอดลมของสัตว์ปีก เช่น ไก่ เป็ด ไก่วง และนก เป็นต้น ส่วนเชื้อ *C. serpentis* พบในสัตว์เลื้อยคลานประเภทงู โดยพบในบริเวณเยื่อบุกระเพาะอาหาร และ *C. nasorum* พบในบริเวณเยื่อบุกระเพาะอาหารและลำไส้ของปลา (O'Donoghue, 1995) ในปี ค.ศ. 1998 มีรายงานการพบเชื้อ *C. saurophilum* ในสัตว์เลื้อยคลานที่มีขนาดเล็กประเภท จิ้งจก ตุ๊กแก ตะกวด โดยพบเชื้อที่บริเวณเยื่อบุลำไส้ (Koudela & Modry, 1998) และในปี ค.ศ. 2000 มีรายงานการพบ species ใหม่ คือ *C. andersoni* พบเชื้อได้ในบริเวณกระเพาะอาหารของสัตว์ประเภทเขี้ยวเอื้อง เช่น วัว ควาย กวาง อูฐ เป็นต้น (Lindsay, 2000) ถึงแม้ว่า *Cryptosporidium* จะมีการจำแนกไว้หลาย species ก็ตาม แต่ species ที่ทำให้เกิดโรคในคนนั้นเชื่อว่าเป็น *C. parvum* เนื่องจาก oocyst ของ *C. muris* มีขนาดใหญ่กว่าของ *C. parvum* และการติดเชื้อของ *C. muris* มักไม่ปรากฏอาการในสัตว์ นอกจากนี้ยังพบรายงานการติดเชื้อ *C. parvum* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ อีกหลายชนิด

#### ระบาดวิทยา

ในประเทศไทยได้มีการสำรวจพบความชุกของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* โดยพบร้อยละ 3.7 ในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 14 ปี และร้อยละ 7.1 ในเด็กที่มีอายุ 2-3 ปี ที่มารับการตรวจโรคอุจจาระร่วงในโรงพยาบาลศิริราช โดยมีอาการท้องเสียเรื้อรังนานกว่า 7 วัน (Thamlikitkul et al, 1987) และพบร้อยละ 26.7 ในเด็กบ้านปากเกร็ดที่มีอาการท้องเสีย ในกลุ่มเด็กอายุ 4-12 เดือน ซึ่งเป็นอัตราการติดเชื้อที่สูงที่สุด (Jongwutiwes et al, 1990) สำหรับสถานเลี้ยงเด็กกำพร้าที่จังหวัดเชียงใหม่พบเด็กติดเชื้อร้อยละ 9.26 และที่โรงพยาบาลเด็กตรวจพบร้อยละ 1.6 การติดเชื้อ *C.*

*parvum* ในผู้ป่วยบางรายที่มีอาการท้องเสียอาจเกิดขึ้นอย่างรุนแรง และอาจเสียชีวิตได้หากได้รับการรักษาไม่ถูกต้อง การแพร่กระจายของโรคอาจเกิดขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยโรคเอดส์ทั้งในกลุ่มที่มีเพศสัมพันธ์ ทั้งแบบ heterosexual และแบบ homosexual ซึ่งในปี ค.ศ. 1994 ได้มีการศึกษาในประเทศสเปน พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคเอดส์ที่มีอาการท้องเสียเรื้อรังร้อยละ 26 และมักพบขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเพศสัมพันธ์แบบ homosexual (Forgacs et al, 1983; Sorvillo et al, 1994)

การแพร่กระจายของเชื้อทางน้ำเป็นสาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่งของการติดเชื้อโดยรายงานการระบาดครั้งใหญ่เกิดขึ้นที่ เมือง Milwaukee มลรัฐ Wisconsin สหรัฐอเมริกา จากการสำรวจชาวเมืองพบผู้ที่ติดเชื้อ *C. parvum* ประมาณ 4 แสนคนมีอาการถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ และบางรายเสียชีวิต เนื่องจากการติดเชื้อดังกล่าว (Addiss et al, 1993) สาเหตุที่สำคัญเกิดจากการปนเปื้อนของ oocyst ในแหล่งน้ำดื่มที่ใช้รวมทั้งในน้ำประปา หลังจากนั้นพบการระบาดเกิดขึ้นคล้ายกันในเมือง Milwaukee โดยมีสาเหตุจากการปนเปื้อนของเชื้อในน้ำแอมป์เปิด (Millard et al, 1994) รวมทั้งในน้ำประปาที่ผ่านการกรองและฆ่าเชื้อโดยน้ำยาคลอรีน สำหรับการกรองที่มีประสิทธิภาพในการแยก oocyst ออกจากน้ำได้นั้นควรใช้แผ่นกรองที่มีขนาดในการกรองน้อยกว่า 1 ไมครอน (Hayes et al, 1989) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำนมสามารถเป็นแหล่งแพร่กระจายของโรค ได้ถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้อ อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่สูงกว่า 67.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สามารถทำลาย oocyst ที่เป็นระยะติดตัวของเชื้อได้ (Fayer et al, 1994)

การติดเชื้อ *C. parvum* จัดเป็น โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonosis) เนื่องจากมีรายงานการระบาดของโรคอุจจาระร่วงในกลุ่มคนที่เลี้ยงสัตว์ และในขณะเดียวกันก็สามารถตรวจพบ oocyst ของเชื้อ *C. parvum* ในกลุ่มคนเหล่านี้ที่มีอาการอุจจาระร่วง นอกจากนี้ยังพบผู้ป่วยที่เป็นนักศึกษา ซึ่งทำการวิจัยเกี่ยวกับสัตว์ และกลุ่มผู้ดูแลสัตว์มีการติดเชื้อ *C. parvum* โดยเฉพาะการติดเชื้อจากวัวมาสู่คนในฟาร์มเลี้ยงวัว นอกจากนี้เชื่อว่าเชื้อ *Cryptosporidium* สามารถแพร่กระจายได้ทางอากาศโดยการหายใจแล้วกลืนเข้าสู่ลำไส้ต่อไป ซึ่งเป็นการแพร่กระจายคล้ายกับการติดเชื้อในทางเดินหายใจของนก (Hojlyng et al, 1987)

จากการรายงานขององค์การอนามัยโลก ในปี ค.ศ. 1997 พบว่าประชากรจำนวน 22.6 ล้านคนทั่วโลกมีการติดเชื้อ HIV และมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น สำหรับในประเทศไทยเริ่มพบผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HIV ตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1980 และในปัจจุบันก็มีแนวโน้มที่สูงขึ้นเช่นกัน การแพร่กระจายของเชื้อสามารถตรวจพบได้ตลอดทั้งปีแต่อาจพบความแตกต่างของอุบัติการณ์ในแต่ละช่วงเวลาในแต่ละปี เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มียาที่ใช้ในการรักษาโรค cryptosporidiosis ที่ได้ผลดีนอกเหนือจากการรักษาแบบประคับประคอง ดังนั้นการทราบแหล่งที่มาของเชื้อโดยการตรวจลักษณะทางพันธุกรรมของ *Cryptosporidium* จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการวางมาตรการในการป้องกันโรคตลอดจนการศึกษาความรุนแรงของโรคจากเชื้อ หรือสายพันธุ์ และ species ต่างๆ อันจะเป็นแนวทางในการวางแผนการควบคุมต่อไป

### อนุกรมวิธานของเชื้อ *Cryptosporidium*

เชื้อ *Cryptosporidium* เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวชนิด eukaryote ซึ่งมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) แยกนิวเคลียสออกจากไซโตพลาสซึมชัดเจน *Cryptosporidium* จัดอยู่ใน Phylum *Apicomplexa* เนื่องจากในบางระยะของการเจริญเติบโตประกอบด้วย apical organelles ได้แก่ polar ring, rhoptries, micronemes, conoid และ subpellicular microtubules จัดอยู่ใน Class *Sporozoa* เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณได้โดยวิธีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศและไม่ใช้เพศได้ในวงชีวิต จัดอยู่ใน Subclass *Coccidiasina* เนื่องจากในวงชีวิตมีการสร้างระยะ merozoite (merogony) ระยะ gametocyte (gametogony) และมีการสร้าง sporozoite (sporogony) ทั้งนี้ก่อนที่จะมีการสร้าง merozoite จะมีการแบ่งนิวเคลียสภายในไซโตพลาสซึมเดียวกันเกิดเป็นระยะ schizont (schizogony) จึงจัดอยู่ใน Order *Eucoccidiorida* และเนื่องจากกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเกิดขึ้นแยกจากกันชัดเจน จึงจัดอยู่ใน Suborder *Eimeriorina* นอกจากนี้ระยะ oocyst ของ *Cryptosporidium* ภายในประกอบด้วย sporozoite ที่เป็นอิสระปราศจากเยื่อหุ้มอื่นนอกจากผนัง oocyst จึงจัดอยู่ใน Family *Cryptosporidiidae* สำหรับที่มาของชื่อ genus เนื่องจากในอดีตไม่มีการค้นพบระยะ oocyst (ประกอบด้วย sporozoite ภายใน) ชัดเจนจึงมีผู้ตั้งชื่อว่า *Cryptosporidium* หรือ "hidden spore" (Fayer & Unger, 1986)

### วงชีวิต (Life cycle)

วงชีวิตของเชื้อ *Cryptosporidium* เป็นแบบ monoxenous life cycle คือ มีการเจริญและการเพิ่มจำนวนแบบอาศัยเพศได้ด้วยวิธี gametogony และแบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธี merogony เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ได้ทั้งสองแบบภายในโฮสต์เพียงโฮสต์เดียว การเจริญเติบโตของเชื้อเกิดขึ้นภายในบริเวณเซลล์เยื่อผนังลำไส้ในลักษณะที่อยู่ในเซลล์ของโฮสต์ แต่อยู่ภายนอกไซโตพลาสซึม และเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเชื้อ *Cryptosporidium* อยู่ภายในส่วน microvilli ของเซลล์เยื่อผนังลำไส้ (Current & Garcia, 1991)

เชื้อ *Cryptosporidium* สามารถเข้าสู่ร่างกายโดยการกิน oocyst ซึ่งเป็นระยะติดต่อ ดังนั้นจึงมักเป็นการติดเชื้อแบบ fecal-oral transmission เมื่อ oocyst ที่เป็นระยะติดต่อผ่านไปถึงลำไส้เล็ก sporozoite ที่อยู่ภายใน oocyst จะออกมาลูกกลมเข้าสู่เซลล์เยื่อผนังลำไส้ ทำให้ microvilli ขยายขนาดและโป่งพองออกเกิดเป็นก้อนกลมประมาณ 2-5 ไมครอน เรียกว่า parasitophorous vacuole (Hampton & Rosario, 1996) ภายในเป็นที่อยู่ของ trophozoite ซึ่งลักษณะของ trophozoite มีรูปร่างกลมหรือรี เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ถึง 2.5 ไมครอน (Iseki, 1979) เป็นระยะเปลี่ยนแปลงมาจาก sporozoite และจะเจริญต่อไปเป็น merozoite ในที่สุด ซึ่งถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ โดยจะมีส่วนหนึ่งที่ใกล้กับเซลล์มีลักษณะเยื่อหุ้มที่เป็น electron-dense ระยะ trophozoite มีนิวเคลียสขนาดใหญ่เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ถึง 1.3 ไมครอน (Vitovec, 1984) และเมื่อ

trophozoite มีการเจริญต่อไปจะเริ่มเข้าสู่กระบวนการสร้าง merozoite โดยที่ trophozoite มีการแบ่งนิวเคลียสทั้งหมด 3 ครั้ง ภายในไซโทพลาสซึมเดียวกันเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่เรียกระยะดังกล่าวว่า mature schizont มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 ถึง 5 ไมครอน ภายในประกอบไปด้วย merozoite 8 ตัว เรียกว่า first generation merozoite และเมื่อเชื้อหุ้ม schizont แตกออก merozoite ที่อยู่ภายในจะเคลื่อนที่ออกมาสู่เซลล์ข้างเคียงของโฮสต์ต่อไป ซึ่ง merozoite ที่เจริญเต็มที่จะมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับพระจันทร์เสี้ยว และถูกล้อมรอบด้วย เยื่อหุ้ม 2 ชั้น โดยบริเวณด้านหน้าของ merozoite ประกอบด้วย apical organelles ได้แก่ conoid polar ring rhoptries และ micronemes เชื่อว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการลูกกลมเข้าสู่เซลล์เช่นเดียวกับ โปรโตซัวในกลุ่ม Apicomplexa อื่นๆ (O'Donoghue, 1995)

ภายหลังจากที่ merozoite เข้าสู่เซลล์แล้วจะเจริญเติบโตเป็น trophozoite และเข้าสู่กระบวนการเพิ่มจำนวนโดย merogony อีกครั้ง อย่างไรก็ตาม trophozoite บางส่วนจะมีการแบ่งนิวเคลียสเพียง 2 ครั้งทำให้ mature schizont ประกอบด้วย merozoite 4 ตัว ระยะ merozoite มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 ถึง 5 ไมครอน ช่วงนี้ถือว่าเป็น second generation merozoite เมื่อ merozoite รุ่นที่ 2 นี้ เข้าสู่เซลล์ข้างเคียง สามารถเจริญไปเป็น เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microgametocyte) และเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (macrogametocyte) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น microgamete และ macrogamete ตามลำดับ โดย microgamete จะไม่มีแฟลกเจลลา (non-flagellated microgamete) ภายในประกอบด้วย ribosomes endoplasmic reticulum และ membrane-bound vacuoles (Goebel et al, 1982) ทั้งนี้ microgametocyte 1 ตัว สามารถเปลี่ยนไปเป็น microgamete ได้ประมาณ 12-16 ตัว สำหรับ macrogametocyte จะเจริญต่อไปเป็น macrogamete โดยไม่มีการเพิ่มจำนวน ลักษณะของ macrogamete มีรูปร่างเป็นทรงกลมในระยะแรกไม่สามารถแยกความแตกต่างจาก trophozoite ได้ อย่างชัดเจน ภายในประกอบไปด้วยนิวเคลียสขนาดใหญ่จำนวน 1 นิวเคลียส และเมื่อเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเกิดกระบวนการปฏิสนธิจะเจริญไปเป็น zygote และ oocyst ตามลำดับ ซึ่งรูปร่างลักษณะของ oocyst เมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่ จะมีรูปร่างกลมหรือรี ภายในประกอบด้วย sporozoite จำนวน 4 ตัวซึ่งมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับพระจันทร์เสี้ยว และมี residual body จำนวนตั้งแต่ 2 จนมากกว่า 40 ก้อน ระยะ oocyst ของ *Cryptosporidium* นอกจากจะไม่มี sporocyst แล้ว ผนังด้านหนึ่งของ oocyst มีรอยต่อที่เรียกว่า subterminal suture (Current et al, 1986) ซึ่งรอยต่อดังกล่าวจะเป็นทางออกของ sporozoite จาก oocyst เพื่อลูกกลมเข้าสู่เซลล์ต่อไป ลักษณะของ oocyst ที่พบมี 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีผนัง oocyst บาง และชนิดที่มีผนังหนา ส่วนใหญ่ oocyst ที่ถูกสร้างขึ้นเป็นชนิดที่มีผนังหนา oocyst ชนิดนี้มักถูกขับออกจากโฮสต์ปนออกมากับอุจจาระ สำหรับ oocyst ที่มีผนังบางมักแตกภายในลำไส้ของโฮสต์ จึงทำให้ sporozoite ลูกกลมกับเข้าไปใน เยื่อลำไส้ใหม่อีกครั้ง (auto-infection) ดังนั้นจึงทำให้เชื่อมีการเพิ่มปริมาณในโฮสต์เป็นอย่างมาก การติดเชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้การดำเนินของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็วและมีพยาธิสภาพมากขึ้น โดยลำดับ



ถึงแม้ว่าจะไม่ได้รับเชื้อใหม่เพิ่มขึ้นจากภายนอก กรณีดังกล่าวมีความสำคัญมากในผู้ป่วยที่มีสภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การที่ oocyst มีการเจริญและแบ่งตัวไปเป็นระยะติดต่อที่มี 4 sporozoite เรียกขบวนการดังกล่าวว่า sporogony สำหรับ oocyst ของ *Cryptosporidium* มีลักษณะที่ต่างจาก coccidia อื่นๆ คือ sporozoite จะถูกล้อมรอบด้วยผนัง oocyst โดยตรงและปราศจาก sporocyst (Upton et al, 1989) ในวงจรชีวิตของเชื้อ *Cryptosporidium* ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มมีการติดเชื้อ โดยได้รับระยะ sporozoite ซึ่งอยู่ภายใน oocyst เข้าไปจนกระทั่งเจริญเป็น oocyst ที่มี sporozoite ภายในอีกครั้ง ใช้เวลาเพียง 2 วัน แต่อย่างไรก็ตามภาวะการติดเชื้ออาจคงอยู่เพียงระยะเวลาสั้นๆ หรืออยู่ได้นานหลายเดือน ขึ้นอยู่กับสภาวะของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ สำหรับระยะฟักตัวของเชื้อ *Cryptosporidium* ในคนใช้ระยะเวลาประมาณ 4-12 วัน นับตั้งแต่ได้รับ oocyst เข้าไปในร่างกายจนกระทั่งเกิดอาการของโรค สำหรับการติดเชื้อเกิดขึ้นในสัตว์ใช้ระยะเวลาประมาณ 2-14 วัน แต่ระยะเวลาที่สามารถตรวจพบ oocyst ในอุจจาระจะคงอยู่นานหลายวันจนกระทั่งหลายๆ เดือน แม้อาการจะหายไปแล้ว (Jokipii & Jokipii, 1986)

