



รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง)  
ทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

รหัสโครงการวิจัย ก-ข(ค) 42.52

การศึกษาความชุกและปัจจัยเสี่ยงต่อโรค cryptosporidiosis และ giardiasis จากอุจจาระโคนมในเขต  
ภาคเหนือของประเทศไทย

Prevalence study and risk factor of cryptosporidiosis and giardiasis from dairy cow faces in  
northern of Thailand

หัวหน้าโครงการ อ.เทวินทร์ อินปิ่นแก้ว

หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ บางเขน  
หน่วยงานหลัก ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ บางเขน

แหล่งทุน : ทุนอุดหนุนวิจัย มก.

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาวิจัย 1 ปี (ปีงบประมาณ 2552)

**รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง)**  
**โครงการวิจัย (Project)**  
**โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552**

**ส่วนที่ 1 สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย (Project)**

- 1.1 ชื่อโครงการ (ไทย) การศึกษาความชุกและปัจจัยเสี่ยงต่อโรค cryptosporidiosis และ giardiasis จากอุจจาระโคนมในเขตภาคเหนือของประเทศไทย
- (อังกฤษ) Prevalence study and risk factor of cryptosporidiosis and giardiasis from dairy cow faces in northern of Thailand
- 1.2 ลักษณะโครงการ  เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว  
 เป็นโครงการย่อยในชุดโครงการวิจัย (ระบุชื่อชุดโครงการวิจัย) .....
- 1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ ..... เทวินทร์ อินปิ่นแก้ว .....
- 1.4 หน่วยงานหลักรับผิดชอบ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 1.5 ประเภทโครงการ  โครงการวิจัย 3 สาขา;  เกษตรศาสตร์  วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  สังคมศาสตร์  
 โครงการวิจัยสถาบันเพื่อพัฒนาคุณภาพ  
 โครงการวิจัยและถ่ายทอดงานวิจัยสู่ประชาชน  
 โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งด้านการวิจัย  
 โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชี่ยวชาญเฉพาะ (SRU)  
 โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงบูรณาการเพื่อการแข่งขันฯ  
 โครงการวิจัยพัฒนาร่วมภาครัฐและเอกชน
- 1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 1 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2552 ถึงปีงบประมาณ 2552
- 1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล ..... ภาควิชาปรสิตวิทยา ..... คณะสัตวแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์/ ฟาร์มโคนมในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่และลำปาง .....
- 1.8 งบประมาณรวมทั้งสิ้น ..... 400,000 ..... บาท ประกอบด้วย
- 1) งบบริหารกลาง ..... 340,000 ..... บาท การเบิกเงิน  งวดที่ 1 เบิกแล้ว ..... 170,000 ..... บาท  
 งวดที่ 2 เบิกแล้ว ..... 170,000 ..... บาท  งวดที่ 3 เบิกแล้ว ..... บาท
- 1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย
- วัตถุประสงค์หลัก**
1. เพื่อตรวจหาความชุกของโรค cryptosporidiosis และ giardiasis ในโคนม
  2. เพื่อวิเคราะห์และค้นหาปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการติดเชื้อ cryptosporidiosis และ giardiasis
  3. จัดทำแผนการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ทั้งการดำเนินงานและแผนปฏิบัติงาน (action plan) เพื่อแนะนำให้กับเกษตรกรไทยและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

## วัตถุประสงค์รอง

1. เพื่อศึกษาและแยกแยะชนิดและสายพันธุ์กรรมของเชื้อ *Cryptosporidium* และ *Giardia* ที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์กรรมที่พบในสัตว์ชนิดอื่น ๆ
2. เพื่อแยกหาสัตว์ที่อาจเป็นตัวเก็บกักโรค (Reservoir hosts)

## 1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ

ปีที่ เดือนที่ ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้

1. 1-6 เก็บอุจจาระโคนมจำนวน 500 ตัวและตรวจหาเชื้อโดยวิธี DMSO modified acid fast stain for *Cryptosporidium* spp. และ Zinc sulphate flotation for *Giardia* spp. และตรวจหาเชื้อทั้งสองชนิดโดยวิธี IFAT
- 7-12 สกัด DNA จำนวน 500 ตัวอย่างและนำ DNA ที่ได้มาทำการ screening หาเชื้อ *Giardia* spp. และ *Cryptosporidium* spp. และ genotyping เพื่อแยก genotype โดยใช้วิธี sequencing และ PCR-RFLP ตามลำดับและสรุปผลงานวิจัย

## 1.12 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- บรรลุ เนื่องจากได้ข้อมูลทั้งในส่วนความชุก สายพันธุ์กรรมของเชื้อที่พบในประเทศไทยและปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อตรงตามวัตถุประสงค์ของโครงการ.....
- บรรลุบางส่วน (ร้อยละ.....) เหตุผล.....
- ไม่บรรลุ เหตุผล.....

## 1.13 ผลผลิต/ สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs) (โปรดระบุรายละเอียด)

- องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐาน ข้อมูลความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* ที่พบอยู่ที่ร้อยละ 5 โดยวิธี modified acid fast stain ร้อยละ 7 โดยวิธี IFAT และร้อยละ 7.6 โดยวิธี PCR ตามลำดับ ในขณะที่ความชุกของเชื้อ *Giardia duodenalis* คิดเป็นร้อยละ 7.0 โดยวิธี zinc sulphate flotation ร้อยละ 8.0 โดยวิธี IFAT และ ร้อยละ 8.8 โดยวิธี PCR.....
- สายพันธุ์พืช/สัตว์/จุลินทรีย์ สายพันธุ์กรรมของเชื้อ *Cryptosporidium* ว่าพบทั้ง *C. parvum* ที่สามารถติดต่อถึงคนได้และ *C. bovis* ที่พบได้ในโคเท่านั้น ส่วนเชื้อ *Giardia duodenalis* นั้นพบ 2 สายพันธุ์คือ Assemblage A1 ที่สามารถพบในคนและ Assemblage E ที่พบในโคนมเท่านั้น.....
- ผลิตภัณฑ์.....
- สิ่งประดิษฐ์.....
- เทคโนโลยี/นวัตกรรม.....
- ฐานข้อมูล/ซอฟต์แวร์.....
- คู่มือ.....
- วิดีทัศน์.....
- การสร้างนักวิจัย/สนับสนุนนิสิตปริญญาตรี..... คน ปริญญาโท 1..... คน ปริญญาเอก 1..... คน
- สนับสนุนการศึกษาปัญหาพิเศษ..... เรื่อง (ระบุ)..... วิทยานิพนธ์..... เรื่อง (ระบุ).....
- อื่นๆ (ระบุ).....