#### การแพร่กระจายของเชื้อในโฮสต์ต่างๆ

*Cryptosporidium* ทำให้เกิดโรคหรือเกิดการติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลาย Order ได้แก่ Order Primates เช่น สัตว์จำพวกลิง Order Artiodactyls เช่น แกะและสุกร Order Perissodactyls เช่น ม้า Order Carnivores ได้แก่ แมวและสุนัข Order Lagomorphs เช่น กระต่าย และ Order Rodentia ได้แก่ สัตว์จำพวกฟันแทะ เช่น หนู Order Diprotodonts ได้แก่ สัตว์ประเภทหมีและจิงโจ้ โดยธรรมชาติในการติดต่อเกิดขึ้นได้ทั้งในสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และสัตว์ที่ถูกกักขัง จากการศึกษาส่วนใหญ่พบการติดเชื้อในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ สวนสัตว์ สัตว์เลี้ยง และสัตว์ในท้องตลาด การติดเชืส่วนใหญ่เชื่อว่าเกิดจาก *C. parvum* โดยพบเชื้อในบริเวณลำไส้เล็ก และการติดเชื่อดังกล่าวมักทำให้สัตว์เกิดการเจ็บป่วย สำหรับการติดเชื้อในหนูขาว หนูขาว หนูตะเภา ลิงวู้ กวางภูเขา และในอูฐ มักพบในบริเวณเยื่ออุกระเพาะอาหาร อย่างไรก็ตาม *C. parvum* จากสัตว์ชนิดหนึ่งสามารถติดต่อสู่สัตว์ต่างชนิดกันได้ เช่น *C. parvum* ที่ได้จาก หนูตะเภา สามารถติดเชื้อในลูกแกะ สุกร และหนูถีบจักรได้ โดยการติดต่อดังกล่าวมักพบในโฮสต์ที่มีอายุน้อยโดยเฉพาะในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (O'Donoghue, 1995)

การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในสัตว์ปีกมีมากกว่า 30 species ข้อมูลดังกล่าวได้จากการตรวจวินิจฉัยในกลุ่มนกที่เลี้ยงไว้ในบ้าน ในสวนนกและในกลุ่มประชากรนกในป่า มีรายงานการระบาดของโรคอย่างรุนแรงอย่างมากในกลุ่มของสัตว์ปีกเศรษฐกิจ เช่น ในไก่ต่างๆ ไก่วง นกคุ้ม ไก่ฟ้า เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในสัตว์ปีกเชื่อว่าเกิดจาก 2 species คือ *C. meleagridis* และ *C. baileyi* โดยอาศัยคุณลักษณะความแตกต่างในด้านความจำเพาะของโฮสต์ บริเวณที่มีการติดเชื้อ และลักษณะของ oocyst อย่างไรก็ตามทั้ง 2 species ยังคงคุณลักษณะบาง

ประการ ไม่สามารถแยกออกจากกัน ได้อย่างชัดเจน แม้ว่าตำแหน่งของการติดเชื้อของ *C. meleagridis* อยู่ในลำไส้ bursa และ cloaca ของไก่วง ลูกไก่ และเป็ด ส่วน *C. baileyi* พบการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ของไก่วง ลูกไก่ และเป็ด ทั้งนี้ความรุนแรงของการเกิดโรคขึ้นอยู่กับ species ของเชื้อ อายุของโฮสต์ และระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Current & Reese, 1986)

การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในสัตว์เลื้อยคลานมีการศึกษาครั้งแรกในระหว่างปี ค.ศ. 1925 ถึง ค.ศ. 1969 พบ 5 species ที่ก่อโรคในสัตว์เลื้อยคลาน ได้แก่ *C. crotali*, *C. lampropeltis*, *C. ameivae*, *C. ctenosauris* และ *C. serpentis* หลังจากนั้นมียางานของการติดเชื้อในสัตว์เลื้อยคลานมากกว่า 57 species พบว่าในสัตว์เลื้อยคลานประเภทงู มีมากถึง 40 species เช่น งูเหลือม งูทางมะพร้าว และงูแมวเซา ในสัตว์เลื้อยคลานตัวเล็กประเภทจิ้งจกมี 15 species เช่น จิ้งจก ตุ๊กแก จิ้งเหลน กิ้งก่า และ แย้ ในสัตว์เลื้อยคลานประเภทเต่า มี 2 species เช่น เต่านา เต่าบก เป็นต้น โรค cryptosporidiosis ที่พบในสัตว์เลื้อยคลานมีความแตกต่างกับการติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และในสัตว์ปีก กล่าวคือ การติดเชื้อทั้งหมดในสัตว์เลื้อยคลานเกิดขึ้นในกระเพาะอาหาร ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีกเกิดขึ้นในระบบลำไส้และในระบบทางเดินหายใจตามลำดับ การติดเชื้อในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่พบในสัตว์ที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ส่วนในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม และในสัตว์ปีกมักพบการติดเชื้อในสัตว์แรกเกิด และในกลุ่มที่มีอายุน้อยๆ ระยะเวลาในการติดเชื้อจนกระทั่งมีการสร้าง oocyst ในสัตว์เลื้อยคลานมีระยะเวลานานหลายเดือนหรือยาวนานมากกว่า 2 ปี (Upton et al, 1989) นอกจากนี้การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ยังพบอย่างน้อยในปลา 9 species โดยสามารถพบได้ในปลาทะเลและในปลาน้ำจืด ส่วนใหญ่พบในปลาที่อยู่ในการเพาะเลี้ยงเชิงเศรษฐกิจ ปลาที่มีการกักขังบริเวณและในปลาสวยงามที่เลี้ยงไว้ในตู้ (Rush et al, 1990)

การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในคนพบรายงานเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 โดย Nime และคณะ และ Meisel และคณะ หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจ oocyst ในอุจจาระจึงมีการสำรวจอุจจาระที่มาตรฐานในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ตัวอย่างอุจจาระในผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสีย โดยเฉพาะในผู้ป่วย AIDS ตลอดจนการตรวจในการระบาดของโรคอุจจาระร่วง ผลการศึกษาพบการติดเชื้อร้อยละ 0.1 ถึง ร้อยละ 27.1 (ค่าเฉลี่ยร้อยละ 4.9) ในกลุ่มประเทศอุตสาหกรรมจากการสำรวจ 56 ประเทศ เปรียบเทียบกับกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาพบการติดเชื้อร้อยละ 0.1 ถึง ร้อยละ 31.5 (ค่าเฉลี่ย ร้อยละ 7.9) จากการสำรวจ 48 ประเทศ (Fayer & Ungar, 1986; Current & Garcia, 1991) และจากการสำรวจในกลุ่มผู้ที่ไม่มีอาการแสดงจากการติดเชื้อ พบอัตราการติดเชื้อถึงร้อยละ 2 (ค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.3) ในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วจากการสำรวจ 12 ประเทศ เปรียบเทียบกับในประเทศกำลังพัฒนาที่ไม่แสดงอาการพบการติดเชื้อ ถึงร้อยละ 9.8 (ค่าเฉลี่ยร้อยละ 1.6) ดังผลการสำรวจ 20 ประเทศ จากการสำรวจเห็นได้ว่าในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาพบการติดเชื้อสูงกว่ากลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วแสดงว่าการติดเชื้อชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับระบบการสุขาภิบาลที่ด้อยคุณภาพ

ภาพ การปนเปื้อนในน้ำดื่ม น้ำใช้ หรือจากคลุกคลีกับสัตว์เลี้ยงซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้พบการติดเชื้อที่สูง (Ungar, 1990)

#### การติดต่อของเชื้อ *Cryptosporidium*

การติดต่อจากคนสู่คนเป็นการระบาดของเชื้อที่สามารถเกิดขึ้นในศูนย์รับเลี้ยงเด็กรายวัน ซึ่งเกิดขึ้นได้บ่อย จากการศึกษาพบว่าเด็กที่มีการติดเชื้อส่วนหนึ่งไม่ปรากฏอาการ อีกทั้งยังสามารถเป็นพาหะของการแพร่เชื้อ ทำให้การระบาดของโรคมึแนวโน้มเกิดขึ้นได้สูงในศูนย์รับเลี้ยงเด็กรายวัน ในสถานกักกันนักโทษ และในชุมชนแออัดมากขึ้น รวมทั้งบุคลากรในโรงพยาบาลนอกจากนี้มีรายงานพบว่าผู้ป่วย AIDS หลายรายที่มารักษาในโรงพยาบาลมีการติดเชื้อมากกว่าเกิดขึ้นภายในโรงพยาบาลทำให้ผู้ป่วยหลายราย เสียชีวิตจากการเกิดโรค cryptosporidiosis ข้อควรระวังโดยทั่วไปที่สำคัญคือ ควรทำการแยกผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องออกจากผู้ป่วยโรคอื่นๆ เพื่อป้องกันการระบาดของโรค (Casemore, 1990)

การติดต่อจากสัตว์สู่คนเป็นการติดเชื้อจากการเลี้ยงสัตว์ภายในบ้าน ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ สัตว์ป่า และสัตว์ในสวนสัตว์ต่างๆ รวมทั้งในสัตว์เลี้ยงที่ใช้เป็นอาหารจากโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งสามารถเป็นพาหะในการติดเชื้อสู่คนได้ โดยมีรายงานผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อมากกว่าหลังจากการเข้าไปสำรวจตลอดจนการทำวิจัยในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่เป็นโรค จึงมีโอกาสเสี่ยงในการได้รับเชื้อได้ถ้าไม่มีระบบการป้องกันที่ดี อย่างไรก็ตาม ไม่มีข้อมูลชัดเจนเกี่ยวกับอัตราส่วนที่แน่นอนของการเกิดโรค cryptosporidiosis ในคนที่เกิดจากการได้รับเชื้อจากสัตว์ (Lengerich et al, 1993)

การติดต่อจากแหล่งน้ำต่าง ๆ มักเป็นการระบาดของเชื้อจากการปนเปื้อนของ oocyst ในสิ่งแวดล้อม การระบาดของเชื้อส่วนใหญ่เกิดขึ้นอันมีสาเหตุจากแหล่งน้ำ เช่น ในปี ค.ศ.1993 พบการระบาดครั้งใหญ่ในมลรัฐ Wisconsin เมือง Milwaukee สหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นพื้นที่อุตสาหกรรม ฟาร์มโคนม และกักขังที่มีการระบาดมีฝนตกลงมาอย่างหนัก จากการสำรวจพบการติดเชื้อประมาณ 403,000 คน โดยคาดว่าแหล่งที่มาการติดเชื้อเกิดจากการปนเปื้อนของ oocyst ในระบบน้ำของเทศบาลเป็นสำคัญ (Mackenzie et al, 1994) สำหรับการระบาดที่เกี่ยวข้องกับแหล่งน้ำ ได้แก่ การเล่นน้ำในทะเลสาป สระว่ายน้ำ แม่น้ำ การใช้น้ำประปามาทำน้ำแข็ง การดื่มนมสดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งส่วนใหญ่ประชากรที่มีการติดเชื้อมีอาการท้องเสียและเกิดขึ้นรุนแรงในกลุ่มประชากรที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องจนอาจถึงแก่ชีวิตได้ นอกจากนี้การปนเปื้อนของ oocyst ไปกับระบบส่งน้ำในเมืองอันมีสาเหตุจากสิ่งขับถ่ายของคนลงสู่ท่อระบายน้ำ หรือปัญหาจากการกำจัดอุจจาระ (Joce et al, 1991) จากการสืบสวนถึงสาเหตุของการระบาดพรอยแตกกว้างของระบบท่อต่างๆ ในอาคารบ้านเรือน และในสระว่ายน้ำซึ่งเป็นที่ยอมรับว่ามีสิ่งปนเปื้อนหรือน้ำโสโครก สามารถเข้าไปปนเปื้อน

การแพร่กระจายเชื้อโรคต่างๆ ทางอากาศ ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นในเด็ก จากการศึกษาถึงแหล่งที่มาของการติดเชื้อมีการตั้งข้อสังเกตว่า oocyst

ของ *Cryptosporidium* มีโอกาสแพร่กระจายทางอากาศและเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจและผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อถิ่นระยะ oocyst เข้าสู่ระบบทางเดินอาหารต่อไป อย่างไรก็ตามการแพร่กระจายของเชื้อทางอากาศเกิดขึ้นสำหรับ *C. meleagridis* และ *C. baileyi* ในสัตว์ปีกได้เช่นกันมีข้อเสนอแนะมากมายถึงการติดเชื้อแต่ก็ไม่มีข้อพิสูจน์อย่างเด่นชัดว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อในอากาศ (Fayer et al, 2000)

### อาการทางคลินิก

อาการแสดงของโรคสามารถจำแนกตามตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ ได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีการติดเชื้อเฉพาะภายในลำไส้ (intestinal cryptosporidiosis) และกลุ่มที่มีการติดเชื้อภายนอกลำไส้ (extraintestinal cryptosporidiosis) อาการแสดงและพยาธิสภาพของโรค cryptosporidiosis มีความสัมพันธ์กับภาวะภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย ซึ่งในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติ มักไม่มีอาการรุนแรง และสามารถหายได้เอง ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องมักมีอาการรุนแรงและอาจถึงกับเสียชีวิตได้

### อาการแสดงและพยาธิสภาพในการติดเชื้อเฉพาะในลำไส้

1. การติดเชื้อโดยไม่ปรากฏอาการ (*asymptomatic infection*) ผู้ที่ติดเชื้อไม่มีอาการผิดปกติทางระบบทางเดินอาหาร สามารถเป็นพาหะในการแพร่กระจายของโรคได้ เช่นการศึกษาในสหรัฐอเมริกา เป็นการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติ พบการติดเชื้อของ *Cryptosporidium* ร้อยละ 12.7 ในบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น แต่ไม่พบอาการท้องเสียแต่อย่างใด (Roberts et al, 1989)

2. อาการท้องเสียอย่างเฉียบพลัน และสามารถหายได้เอง (*acute self-limited diarrhea*) ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสียมีระยะเวลาเฉลี่ยประมาณ 6 วัน หรืออยู่ในช่วง 2 ถึง 30 วัน อาการที่พบบ่อยที่สุดคือ อาการถ่ายเหลวเป็นน้ำ เมื่ออาหาร ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ไอ และในบางครั้งมีไข้ร่วมด้วย ในปี ค.ศ.1992 Blanshard รายงานการสำรวจในอังกฤษ พบอาการดังกล่าวในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส HIV ที่มีระดับภูมิคุ้มกันยังไม่บกพร่องมาก โดยมีค่าของ CD4+lymphocyte มากกว่าหรือเท่ากับ 250/mm<sup>3</sup> อาการเหล่านี้สามารถหายได้เอง สำหรับผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติจากการศึกษาในแอฟริกาตะวันตก ประเทศกัวเตมาลา อเมริกาใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่าผู้ป่วยเด็กที่มีอาการเกี่ยวกับโรค cryptosporidiosis มีอัตราการเสียชีวิตประมาณร้อยละ 2 ถึง ร้อยละ 4 สูงกว่าที่พบในเด็กที่มีอาการท้องเสียจากการติดเชื้ออื่นๆ (Lima et al, 1992)

3. อาการท้องเสียเรื้อรัง (*chronic disease*) การเกิดโรค cryptosporidiosis อย่างเรื้อรัง มักพบในผู้ป่วย AIDS ที่มีภูมิคุ้มกันมาก โดยมีค่า CD4+lymphocyte ต่ำกว่า 250/mm<sup>3</sup> ระยะเวลาที่มีอาการประมาณ 20 ถึง 30 สัปดาห์ ปัญหาที่พบจากอาการท้องเสียเรื้อรังคือ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการ

ขาดน้ำ (dehydration) ผอมแห้งและน้ำหนักลด ตลอดจนเกิดภาวะการดูดซึมสารอาหารบกพร่อง (malabsorption)(Blanshard et al, 1992)

4. การเกิดโรครุนแรง (*fulminant disease*) มักพบเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องอย่างรุนแรง โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรค AIDS หรือผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน อาการของโรคเกิดขึ้นอย่างเฉียบพลันและรุนแรงคล้ายกับผู้ป่วยอหิวาตกโรค ซึ่งทำให้มีอัตราการตายสูงมาก อาการส่วนใหญ่ที่พบในผู้ป่วย คือ การขาดน้ำอย่างรุนแรงเกิดภาวะช็อก ตลอดจนการพบภาวะอิเล็กโทรไลต์ขาดสมดุล (electrolyte imbalance) ในบางรายมีการสูญเสียน้ำมากถึง 1 ลิตรต่อ 1 ชั่วโมง ผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตภายในระยะเวลาประมาณ 10 วันหรืออาจนานถึง 5 สัปดาห์ (Blanshard et al, 1992)

#### อาการแสดงและพยาธิสภาพในการติดเชื้อภายนอกถ้าได้ร่วมด้วย

พบได้น้อยมาก มักพบในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะโรค AIDS สามารถพบการติดเชื้อเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ อาการสำคัญคือ อาการไอ หายใจขัด และการมีสารคัดหลั่งบริเวณหลอดลมออกมาเป็นจำนวนมาก อาการเหล่านี้คล้ายกับอาการที่พบในสัตว์ปีก อาการแสดงของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นก่อนที่ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสียและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในผู้ใหญ่ได้ โรค cryptosporidiosis ที่มีการติดเชื้อในระบบหายใจที่ปรากฏให้เห็นในกลุ่มผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันอื่นๆ เช่นในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งของต่อมไทรอยด์หรือในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูกในขณะที่ต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในหนูทดลองพบว่าหนูมีความผิดปกติในระบบทางเดินหายใจเป็นอย่างมาก น้ำหนักลด และมีการขยายตัวของปอดเนื่องจากความยืดหยุ่นเสียไป มีการหลุดลอกของเซลล์ และการตายของเนื้อเยื่อทำให้มีการสะสมของเยื่อเมือกในระบบทางเดินหายใจเป็นจำนวนมากและมีการอักเสบของถุงลม (Forgacs et al, 1983)

การเกิดโรค cryptosporidiosis ติดต่อกันเป็นเวลานานในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องอาจมีการลุกลามของเชื้อจากลำไส้เข้าสู่ตับและท่อน้ำดี ตลอดจนท่อน้ำดีของตับอ่อนทำให้ผู้ป่วยเกิดการอักเสบของถุงน้ำดี (cholecystitis) การอักเสบของท่อน้ำดี (cholangitis) และตับอ่อนอักเสบ (pancreatitis) นอกจากนี้การระบาดของโรค cryptosporidiosis ครั้งใหญ่ในเมือง Milwaukee สหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1993 ภายหลังการระบาด 1 ปี พบผู้ป่วยที่มีอาการของโรคทางเดินน้ำดีร่วมด้วยมีอัตราการเสียชีวิตสูงกว่าที่มีการติดเชื้อที่ลำไส้เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผู้ที่เสียชีวิตส่วนใหญ่มีระดับ CD4+lymphocyte ต่ำกว่า 50/mm<sup>3</sup>

#### วิธีการตรวจเพื่อการวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium*

1. การตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* ในอุจจาระ
2. การตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* จากการตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (biopsy)
3. การตรวจโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

#### 4. การตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อ *Cryptosporidium*

##### 1. การตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* ในอุจจาระ

การตรวจหา oocyst ในอุจจาระเริ่มขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ.1978 โดย Polenz และคณะได้ทำการย้อมสีอุจจาระลูกวัวที่เป็น โรคด้วยสี giemsa ต่อมาได้ใช้สีชนิดเดียวกันย้อมสีอุจจาระจากผู้ป่วย แม้ว่าสี giemsa จะแยกความแตกต่างของ oocyst ออกจากส่วนอื่นๆ ของอุจจาระได้ แต่ความชัดเจนในการตรวจหายังมีจำกัด อย่างไรก็ตามภายหลังมีผู้พัฒนาวิธีย้อมสีหลากหลายชนิด ซึ่งสีที่นิยมใช้มากที่สุดคือ การย้อมด้วยวิธี modified acid fast ซึ่งสีดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างของ oocyst ออกจาก yeast ซึ่งมีขนาดรูปร่างใกล้เคียงกันได้อย่างชัดเจน โดย oocyst ของ *Cryptosporidium* ติดสีชมพูแดง ในขณะที่ yeast ติดสีของ counterstain (Ma & Soave, 1983) จากการย้อมสี acid-fast ทำให้สังเกตได้ว่า oocyst ที่พบในอุจจาระประกอบด้วยชนิดที่ติดสีของ carbol fuchsin เป็นสีชมพูแดงชัดเจน ในขณะที่บาง oocyst จะติดสีได้น้อย หรือแทบไม่ติดสีเลย นอกจากนี้การย้อมด้วย giemsa และ acid-fast แล้วยังมีผู้คิดวิธีย้อมสี oocyst ของ *Cryptosporidium* ในลักษณะและสีที่ปรากฏบน oocyst จะแตกต่างกันไป เช่นสี safranin-methylene blue ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการย้อมด้วย acid-fast สี methylene silver จะทำให้ yeast ติดสีดำ ในขณะที่ oocyst ไม่ติดสี ซึ่งเป็นการย้อมแบบ negative stain เช่นเดียวกับสี nigrosin (Pohjola et al, 1984) นอกจากนี้สีอื่นๆ ที่มีผู้ทดลองย้อม oocyst แต่ให้ผลไม่ดีแม้จะแยก oocyst ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ในอุจจาระได้ เช่นสี periodic acid-Schiff สี trichrome สี methylene-eosin สี Gram (Garcia et al, 1983) เป็นต้น สำหรับการย้อมด้วยสีเรืองแสง (fluorochrome stains) นั้นเนื่องจากไม่สามารถเห็นรายละเอียดภายใน oocyst ได้ ดังนั้นในบางครั้งจำเป็นต้องใช้สีย้อมชนิด acid-fast ตรวจสอบยืนยันอีกครั้ง สำหรับการย้อมสีพิเศษสามารถทำการย้อมอุจจาระที่ยังสดและที่มีการทำให้คงสภาพเดิมโดยการเติมสารละลายจำพวก 10% formalin และ sodium acetate-acetic acid-formalin (SAF) หรือ polyvinyl alcohol (PVA) แต่ไม่นิยมใช้เพราะไม่สามารถเข้ากันได้กับขั้นตอนในการย้อมสีพิเศษ

##### 2. การตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* จากการตัดชิ้นเนื้อเยื่อ

การตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* โดยการตัดชิ้นเนื้อเยื่อเป็นการตรวจหาระยะการเจริญเติบโตของเชื้อภายในเซลล์ (endogenous developmental stages) การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ที่มีการวินิจฉัยในสัตว์และในคน ดังนั้นในระยะแรกๆ ที่ยังไม่ทราบการย้อมสีเพื่อหา oocyst ในอุจจาระจำเป็นต้องอาศัยวิธีนี้ โดยการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสีทึบกรด สีของ hematoxylin และ eosin หรือ ย้อมด้วยสี giemsa อย่างไรก็ตามการใช้สีย้อมอื่นๆ ที่มีการทดสอบนั้นก็ไม่ได้ให้ผลวินิจฉัยระยะต่างๆ ของเชื้อชัดเจน ดังนั้นในการศึกษารายละเอียดของเชื้อ ต้องอาศัยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Lager & Landas, 1991) อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จำเป็นต้องทำให้เซลล์คงสภาพเดิมมากที่สุด จึงต้องผ่านขั้นตอนการรักษาสภาพเซลล์ที่ค่อนข้างยุ่งยาก นอกจากนี้ค่า

ใช้ง่ายในการวินิจฉัยที่สูง ใช้เวลานานในการวินิจฉัย และขาดความไวในการตรวจ เพราะระยะต่างๆ ของเชื้อในเนื้อเยื่อมีขนาดเล็กมากในขณะเดียวกันการตรวจวินิจฉัยแบบนี้ไม่สามารถแยก species ของเชื้อได้ ดังนั้นการใช้เทคนิคการตรวจดังกล่าวเหมาะสำหรับการศึกษาทางพยาธิวิทยาของโรคและเกี่ยวกับการศึกษาทางโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ จึงไม่เหมาะกับการตรวจวินิจฉัยทั่วไป

### 3. การตรวจโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

การวินิจฉัยการติดเชื้อ *Cryptosporidium* โดยการตรวจทางอิมมูโนวิทยาเพื่อหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองต่อเชื้อ *Cryptosporidium* อย่างไรก็ตามการตรวจพบแอนติบอดีไม่เป็นเครื่องแสดงถึงการติดเชื้อในขณะที่ตรวจพบแอนติบอดีดังกล่าวเนื่องจากระดับแอนติบอดีจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อโรคได้ดำเนินไประยะหนึ่งแล้วและแอนติบอดีดังกล่าวสามารถคงอยู่ได้นานมากกว่า 12 เดือน ดังนั้นวิธีทางอิมมูโนวิทยาจึงมีประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยามากกว่าการวินิจฉัยผู้ที่กำลังติดเชื้อ วิธีที่ใช้ในการตรวจมีได้หลายวิธี เช่น immunofluorescence (IF) (Sterling & Arrowood, 1986), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Whitmire & Harp, 1991) เป็นต้น สำหรับการประยุกต์ใช้วิธีการทางอิมมูโนวิทยา เพื่อย้อมสี oocyst เช่นการใช้วิธี fluorescent antibody test โดยอาศัย polyclonal antibody ต่อผนัง oocyst ที่ได้จากกระต่าย ภายหลังจากการที่ปฏิกิริยาจะพบการเรืองแสงของ oocyst ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ fluorescence วิธีดังกล่าวนอกจากจะตรวจหา oocyst ในอุจจาระได้ยังสามารถตรวจหา oocyst ที่มีการปนเปื้อนในปริมาณน้อยๆ ในตัวอย่างจากแหล่งน้ำต่างๆ ได้ เนื่องจากการติดเชื้อ *Cryptosporidium* บางครั้งปริมาณ oocyst อาจปะปนมากับอุจจาระได้น้อยโดยเฉพาะในกลุ่มที่ไม่มีอาการหรือมีอาการไม่รุนแรง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำให้ปริมาณ oocyst ในอุจจาระมีความเข้มข้นขึ้นโดยการตกตะกอน (sedimentation) หรือ การลอยตัว (flotation) ทำให้ความไวในการตรวจสอบเพิ่มมากขึ้น เช่นการทำให้ปริมาณของ oocyst เข้มข้นขึ้นโดยการปั่นให้ตกตะกอนในสารละลาย formalin-ether หรือ formalin-ethyl acetate สำหรับการทำให้ oocyst ลอยตัวต้องใช้สารละลายที่มีความถ่วงจำเพาะมากกว่าความถ่วงจำเพาะของ oocyst เช่นการใช้สารละลายอิ่มตัวของ sodium chloride (ความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.20) หรือ magnesium sulphate (ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.30) หรือ สารละลาย sucrose (ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.34) สารละลาย zinc sulphate (ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.49) และ potassium iodide (ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.72) (Current & Garcia, 1991) เทคนิคในการลอยตัวนั้น ถ้าให้ได้ผลดีให้ใช้สารละลายอิ่มตัวที่มีความถ่วงจำเพาะสูง แต่ต้องทำการทดสอบทันทีหลังจากเตรียมสารละลายเสร็จ เพราะถ้าทิ้ง oocyst ไว้ในสารละลายนานจะมีผลทำให้ลักษณะของ oocyst มีลักษณะผิดปกติไปได้ยากแก่การวินิจฉัย หลังจากทำให้ปริมาณของ oocyst มีความเข้มข้นขึ้นแล้ว นำมาตรวจวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase-contrast โดยใช้กำลังขยาย 200-400 เท่า ซึ่งจะให้เห็นรูปร่าง oocyst ของ

*Cryptosporidium* มีลักษณะแวววาว ตรงกันข้ามกับพื้นหลัง โดยทั่วไปในแต่ละ oocyst มี granule บรรจุอยู่ภายใน ซึ่งจะเห็นเป็นสีดำวาว สำหรับการศึกษารูปร่างของ oocyst ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ชนิด interference-contrast พบว่าเหมาะสมกับการศึกษาโครงสร้างภายในของ oocyst โดยพบ ลักษณะของ sporozoite และ residual bodies การตรวจหา oocyst ในอุจจาระสามารถทำการตรวจวินิจฉัยหลังจากกระบวนการ floatation หรือ sedimentation ได้โดยนำอุจจาระที่ผ่านการ floatation หรือ sedimentation ดังกล่าวมาทำการย้อมสีต่างๆ เช่น สี acid-fast จะทำให้มีความไวในการตรวจ สูงยิ่งขึ้น

#### 4. การตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อ *Cryptosporidium*

จากการศึกษาองค์ประกอบทางพันธุกรรมของเชื้อ *Cryptosporidium* ด้วยเทคนิค pulsed field gradient gel electrophoresis เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1988 (Mead et al, 1988) พบว่า *C. parvum* มีโครโมโซม ขนาดแตกต่างกันอยู่ระหว่าง 1.4 ถึง 3.3 Mb ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเพิ่มมากขึ้น โดยการใช้เทคนิค contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis และ southern blot hybridization (Hays et al, 1995) พบว่าโครโมโซมของ *C. parvum* มีขนาดแตกต่างกันอยู่ระหว่าง 0.945 ถึง 2.2 Mb โดยการจัดเรียงโครโมโซมที่มีขนาดเล็กที่สุดเป็นโครโมโซมที่ 1 และเรียงลำดับตามขนาดขึ้นมาจนถึงโครโมโซมที่ 8 ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุด โดยโครโมโซมที่ 1 และ 2 มีขนาด 1.04 Mb และ 1.08 Mb ตามลำดับ ส่วนโครโมโซมที่ 3 4 และ 5 มีขนาดเท่ากันคือ 1.24 Mb โครโมโซมที่ 7 และ 8 มีขนาดเท่ากันคือ 1.54 Mb สำหรับ genome size ของเชื้อ *Cryptosporidium* มีขนาด 10.4 Mb โดยทั่วไปลักษณะ โครงสร้างของโครโมโซมที่ปลายทั้งสองข้าง ประกอบด้วย telomere ที่มีคล้ายคลึงกับโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตที่มีเชื้อหุ้มนิวเคลียสอื่นๆ ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบสที่ซ้ำกันเป็นชุดเรียงต่อกัน (tandem repeated sequence)

สำหรับการวิเคราะห์ยีนของ *Cryptosporidium* ยังมีการศึกษาค่อนข้างจำกัดอย่างไรก็ตาม ยีนที่พบส่วนใหญ่ เป็นยีนที่มีชุดเดียวต่อ genome (single copy gene) เช่น thrombospondin-related adhesion protein (TRAP-C1) (Sulaiman et al, 1998) *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) (Spano et al, 1997) เป็นต้น สำหรับยีนที่มีหลายชุด ต่อ genome ที่สำคัญและมักใช้ในการหาชนิดของเชื้อตลอดจนการวินิจฉัยคือยีน small subunit ribosomal RNA หรือ 18S rRNA (SSU rRNA) (Morgan et al, 1997) เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *cryptosporidium* species ต่างๆ ในส่วนของยีน SSU rRNA พบว่าประกอบด้วยส่วนที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสสูง (conserved regions) และส่วนที่มีความแตกต่างของลำดับเบส (variable regions) ระหว่าง species ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน SSU rRNA นอกจากจะมีประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อ *Cryptosporidium* แล้วยังสามารถใช้ส่วนของ gene ดังกล่าวในการจำแนก species ของเชื้อ *Cryptosporidium* เพื่อการวิจัยต่อไป