## 1.14 ผลลัพธ์/ผลสำเร็จที่ได้/หรือคาดว่าจะได้จากการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

## (1) เป้าหมายการนำไปใช้ประโยชน์ (ระบุกลุ่มเป้าหมายของงานวิจัยเชิงปริมาณ/คุณภาพ)

- ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนรู้ การสอน สามารถนำผลงานวิจัยไปอ้างอิงได้ว่าในประเทศไทยพบเชื้อนี้อยู่และสามารถให้ความรู้กับนิสิตได้เกี่ยวกับเชื้อนี้ในประเทศไทย.....
- ด้านการเกษตร สามารถให้ความรู้กับเกษตรกรว่าเชื้อนี้พบได้ในฟาร์มและเมื่อมีการระวังป้องกันที่ดีเมื่อสัตว์ไม่ป่วยก็มีคุณภาพที่ดีได้ ผลผลิตก็จะดีขึ้น.....
- ด้านอุตสาหกรรม.....
- ด้านทรัพยากรธรรมชาติ/สิ่งแวดล้อม.....
- ด้านคุณภาพชีวิต สุขภาพอนามัย เชื้อที่พบติดถึงคนได้ก็สามารถนำผลวิจัยที่ได้ให้ความรู้กับเกษตรกรหรือคนงานในฟาร์มเพื่อจะได้มีการป้องกันไม่ให้มีการติดถึงคนได้.....
- ด้านเศรษฐกิจ.....
- ด้านสังคม.....
- ด้านการทำนุบำรุงศิลป ศาสนา วัฒนธรรม.....
- ด้านการถ่ายทอดเทคโนโลยี/ฝึกอบรมแก่กลุ่มเป้าหมาย.....
- เสนอภาครัฐ เพื่อใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ.....
- นำความรู้ไปวิจัย/พัฒนาขั้นต่อไป.....
- ก่อให้เกิดความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน/การสร้างเครือข่าย.....
- อื่นๆ (ระบุ).....

## (2) สรุปผลการนำผลการวิจัยไปเผยแพร่ / ถ่ายทอด ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ (ระบุรายละเอียดอยู่ระหว่างดำเนินการส่งตีพิมพ์/ตีพิมพ์แล้วในรูปแบบเอกสารอ้างอิงและแนบสำเนาเป็น

## ภาคผนวกของรายงาน)

- ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ต่างประเทศ...1..... เรื่อง (ระบุ) Asian Meeting of Animal Medical Specialties (11-13 December 2009, Taipei, Taiwan).
- นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ในประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- นำเสนอทางวิทยุ/โทรทัศน์/Website..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- นำเสนอทางนิทรรศการ..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- บทความ/เอกสารสิ่งพิมพ์/วีดีทัศน์..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ถ่ายทอดฝึกอบรมแก่เกษตรกร/ผู้สนใจ..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชน/อุตสาหกรรม/ผู้ประกอบการ (ประโยชน์เชิงพาณิชย์)..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ (ระบุ).....
- มีผู้นำผลงานวิจัยไปอ้างอิง (ระบุ).....

อื่นๆ (ระบุ).....

1.15 การยื่นจด  สิทธิบัตร  อนุสิทธิบัตร  ลิขสิทธิ์  
 มีศักยภาพที่จะยื่นจด (ระบุ).....  ยื่นจดแล้ว เมื่อ.....

1.16 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ (ระบุว่าก่อให้เกิดผลกระทบอย่างไร)

ด้านความมั่นคง อาทิ การเมืองการปกครอง กฎหมาย การต่างประเทศ โครงสร้างพื้นฐาน และบริการโทรคมนาคม ฯลฯ (ระบุ).....

ด้านการเศรษฐกิจ อาทิ การพาณิชย์กรรม การเกษตรกรรม การอุตสาหกรรม การท่องเที่ยว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พลังงาน ฯลฯ (ระบุ).....

ด้านคุณภาพชีวิตและสังคม ศักยภาพของคนและการศึกษา การแพทย์และสาธารณสุข หลักประกันความมั่นคง สวัสดิการสังคม วัฒนธรรม จริยธรรมและค่านิยม ฯลฯ (ระบุ) เนื่องจากสายพันธุ์ที่พบเป็นสายพันธุ์ที่ติดต่อกับคนได้จึงควรที่จะมีการนำผลที่ได้ไปให้ความรู้กับเกษตรกรที่ทำงานให้มีความระมัดระวังเมื่อมีการสัมผัสกับสัตว์ที่อยู่ในฟาร์มนั้นๆ เพื่อป้องกันการติดเชื้อนี้

ด้านทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม การบริหารจัดการการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์ การป้องกันการทำลาย ลดการสูญเสีย การฟื้นฟูทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ฯลฯ

อื่นๆ (ระบุ).....

1.17 ผลการดำเนินงานวิจัยสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ชาติ ในด้าน

ยุทธศาสตร์การจัดความยากจน

ยุทธศาสตร์พัฒนาคนและสังคมที่มีคุณภาพ

ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุล และแข่งขันได้

ยุทธศาสตร์การบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

ยุทธศาสตร์การต่างประเทศและเศรษฐกิจระหว่างประเทศ

ยุทธศาสตร์การพัฒนานกฎหมายและส่งเสริมการบริหารกิจการบ้านเมืองที่ดี

ยุทธศาสตร์การส่งเสริมประชาธิปไตยและกระบวนการประชาสังคม

ยุทธศาสตร์การรักษาความมั่นคงของรัฐ

ยุทธศาสตร์การรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลก

อื่นๆ โปรดระบุ.....

1.18 ปัญหา อุปสรรค ในการดำเนินงานวิจัยและแนวทางแก้ไข.....

1.19 งานที่จะทำต่อไป/ค่าชี้แจงเพิ่มเติม... ทำวิจัยในเขตจังหวัดและภาคอื่น ๆ ที่มีการเลี้ยงโคนมเพื่อดูว่าแต่ละพื้นที่จะมีการกระจายตัวของเชื้อนี้ต่างกันหรือไม่และเป็นสายพันธุ์ที่พบเหมือนกับงานวิจัยครั้งนี้หรือไม่

1.20 ได้แนบ “รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project)” ตามหัวข้อ ในส่วนที่ 2 (หน้าถัดไป) มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ

(.....เทวินทร์ อินันแก้ว.....)

6 / 3 / 58 วัน/เดือน/ปี ที่รายงาน

## ส่วนที่ 2

## รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ.....2552.....

โครงการวิจัยรหัส .....ก-ช(ด)42.52.....

การศึกษาความชุกและปัจจัยเสี่ยงต่อโรค cryptosporidiosis และ giardiosis จากอุจจาระโคนม  
ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย

Prevalence study and risk factor of cryptosporidiosis and giardiosis from dairy cow  
feces in northern of Thailand

เทวินทร์ อินปันแก้ว<sup>(1)</sup> สถาพร จิตตपालพงศ์<sup>(1)</sup> นฤมล ถัดทะพงษ์<sup>(1)</sup> รีเบคก้า ไทป<sup>(2)</sup> นงนุช ภิญโญ  
ภานุวัฒน์<sup>(1)</sup> วิษณุวัฒน์ ฉิมน้อย<sup>(1)</sup>

Tawin Inpankaew<sup>(1)</sup> Sathaporn Jittapalapong<sup>(1)</sup> Nalumon Thadtapong<sup>(1)</sup> Rebecca Traub<sup>(2)</sup>  
Nongnuch Pinyopanuwat<sup>(1)</sup> Wissanuwat Chimnoi<sup>(1)</sup>

## บทคัดย่อ

จุดประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาความชุก และการแยกสายพันธุ์กรรมของ *Cryptosporidium* spp. และ *Giardia duodenalis* จากอุจจาระของโคนม ใน 3 จังหวัดของภาคเหนือ (เชียงใหม่ ลำปาง) โดยทำการเก็บอุจจาระโคนมจำนวน 500 ตัวอย่าง ทำการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* spp. โดยวิธี DMSO-modified acid fast stain, immunofluorescence antibody test (IFAT) และ polymerase chain reaction (PCR) ในขณะที่การตรวจหาเชื้อ *G. duodenalis* ใช้วิธี zinc sulphate centrifugal flotation, IFAT และ PCR ซึ่งผลการศึกษาพบความชุกรวมของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. โดยวิธี DMSO-modified acid fast stain พบ 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5) วิธี IFAT พบ 35 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7) และวิธี PCR พบ 38 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.6) จากทั้งหมด 500 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อการติดเชื้อนี้ ในขณะที่ผลการศึกษาความชุกรวมของการติดเชื้อ *G. duodenalis* ในโคนมเขตภาคเหนือของประเทศไทยคิดเป็นร้อยละ 7.0 (35/500) จากการตรวจโดยวิธี zinc sulphate flotation ร้อยละ 8.0 (40/500) จากการตรวจโดยวิธี IFAT และร้อยละ 8.8 (44/500) จากการตรวจโดยวิธี PCR การวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงพบว่าไม่มีปัจจัยเสี่ยงใดๆที่มีนัยสำคัญทางสถิติต่อการติดเชื้อ *Cryptosporidium* และ *Giardia* ในการศึกษาครั้งนี้ การแยกสายพันธุ์กรรมของ *Cryptosporidium* spp. พบ 2 สายพันธุ์คือ *C. parvum* และ *C. bovis* ในขณะที่ *G. duodenalis* พบว่าเป็น Assemblage AI และ Assemblage E