นอกจากยีน SSU rRNA แล้วมีผู้ศึกษาอื่น ๆ อาทิ  $\beta$ -tubulin (Sulaiman et al, 1999), actin (Kim et al, 1992) ตลอดจน thrombospondin-related adhesive protein (TRAP-C1) (Spano et al, 1998) เป็นต้น สำหรับ TRAP ใน *Cryptosporidium* เชื่อว่าน่าจะมีมีความสำคัญเช่นเดียวกับ TRAP ที่พบใน coccidia และมาลาเรีย กล่าวคือเป็น โปรตีนที่สร้างจาก microneme และปรากฏบนผิวของ sporozoite (Spano et al, 1998) สำหรับ TRAP ที่พบในเชื้อมาลาเรียพบว่าเกี่ยวข้องกับเกาะติดระหว่างผิวของ sporozoite กับคอมเพล็กซ์ของ และเกาะติดกับผิวของเซลล์ชั้นบริเวณ basolateral domain (Robson et al, 1995) จึงเชื่อว่ามีบทบาทเกี่ยวกับการลุกลามเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า TRAP เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของ sporozoite (gliding motility)(Kappe et al, 1999) ดังนั้น TRAP จึงมีความสำคัญในการดำรงชีวิตของปรสิตดังกล่าว จากการวิเคราะห์ลำดับ DNA และลำดับกรดอะมิโน พบว่า TRAP ประกอบด้วยบริเวณต่าง ๆ 6 บริเวณ ได้แก่ (1) signal sequence (2) บริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 200 ตัวซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ von Willebrand factor (3) บริเวณที่สามารถเกาะติดกับ sulfate-glycosaminoglycans (4) บริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เรียงเข้าไปมาและมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิด proline สูง (5) บริเวณที่ฝังตัวอยู่ในเมมเบรนของเซลล์ และ (6) บริเวณด้านท้ายในส่วนของ carboxy-terminus (Templeton & Kaslow, 1997) จากการศึกษาความหลากหลายของยีน TRAP ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* พบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ หลายตำแหน่งกระจายทั่วไป โดยการแทนที่ส่วนใหญ่มักทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดไป (Robson et al, 1990; Jongwutiwes et al, 1998; Putapomtip et al, 2001) แม้ว่าจะมีผู้ศึกษาความหลากหลายของยีน TRAP-C1 ของเชื้อ *Cryptosporidium* โดยวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และทำการวิเคราะห์ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน (restriction endonucleases) พบว่ายีน TRAP ปรากฏเพียง 2 รูปแบบ อย่างไรก็ตามการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายในดังกล่าวอาจไม่ครอบคลุมความหลากหลาย โดยการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ได้ชัดเจน นอกจากนี้ลำดับ DNA ของยีน TRAP มีผู้ศึกษาไว้เพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้น การทราบความหลากหลายดังกล่าวนอกจากจะช่วยตรวจสอบความแตกต่างของ *Cryptosporidium* ให้ละเอียดมากขึ้น จากการวิเคราะห์ลำดับ DNA ของยีน SSU rRNA แล้ว ลำดับ DNA ของยีน TRAP-C1 ยังมีความสำคัญในการเป็นข้อมูลพื้นฐานของการพัฒนาวัคซีนป้องกันการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ค่อนข้างเหมือนกับยีน TRAP ของเชื้อมาลาเรีย (Robson et al, 1995; Jongwutiwes et al, 1998; Kappe et al, 1999; Putapomtip et al, 2001)

จากการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* มีหลายวิธี เช่น การตรวจหา oocyst ในอุจจาระโดยการย้อมสีพิเศษ หรือจากการตรวจชิ้นเนื้อ เป็นต้น วิธีการดังกล่าวไม่สามารถแยก species ของเชื้อได้ การใช้วิธี PCR นี้เหมาะสมสำหรับการตรวจในรายที่มีเชื้อจำนวนน้อย และการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีการหาลำดับเบส DNA ในส่วนของยีน SSU rRNA สามารถบอกถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *Cryptosporidium* ในระดับ species (Xiao et al, 2000) ดังนั้นในการ

ศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรม ของเชื้อ *Cryptosporidium* ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส HIV ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยใช้เทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับ DNA ในส่วนของยีน SSU rRNA และยีน TRAP-C1 จากผลการศึกษาจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำคัญในการศึกษาถึงแหล่งที่มาของการติดเชื้อ รวมทั้งทำให้ทราบถึงการแพร่กระจายของเชื้อซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการควบคุมโรคต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลำดับ DNA ในบางส่วนของยีนที่สร้างไรโบโซม ตัวยูนิตเล็ก (small subunit ribosomal RNA gene) ของ *Cryptosporidium* ที่ได้จากอุจจาระผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอดส์ (HIV-infected patients)
2. ศึกษาลำดับ DNA ของยีนที่สร้างธอมโบสปอนดิโนรีเทอเทอซีทีฟโปรตีน (thrombospondin-related adhesive protein gene, TRAP-C1) ของ *Cryptosporidium* ที่ได้จากอุจจาระผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอดส์
3. วิเคราะห์ลำดับ DNA ของยีนจากข้อ 1 และ 2 เปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่ได้จาก *Cryptosporidium* จากมนุษย์และสัตว์ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล DNA ของ National Center for Biotechnology Information สหรัฐอเมริกา

## วิธีดำเนินการวิจัย

**การแยก oocyst ของ *Cryptosporidium* ออกจากกากอุจจาระ**

การแยก oocyst ออกจากกากอุจจาระนำตัวอย่างอุจจาระที่ได้จากการตรวจเชื้อ *Cryptosporidium* ณ ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำมากรองใส่หลอดทดลองปลายแหลม ขนาด 15 มิลลิลิตรประมาณอุจจาระ 1-2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย sucrose ความเข้มข้นร้อยละ 55 ประมาณ 5-10 เท่าของปริมาณอุจจาระและเติมน้ำ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000-1,500 รอบต่อนาที ใช้เวลา 15 นาที คู่อส่วนที่เป็น oocyst ซึ่งอยู่ตรงบริเวณรอยต่อของสารละลายน้ำตาล sucrose นำไปใส่ไว้ในหลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิดความจุ 1.5 มิลลิลิตรทำการปั่นล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) และนำไปเก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$  (Kim et al, 1992)

### การวิเคราะห์ผลการตรวจฟิล์มสไลด์

การตรวจฟิล์มสไลด์ในรายที่พบเชื้อ *Cryptosporidium* ทำการบันทึกผลการตรวจขนาดของ oocyst และระดับความหนาแน่นของ oocyst สำหรับการประเมินความหนาแน่นของเชื้อ *Cryptosporidium* จากการตรวจนับปริมาณ oocyst ใน 30 วงกล้องที่กำลังขยายเลนส์ objective 100 เท่า ใน oil immersion สำหรับการวัดขนาดของ oocyst ทำการวัดขนาดทางด้านยาว และทางด้านกว้างของ oocyst จำนวนปริมาณ 30 oocyst พร้อมทั้งคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้าง (shape index) ที่กำลังขยายเลนส์ objective 100 เท่า ใน oil immersion (Sargent et al, 1998)

oocyst ของเชื้อ *Cryptosporidium* มีรูปร่างกลมหรือรี ผนังเรียบไม่มีสี มีรอยเส้นจางที่ขั้วบนเป็นเส้นทแยงเฉียงลงมายาว 1/2 ถึง 1/3 ของ oocyst ภายในประกอบด้วย sporozoite มีรูปร่างคล้ายกล้วยหอมจำนวน 4 ตัว มีขนาดความยาวประมาณ 4.9 – 11.1 ไมโครเมตร ความกว้างประมาณ 1.0–1.2 ไมโครเมตร (Vandepitte et al, 1985) ทั้งหมดเรียงตัวขนานกันอยู่ด้านใดด้านหนึ่ง ภายใน oocyst มี residual body จำนวนตั้งแต่ 2 ถึงมากกว่า 40 (Upton & Current, 1985)

### การเตรียม DNA

การสกัด DNA (DNA extraction) โดยนำ oocyst ที่ได้จากวิธี flotation มาสกัด DNA โดยใช้ Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega)

1. นำ oocyst ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง เติม cell lysis solution 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำมาทำให้ oocyst แยก โดยการทำให้ freeze-thaw คือ การใช้อุณหภูมิตั้งที่  $90^{\circ}\text{C}$  และอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดย แช่ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่เติม absolute ethanol ลงไป โดยใช้เวลาในการทำซ้ำ 5-6 รอบ
2. เติม cell lysis solution 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันหรือใช้ vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที
3. นำไปปั่นด้วย high speed refrigerated microcentrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
4. ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง เติม nuclei lysis solution 300 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง 5-6 ครั้ง จนของเหลวเป็นเนื้อเดียวกัน ใสของเหลวก่อนข้างเหนียว
5. เติม protein precipitation 100 ไมโครลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันนาน 10-20 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
6. ดูดของเหลวส่วนบนใส่ microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตกตะกอน DNA โดยเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของของเหลวที่ได้ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  นานประมาณครึ่งชั่วโมง

7. เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งจะได้ตะกอน DNA อยู่ที่ก้นหลอด

8. ล้างตะกอน DNA โดยเติม ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 80 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งตะกอน DNA จะอยู่ที่ก้นหลอด คว่ำหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องจน DNA แห้ง แล้วละลาย DNA โดยเติม TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และนำ DNA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับปฏิกิริยาในขั้นต่อไป

### การเพิ่มปริมาณ DNA

องค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณ DNA เบ้ หมายถึง โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) ในปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. DNA ดั้งแบบปริมาตร 2 ไมโครลิตร
2. PCR primers คู่นอก (P1 และ P2) ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
3. nucleotide substrate (dATP dTTP dCTP และ dGTP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
4. 10 x PCR reaction buffer ซึ่งประกอบด้วย 100 มิลลิโมล ของ Tris HCl 500 มิลลิโมล ของ KCl 10 มิลลิโมลของ MgCl<sub>2</sub> และ gelatin ร้อยละ 0.01 ปริมาตร buffer ที่ใช้คือ 2 ไมโครลิตร
5. น้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 14.5 ไมโครลิตร
6. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ส่วนประกอบที่ได้ทั้งหมดนี้ เรียกว่า PCR reaction mixture แล้วนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนที่ทำให้ DNA ดั้งแบบแยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที ในรอบแรก จากนั้นทำให้ DNA แยกสายโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นต่อไปทำให้ primer จับคู่กับ DNA ดั้งแบบ (primer template annealing) โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 50°C เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอนต่อไปคือการสร้างสาย DNA (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที ปฏิกิริยาจะดำเนินไปจนครบ 35 รอบ โดยในรอบที่ 35 นี้ ในขั้นตอนในการสร้างสาย DNA จะเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C นาน 7 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์

สำหรับ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน SSU rRNA ได้แก่ P1 primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-CAGGGAGG TAGTGACAAGAA-3' ซึ่งตรงกับตำแหน่งเบสที่ 437 ถึง 456 ในยีน SSU rRNA ของ *C. parvum* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 434 ถึง 453 ของ *C. baileyi* หรือตำแหน่งเบสที่ 437 ถึง 456 ของ *C. muris* หรือตำแหน่งเบสที่ 447 ถึง 466 ของ *C. felis* หรือ

ตำแหน่งเบสที่ 436 ถึง 455 ของ *C. meleagridis* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 436 ถึง 455 ของ *C. wrairi* และตรงกับตำแหน่งเบสที่ 437 ถึง 456 ของ *C. serpentis* สำหรับ P2 primer มีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCAGCCTTGCGACCATACTC-3' ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1070 ถึง 1089 ของ *C. parvum* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1057 ถึง 1116 ของ *C. felis* หรือตำแหน่งเบสที่ 1065 ถึง 1084 ของ *C. meleagridis* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1066 ถึง 1085 ของ *C. wrairi* และตำแหน่งเบสที่ 1062 ถึง 1081 ของ *C. serpentis* การตรวจผลผลิตของปฏิกิริยาอาศัยขนาดความยาวของ DNA ซึ่งมีความยาวประมาณ 650 ถึง 670 คู่เบส และทำการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยวิธี แยกด้วยกระแสไฟฟ้า กระแสตรงที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใน agarose gel

ในการทำ PCR รอบสอง โดยแบ่งผลผลิตจากการทำ PCR ในรอบแรกเพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบ องค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. DNA ต้นแบบปริมาตร 2 ไมโครลิตร
2. PCR primer คู่นอก (P3 และ P4) ความเข้มข้น 20 พิโคโมล ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร
3. nucleotide substrate (dATP dTTP dCTP และ dGTP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล

ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

4. 10 x PCR reaction buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
5. น้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 36.75 ไมโครลิตร
6. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

นำ PCR reaction mixture นี้ไปทำปฏิกิริยา PCR ขั้นตอน อุณหภูมิและเวลาเช่นเดียวกับการทำ PCR ในรอบแรก การเพิ่มปริมาณ DNA ในรอบนี้ primer ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ P3 primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3' ซึ่งตรงกับตำแหน่งเบสที่ 525 ถึง 544 ในยีน SSU rRNA ของ *C. parvum* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 525 ถึง 544 ของ *C. felis* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 524 ถึง 543 ของ *C. meleagridis* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 525 ถึง 545 ของ *C. serpentis* หรือตำแหน่งเบสที่ 522 ถึง 541 ของ *C. baileyi* และตรงกับตำแหน่งเบสที่ 525 ถึง 544 ของ *C. wrairi* สำหรับ P4 primer มีลำดับเบสดังนี้ 5'-TAAGGTGCTGAAGGAGTAA GG-3' ซึ่งตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1019 ถึง 1040 ในยีน SSU rRNA ของ *C. parvum* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1013 ถึง 1034 ของ *C. muris* หรือตำแหน่งเบสที่ 1046 ถึง 1067 ของ *C. felis* หรือตำแหน่งเบสที่ 1014 ถึง 1035 ของ *C. meleagridis* หรือตำแหน่งเบสที่ 1011 ถึง 1032 ของ *C. serpentis* หรือตำแหน่งเบสที่ 1006 ถึง 1027 ของ *C. baileyi* และตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1015 ถึง 1036 ของ *C. wrairi* ผลผลิตของปฏิกิริยาจะได้สาย DNA ที่มีความยาวประมาณ 480-500 คู่เบส ตรวจวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ในรอบแรก

สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน TRAP-C1 โดยอาศัย PCR ทำนองเดียวกับการเพิ่มปริมาณยีน SSU rRNA แต่อาศัย primer CR-TRAP-R: 5'-GTAGTGTAGTAATTAATCTAACCAGA-3' และ

CR-TRAP-F: 5'-CAATAAGTGAAGAATTGTGGTGGGA-3' ขั้นตอนที่ทำให้ DNA ดันแบบแยกสายที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที ในรอบแรก จากนั้นทำให้ DNA แยกสายโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นต่อไปทำให้ primer จับคู่กับ DNA ดันแบบโดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 55°C เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอนต่อไปคือการสร้างสาย DNA ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที ปฏิบัติการจะดำเนินไปจนครบ 35 รอบ โดยในรอบที่ 35 นี้ ในขั้นตอนในการสร้างสาย DNA จะเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C นาน 7 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์

#### การวิเคราะห์ผลผลิต PCR

วิเคราะห์แถบ DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการศึกษากรดนิวคลีอิกจำนวนเล็กน้อย โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีของกรดนิวคลีอิกที่มีโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต (PO<sub>4</sub>) ทำให้ประจุเป็นลบ ดังนั้นเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจึงเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยวิ่งผ่านตัวกลางคือ agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v) เตรียมโดยการชั่ง agarose 1 กรัม ละลายใน TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำไปอุ่นให้ร้อนจนเจลละลายหมดแต่ไม่ควรให้เดือดตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 50 ถึง 60°C นำไปเทในถาดพลาสติกที่เตรียมไว้ขนาด 5.5 x 10.5 เซนติเมตร จากนั้นใส่ comb ลงไปในช่องที่เตรียมเพื่อทำร่องสำหรับหยอดผลผลิตจาก PCR ตั้งทิ้งไว้ 50 นาที ให้เจลแข็งตัว เท TAE buffer ลงไปให้ท่วมผิวหน้าเจล แล้วจึงค่อย ๆ คึงหรือออกจากเจล จากนั้นนำถาดไปวางใน chamber (horizontal electrophoresis) ที่มี TAE buffer โดยให้ปริมาณของ TAE buffer ท่วมเจลประมาณ 1 เซนติเมตร

นำผลผลิตจาก PCR ที่ต้องการวิเคราะห์มาผสมกับ loading dye (ประกอบด้วย bromophenol blue ร้อยละ 0.25 xylene cyanol FF ร้อยละ 0.25 และ สารละลาย Ficoll type 400 ร้อยละ 40 (w/v) ในอัตราส่วน 6:1 แล้วหยอดลงไปในหลุมบนเจล โดยใช้ DNA ที่ทราบขนาด ( $\lambda$ /Hind III หรือ  $\phi$ 174/Hind III) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ศึกษา เปิด power supply ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านเจลจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 30 นาที หรือจนกระทั่งสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปได้ 2 ใน 3 ของเจล จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน TAE buffer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที ตรวจสอบแถบ DNA จากการเรืองแสงภายใต้แสง UV

#### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน SSU rRNA และ ยีน TRAP-C1

การหาลำดับเบสของ DNA โดยวิธี automated DNA sequencing โดยอาศัยหลักการของ dideoxy chain termination (Sanger et al, 1977) คือการใช้สารเคมีปรับเปลี่ยนเบสของ DNA

การเตรียม DNA โดยใช้ GEX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit

1. นำ GFX column ซึ่งเป็น glass fiber matrix อยู่ภายใน column ใส่ใน collection tube ขนาดความจุประมาณ 2 มิลลิลิตร เติม capture buffer 500 ไมโครลิตร
2. ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดผลผลิตจากการทำ PCR ในรอบที่ 2 ใส่ใน GFX column ผสมให้เข้ากันกับ capture buffer โดยใช้ไมโครปิเปตต์ดูดขึ้นและปล่อยลง 4-6 ครั้ง
3. นำไปปั่นด้วย high speed refrigerated microcentrifuge ด้วยความเร็ว 10,000 ถึง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
4. เทสารละลายที่มีอยู่ใน collection tube ทิ้ง นำ GFX column ใส่ใน collection tube อีกครั้ง เติม wash buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000-13,000 รอบต่อนาที 30 วินาที
5. นำ GFX column ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ซึ่งสามารถใช้ TE buffer (10 มิลลิโมล Tris HCL pH 8.0 และ 1 มิลลิโมล EDTA pH 8.0)
6. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000-13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

นำผลผลิตที่ได้วิเคราะห์ DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) โดยใช้ DNA ที่ทราบขนาด ( $\lambda$ /Hind III) เป็นตัวเปรียบเทียบปริมาณของ DNA

การเตรียมตัวติดตามโดยใช้ ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

องค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dRhodamine Dye Terminator Ready Reaction ปริมาตร 8 ไมโครลิตร DNA ที่ต้องการติดฉลากปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยใช้ primer P3 หรือ P4 สำหรับยีน SSU rRNA และ primers TRAPCI-S1: 5'-ATGAAGTCTCCAGATGGAAT-3', TRAPCI-S2: 5'-TCCATGCTATACACATAGAT-3', TRAPCI-S3: 5'-CATGTTCAATGTGAATTGGG-3' และ TRAP-R1: 5'-GTCGCACACTCTCCGATCA-3' สำหรับยีน TRAP-C1 โดย primer ที่ใช้มีความเข้มข้น 2 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำ reaction mixture นี้ไปทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. ทำให้ DNA แยกสาย โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 96°C เป็นเวลา 30 วินาที
2. ขั้นตอนไปทำให้ primer จับคู่กับ DNA โดยใช้อุณหภูมิที่ 50°C เป็นเวลา 30 วินาที
3. ขั้นตอนการสร้างสาย DNA ใช้อุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 4 นาที ปฏิกิริยาจะดำเนินไปจนครบ 25 รอบ และในรอบที่ 25 นี้ในขั้นตอนการสร้างสาย DNA จะทำการลดอุณหภูมิเป็น 4°C เป็นเวลา 30 นาที

การตกตะกอน DNA สำหรับเข้าเครื่อง ABI 310 DNA Sequencer

1. นำผลผลิตของปฏิกิริยามาตกตะกอนกับสารละลายของ 3M sodium acetate, pH 4.6 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. ใช้ปีเปตต์ดูดผลิตผลของปฏิกิริยาทั้งหมดใส่ในสารละลายข้างต้น ผสมให้เข้ากัน และนำไปแช่ที่ตู้  $-80^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา ประมาณ 10 นาที
3. เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15-30 นาที
4. นำปีเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง จะได้ตะกอน DNA อยู่ที่ก้นหลอด
5. ล้างตะกอน DNA โดยเติม ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร
6. นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที
6. เมื่อครบเวลาใช้ปีเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง
7. ตั้งหลอดทิ้งไว้จนกว่า DNAแห้ง ละลาย DNA โดยการเติม template suppression reagent ปริมาตร 25 ไมโครลิตร
8. นำ DNA ที่เติมสารละลาย template suppression reagent นำมาทำให้ DNA ต้นแบบแยกสายที่อุณหภูมิ  $95^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้สักครู่ใช้ไมโครปีเปตต์ดูดสารละลายใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และนำไปเข้าเครื่อง ABI 310 DNA Sequencer

## ผลการวิจัย

### รายละเอียดประชากรตัวอย่าง

จากการคัดเลือกตัวอย่างอุจจาระที่พบ *Cryptosporidium* oocyst ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ที่มารับบริการการตรวจรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พบว่าผู้ป่วยที่ให้อุจจาระเพียงพอสำหรับการศึกษานี้ จำนวน 20 คน ซึ่งมารับบริการในระหว่างปี ค.ศ.1996 ถึง ปี ค.ศ.2000 เป็นเพศชาย จำนวน 14 คน เพศหญิงจำนวน 6 คน มีอายุเฉลี่ย  $31.3 \pm 15.5$  ปี ผู้ป่วยที่มารับบริการอาศัยอยู่ในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 10 คน คิดเป็นร้อยละ 50 ภาคเหนือจำนวน 2 คน คิดเป็นร้อยละ 10 ได้แก่จังหวัด เชียงราย และพะเยา ภาคกลางที่ไม่ใช่กรุงเทพจำนวน 4 คน คิดเป็นร้อยละ 20 ได้แก่จังหวัด ปทุมธานี สมุทรปราการ นครปฐม และนครนายก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีจำนวน 2 คน คิดเป็นร้อยละ 10 ได้แก่จังหวัด เลยและอุดรธานี ภาคใต้ มีจำนวน 1 คน คิดเป็นร้อยละ 5 ได้แก่จังหวัดกระบี่ ภาคตะวันออกจำนวน 1 คน คิดเป็นร้อยละ 5 ได้แก่จังหวัด ระยอง สำหรับอาชีพของผู้ป่วยมีดังนี้ ทำธุรกิจส่วนตัว จำนวน 9 คน คิดเป็นร้อยละ 45 อาชีพรับจ้างจำนวน 6 คน คิดเป็นร้อยละ 30 รับราชการ 1 คน คิดเป็นร้อยละ 5 ไม่มีอาชีพ 4 คน คิดเป็นร้อยละ 20 ระยะเวลาที่ตรวจพบการติดเชื้อ HIV ของผู้ป่วยมีดังนี้ ระยะเวลาในการติดเชื้อ 1 ปี มีจำนวน 7 คน คิดเป็นร้อยละ 35 ระยะเวลาในการติดเชื้อ 2 ปี มีจำนวน 4 คน คิดเป็นร้อยละ 20 ระยะเวลาในการติดเชื้อ 3 ปี มีจำนวน



2 คน คิดเป็นร้อยละ 10 ระยะเวลาในการติดเชื้อ 4 ปี มีจำนวน 3 คน คิดเป็นร้อยละ 15 ระยะเวลาในการติดเชื้อตั้งแต่ 5 ปีขึ้นไป มีจำนวน 2 คน คิดเป็นร้อยละ 10 ไม่ทราบระยะเวลาในการติดเชื้อ มีจำนวน 1 คน คิดเป็นร้อยละ 5 ที่มาหรือสาเหตุของการติดเชื้อ HIV เกิดจากมีเพศสัมพันธ์แบบรักต่างเพศ (heterosexual) จำนวน 6 คน คิดเป็นร้อยละ 30 เกิดจากมีเพศสัมพันธ์แบบรักร่วมเพศ (homosexual) จำนวน 1 คน คิดเป็นร้อยละ 5 เกิดจากติดเชื้อจากมารดาสู่ทารกในครรภ์ (vertical transmission) จำนวน 3 คน คิดเป็นร้อยละ 15 เกิดจากการ ใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน (intravenous drug users, IVDU) จำนวน 2 คน คิดเป็นร้อยละ 10 และไม่ทราบที่มาของการติดเชื้อ 8 คน คิดเป็นร้อยละ 40 (ตารางที่ 1)

ผลการวิเคราะห์การตรวจทางโลหิตวิทยามีดังต่อไปนี้ ค่าเฉลี่ยระดับความเข้มข้นของเลือด (hematocrit) คิดเป็นร้อยละ  $34.80 \pm 9.04$  โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ไมโครลิตร คิดเป็น  $3.68 \pm 0.77$  ล้าน ค่าเฉลี่ยของปริมาณเม็ดเลือดขาวต่อ 1 ไมโครลิตร คิดเป็น  $5,090 \pm 2,660$  ค่าเฉลี่ยจำนวน neutrophil คิดเป็นร้อยละ  $54.93 \pm 15.36$  ค่าเฉลี่ยจำนวน lymphocyte คิดเป็นร้อยละ  $29.98 \pm 12.21$  ค่าเฉลี่ยของ CD4+ และ CD8+ lymphocyte คิดเป็นร้อยละ  $81.65 \pm 41.18$  และ  $932.45 \pm 493.25$  เซลล์ต่อไมโครลิตร ตามลำดับ สำหรับการติดเชื้ออื่นๆ ที่ตรวจพบร่วมด้วยในกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษาได้แก่ oral candidiasis จำนวน 6 คน pneumonia ที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วย co-trimoxazole จำนวน 4 คน pulmonary tuberculosis จำนวน 4 คน sinusitis จำนวน 3 คน และเชื้ออื่นๆ ได้แก่ hepatitis B, hepatitis C, genital herpes, *Mycobacterium avium* complex, *Salmonella* group C, herpes zoster และ condyloma acuminata (ตารางที่ 2) อาการที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์ทุกรายมีอาการท้องเสียเป็นน้ำเป็นส่วนใหญ่ และในบางรายมีอาการท้องเสียเป็นน้ำปนมูก นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยบางรายมีอาการเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน และปวดท้อง คิดเป็นร้อยละ 50 ร้อยละ 40 ร้อยละ 40 และร้อยละ 20 ตามลำดับ สำหรับอาการอื่นๆที่อาจพบร่วมด้วยได้แก่ ไข้ ไอ อ่อนเพลีย และปวดศีรษะ

ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* จากการข้อมูจจาระผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส HIV ด้วยวิธี modified Kinyoun acid fast stain จะเห็นลักษณะของ oocyst ติดสีแดงภายในมี sporozoite รูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยวหรือกล้วยหอม และในส่วนของกากอุจจาระ เชื้อราวมทั้งแบคทีเรียต่างๆ เห็นการติดสีเป็นสีเขียวซึ่งสามารถแยกออกจากลักษณะของ oocyst ได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 1) ซึ่งมีความแตกต่างจากการดูอุจจาระสดภายหลังจากที่ได้ทำการแยกกากอุจจาระด้วยวิธี Sheather sugar flotation นำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่าสามารถเห็นลักษณะของ oocyst กลมรี และมีลักษณะวาวขนาดประมาณ 4-6 ไมครอน (รูปที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับผู้ป่วย

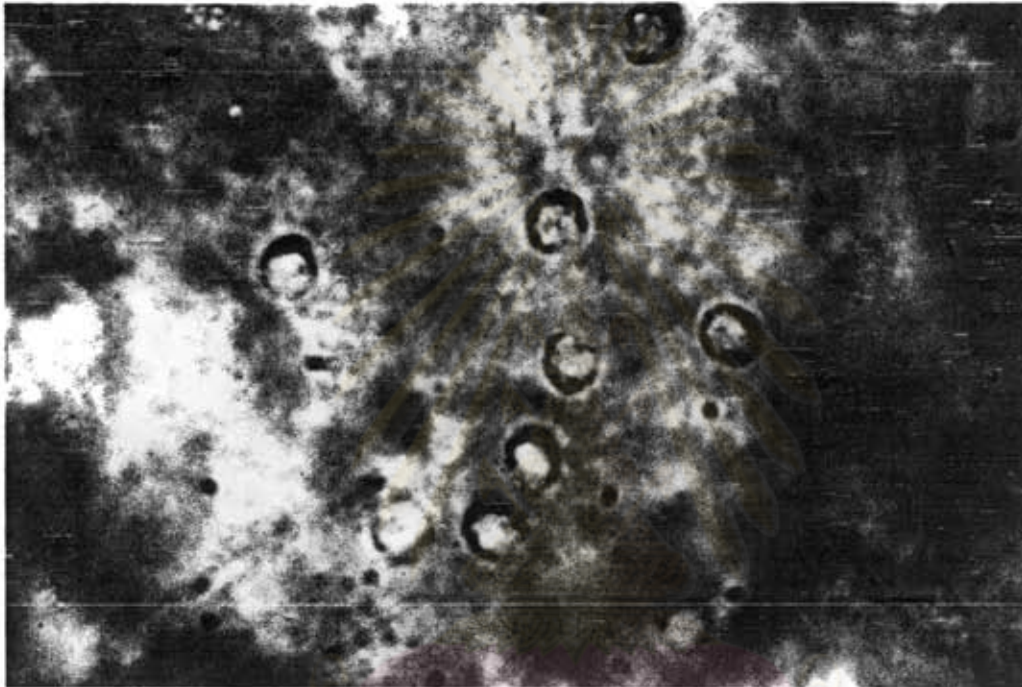
Isolate	Age (year)	Sex	Address (Province)	Duration of HIV infection (year)	Mode of HIV Acquisition
No.1	40	Male	Krabee	2	ND
No.2	32	Male	Bangkok	ND	IVDU*
No.3	28	Male	Bangkok	1	Heterosexual
No.4	46	Female	Bangkok	1	ND
No.5	45	Male	Bangkok	5	Homosexual
No.6	6	Male	Chiangrai	2	Vertical**
No.7	6	Female	Bangkok	6	Vertical
No.8	49	Male	Bangkok	3	ND
No.9	48	Male	Nakornpratom	4	Heterosexual
No.10	25	Male	Bangkok	1	ND
No.11	29	Male	Bangkok	2	ND
No.12	2	Male	Udonthani	2	Vertical
No.13	37	Female	Rayong	1	ND
No.14	55	Male	Bangkok	1	Heterosexual
No.15	43	Male	Bangkok	4	ND
No.16	22	Female	Nakorn-nayok	3	Heterosexual
No.17	18	Female	Payao	5	Heterosexual
No.18	27	Male	Pathumthani	1	IVDU
No.19	46	Male	Samut-Prakarn	1	Heterosexual
No.20	27	Female	Loei	4	ND

\*Intravenous Drug User

\*\*Vertical Transmission

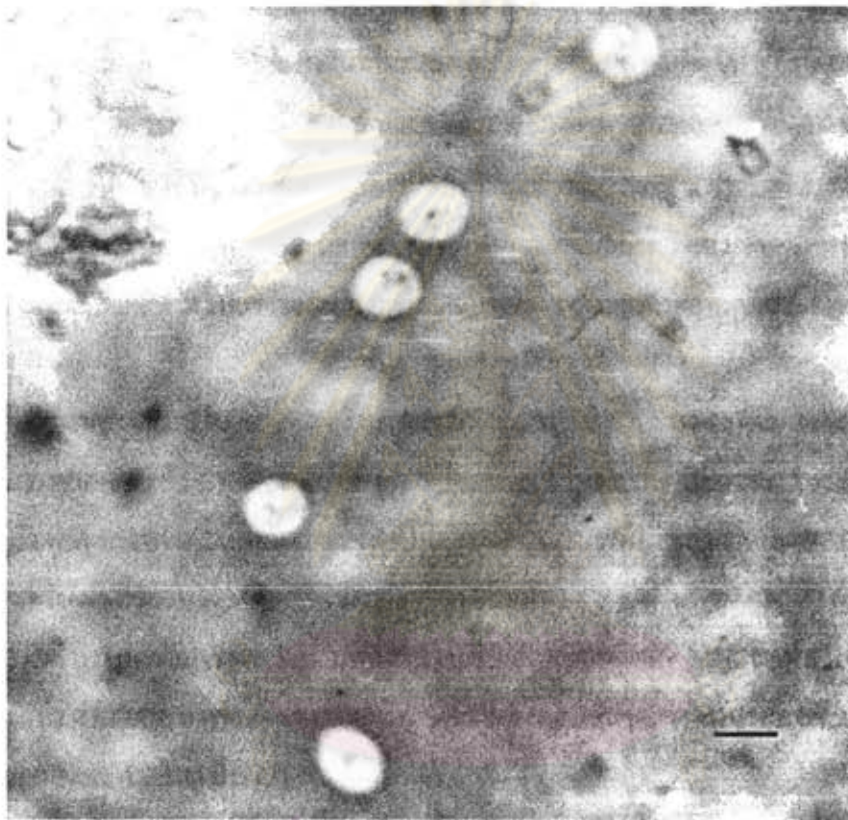
ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับปริมาณ CD4+/CD8+ lymphocytes และอาการทางคลินิก

Isolate	CD4+ cell (cells/ $\mu$ l)	CD8+ cell (cells/ $\mu$ l)	Associated Infections
No.1	74	1035	-
No.2	62	1023	oral candidiasis, pulmonary TB hepatitis B and C
No.3	32	363	sinusitis, genital herpes
No.4	26	317	<i>Mycobacterium avium</i> complex
No.5	147	1688	-
No.6	82	487	pneumonia, sinusitis
No.7	139	708	pneumonia, sinusitis
No.8	139	1188	pneumonia
No.9	26	339	pulmonary TB
No.10	130	1400	-
No.11	59	1927	pulmonary TB, <i>Salmonella</i> gr C
No.12	71	1230	oral candidiasis, pneumonia
No.13	36	552	oral candidiasis
No.14	70	994	oral candidiasis
No.15	29	156	condyloma acuminata
No.16	71	1113	oral candidiasis, pulmonary TB
No.17	90	1132	herpes zoster
No.18	121	1593	-
No.19	100	679	hepatitis B
No.20	129	725	oral candidiasis



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 แสดงตัวอย่าง oocyst ของ *Cryptosporidium* spp. ในอุจจาระผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ย้อม  
ด้วยวิธี modified kinyoun acid fast เส้นกำกับแสดงขนาดความยาว 5 ไมครอน



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แสดงตัวอย่าง oocyst ของ *Cryptosporidium* spp. ที่แยกออกจากอุจจาระด้วยวิธี sugar floatation