คำสำคัญ: *Cryptosporidium*, *Giardia*, โคนม, ประเทศไทย, ปฏิกริยาภูมิคุ้มกัน

## ABSTRACT

The aims of this study were to determine prevalence, risk factors, and genotype of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* from feces of dairy cattle from the northern part (Chiang Rai, Chiang Mai and Lumpang provinces) of Thailand. A total of 500 fecal samples were collected directly from rectum and *Cryptosporidium* infection was examined by using DMSO-modified acid fast stain, Immunofluorescence antibody test (IFAT) and polymerase chain reaction (PCR). One the other hand, *Giardia duodenalis* infection was diagnosed by zinc sulphate centrifugal flotation technique, IFAT and PCR. The prevalence of *Cryptosporidium* spp. was 5% by DMSO-modified acid fast stain, 7.0% by IFAT and 7.6% by PCR respectively. While, *G. duodenalis* in dairy cows was 7% (35/500) by using zinc sulphate centrifugal flotation technique, 8.0% (40/500) by IFAT and 8.8% (44/500) by using PCR. No significant risk factors for *Cryptosporidium* and *Giardia* infection in dairy cattle were found in this study. For genotype identification of *Cryptosporidium* spp. were *C. parvum* and *C. bovis*. While, all PCR positives from *G. duodenalis* were Assemblage AI and Assemblage E in this study.

**Keywords:** *Cryptosporidium*, *Giardia*, dairy cows, Thailand, PCR

---

<sup>(1)</sup> ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<sup>(1)</sup> Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University.

<sup>(2)</sup> คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยควีนสแลนด์ เมืองบริสเบน ประเทศออสเตรเลีย

<sup>(2)</sup> School of Veterinary Science, University of Queensland, Brisbane, Australia

## คำนำ (Introduction)

โรคติดต่อจากสัตว์สู่คนเกิดจากเชื้อได้หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ไวรัส รวมทั้งโปรโตซัวบางชนิดสามารถติดต่อสู่คนได้ ในจำนวนเชื้อโปรโตซัวนั้น *Cryptosporidium* spp. และ *Giardia duodenalis* เป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงในผู้ป่วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเช่นผู้ป่วยเอดส์ โดยผู้ป่วยจะมีอาการอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงจนอาจทำให้เสียชีวิตได้ โดยมีรายงานการระบาดของโรค cryptosporidiosis จากการปนเปื้อนในแหล่งน้ำดื่มทั้งในประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ แคนาดา ออสเตรเลียและญี่ปุ่นมากกว่า 25,000 ราย โดยการปนเปื้อนของเชื้อนี้จากสัตว์เป็นปัจจัยสำคัญของการแพร่กระจายของโรค รวมทั้งมีรายงานความชุกของโรค cryptosporidiosis ในโคนมของประเทศไทยอีกด้วย ในส่วนของ *Giardia* มีรายงานการระบาดของเชื้อโปรโตซัวจากการปนเปื้อนในแหล่งน้ำดื่มทั่วโลกโดยมีเชื้อ *Giardia* เป็นโปรโตซัวที่มีระบาดมากเป็นหลักถึงร้อยละ 40.6 ของพื้นที่ที่มีการระบาดทั้งหมด (Karanis et al., 2007)

### *Cryptosporidium* spp.

*Cryptosporidium* เป็นเชื้อโปรโตซัวที่จัดอยู่ใน Phylum Apicomplexa ระยะเวลาต่างๆ ของการเจริญเติบโตเกาะอยู่ที่ผนังเยื่อบุลำไส้ มีวงจรชีวิตสมบูรณ์ได้ภายในโฮสต์เดียว

ลักษณะของอูชีสต์มีรูปร่างกลม หรือกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 ไมโครเมตร ผนังหนา ภายในอูชีสต์มี sporozoite ที่มีรูปร่างเรียวยาว คล้ายเสี้ยวพระจันทร์ มีขนาดประมาณ 1.5 x 0.75 ไมโครเมตร เรียงตัวขนานกันอยู่ภายในอูชีสต์ ในปัจจุบันพบอย่างน้อย 14 species (ตารางที่ 1) (Hunter and Thompson, 2005)

*Cryptosporidium* สามารถจำแนกได้เป็น 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์คน (human genotype) และสายพันธุ์สัตว์ (animal genotype) โดยสายพันธุ์คนจะติดต่อระหว่างคนกับคนเท่านั้น ส่วนสายพันธุ์สัตว์สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คน จากคนสู่สัตว์ และจากสัตว์สู่สัตว์ได้ด้วย จึงทำให้เชื้อชนิดนี้มีการระบาดได้ง่ายและรวดเร็ว ยากต่อการป้องกันและควบคุม ในระยะหลังนี้มีรายงานการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในคนมากขึ้นทั้งนี้อาจเป็นเพราะโลกมีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องเพิ่มขึ้น โดยสามารถตรวจพบเชื้อ *Cryptosporidium* spp. จำนวนร้อยละ 13.0 ของผู้ติดเชื้อ HIV ที่มีอาการท้องเสียในประเทศไทย (Saksirisampant et al., 2002) ประกอบกับการให้ความสำคัญของโรคติดต่อระหว่างคนและสัตว์มีมากขึ้น เชื้อนี้จึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย ในปัจจุบัน

### ตารางที่ 1. Species of *Cryptosporidium*.

Species	Major hosts
<i>Cryptosporidium muris</i>	rodents
<i>Cryptosporidium parvum</i>	cattle & other livestock, humans
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	birds
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	guinea pigs
<i>Cryptosporidium felis</i>	cats
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	reptiles
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	poultry
<i>Cryptosporidium saurophilum</i>	lizards
<i>Cryptosporidium galli</i>	poultry
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	cattle
<i>Cryptosporidium canis</i>	dogs
<i>Cryptosporidium molnari</i>	fish
<i>Cryptosporidium hominis</i>	humans
<i>Cryptosporidium suis</i>	pigs

*Cryptosporidium* สามารถติดต่อได้ทางอาหารและน้ำดื่มโดยมีการปนเปื้อนของเชื้อนี้ เชื้อชนิดนี้มีการเจริญและแบ่งตัวทั้งระยะมีเพศ (sexual stage) และไม่มีเพศ (asexual stage) ในลำไส้เล็กของคนหรือสัตว์ป่วยซึ่งจะทำให้คนหรือสัตว์นั้นๆมีอาการท้องร่วงเป็นน้ำ (watery diarrhea) (Ortega-Mora *et al.*, 1999) มีไข้ ปวดท้อง อาการท้องเสียคงอยู่ประมาณ 5-8 วัน สัตว์ที่มีรายงานการเกิดโรคมามากที่สุดได้แก่ โค (Jellison *et al.*, 2002) ซึ่งโรคนี้จะพบได้มากในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องและสัตว์อายุน้อยๆหรือในระยะคลอดที่มีภาวะเครียด (Forney *et al.*, 1999) ทำให้คนหรือสัตว์เหล่านี้แสดงอาการที่รุนแรงกว่าปกติและเนื่องจากปัจจุบันยังไม่มียาชนิดใดที่ใช้รักษาได้ผลดีต่อเชื้อนี้ทั้งในคนและสัตว์ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีคุณสมบัติต่างจากเชื้อโปรโตซัวที่อาศัยในเนื้อเยื่ออื่นๆ คือ ตัวเชื้ออาศัยอยู่ในเซลล์แต่อยู่นอกเยื่อหุ้มเซลล์ (Sharma and Bhutani, 1988) ทำให้การออกฤทธิ์ของยาเป็นไปได้ยาก การรักษาไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร

การวินิจฉัยโรค cryptosporidiosis ทำได้โดยตรวจหาอูฐีสติในอุจจาระซึ่งมีหลายวิธีได้แก่ การตรวจกายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี floatation และ wet mount examination วิธีย้อมสี acid-fast เช่นย้อมสี carbol-fuchsin เป็นต้น การใช้วิธีทางซีรั่มวิทยา เช่น วิธี immunofluorescence assay ที่ใช้ monoclonal antibody และวิธี enzyme immunoassay

เป็นต้น ในปัจจุบันการใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลก็เป็นทางเลือกที่ใช้กันแพร่หลายซึ่งให้ผลดีและแม่นยำเป็นน่าเชื่อถือจึงควรที่จะมีการศึกษาเรื่องนี้ในประเทศไทยเพื่อให้ได้ข้อมูลของเชื้อนี้ทั้งด้านของ การติดต่อ อุบัติการณ์การรวมทั้งด้านระบาดวิทยาของโรคนี้ด้วย

ในต่างประเทศได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อนี้กันอย่างกว้างขวาง (Qkhuisen and Chappell, 2002) รวมทั้งการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของเชื้อนี้ด้วยโดยพบว่าสายพันธุ์สัตว์ที่ติดต่อกันจากสัตว์สู่คนและจากคนสู่สัตว์และจากสัตว์สู่สัตว์นั้นส่วนใหญ่มักจะเป็น *Cryptosporidium parvum* ซึ่งพบส่วนใหญ่ในโค รวมทั้งในโคนมด้วยโดย (O' Handley et al., 1999) ได้ทำการศึกษาการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในลูกโคนมโดยพบว่าการติดเชื้อนี้ในลูกโคทำให้ลูกโคมีอาการท้องเสียและเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการท้องเสียในช่วงประมาณเดือนแรกของการได้รับเชื้อนี้ในลูกโค แต่หลังจากนั้นลูกโคจะไม่มีอาการท้องเสีย อย่างไรก็ตามพบว่าโคยังมีการปล่อยระยะระยะของเชื้อนี้อยู่ทำให้โคมีความสำคัญที่อาจจะเป็นสัตว์รังโรค (reservoir host) ในการถ่ายทอดเชื้อนี้สู่สัตว์หรือสู่คนได้

แต่สำหรับในประเทศไทยยังมีผู้ทำการศึกษากันน้อยมาก ทำให้ข้อมูลเกี่ยวกับระบาดวิทยาของโรค วงจรชีวิต สัตว์รังโรค (reservoir host) ฤดูกาลระบาด ตลอดจนทั้งสายพันธุ์ของเชื้อที่มีอยู่ในประเทศไทยยังไม่ชัดเจน โดยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ป่วยเอดส์ (Saksirisampant et al., 2002) ได้รายงานความชุกของโรค cryptosporidiosis ในผู้ป่วยเอดส์โดยทำการเก็บอุจจาระผู้ป่วยจำนวนที่มีอาการท้องเสียจำนวน 156 คน ในโรงพยาบาลบำราศนราดูร ซึ่งพบว่าความชุกในประชากรกลุ่มนี้คือร้อยละ 12.8 ส่วนอัตราการติดโรคในประชากรในภาคต่างๆทั้งในกลุ่มคนที่ปกติหรือมีการใกล้ชิดกับสัตว์ยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจังรวมถึงอัตราการติดโรคในสัตว์ด้วย

### *Giardia duodenalis*

ปัจจุบัน *G. duodenalis* เป็นพยาธิโปรโตซัวที่อาศัยในลำไส้เล็กของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ รวมทั้งในโคนมด้วย โดยที่ชีวิตของโปรโตซัวชนิดนี้จะประกอบด้วย 2 ระยะคือ ระยะโทรโพซอยท์และระยะซิสต์ โดยที่ระยะโทรโพซอยท์เป็นระยะที่จะติดต่อและเพิ่มจำนวนในตัวโฮสต์ ขณะที่ระยะซิสต์จะเปลี่ยนแปลงมาจากระยะโทรโพซอยท์โดยมีการสร้างผนังหุ้มไว้เพื่อทนทานกับสภาพแวดล้อมภายนอกเพื่อออกจากตัวโฮสต์และถ่ายทอดเชื้อต่อไป

*G. duodenalis* สามารถติดต่อได้ทางอาหารและน้ำดื่มโดยมีการปนเปื้อนของเชื้อนี้ เชื้อชนิดนี้มีการเจริญและแบ่งตัวทั้งระยะมีเพศ (sexual stage) และไม่มีเพศ (asexual stage) ในลำไส้เล็กของคนหรือสัตว์ป่วยซึ่งจะทำให้คนหรือสัตว์นั้นๆมีอาการท้องร่วงเป็นน้ำ (watery diarrhea) ซึ่งโรคนี้จะพบได้มากในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องและสัตว์อายุน้อยๆหรือในระยะคลอดที่มีภาวะเครียดทำให้คนหรือสัตว์เหล่านี้แสดงอาการที่รุนแรงกว่าปกติได้

ในช่วงเริ่มต้นของศตวรรษที่ 20 การศึกษาถึง taxonomy ของเชื้อ *Giardia* ในระดับสายพันธุ์ค่อนข้างที่จะยุ่งยากและซับซ้อน ซึ่งส่วนใหญ่มักจะแยกตามโฮสต์เท่านั้น จนถึงปี ค.ศ. 1951 Filice ได้อธิบายและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Giardia* ไว้ 3 สายพันธุ์คือ *G. duodenalis* ที่พบได้ในคน สัตว์เลี้ยง และปศุสัตว์ *G. agilis* ซึ่งพบได้ในพวกสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และ *G. muris* ซึ่งพบได้ในหนู และมีรายงานเพิ่มเติมอีก 2 สายพันธุ์ที่พบได้ในนก (Thompson *et al.*, 2000) (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2. Recognized species in the genus *Giardia*.**

Species	Host	Morphological characteristics
<i>G. duodenalis</i>	wide range of domestic and wild mammals including humans	pear-shaped trophozoites with claw-shaped median bodies
<i>G. agilis</i>	amphibians	long, narrow trophozoites with club-shaped median bodies
<i>G. muris</i>	rodents	rounded trophozoites with small round median bodies
<i>G. psittaci</i>	birds	pear-shaped trophozoites, with no ventrolateral flange. claw-shaped median bodies
<i>G. ardeae</i>	birds	rounded trophozoites, with prominent notch in ventral disc and rudimentary caudal flagellum. round-oval to claw shaped median bodies

อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน การใช้เทคนิคทางด้านโมเลกุล ในการศึกษาถึง taxonomy โครงสร้างประชากร รวมทั้งความเป็นไปได้ที่สายพันธุ์สัตว์สามารถติดต่อถึงกันได้ มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยพบว่าลักษณะรูปร่างของเชื้อ *G. duodenalis* และทางด้านพันธุกรรมจะมีลักษณะคล้ายกัน (Thompson *et al.*, 2000) โดย *Giardia* isolates ที่พบในคนจะสามารถพบได้ในกลุ่มพันธุกรรมหลัก 2 กลุ่มหรือที่เรียกว่า Assemblage และยังสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก โดย Assemblage A กลุ่มที่ 1 สามารถพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดรวมทั้งโคนมและคน (Mayrhofer *et al.*, 1995) ส่วน Assemblage A กลุ่มที่ 2 มักพบในสายพันธุ์คนและสุนัข (Traub *et al.*, 2004) กลุ่มต่อมาคือ Assemblage B เป็นสายพันธุ์ที่พบในคนเป็นหลักแต่อาจพบได้ในสุนัขด้วย (Monis *et al.*, 1996; Monis *et al.*, 1998) ส่วนสายพันธุ์อื่นๆที่พบได้จะเป็นสาย

พันธุ์ที่จำเพาะต่อโฮสต์นั้นๆและไม่ติดต่อกับคน เช่น กลุ่มAssemblage C/D เป็นสายพันธุ์ที่จำเพาะในสุนัข, กลุ่มAssemblage E เป็นสายพันธุ์ที่จำเพาะในสัตว์ทางด้านปศุสัตว์เช่น โค กระบือ เป็นต้น และ กลุ่มAssemblage F เป็นสายพันธุ์ที่จำเพาะในแมว ดังแสดงในตารางที่ 3 (Olsen *et al.*, 2004).

### ตารางที่ 3. Genotypic groupings of *G. duodenalis*.

Assemblage (genotypic grouping)	Host range
Assemblage A (group I)	humans and other mammals; zoonotic
Assemblage A (group II)	mainly humans, dogs; zoonotic
Assemblage B (group III)	humans and other mammals; zoonotic
Assemblage B (group IV)	humans
Assemblage C/D	dogs
Assemblage E	livestock
Assemblage F	cats

ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวทำให้มีความเป็นไปได้ที่โคนมจะสามารถเป็นแหล่งรังโรค giardiasis และอาจจะสามารถที่จะถ่ายทอดเชื้อนี้ไปสู่คนหากมีการสัมผัสเชื้อนี้ทั้งโดยตรงและทางอ้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเด็กที่อยู่โดยรอบบริเวณฟาร์มรวมทั้งคนงานในฟาร์มโคนมและเจ้าของฟาร์มด้วย

ในปัจจุบันหลายประเทศในทวีป ยุโรป อเมริกา ออสเตรเลียและเอเชียใต้ให้ความสำคัญถึงโรค giardiasis ที่สามารถติดต่อกับคนได้ (Hopkin *et al.* 1997; Capelli *et al.* 2003; Sulaiman *et al.* 2003; Traub *et al.* 2004) และยังมีการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่แม่นยำในการตรวจหาเชื้อชนิดนี้ อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อมีค่าเพียงเล็กน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลในสัตว์โดยส่วนใหญ่จะเป็นข้อมูลในคน จึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาในสัตว์ซึ่งสามารถที่จะเป็นแหล่งรังโรคและเนื่องจากในประเทศไทยมีรายงานโรค giardiasis ในสัตว์น้อยมากทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่ามีความเป็นไปได้มากน้อยเพียงใดที่โรคนี้ในคนติดต่อมาจากสัตว์ ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาควบคู่กันไปในคนและในสัตว์ เพื่อที่จะได้ข้อมูลทางระบาดวิทยาของโรคนี้ในประเทศไทย

### ความสำคัญทางด้านสาธารณสุข

มีรายงานการติดเชื้อ *Cryptosporidium* และ *Giardia* อย่างกว้างขวางทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องรวมทั้งในเด็กเล็ก โดยมีรายงานความชุกของโรค cryptosporidiosis ในผู้ป่วยเอดส์โดยทำการเก็บอุจจาระผู้ป่วยจำนวนที่มีอาการท้องเสียจำนวน 156 คน ในโรงพยาบาลบาราคนาควูร์ ซึ่งพบว่าความชุกในประชากรกลุ่มนี้คือร้อยละ 12.8 ส่วน

อัตราการติดเชื้อในประชากรในภาคต่างๆทั้งในกลุ่มคนที่ปกติหรือมีการใกล้ชิดกับสัตว์ยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจังรวมถึงอัตราการติดเชื้อในสัตว์ด้วย

ส่วน giardiasis มีรายงานในสถานเลี้ยงเด็กก่อนว่าเกิดการ outbreak ของเชื้อนี้อยู่ (Thompson, 2000) ในประเทศไทยมีรายงานความชุกของเชื้อนี้ในคนอยู่ที่ร้อยละ 5.3- 16.4 (Waikagul et al. 2002; Nuchprayoon et al. 2002; Sirivichayakul et al. 2003) แต่ยังไม่มีการรายงานความชุกของทั้งสองโรคนี้ในโคนมของประเทศไทย อย่างไรก็ตามจากการค้นคว้าข้อมูลในหลายๆประเทศพบว่าในสายพันธุ์ของเชื้อทั้งสองที่พบในโคนมนั้นมีสายพันธุ์ที่พบในคนด้วย ดังนั้นโคนมมีโอกาสที่สามารถเป็นแหล่งรังโรคและถ่ายทอดเชื้อมาสู่คนได้จากการสัมผัสเชื้อที่ปนออกมากับอุจจาระของโคที่ป่วยทั้งโดยโดยตรงและทางอ้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในฟาร์มโคนมที่ไม่มีการจัดการภายในฟาร์มที่ดีอาจจะทำให้คนงานหรือเจ้าของฟาร์มมีโอกาสที่จะสัมผัสและติดเชื้อนี้ได้ซึ่งทำให้มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขในแง่ของการเป็นโรคสัตว์สู่คนได้ การลดปริมาณของโรคในโคอาจเป็นหนทางหนึ่งที่จะลดอัตราการเกิดโรคในคนด้วย ปัจจุบันประเทศไทยยังขาดข้อมูลความชุกของโรคนี้ในโคนม ทำให้ขาดความรู้เบื้องต้นที่จะใช้พิจารณาถึงโอกาสที่เชื้อนี้จะแพร่จากโคนมมาสู่คน

โดยจุดประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาความชุก วิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยง และการแยกสายพันธุ์ของ *Cryptosporidium* spp. และ *Giardia duodenalis* จากอุจจาระของโคนม ใน 3 จังหวัดของภาคเหนือ (เชียงราย เชียงใหม่และลำปาง)

### อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

#### 1. การคัดเลือกโคนม

ทำการสุ่มคัดเลือกโคนมจำนวน 500 ตัว โดยจะทำการเก็บตัวอย่าง 3 จังหวัด คือ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ และ ลำปาง โดยการคัดเลือกฟาร์มจะเป็นการสุ่มแบบไม่เจาะจง (stratified random sampling procedure)

#### 2. การเก็บตัวอย่างอุจจาระของโคนม

ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระโคนมในเขตจังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ และ ลำปาง จำนวน 500 ตัว โดยตารางสรุปการเก็บตัวอย่างดังนี้

จังหวัด	จำนวน (ตัวอย่าง)
เชียงราย (29 ฟาร์ม)	250
เชียงใหม่ (8 ฟาร์ม)	150
ลำปาง (5 ฟาร์ม)	100
<b>รวม (42 ฟาร์ม)</b>	<b>500</b>