จากการย้อมสีพิเศษสามารถวัดขนาดของ oocyst ของแต่ละตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างละ 30 oocyst โดยวัดขนาดตามความยาวและความกว้าง ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างจากขนาดของ oocyst ได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีขนาดของ oocyst เล็กที่สุดมีความยาวอยู่ในช่วง 3.5 ถึง 6.0 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $4.64 \pm 0.65$  ไมครอน ขนาดความกว้างอยู่ในช่วง 3.0 ถึง 4.8 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $4.07 \pm 0.57$  ไมครอน ได้แก่ตัวอย่าง No.1 กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีขนาด oocyst ปานกลาง มีความยาวอยู่ในช่วง 4.0 ถึง 6.5 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $5.38 \pm 0.49$  ไมครอน ความกว้างอยู่ในช่วง 4.0 ถึง 6.0 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $4.69 \pm 0.39$  ไมครอน ได้แก่ตัวอย่าง No. 2 - 5 และ No. 7 - 20 ในกลุ่มที่สามเป็นกลุ่มที่มีขนาดของ oocyst ใหญ่ที่สุดมีความยาวอยู่ในช่วง 7.5 ถึง 9.0 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $8.43 \pm 0.44$  ไมครอน ความกว้างอยู่ในช่วง 5.5 ถึง 7.0 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $6.25 \pm 0.42$  ไมครอน ได้แก่ตัวอย่างที่ No.6 (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงดัชนีขนาด หรือสัดส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของ oocyst พบว่า oocyst ในกลุ่มที่ 1 และในกลุ่มที่ 2 ไม่แตกต่างกัน แต่ในกลุ่มที่ 3 มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจน

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของยีน SSU rRNA ของ *Cryptosporidium* ด้วยวิธี PCR รอบแรกจากการใช้ PCR primers คู่นอก (P1 และ P2) ให้ผลบวกมีความยาวประมาณ 650-670 คู่เบส เมื่อนำผลิตภัณฑ์จาก PCR รอบแรกมาทำปฏิกิริยา PCR ในรอบที่สอง โดยใช้ PCR primers คู่ใน (P3 และ P4) ให้ผลบวกทั้งหมดโดยมีความยาวของผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 480-500 คู่เบส โดยแถบผลิตภัณฑ์ PCR สำหรับตัวอย่าง No.1-15 แสดงในรูปที่ 3 สำหรับผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน TRAP-C1 พบว่าให้ผลบวกในทุกตัวอย่างโดยมีขนาดเท่ากันประมาณ 2 กิโลเบสดังแสดงตัวอย่าง No.1-15 ในรูปที่ 4

ผลการวิเคราะห์การเรียงลำดับเบส DNA ของแต่ละตัวอย่างแสดงในรูปที่ 5 พบว่าประกอบด้วยส่วนที่ต่างและส่วนที่เหมือนกันของกลุ่มตัวอย่าง สามารถแยกการวิเคราะห์ได้เป็น 4 แบบด้วยกัน แบบแรกคือ No.1 แบบที่ 2 ได้แก่ No.2 แบบที่ 3 ได้แก่ตัวอย่าง No.3-5 และ No.7-20 แบบที่ 4 ได้แก่ตัวอย่าง No.6 มีการเรียงลำดับเบสที่ไม่เหมือนกับกลุ่มตัวอย่างดังกล่าว (รูปที่ 6) ดังนั้นจึงได้นำมาทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อ *Cryptosporidium* ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้พบว่าในตัวอย่าง No.1 มีการเรียงลำดับเบสเหมือนกับ *C. felis* (GenBank Accession Number AF112575) ในตัวอย่าง No.6 มีการเรียงลำดับเบสเหมือนกับ *C. muris* (Genbank Accession Number L19069) และในกลุ่มตัวอย่าง No.2 มีการเรียงลำดับเบสเหมือนกับ *C. meleagridis* (Genbank Accession Number AF112574) และในกลุ่มตัวอย่าง No.3-5 และ No.7-20 มีการเรียงลำดับเบสเหมือนกับ *C. parvum* สายพันธุ์ HCNV4 ซึ่งเป็น isolate ที่ได้จากคน (Genbank Accession Number AF093489) (รูปที่ 7) และจากการศึกษาการเปรียบเทียบการเรียงลำดับเบสของ DNA ในกลุ่มของ *C.*

ตารางที่ 3 แสดงขนาดของ oocyst ของ *Cryptosporidium* จากตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

Isolate	Dimension of <i>Cryptosporidium</i> Oocyst (mean±S.D.)		
	Length (μ)	Width (μ)	Shape Index
No.1	3.5-6.0 (4.64±0.65)	3.0-4.8 (4.07±0.57)	1.04-1.38 (1.14±0.08)
No.2	4.8-6.5 (5.26±0.36)	4.0-6.0 (4.69±0.44)	1.00-1.45 (1.13±0.08)
No.3	4.5-6.0 (5.28±0.42)	4.0-5.0 (4.72±0.47)	1.03-1.25 (1.12±0.06)
No.4	4.5-6.0 (5.22±0.42)	4.0-5.6 (4.58±0.39)	1.04-1.33 (1.14±0.08)
No.5	4.8-6.0 (5.25±0.34)	4.0-5.2 (4.59±0.42)	1.04-1.25 (1.16±0.11)
No.6	7.5-9.0 (8.43±0.44)	5.5-7.0 (6.25±0.42)	1.30-1.47 (1.35±0.07)
No.7	4.2-6.2 (5.28±0.47)	4.0-6.0 (4.66±0.52)	1.03-1.25 (1.14±0.07)
No.8	4.8-6.0 (5.36±0.37)	4.0-5.8 (4.67±0.42)	1.04-1.45 (1.15±0.10)
No.9	4.0-6.5 (5.38±0.49)	4.0-5.8 (4.65±0.48)	1.03-1.38 (1.16±0.08)
No.10	4.5-6.5 (5.32±0.45)	4.0-6.0 (4.67±0.57)	1.04-1.30 (1.15±0.08)
No.11	4.0-6.0 (5.26±0.49)	3.5-5.4 (4.56±0.46)	1.04-1.25 (1.16±0.10)
No.12	4.2-6.2 (5.27±0.44)	4.0-6.0 (4.68±0.51)	1.03-1.25 (1.13±0.07)
No.13	4.0-6.0 (5.33±0.43)	4.0-5.8 (4.58±0.48)	1.04-1.33 (1.17±0.07)
No.14	5.0-6.0 (5.30±0.35)	4.0-5.8 (4.66±0.52)	1.03-1.38 (1.15±0.10)
No.15	4.6-6.0 (5.35±0.47)	4.0-5.0 (4.65±0.45)	1.04-1.33 (1.16±0.07)
No.16	4.8-5.8 (5.27±0.31)	4.0-5.0 (4.61±0.39)	1.04-1.25 (1.15±0.07)
No.17	4.8-6.0 (5.20±0.41)	4.0-5.0 (4.58±0.37)	1.04-1.25 (1.16±0.07)
No.18	4.8-6.2 (5.35±0.47)	4.5-6.0 (4.36±0.40)	1.04-1.33 (1.16±0.07)
No.19	4.2-6.0 (5.30±0.50)	4.0-5.2 (4.66±0.38)	1.04-1.38 (1.14±0.07)
No.20	4.0-6.0 (5.37±0.36)	4.0-5.0 (4.65±0.33)	1.08-1.25 (1.16±0.08)



รูปที่ 3 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR รอบสองจากการใช้ PCR primers คู่ใน ในส่วนของยีน SSU rRNA ของ *Cryptosporidium* spp. วิเคราะห์ใน 2% agarose gel electrophoresis ซึ่งมีความยาวประมาณ 480-500 คู่เบส โดย M คือ  $\lambda$ /Hind III, M1 คือ  $\Phi$  174/Hind III, และ 1=No.1; 2=No.2; 3=No.3; 4=No.4; 5=No.5; 6=No.6; 7=No.7; 8=No.8; 9=No.9; 10=No.10; 11=No.11; 12=No.12; 13=No.13; 14=No.14 และ 15=No.15





รูปที่ 4 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน TRAP-C1 ของ *Cryptosporidium* spp. ใน 1% agarose gel electrophoresis ซึ่งมีความยาวประมาณ 2 กิโลเบส โดย M คือ  $\lambda$ /Hind III, และ 1=No.1; 2=No.2; 3=No.3; 4= No.4; 5=No.5; 6=No.6; 7=No.7; 8=No.8; 9=No.9; 10=No.10; 11=No.11; 12=No.12; 13=No.13; 14=No.14 และ 15=No.15





NO. 1 327:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 405  
 NO. 2 316:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 405  
 NO. 3 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 4 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 5 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 6 314:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 403  
 NO. 7 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 8 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 9 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 10 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 11 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 12 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 13 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 14 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 15 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 16 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 17 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 18 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 19 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 NO. 20 320:GGTGAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAAACAACTAAATGCGAAAGCAATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATC 409  
 \*\*\*\*\*  
 NO. 1 427:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTTGTT 491  
 NO. 2 406:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 470  
 NO. 3 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 4 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 5 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 6 404:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTTGTT 468  
 NO. 7 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 8 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 9 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 10 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 11 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 12 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 13 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 14 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 15 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 16 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 17 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 18 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 19 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 NO. 20 410:GAAGCGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 \*\*\*\*\*

รูปที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน SSU rRNA ของ *Cryptosporidium* spp. ในแต่ละตัวอย่าง \* หมายถึง ลำดับเบสที่เหมือนกัน - หมายถึง มีการขาดหายไปของเบสในตำแหน่งดังกล่าว

*C. parvum* HCNV4  
 No. 3-5, 7-20  
*C. felis*  
 NO. 1  
*C. muris*  
 NO. 6  
*C. meleagridis*  
 NO. 2

1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTAATA-ATT-T 88  
 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTAATA-ATT-T 88  
 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTAATAACCTTAT 90  
 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTAATAACCTTAT 90  
 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-GTA--TAAT 87  
 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-GTA--TAAT 87  
 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTAATA-ATT-T 88  
 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTAATA-ATT-T 88  
 \* \* \* \* \*

*C. parvum* HCNV4  
 No. 3-5, 7-20  
*C. felis*  
 NO. 1  
*C. muris*  
 NO. 6  
*C. meleagridis*  
 NO. 2

89: ATATAAA-ATATTTGATGAA--TA--T-TTATAATAATTAACATAATTCATA-----TT---ACT--ATTTTTTT--TTTT-AGT-A 157  
 89: ATATAAA-ATATTTGATGAA--TA--T-TTATAATAATTAACATAATTCATA-----TT---ACT--ATTTTTTT--TTTT-AGT-A 157  
 91: ATATA-ATATTTTTTTTAA'A--TAT-TATTATGTAAGATTAAACATAATTCATAAT-T-TTTAAGACTGAATTT--TTAGTTTTGA-TAA 171  
 91: ATATA-ATATTTTTTTTAAA--TAT-TATTATGTAAGATTAAACATAATTCATAAT-T-TTTAAGACTGAATTT--TTAGTTTTGA-TAA 171  
 88: CTATA-ATA----TTACT-AAGGTATATATTA--TATTATCAACATCCTTCCCTATTATATTT---CT-AA-----A-----T-A-T-A 150  
 88: CTATA-ATA----TTACT-AAGGTATATATTA--TATTATCAACATCCTTCCCTATTATATTT---CT-AA-----A-----T-A-T-A 150  
 89: ATATATA-ATA-TTTGATTAA--TA--T-TTATATAATTAACATAATTCATA-----TT---ACT--A---AATT--TATT-AGT-A 153  
 89: ATATATA-ATA-TTTGATTAA--TA--T-TTATATAATTAACATAATTCATA-----TT---ACT--A---AATT--TATT-AGT-A 153  
 \* \* \* \* \*

*C. parvum* HCNV4  
 No. 3-5, 7-20  
*C. felis*  
 NO. 1  
*C. muris*  
 NO. 6  
*C. meleagridis*  
 NO. 2

158: TATGAAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAT-A-TTAAAGATTTTTA 245  
 158: TATGAAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAT-A-TTAAAGATTTTTA 245  
 172: TATGAAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCCTTTTGGCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAA-TAAAAGATTTTTA 260  
 172: TATGAAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCCTTTTGGCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAA-TAAAAGATTTTTA 260  
 151: TAGGAAACTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCAACTGCCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGT-AAGGACTTTTG 239  
 151: TAGGAAACTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCAACTGCCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGT-AAGGACTTTTG 239  
 154: TATGAAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAT-A-TTAAAGATTTTTA 241  
 154: TATGAAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAT-A-TTAAAGATTTTTA 241  
 \* \* \* \* \*

*C. parvum* HCNV4 246: TC--TTTTTTATTGGTTCTAAGATAAGAA-TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTA 332  
 No. 3-5, 7-20 246: TC--TTTTTTATTGGTTCTAAGATAAGAA-TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTA 332  
*C. felis* 261: TCTTTTTTTATTGGTTCTAAGATAAAAA-TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGATATTCCTTA 349  
 NO. 1 261: TCTTTTTTTATTGGTTCTAAGATAAAAA-TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGATATTCCTTA 349  
*C. muris* 240: TC--TTTCTTATTGGTTCTAAGGACAA-AAGTAATGGTTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTA 326  
 NO. 6 240: TC--TTTCTTATTGGTTCTAAGGACAA-AAGTAATGGTTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAACAGCCAGAGGTGAAATTCCTTA 326  
*C. meleagridis* 242: TC--TTTCTTATTGGTTCTAAGATAAAAA-TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTA 328  
 NO. 2 242: TC--TTTCTTATTGGTTCTAAGATAAAAA-TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTA 328  
 \*\* \*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

*C. parvum* HCNV4 333: GATTTGTTAAAGACAAACTAATCGGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA 422  
 No. 3-5, 7-20 333: GATTTGTTAAAGACAAACTAATCGGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA 422  
*C. felis* 350: GATTTGTTAAAGACAAACTAATCGGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA 439  
 NO. 1 350: GATTTGTTAAAGACAAACTAATCGGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA 439  
*C. muris* 327: GATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA 416  
 NO. 6 327: GATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA 416  
*C. meleagridis* 329: GATTTGTTAAAGACAAACTAATCGGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA 418  
 NO. 2 329: GATTTGTTAAAGACAAACTAATCGGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA 418  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

*C. parvum* HCNV4 423: TACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 No. 3-5, 7-20 423: TACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
*C. felis* 440: TACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTTGTT 491  
 NO. 1 440: TACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTTGTT 491  
*C. muris* 417: TACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTTGTT 468  
 NO. 6 417: TACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTTGTT 468  
*C. meleagridis* 419: TACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 470  
 NO. 2 419: TACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 470  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

รูปที่ 6 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนยีน SSU rRNA ของ *Cryptosporidium* ในแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบกับลำดับเบส DNA ของ *Cryptosporidium* สายพันธุ์อื่นๆ  
 \* หมายถึง ลำดับเบสที่เหมือนกัน - หมายถึง มีการขาดหายไปของเบสในตำแหน่งนั้นๆ

*C. parvum* bovine 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
*C. parvum* CPF 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
*C. parvum* CPM-1 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
*C. parvum* CPM1 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
*C. parvum* GCH1 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
*C. parvum* HFL5 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
*C. parvum* IOWA 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
*C. parvum* TAMU 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
*C. parvum*-K2 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
*C. parvum*-MT 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
*C. parvum*-P1 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
*C. parvum* HCNV4 1: CCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTA 89  
 No. 3-5, 7-20 \*\*\*\*\* +

*C. parvum* bovine 90: TATA-AAATA-TTTTG-ATGAA--TATTTATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA-----TATAT--TTTAGTATATGAAATTTT 165  
*C. parvum* CPF 90: TATA-AAATA-TTTTG-ATGAA--TATTTATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA-AAAT-T-T-T-GTTTTGGTATATGAAATTTT 168  
*C. parvum* CPM-1 90: TATA-AAATA-TTTT-AAATA--TATTTATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA-AAAT-T-T-T--TTTGGTATATGAAATTTT 169  
*C. parvum* CPM1 90: TATA-ATATA-TTTTG-ATGAA--TATTTATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA----T-TTTT--TTTGGTATATGAAATTTT 166  
*C. parvum* GCH1 90: TATA-AAATA-TTTTG-ATGAA--TATTTATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA-----TATAT--TTTGGTATATGAAATTTT 165  
*C. parvum* HFL5 90: TATA-AAATA-TTTTG-ATGAA--TATTTATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA-----TT--TTTGGTATATGAAATTTT 162  
*C. parvum* IOWA 90: TATA-AAATA-TTTTG-ATGAA--TATTTATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA-----TATAT--TTTGGTATATGAAATTTT 165  
*C. parvum* TAMU 90: TATA-AAATA-TTTTG-ATGAA--TATTTATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA-----TATAT--TTTGGTATATGAAATTTT 165  
*C. parvum*-K2 90: TATAT-TATACTTTT---T-AAAGTGTATATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA-ATT-T-T-T--TTGGTATATGAAATTTT 166  
*C. parvum*-MT 90: TATA-AAATA-TTTTG-ATGAA--TATTTATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA-----TATAT--TTTGGTATATGAAATTTT 165  
*C. parvum*-P1 90: TATA-AAATA-TTTTG-ATGAA--TATTTATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA-T-T-T--ATTGGTATATGAAATTTT 165  
*C. parvum* HCNV4 90: TATA-AAATA-TTTTG-ATGAA--TATTTATAATAATTAACATAAATTCATATTTACTA--TT-TTTTT--TTTGGTATATGAAATTTT 168  
 No. 3-5, 7-20 \*\*\*\*\* +

*C. parvum* bovine 166: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 253  
*C. parvum* CPF 169: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 256  
*C. parvum* CPM-1 170: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 257  
*C. parvum* CPM1 167: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 254  
*C. parvum* GCH1 166: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 253  
*C. parvum* HFL5 163: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 250  
*C. parvum* IOWA 166: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 253  
*C. parvum* TAMU 166: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 253  
*C. parvum*-K2 167: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 254  
*C. parvum*-MT 166: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 253  
*C. parvum*-P1 166: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 253  
*C. parvum* HCNV4 169: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 256  
 No. 3-5, 7-20 169: ACTTTGAGAAAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGC-ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAAATATAAAGATTTTATCTTCTTATT 256  
 \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*

*C. parvum* bovine 252: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 351  
*C. parvum* CPF 257: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 344  
*C. parvum* CPM-1 258: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 345  
*C. parvum* CPM1 255: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 342  
*C. parvum* GCH1 254: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 341  
*C. parvum* HFL5 251: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 338  
*C. parvum* IOWA 254: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 341  
*C. parvum* TAMU 254: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 341  
*C. parvum*-K2 255: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 342  
*C. parvum*-MT 254: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 341  
*C. parvum*-P1 257: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 343  
*C. parvum* HCNV4 257: GGTTCTAAGATA-AGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAG 343  
 No. 3-5, 7-20 \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*



*C. parvum* bovine 352: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 440  
*C. parvum* CPF 345: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 433  
*C. parvum* CPM-1 346: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 434  
*C. parvum* CPM1 343: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 434  
*C. parvum* GCH1 342: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 430  
*C. parvum* HFL5 339: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 427  
*C. parvum* IOWA 342: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 430  
*C. parvum* TAMU 342: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 430  
*C. parvum*-K2 343: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 431  
*C. parvum*-MT 342: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 430  
*C. parvum*-P1 342: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 430  
*C. parvum* HCNV4 344: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 432  
*No. 3-5, 7-20* 344: ACAAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAG 432  
 \* \* \* \* \*

*C. parvum* bovine 441: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 471  
*C. parvum* CPF 434: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
*C. parvum* CPM-1 435: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 475  
*C. parvum* CPM1 435: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 472  
*C. parvum* GCH1 431: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 471  
*C. parvum* HFL5 428: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 468  
*C. parvum* IOWA 431: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 471  
*C. parvum* TAMU 431: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 471  
*C. parvum*-K2 432: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 472  
*C. parvum*-MT 431: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 471  
*C. parvum*-P1 431: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 471  
*C. parvum* HCNV4 433: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
*No. 3-5, 7-20* 433: TCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTT 474  
 \* \* \* \* \*

รูปที่ 7 แสดงลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน SSU rRNA ของ *Cryptosporidium parvum* เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ

*Cryptosporidium* ในสายพันธุ์อื่น ๆ \* หมายถึง ลำดับเบสที่เหมือนกัน - หมายถึง มีการขาดหายไปของเบสในตำแหน่งนั้น ๆ

*C. parvum* พบว่า สามารถแยกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มที่สามารถติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่างชนิดกัน ได้โดยเฉพาะในวัวและคนเรียกว่า bovine genotype และกลุ่มที่พบการติดเชื้อเฉพาะในคน โดยไม่สามารถติดเชื้อในสัตว์อื่นๆ เรียกว่า human genotype ทั้งนี้ในแต่ละกลุ่มอาจพบความแตกต่างในการเรียงลำดับ DNA ใน SSU rRNA อย่างไรก็ตามตัวอย่างทั้งหมดในการศึกษาที่พบว่าเป็น *C. parvum* ล้วนเป็น human genotype และไม่พบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างเลย

ผลการศึกษาถึงความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* โดยวิธี PCR เริ่มต้นจากการนับปริมาณของ oocyst ที่ได้จากการแยกกากอุจจาระออกจาก oocyst โดยวิธี Sheather sugar flotation และนำไปสกัด DNA หลังจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยการเจือจางปริมาณ DNA ในอัตราส่วนต่างๆ กัน นำมาวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งให้ผลของการเจือจาง DNA เท่ากับ 1:2500 และนำมาคำนวณหาความไวในการตรวจวินิจฉัยดังนี้ จากการตรวจนับปริมาณ oocyst ได้ทั้งหมด 2,034 oocyst ในปริมาตร 4 ไมโครลิตร ปริมาตรทั้งหมดที่นำมาสกัด DNA เท่ากับ 250 ไมโครลิตร หลังจากสกัด DNA โดยเติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ดังนั้นจึงทำให้มีปริมาณของ oocyst เท่ากับ 127,125 oocyst จากการทำปฏิกิริยา PCR ใช้ DNA ในปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพราะฉะนั้นจึงทำให้มีปริมาณ oocyst เท่ากับ 6356.25 oocyst และจากการทำปฏิกิริยา PCR มีการเจือจางปริมาณ DNA ให้ผลผลิตเท่ากับ 1:2500 ดังนั้นปริมาณ oocyst ที่สามารถตรวจวินิจฉัยโดยวิธี PCR คือมีปริมาณ 3 oocyst

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน TRAP-C1 มีการศึกษาก่อนหน้านี้เพียง 1 ตัวอย่างคือ *C. parvum* ชนิด bovine genotype โดย strain ที่ใช้ศึกษาคือ Moredun strain ดังนั้น จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก strain ดังกล่าวสำหรับการอ้างอิงดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่า TRAP-C1 ของทุกตัวอย่างที่ใช้ศึกษามีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ลำดับที่ 37 เปลี่ยนจาก A เป็น T ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก isoleucine เป็น phenylalanine การแทนที่ในตำแหน่งที่ 181 และ 193 จาก T เป็น A ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก leucine เป็น isoleucine การแทนที่ในตำแหน่งที่ 241 จาก T เป็น A ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก leucine เป็น methionine การแทนที่จก A เป็น T ในตำแหน่ง 362 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก aspartic acid เป็น valine การแทนที่จาก C เป็น T ในตำแหน่ง 367 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก histidine เป็น tyrosine นอกจากนี้ยังมีการแทนที่ในตำแหน่งที่ 376, 394, 607, 685, 892, 910, 1049, 1198, 1183, 1114, 1668 และ 1699 ส่วนการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่เหลืออีก 20 ตำแหน่ง ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไป ได้แก่ตำแหน่งที่ 45, 66, 93, 120, 330, 387, 393, 537, 618, 810, 1005, 1023, 1230, 1500, 1512, 1575, 1800, 1824 และ 1905 ส่วนตัวอย่าง No. 2 ซึ่งเป็น *C. meleagridis* พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 35 ตำแหน่ง โดยเป็นการแทนที่ที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 18 ตำแหน่ง และการแทนที่ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 17 ตำแหน่ง ในทำนองเดียวกัน ตัวอย่าง No. 6 ซึ่งเป็น *C. muris* พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำ









ให้กรโคอะมิโนเปลี่ยนชนิด 20 ตำแหน่ง และไม่ทำให้กรโคอะมิโนเปลี่ยนแปลง 17 ตำแหน่ง สำหรับ ตัวอย่าง No. 3-5 และ No. 7-20 ซึ่งเป็น *C. parvum* (human genotype) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน TRAP-C1 เหมือนกันทุกตำแหน่ง โดยพบการแทนที่ทั้งหมด 35 ตำแหน่ง ในจำนวนนี้พบการ แทนที่ของนิวคลีโอไทด์แล้วทำให้กรโคอะมิโนเปลี่ยนแปลง 16 ตำแหน่ง

## วิจารณ์ผลการทดลอง

การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในระบบทางเดินอาหารทำให้เกิดอาการตั้งแต่ท้องเสียเฉียบพลันแต่หายได้เอง มีระยะฟักตัวของโรคตั้งแต่ 2-30 วัน เฉลี่ย 6 วัน มักพบในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติ นอกจากอาการท้องเสียเป็นน้ำแล้ว มักพบร่วมกับอาการเบื่ออาหาร ปวดท้อง ไข้และไอร่วมด้วย สำหรับอาการของโรคในผู้ป่วยเอดส์มักรุนแรงและเรื้อรัง นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อลุกลามนอกลำไส้ เช่น หลอดลม ระบบทางเดินน้ำดี ถุงน้ำดี และตับอ่อน เป็นต้น (Griffiths, 1998) ปัจจุบันยังไม่พบว่ามีวัคซีนใดที่มีประสิทธิภาพทำลายเชื้อได้ ดังนั้นการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อดังกล่าวจึงอาศัยการรักษาแบบประคับประคองเท่านั้น สำหรับผู้ที่มีภาวะคุ้มกันบกพร่องการป้องกันการติดเชื้อจึงเป็นสิ่งสำคัญ อย่างไรก็ตามแม้จะพบว่าปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้ออาจเกิดขึ้นได้หลายทาง แต่ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งคือการเข้าใจคุณลักษณะของเชื้อ ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยการศึกษาในระดับอนุชีววิทยา และเปรียบเทียบคุณลักษณะทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่าง *Cryptosporidium* ที่ได้จากผู้ป่วยซึ่งในประเทศไทยไม่มีการศึกษามาก่อน ความรู้ดังกล่าวจะช่วยให้เกิดความเข้าใจในแหล่งที่มาของเชื้ออันจะเป็นแนวทางในการวางแผนทางการป้องกันโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะช่วยลดภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อฉวยโอกาสชนิดนี้ในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์ตลอดจนผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันต่อไป

*Cryptosporidium* เป็น โปรโตซัวประเภทฉวยโอกาส ทำให้เกิดโรค cryptosporidiosis ส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในผู้ป่วย HIV ซึ่งทำให้ผู้ป่วยเหล่านี้มีอาการท้องเสีย ถ่ายเหลวเป็นน้ำ และในบางครั้งมีมูกปนมากับอุจจาระ ระยะเวลาของการเกิดโรคในกลุ่มผู้ป่วยดังกล่าวมักเรื้อรัง เป็นเดือนหรืออาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต จากการศึกษาถึงการระบาดของโรค *Cryptosporidium* ในผู้ป่วยโรค AIDS พบว่าส่วนใหญ่การระบาดเกิดขึ้นในกลุ่มของประเทศกำลังพัฒนามากกว่ากลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว จากการสำรวจในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา 48 ประเทศ พบการติดเชื้อประมาณร้อยละ 7.9 และในกลุ่มประเทศพัฒนาแล้ว 56 ประเทศพบการติดเชื้อประมาณร้อยละ 4.9 จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าปัจจัยที่มีการติดเชื้อในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาเกี่ยวข้องกับสุขาภิบาลที่ไม่ดี มีการปนเปื้อนของเชื้อในระบบการส่งน้ำ การอยู่ในชุมชนแออัดต่างๆ หรือเป็นการติดเชื้อจากสัตว์ผู้คน เป็นต้น (Current & Garcia, 1991) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำสำรวจจากการตรวจอุจจาระของผู้ป่วยที่มารับบริการ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 ถึงปี ค.ศ. 2000 จำนวนผู้ป่วยที่มา

รับบริการประมาณ 1040 ราย พบการติดเชื้อ *Cryptosporidium* 110 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.5 ในจำนวนนี้พบว่าเป็นผู้ใหญ่ร้อยละ 8.65 ในเด็กร้อยละ 1.92 ส่วนใหญ่พบว่าผู้ป่วยเหล่านี้มีการติดเชื้อ HIV และมีอาการท้องเสีย ถ่ายเหลวเป็นน้ำ อีกทั้งยังพบว่าผู้ป่วยทุกรายมีน้ำหนักลด และมีภาวะของการขาดสารอาหาร สอดคล้องกับการศึกษาของ Moolasart และคณะ (1995) ซึ่งศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HIV พบการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในผู้ใหญ่ร้อยละ 7.9 และในเด็กร้อยละ 19

ในการศึกษานี้ได้นำปัจจัยด้านประชากรที่เป็นข้อมูลทั่วไป และประวัติการป่วยจากประชากรตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับการเกิดโรคพบว่า อัตราการตรวจพบเชื้อ *Cryptosporidium* พบในกลุ่มผู้ป่วย HIV เพศชายมากกว่าเพศหญิงในอัตราส่วนเท่ากับ 2.33 ต่อ 1 ซึ่งปัจจัยเสี่ยงของการได้รับเชื้อ HIV พบการติดเชื้อในเพศชายมากกว่าเพศหญิงเนื่องจากเพศชายมีพฤติกรรมในการมีเพศสัมพันธ์กับหญิงบริการที่ติดเชื้อ ในขณะที่เพศหญิงมักได้รับเชื้อจากสามี สำหรับผู้ป่วยในการศึกษานี้ที่น่าจะได้รับเชื้อจากการใช้เข็มฉีดยาที่ไม่สะอาดพบน้อยกว่ากลุ่มอื่นมากกว่าผู้ที่ฉีดยาเข้าเส้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pedersen และคณะ (1996) และเมื่อพิจารณาถึงกลุ่มอายุของผู้ป่วยพบว่าอัตราการติดเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุ 21-40 ปี เนื่องจากอยู่ในช่วงวัยทำงานและอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ ซึ่งมีการมารับการตรวจรักษามากกว่าในเด็ก แต่อายุไม่มีความสัมพันธ์กับการป่วยเป็นโรค cryptosporidiosis คล้ายกับการศึกษาของ Casemore (1990) ที่พบว่าอายุมีความสัมพันธ์กับการป่วยเป็นโรค cryptosporidiosis ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การปนเปื้อนของ oocyst จากการกิน ซึ่งพบมากในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี เนื่องจากเป็นการสำรวจในสถานรับเลี้ยงเด็ก รวมทั้งในโรงเรียน ดังนั้นจึงทำให้พบอัตราการติดเชื้อในเด็กมากกว่าในผู้ใหญ่

โดยทั่วไปการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยที่มีปริมาณของ CD4+ lymphocyte มีค่าต่ำกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร สำหรับผู้ป่วยที่ทำการศึกษามีค่าของ CD4+ lymphocyte ต่ำกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร (Blanshard et al, 1992) ทุกรายและยังพบว่าผู้ป่วยเหล่านี้ส่วนใหญ่มีการติดเชื้อของ pulmonary tuberculosis และมีแนวโน้มของการติดเชื้ออื่นร่วมด้วย อาการสำคัญที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์คือ มีอาการของการท้องเสีย ถ่ายเหลวเป็นน้ำ ซึ่งในบางครั้งมีลักษณะของมูกปนออกมากับอุจจาระ สามารถพบอาการดังกล่าวในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ทุกรายที่ทำการศึกษา นอกจากนี้ยังพบอาการอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้แก่ การเป็นไข้ ไอ อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน และมีอาการของการปวดท้อง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Dupont และคณะ (1995) ดังนั้นการติดเชื้อของ *Cryptosporidium* ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องมักมีอาการรุนแรงมากกว่าในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติ อีกทั้งยังพบว่าการติดเชื้อดังกล่าวไม่ได้มีการติดเชื้อเฉพาะภายในลำไส้เท่านั้น ยังสามารถพบการติดเชื้อภายนอกลำไส้ได้ถ้ามีการติดเชื้ออย่างรุนแรงซึ่งทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตจากการติดเชื้อ ดังกล่าวได้

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* นั้น โดยการตรวจหา oocyst ในอุจจาระเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และไม่เป็นการรบกวนผู้ป่วยเหมือนการตัดชิ้นเนื้อลำไส้ ซึ่งจากการตัดชิ้น



เนื้อเยื่อลำไส้อาจตรวจไม่พบระยะต่างๆ ของเชื้อ แต่ในทางตรงข้ามสามารถพบ oocyst ในอุจจาระซึ่งอาจเป็นเพราะการคัดขึ้นเนื้อเยื่อไม่ตรงกับตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ เพราะว่าการติดเชื้อของ *Cryptosporidium* สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพภายนอกลำไส้ได้ เช่น ที่กระเพาะอาหาร ดับเป็นต้น อีกทั้งค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยมีราคาสูง และใช้เวลาตรวจนานกว่าการตรวจหา oocyst ในอุจจาระจากการย้อมสีพิเศษชนิดต่างๆ ที่มีการศึกษาของ Jongwutiwes และคณะ (1988) พบว่าการย้อมด้วยวิธี modified Kinyoun acid fast ให้การติดสีของ oocyst แยกออกจาก yeast และพื้นหลังได้อย่างชัดเจน สามารถดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายวัตถุ 40 เท่า อีกทั้งสามารถมองเห็นลักษณะของ sporozoites ได้อย่างชัดเจน วิธีนี้มีความสะดวก รวดเร็ว แม่นยำ และใช้เวลาในการย้อมไม่นานรวมไปถึงค่าใช้จ่ายก็ไม่มากนัก (Jongwutiwes et al, 1988)