3. **ทำการกรอกแบบสอบถาม** เพื่อเก็บข้อมูลในฟาร์มเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงที่จะมีผลต่อการเกิดโรค cryptosporidiosis และ giardiosis ในโคนม
4. **ทำการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* โดยวิธี DMSO-modified acid-fast stain** มีขั้นตอนดังนี้
  - 1) ทำการเตรียมอุจจาระบางๆลงบนสไลด์จากนั้นปล่อยให้แห้ง
  - 2) ทำการ fix สไลด์ใน absolute methanol 5-10 วินาที
  - 3) ย้อมด้วย carbol-fuchsin-DMSO 5 นาที
  - 4) ล้างด้วยน้ำสะอาด
  - 5) ทำการ decolorized และ counterstain ใน malachite green 1-2 นาที
  - 6) ล้างด้วยน้ำสะอาด เสร็จแล้วปล่อยให้แห้ง
  - 7) จุ่มสไลด์ลงใน absolute alcohol 2 ครั้ง
  - 8) จุ่มสไลด์ลงใน xylene 2 ครั้ง
  - 9) mount สไลด์
  - 10) นำไปตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์
5. **ทำการตรวจหาเชื้อ *Giardia* โดยวิธี Zinc Sulfate floatation** โดยมีขั้นตอนดังนี้
  - 1) อุจจาระ 1 กรัมใส่ลงในปีกเกอร์ จากนั้นเทน้ำกลั่นลงไปประมาณ 10 -15 มล. คนสารละลายอุจจาระให้เข้ากัน
  - 2) กรองสารละลายอุจจาระที่ได้ผ่านตะแกรงกรองหรือผ้าก๊อชแล้วเทสารละลายที่กรองได้ลงใน centrifuge tube ขนาด 15 มล. จำนวน 10 มล.
  - 3) นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบกำหนดนำหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนใสด้านบนทิ้ง
  - 4) เติมสารละลาย zinc sulfate ลงไปในหลอดประมาณครึ่งหนึ่งจากนั้นทำการคนให้ตะกอนผสมกันดีกับสารละลาย zinc sulfate แล้วเติมสารละลายให้ถึง 10 มล.
  - 5) นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที
  - 6) ใช้ wire loop ตะที่ผิวด้านบนของหลอดแล้วนำมาแตะลงบนสไลด์ประมาณ 7-8 ครั้ง
  - 7) ปิดทับด้วย cover slip
  - 8) นำไปตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

6. **ทำการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* และ *Giardia* โดยวิธี immunofluorescence antibody test (IFAT) (O'Hanley *et al.*, 1999)**

- 1) นำอุจจาระประมาณ 1 กรัม ทำการ purified ซีสต์และอูซีสต์โดยวิธี Sucrose flotation
- 2) นำตะกอนที่ได้หยดลงบนสไลด์จำนวน 15  $\mu$ l และทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการ fix สไลด์ด้วย acetone เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งให้แห้ง
- 3) หยด *Giardia* หรือ *Cryptosporidium*-specific fluorescein isothiocyanant-labeled monoclonal antibody ลงบนสไลด์จำนวน 1-2 หยด
- 4) incubated สไลด์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS และปล่อยให้แห้งจากนั้นทำการ mount สไลด์ด้วย fluorescent antibody mounting fluid และปิดด้วย cover slip
- 5) นำสไลด์ที่ได้ไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence ที่กำลังขยาย 100X และ
- 6) 400X ตามลำดับ

7. **ทำการสกัด DNA ของเชื้อจากอุจจาระ**

ทำการสกัด DNA ของเชื้อนี้โดยตรงจากอุจจาระโดยใช้ QIAamp stool DNA Extraction Kit

8. **ทำ PCR เพื่อแยก genotype**

8.1 **ทำ PCR เพื่อแยก genotype ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp.**

โดยใช้วิธี PCR-RFLP ตามวิธีของ Xiao และคณะ, 1999 โดยเป็น nested PCR ในตำแหน่ง small-subunit rRNA gene ซึ่งจะแยกเป็น primary PCR ซึ่งจะใช้ primer คือ

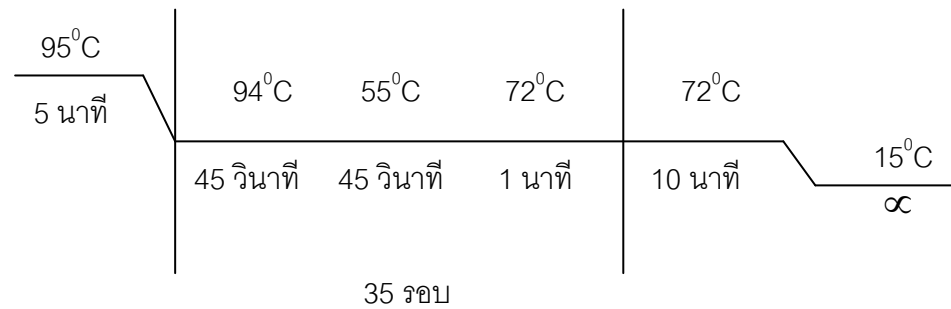
F1 (AL1687) 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'

R1 (AL3417) 5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'

โดย PCR product จะมีขนาด 1,325 bp และ PCR mixture ประกอบด้วย

- 200  $\mu$ M ของ deoxynucleoside triphosphate (dNTP) แต่ละตัว
- 2.5  $\mu$ l 10X PCR buffer (Perkin Elmer, Wellesley, MA)
- $MgCl_2$  2.0 mM
- Taq polymerase 1.5 U (Gibco BRL, Frederick, MD)
- 12.5 pM ของ primer แต่ละ primer
- PCR Grade Ultra Pure Water (Biotech International)
- DNA 1  $\mu$ l

## PCR condition ประกอบด้วย



secondary PCR ซึ่ง primer ที่ใช้คือ

F2 (AL3032) 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'

R2 (AL1598) 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'

โดย PCR product จะมีขนาดประมาณ 819-825 bp และ PCR mixture รวมถึง PCR condition จะเหมือนกับ Primary PCR

หลังจากได้ PCR product จาก secondary PCR แล้ว นำ PCR product ที่ได้มา 20 µl มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ ใน mixture ที่ประกอบด้วย *SspI* 20 U หรือ *VspI* 20 U และ restriction buffer 5 µl จากนั้น incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมา run ใน 2% agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide

## 8.2 ทำ PCR เพื่อแยก genotype ของเชื้อ *Giardia* spp.

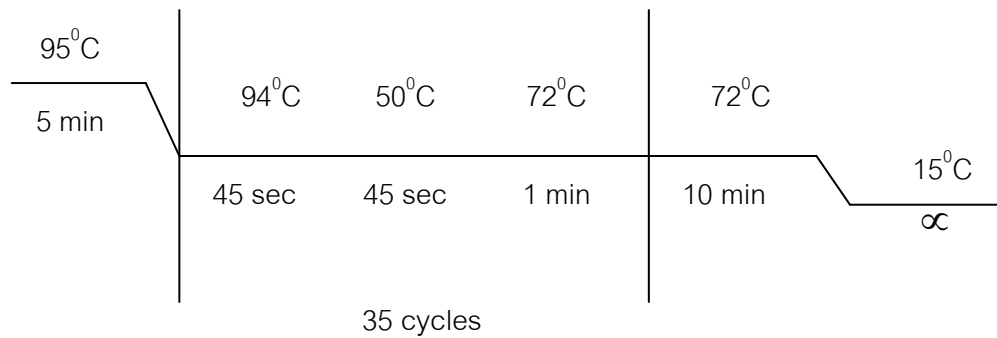
โดยใช้วิธี PCR ตามวิธีของ Read และคณะ, 2002 โดยเป็น nested PCR ในตำแหน่ง small-subunit rRNA gene ซึ่งจะแยกเป็น

primary PCR ซึ่งจะใช้ primer คือ

- RH11, forward primer [5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3']
- RH4, reverse primer [5'AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3']

โดย PCR product จะมีขนาดประมาณ 130 bp และ PCR mixture ประกอบด้วย

- 200 µM ของ deoxynucleoside triphosphate (dNTP) แต่ละตัว
- 2.5 µl 10X PCR buffer (Perkin Elmer, Wellesley, MA)
- MgCl<sub>2</sub> 2.0 mM
- Taq polymerase 1.5 U (GIBCO BRL, Frederick, MD)
- 12.5 pM ของ primer แต่ละ primer
- PCR Grade Ultra Pure Water (Biotech International)
- DNA 1 µl



secondary PCR ซึ่ง primer ที่ใช้คือ

- GiarF [5'-GACGCTCTCCCAAGGAC-3']
- GiarR [5'-CTGCGTCACGCTGCTCG-3']

โดย PCR product จะมีขนาดประมาณ 130 bp และ PCR mixture รวมถึง PCR condition จะเหมือนกับ primary PCR

หลังจากได้ PCR product จาก secondary PCR แล้ว นำ PCR product ที่ได้มา run ใน 1% agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide ถ้าพบตัวอย่าง positive จะทำการส่งตัวอย่างนั้นไป sequencing เพื่อแยก genotype ต่อไป

#### 9. ขั้นตอนและวิธีการในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลที่ได้จะนำมาวิเคราะห์และสรุปชนิดของเชื้อว่าเป็นสายพันธุ์ใด และคำนวณความชุก (prevalence) ของโรคด้วย อีกทั้งวิเคราะห์ uni-variate risk factor ของความชุกของเชื้อนี้ที่พบในโคนม เช่น อายุ การจัดการฟาร์ม เป็นต้นโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ

#### ผลการวิจัย (Results)

**ความชุกของเชื้อ *Giardia duodenalis* และ *Cryptosporidium* spp.**

ความชุกรวมของการติดเชื้อ *G. duodenalis* ในโคนมเขตภาคเหนือของประเทศไทยคิดเป็นร้อยละ 7.0 (35/500) จากการตรวจโดยวิธี zinc sulphate flotation ร้อยละ 8.0 (40/500) จากการตรวจโดยวิธี IFAT และร้อยละ 8.8 (44/500) จากการตรวจโดยวิธี PCR โดยพบว่าจังหวัดลำปางพบการติดเชื้อนี้มากที่สุด รองลงมาคือจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดเชียงรายตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความชุกของการติดเชื้อ *G. duodenalis* ในโคนมจากการตรวจด้วยวิธี zinc sulphate floatation, IFAT และ PCR ตามลำดับ

จังหวัด	<i>G. duodenalis</i>		
	Zinc sulphate floatation	IFAT	PCR
เชียงราย	5/250 (2.0%)	5/250 (2.0%)	5/250 (2.0%)
เชียงใหม่	8/150 (5.3%)	9/150 (6.0%)	9/150 (6.0%)
ลำปาง	22/100 (22.0%)	26/100 (26.0%)	30/100 (30.0%)
<b>รวม</b>	<b>35/500 (7.0%)</b>	<b>40/500 (8.0%)</b>	<b>44/500 (8.8%)</b>

ในขณะที่ผลการศึกษาการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. โดยวิธี DMSO-modified acid fast stain พบ 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.0) วิธี IFAT พบ 35 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.0) และวิธี PCR พบ 38 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.6) จากทั้งหมด 500 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อการติดเชื้อนี้ ซึ่งจังหวัดที่พบการติดเชื้อนี้มากที่สุดคือจังหวัดเชียงราย ตามมาด้วยจังหวัดลำปางและจังหวัดเชียงใหม่พบการติดเชื้อนี้น้อยที่สุด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความชุกของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในโคนมจากการตรวจด้วยวิธี DMSO-modified acid fast stain, IFAT และ PCR ตามลำดับ

จังหวัด	<i>Cryptosporidium</i> spp.		
	DMSO-modified acid fast stain	IFAT	PCR
เชียงราย	10/250 (4.0%)	19/250 (7.6%)	22/250 (8.8%)
เชียงใหม่	6/150 (4.0%)	7/150 (4.7%)	7/150 (4.7%)
ลำปาง	9/100 (9.0%)	9/100 (9.0%)	9/100 (9.0%)
<b>รวม</b>	<b>25/500 (5.0%)</b>	<b>35/500 (7.0%)</b>	<b>38/500 (7.6%)</b>

อย่างไรก็ตามพบการติดเชื้อร่วม (Mix infection) จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.8) โดยพบในจังหวัดลำปาง 2 ตัวอย่าง จังหวัดเชียงราย 1 ตัวอย่างและจังหวัดเชียงใหม่ 1 ตัวอย่างตามลำดับ

**ผลการวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องต่อการติดเชื้อ *Giardia duodenalis* และ *Cryptosporidium* spp.**

ผลการวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงทั้งอายุ เพศ พันธุ์ของโคนม การจัดการฟาร์ม ลักษณะฟาร์ม ลักษณะโรงเรือน ลักษณะการเลี้ยงโคนม ประวัติการถ่ายอุจจาระเหลว ลักษณะของอุจจาระ โดยไม่มีปัจจัยเสี่ยงใดๆข้างต้นที่มีนัยสำคัญทางสถิติต่อการติดเชื้อ *Cryptosporidium* และ *G. duodenalis* ในการศึกษาครั้งนี้

**สายพันธุ์ของเชื้อ *G. duodenalis* และ *Cryptosporidium* spp.**

ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อ *G. duodenalis* พบว่า 34 ตัวอย่างจากทั้งหมด 44 ตัวอย่างเป็น Assemblage E (ร้อยละ 77.3) ที่เหลือ (10 ตัวอย่าง) เป็น Assemblage AI (ร้อยละ 22.7) ส่วนในกรณีการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. โดยวิธี PCR-RFLP พบว่า 22 ตัวอย่าง (ร้อยละ 58.0) เป็น *C. parvum* และอีก 16 ตัวอย่าง (ร้อยละ 42.0) จากทั้งหมด 38 ตัวอย่างเป็น *C. bovis*