สำหรับการตรวจหา oocyst โดยการใช้ monoclonal antibodies ที่จำเพาะวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายที่สูงและเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการที่ขาดทักษะการย้อมสี และการตรวจจากเชื้อ (Rusnak et al, 1989) ในสิ่งแวดล้อมมากกว่าที่จะใช้ในการศึกษาในคน จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ oocyst โดยวิธี sedimentation และวิธี flotation เป็นวิธีที่ประหยัดและมีความไวมากที่สุดแต่จากการศึกษาทั้งสองวิธีนี้ พบว่าวิธี sedimentation ไม่เหมาะสมกับการศึกษาในครั้งนี้ เนื่องจากปริมาณของกากอุจจาระ และสิ่งเจือปนอื่นๆ ซึ่งมีผลสำหรับการเตรียม DNA ที่จะใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้วิธี Sheather sucrose flotation เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ oocyst (Kim et al, 1992) การศึกษานี้พบว่า การตรวจวินิจฉัย oocyst จากอุจจาระผู้ป่วย โดยวิธี modified Kinyoun acid fast สอดคล้องกับการศึกษาของ Jongwutiwes และ คณะ (1988) ซึ่งสามารถเห็นลักษณะรูปร่างของ oocyst และแยกความแตกต่างของขนาด oocyst ที่ตรวจพบได้ ดังนั้นจึงได้ตรวจวัดขนาดของ oocyst ในแต่ละตัวอย่าง จำนวน 30 oocyst ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ขนาด oocyst พบว่า ขนาดของ oocyst สามารถแยกความแตกต่างได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 (No.1) ความยาว ( $4.6 \pm 0.65$ ) ความกว้าง ( $4.07 \pm 0.57$ ) กลุ่มที่ 2 (No.2-5 และ No.7-20) ความยาว ( $5.38 \pm 0.49$ ) ความกว้าง ( $4.69 \pm 0.39$ ) และในกลุ่มที่ 3 (No.6) ความยาว ( $8.43 \pm 0.44$ ) ความกว้าง ( $6.25 \pm 0.42$ ) จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าในกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.01$

สำหรับการแยก species ของเชื้อ *Cryptosporidium* นอกจากอาศัยขนาดของ oocyst แล้ว ความจำเพาะต่อโฮสต์ของเชื้อแต่ละ species และบริเวณที่มีการติดเชื้อในโฮสต์ นั้นมีข้อจำกัดหลายอย่างด้วยกัน คือ ปัญหาจากการเลือกสัตว์ทดลองให้เหมาะกับ species ของเชื้อที่ทำการศึกษา ซึ่งในสัตว์บางชนิดพบการติดเชื้อได้หลาย species นอกจากนี้ระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์และอายุล้วนมีผลต่อความสามารถในการรับเชื้อในสัตว์ต่างๆ ได้ ดังนั้นการศึกษาดังกล่าวจึงจำกัดเฉพาะบางห้องปฏิบัติการเท่านั้น

ในการศึกษานี้ได้นำเอาเทคนิคทางอณูชีววิทยา มาใช้ในการวิเคราะห์ species ของเชื้อ *Cryptosporidium* โดยวิธี PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของยีน SSU rRNA (Xiao et al, 1999) เนื่องจากเป็นยีนที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสสูง และมีความแตกต่างของลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ดังนั้นยีนนี้สามารถนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ เพื่อใช้ในการจำแนก species ของเชื้อ *Cryptosporidium* (Morgan et al, 1997)

จากการวิเคราะห์ผลการเรียงลำดับเบสในส่วน of SSU rRNA เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับเบสใน GenBank สามารถแยกความแตกต่างได้ 4 กลุ่ม โดยที่ในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ตัวอย่าง No.1 ตรงกับ *C. felis* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ตัวอย่าง No.3-5 และ No.7-20 ตรงกับ *C. parvum* human genotype กลุ่มที่ 3 ได้แก่ตัวอย่าง No.2 ตรงกับ *C. meleagridis* และกลุ่มที่ 4 ตัวอย่าง No.6 ตรงกับ *C. muris* เป็นที่น่าสังเกตว่าในการศึกษานี้พบการติดเชื้อของ *C. parvum* ชนิด human genotype เท่านั้น โดยไม่พบ *C. parvum* bovine genotype และ *C. parvum* dog genotype เลย และการติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดขึ้นในผู้ใหญ่มากกว่าในเด็ก ส่วนในเด็กพบการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ซึ่งเป็น species อื่นๆ ที่มีโฮสต์ตามธรรมชาติที่เป็นสัตว์ปีก หนู และงู จึงอาจเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อในเด็กนั้นเป็นการติดเชื้อจากสัตว์สู่คน เนื่องจากเด็กน่าจะจะมีโอกาสคลุกคลีกับสัตว์มากกว่าผู้ใหญ่ และในการรักษาสุขภาพอนามัยที่ไม่ดี รวมทั้งอาจมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย อนึ่งการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน TRAP-C1 พบว่าความแตกต่างของการจัดกลุ่ม *Cryptosporidium* ให้ผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน of ยีน SSU rRNA

จากการวิเคราะห์ผลการเรียงลำดับเบสมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการทราบแหล่งที่มาของการติดเชื้อ และสามารถนำมาอธิบายระบาดวิทยาของเชื้อแต่ละชนิดได้ ข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นแนวทาง อันสำคัญในการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคต่อไปในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เอกสารอ้างอิง

- Addiss DG, Pond RS, Remshak M, Juranek DD, Stokes S, Davis JP. Reduction of risk of watery diarrhea with point-of-use water filters during a massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin, 1993. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54:549-553.
- Blanshard C, Jackson AM, Shanson DC, Francis N, Gazzard BG. Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. *Q J Med* 1992;85:813-823.
- Casemore DP. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiol Infect* 1990;104:1-28.
- Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Lab Med* 1991;11:873-897.
- Current WL, Reese NC. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J Protozool* 1986;33:98-108.
- Current WL, Reese NC, Ernst JV, Bailey WS, Heyman MB, Weinstein WM. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N Engl J Med* 1983;308:1252-1257.
- Current WL, Upton SJ, Haynes TB. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J Protozool* 1986;33:289-296.
- DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N Engl J Med* 1995;332:855-859.
- Fayer R, Ungar BL. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol Rev* 1986;50:458-483.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 2000;30:1305-1322.
- Forgacs P, Tarshis A, Ma P, Federman M, Mele L, Silverman ML, Shea JA. Intestinal and bronchial cryptosporidiosis in an immunodeficient homosexual man. *Ann Intern Med* 1983;99:793-794.
- Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1983;18:185-190.
- Gerberding JL. Diagnosis and management of HIV-infected patients with diarrhea. *J Antimicrob Chemother* 1989;23:83-89.
- Goebel E, Braendler U. Ultrastructure of microgametogenesis, microgametes and gametogony of

- Cryptosporidium* spp. in the small intestine of mice. *Protistologia* 1982;18:331-344.
- Goldstein ST, Juranek DD, Ravenholt O, Hightower AW, Martin DG, Mesnik JL, Griffiths SD, Bryant AJ, Reich RR, Herwaldt BL. Cryptosporidiosis: an outbreak associated with drinking water despite state-of-the-art water treatment. *Ann Intern Med* 1996;124:459-468.
- Greenson JK, Belitsos PC, Yardley JH, Bartlett JG. AIDS enteropathy: occult enteric infections and duodenal mucosal alterations in chronic diarrhea. *Ann Intern Med* 1991;114:366-72.
- Griffiths JK. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. *Adv Parasitol* 1998;40:37-83.
- Hampton JC, Rosario B. The attachment of protozoan parasites to intestinal epithelial cells of the mouse. *J Parasitol* 1996;52:939-949.
- Hayes EB, Matte TD, O'Brien TR, McKinley TW, Logsdon GS, Rose JB, Ungar BL, Word DM, Pinsky PF, Cummings ML, et al. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *N Engl J Med* 1989;320:1372-1376.
- Hays MP, Mosier DA, Oberst RD. Enhanced karyotype resolution of *Cryptosporidium parvum* by contour-clamped homogeneous electric fields. *Vet Parasitol* 1995;58:273-280.
- Hojlyng N, Holten-Andersen W, Jepsen S. Cryptosporidiosis: a case of airborne transmission. *Lancet* 1987;2:271-272.
- Iseki M. *Cryptosporidium felis* spp. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn J Parasitol* 1979;28:285-307.
- Jaggi N, Rajeshwari S, Mittal SK, Mathur MD, Baveja UK. Assessment of the immune and nutritional status of the host in childhood diarrhoea due to *Cryptosporidium*. *J Comm Dis* 1994;26:181-185.
- Joce RE, Bruce J, Kiely D, Noah ND, Dempster WB, Stalker R, Gumsley P, Chapman PA, Norman P, Watkins J, et al. An outbreak of cryptosporidiosis associated with a swimming pool. *Epidemiol Infect* 1991;107:497-508.
- Jokipii L, Pohjola S, Jokipii AM. *Cryptosporidium*: a frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet* 1983;2:358-361.
- Jokipii L, Jokipii AM. Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *N Engl J Med* 1986;315:1643-1647.
- Jongwutiwes S, Teeravanichpong S, Kraivichian P. Cryptosporidiosis: report of a case with life-threatening diarrhea. *J Med Assoc Thai* 1990;73:234-238.
- Jongwutiwes S, Kraivichian P, Kulkumthorn M, Sitthichareonchai P, Jaroenkorn M.

- Cryptosporidiosis among orphanage children in Thailand: a one year prospective study. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990;21:458-464.
- Jongwutiwes S, Putaporntip C, Kanbara H, Tanabe K. Variation in the thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) gene of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1998;92:349-353.
- Kappe S, Bruderer T, Gantt S, Fujioka H, Nussenzweig V, Menard R. Conservation of gliding motility and cell invasion machinery in apicomplexan parasites. *J Cell Biol* 1999;147:937-943.
- Kim K, Gooze L, Petersen C, Gut J, Nelson RG. Isolation, sequence and molecular karyotype analysis of the actin gene of *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol* 1992;50:105-114.
- Koudela B, Modry D. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. *Fol Parasitol* 1998;45:93-100.
- Lager DJ, Landas SK. Correlative light and scanning electron microscopy of intestinal giardiasis, cryptosporidiosis, and spirochetosis. *Ultrastruct Pathol* 1991;15:585-591.
- Lengerich EJ, Addiss DG, Marx JJ, Ungar BL, Juranek DD. Increased exposure to cryptosporidia among dairy farmers in Wisconsin. *J Infect Dis* 1993;167:1252-1255.
- Lima AA, Fang G, Schorling JB, De Albuquerque L, Mcauliffe JF, Mota S, Leite R, Guerrant RL. Persistent diarrhea in Northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. *Acta Paediatr* 1992;81:39-44.
- Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol* 2000;47:91-95.
- Ma P, Soave R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J Infect Dis* 1983;147:824-828.
- MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 1994;331:161-167.
- Mead JR, Arrowood MJ, Current WL, Sterling CR. Field inversion gel electrophoretic separation of *Cryptosporidium* spp. chromosome-sized DNA. *J Parasitol* 1988;74:366-369.
- Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. Overwhelming watery diarrhea associated with a cryptosporidium in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 1976;70:1156-1160.

- Millard PS, Gensheimer KF, Addiss DG, Sosin DM, Beckett GA, Houck-Jankoski A, Hudson A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *JAMA* 1994;272:1592-1596.
- Moolasart P, Eampokalap B, Ratanasrithong M, Kanthasing P, Tansupaswaskul S, Tanchanpong C. Cryptosporidiosis in HIV infected patients in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1995;26:335-338
- Morgan UM, Constantine CC, Forbes DA, Thompson RC. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *J Parasitol* 1997;83:825-830.
- Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 1976;70:592-5598.
- O'Donoghue PJ. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol* 1995;25:139-195.
- Panciera RJ, Thamassen RW. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Pathol* 1971;8:479-484.
- Pedersen C, Danner S, Lazzarin A, Glauser MP, Weber R, Katlama C, Barton SE, Lundgren JD. Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients. *Genitourin Med* 1996;72:128-31.
- Pohlenz J, Moon HW, Cheville NF, Bemrick WJ. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *J Am Vet Med Assoc* 1978;172:452-457.
- Pohjola S. Negative staining method with nigrosin for the detection of cryptosporidial oocysts: a comparative study. *Res Vet Sci* 1984;36:217-219.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tia T, Ferreira MU, Kanbara H, Tanabe K. Diversity in the thrombospondin-related adhesive protein gene (TRAP) of *Plasmodium vivax*. *Gene* 2001;268:97-104.
- Roberts WG, Green PH, Ma J, Carr M, Ginsberg AM. Prevalence of cryptosporidiosis in patients undergoing endoscopy: evidence for an asymptomatic carrier state. *Am J Med* 1989;87:537-539.
- Robson KJ, Frevert U, Reckmann I, et al. Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. *EMBO J* 1995;14:3883-3894.
- Rush BA, Chapman PA, Ineson RW. A probable waterborne outbreak of cryptosporidiosis in the Sheffield area. *J Med Microbiol* 1990;32:239-242.

- Rusnak J, Hadfield TL, Rhodes MM, Gaines JK. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1989;27:1135-1136.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467.
- Sarabia-Arce S, Salazar-Lindo E, Gilman RH, Naranjo J, Miranda E. Case-control study of *Cryptosporidium parvum* infection in Peruvian children hospitalized for diarrhea: possible association with malnutrition and nosocomial infection. *Ped Infect Dis J* 1990;9:627-631.
- Sargent KD, Morgan UM, Elliot A, Thompson RC. Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. *Vet Parasitol* 1998;77:221-227.
- Smith PD, Janoff EN. Infectious diarrhea in human immunodeficiency virus infection. *Gastroenterol Clin North Am* 1988 Sep;17:587-98.
- Sorvillo F, Lieb LE, Kerndt PR, Ash LR. Epidemiology of cryptosporidiosis among persons with acquired immunodeficiency syndrome in Los Angeles County. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:326-331.
- Spano F, Putignani L, McLauchlin J, Casemore DP, Crisanti A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol Lett* 1997;150:209-217.
- Spano F, Putignani L, Naitza S, Puri C, Wright S, Crisanti A. Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Mol Biochem Parasitol* 1998;92:147-162.
- Spano F, Putignani L, Guida S, Crisanti A. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related anonymous protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Exp Parasitol* 1998;90:195-198.
- Sterling CR, Arrowood MJ. Detection of *Cryptosporidium* sp. infections using a direct immunofluorescent assay. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:S139-S142.
- Sulaiman IM, Xiao L, Yang C, Escalante L, Moore A, Beard CB, Arrowood MJ, Lal AA. Differentiating human from animal isolates of *Crypto. poridium parvum*. *Emerg Infect Dis* 1998;4:681-685.
- Sulaiman IM, Lal AA, Arrowood MJ, Xiao L. Biallelic polymorphism in the intron region of  $\beta$ -

- tubulin gene of *Cryptosporidium* parasites. *J Parasitol* 1999;89, 154-157.
- Templeton TJ, Kaslow DC. Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;84:13-24.
- Thamlikitkul V, Tepmongkol M, Lamon C, SriPOCHANG S, Rungnapawate W, Suvajeejarun T. Cryptosporidiosis in Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987;18:229-232.
- Tzipori S, Griffiths JK. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Adv Parasitol* 1998;40:5-35.
- Ungar BLP. Cryptosporidiosis in human (*Homo sapiens*) CRC Press Boston. 1990;59-82.
- Upton SJ, Current WL. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *J Parasitol* 1985;71:625-629.
- Upton SJ, McAllister CT, Freed PS, Barnard SM. *Cryptosporidium* spp. in wild and captive reptiles. *J Wildl Dis* 1989;25:20-30.
- Vandepitte J, Robrechts J, Vanneste S. *Cryptosporidium* causing severe enteritis in a Belgian immunocompetent patient. *Acta Clin Belg* 1985;40:43-47.
- Vasquez JR, Gooze L, Kim K, Gut J, Petersen C, Nelsen RG. Potential antifolate resistance determinants and genotypic variation in the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;79:153-165.
- Vivotec J. Variable localization of cryptosporidia in the intestine of spontaneously infected calves. *Vet Med* 1984;29:201-205.
- Wanke CA, Cohan D, Thummakul T, Jongwutiwes S, Grayson ML, Hammer SM, Hanvanich M. Diarrheal disease in patients infected with human immunodeficiency virus in Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:871-874.
- Whitmire WM, Harp JA. Characterization of bovine cellular and serum antibody responses during infection by *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* 1991;59:990-995.
- Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RC, Fayer R, Lal AA. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3386-3391.
- Xiao L, Morgan UM, Fayer R, Thompson RCA, Lal AA. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitol Today* 2000;16,:287-292.