**วิจารณ์ผล (Discussion)**

โรค cryptosporidiosis และ giardiasis ในโคนมมีการศึกษาอย่างกว้างขวางทั้งในประเทศแถบยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย รวมทั้งในแถบเอเชีย รวมทั้งในประเทศไทยด้วย โดยในการศึกษานี้พบว่า ความชุกของการติดเชื้อ *G. duodenalis* ในโคนมเขตภาคเหนือของประเทศไทยคิดเป็นร้อยละ 7.0 (35/500) จากการตรวจโดยวิธี zinc sulphate flotation ร้อยละ 8.0 (40/500) จากการตรวจโดยวิธี IFAT และร้อยละ 8.8 (44/500) จากการตรวจโดยวิธี PCR โดยพบว่าจังหวัดลำปางพบการติดเชื้อนี้มากที่สุด รองลงมาคือจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดเชียงรายตามลำดับ โดยรายงานครั้งนี้พบความชุกต่ำกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ในประเทศอื่นๆเช่นในโคนมของแคนาดาที่ความชุกร้อยละ 32.0 (Budu-Amoako *et al.*, 2012) อินเดียที่ความชุกร้อยละ 12.2 (Khan *et al.*, 2011) และมาเลเซียที่ความชุกร้อยละ 12.5 (Muhid *et al.*, 2012) ในขณะที่ผลการศึกษการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. โดยวิธี DMSO-modified acid fast stain พบ 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.0) วิธี IFAT พบ 35 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7) และวิธี PCR พบ 38 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.6) โดยจังหวัดที่พบการติดเชื้อนี้มากที่สุดคือจังหวัดเชียงราย ตามมาด้วยจังหวัดลำปางและจังหวัดเชียงใหม่พบการติดเชื้อนี้น้อยที่สุด ทั้งนี้เมื่อเทียบผลกับการวิจัยในประเทศอื่นๆก่อนหน้านี้พบว่ารายงานครั้งนี้พบการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ต่ำกว่าในแคนาดา (Trotz *et al.*, 2005) สหรัฐอเมริกา (Fayer *et al.*, 2000) ออสเตรเลีย (Becher *et al.*, 2004) ญี่ปุ่น (Sakai *et al.*, 2003) และเวียดนาม (Nguyen *et al.*, 2007) รวมทั้งที่เคยมีรายงานในภาคกลางของประเทศไทยด้วย (Nuchjangreed *et al.*, 2008) ซึ่งผลที่แตกต่างกันอาจ

เนื่องมาจากวิธีการตรวจที่แตกต่างกันรวมทั้งการพบซีสต์ของเชื้อทั้งสองชนิดจำนวนน้อยในอุจจาระ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าวิธี PCR ให้ผลการตรวจที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ เช่นเดียวกับการรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าการตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์มักจะให้ผลบวกที่ต่ำกว่าที่ควรจะเป็นเนื่องจากวิธีนี้ความไวค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับวิธีทางซีรั่มวิทยาหรือวิธีทางอณูชีวโมเลกุล (Inpankaew *et al.*, 2007)

ผลการวิเคราะห์หีบัจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อนี้ พบว่าไม่มีหีบัจัยเสี่ยงใดๆที่มีนัยสำคัญทางสถิติต่อการติดเชื้อ *G. duodenalis* ในการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปมักจะพบเชื้อทั้งสองชนิดในลูกโคนมเป็นหลักซึ่งมักจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดท้องเสียในลูกโคนมด้วย

ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อ *Cryptosporidium spp.* ในการวิจัยครั้งนี้พบมี 2 สายพันธุ์คือว่า *C. bovis* ซึ่งสายพันธุ์นี้สามารถที่จะพบได้โคนมหรือทางด้านปศุสัตว์เท่านั้น และ *C. parvum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถพบได้ในคน ซึ่งทำให้เชื้อนี้สามารถถ่ายทอดไปสู่คนหรือในโคนมด้วยตัวเองซึ่งอาศัยอยู่ในฟาร์มเดียวกันได้มากกว่าฟาร์มที่ไม่พบการติดเชื้อ ในขณะที่การแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *G. duodenalis* โดยวิธี sequencing พบว่าเป็น Assemblage AI ซึ่งพบได้ในคนและ Assemblage E ซึ่งพบในโคนมหรือทางด้านปศุสัตว์เท่านั้นทำให้เชื้อนี้มีโอกาสที่จะถ่ายทอดจากสัตว์สู่คน โดยเฉพาะอย่างยิ่งคนงานในฟาร์มที่สัมผัสกับสัตว์โดยตรงและจากสัตว์ที่อยู่ร่วมกันในฟาร์มได้

การศึกษาในครั้งนี้พบความชุกของโคนมที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *Cryptosporidium* และ *Giardia* ในระดับต่ำ อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ของเชื้อทั้งสองชนิดที่พบเป็นสายพันธุ์ที่ติดได้ในคน ถึงแม้ว่าโคนมจะไม่แสดงอาการให้เห็นแต่ก็สามารถเป็นตัวกักโรคที่สำคัญของเชื้อได้ ฉะนั้นเราควรที่จะให้ความสนใจในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อนี้ทั้งในคนและในสัตว์ เพื่อไม่ให้มีการถ่ายทอดเชื้อนี้ได้ทั้งจากสัตว์สู่คนและคนสู่สัตว์

### กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณนายสัตวแพทย์ของกรมปศุสัตว์ประจำจังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงรายและจังหวัดลำปางที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างอุจจาระโคนม รวมทั้งเจ้าของฟาร์มโคนมทุกๆฟาร์มที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการวิจัยในครั้งนี้ โดยโครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยโดยสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ)

### เอกสารอ้างอิง (References)

ข้อมูลจำนวนปรสิตวีในประเทศไทยปี 2548 ศูนย์สารสนเทศ กรมปรสิตฯ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 192 หน้า

Becher KA, Robertson ID, Fraser DM, Palmer DG, Thompson RC. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Vet Parasitol.* 2004; 123:1-9.

Budu-Amoako E, Greenwood SJ, Dixon BR, Barkema HW, McClure JT. *Giardia* and *Cryptosporidium* on dairy farms and the role these farms may play in contaminating water sources in Prince Edward Island, Canada. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2012; 26:668-673.

Capelli G, Paoletti B, Iorio R, Frangipane DRA, Pietrobelli M, Bianciardi P, Giangaspero A. Prevalence of *Giardia* spp. In dogs and humans in Northern and Central Italy. *Parasitology Research* 2003;90(Suppl 3):S154-5.

Fayer, R., Morgan, R., Upton, S.J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology.* 30:1305-22

Fayer R, Trout JM, Graczyk TK, Lewis EJ. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Vet Parasitol.* 2000 Nov 10;93(2):103-12.

Forney, J.R., De Wald, D.B., Yang, S. 1999. A role for host Phosphoinositide 3-Kinase and Cytoskeletal Remodeling during *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 67:844-52

Gatei, W., Suputtamongkol, D., Waywa, D. 2002. Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Annals of Tropical Medicine and Parasitol.* 96:797-802

Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RCA. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitology* 1997;83(1):44-51.

Hsu BM, Wun HY, Hsu PC. Prevalence and genotyping of *Giardia* in husbandry systems in Taiwan. *Parasitol Res.* 2007 Jul;101(2):275-80.

- Hunter PR and Thompson RCA. 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. International Journal for Parasitol. 35: 1181-1190.
- Inpankaew T, Traub R, Thompson RC, Sukthana Y. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2007; 38:247-255.
- Jellison, KL., Hemond, HF., Schauer, DB. 2002. Sources and species of *cryptosporidium* oocyst in the Wachusett Reservoir watershed. Appl Environ Microbiol. 68: 569-575.
- Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J Water Health. 2007 Mar;5(1):1-38.
- Khan SM, Debnath C, Pramanik AK, Xiao L, Nozaki T, Ganguly S. 2011. Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. Veterinary Parasitology. 2011; 178:342-345.
- McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Diaz, S., Nichols, G.L. 2000. Molecular epidemiology analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. Journal of clinical microbial.38:3984-90
- Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. Division of *Giardia* isolate from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. Parasitology 1995;111(Pt1):11-17.
- Mendonça C, Almeida A, Castro A, de Lurdes Delgado M, Soares S, da Costa JM, Canada N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. Vet Parasitol. 2007 Jun 20;147(1-2):47-50.
- Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. Parasitology. 1996 Jan;112 ( Pt 1):1-12.
- Monis PT, Andrews RH. Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. International Journal for Parasitology. 1998 Jun;28(6):981-7.

- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac-Renton JL, Ey PL. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology*. 1998 Jan;116 ( Pt 1):7-19.
- Muhid A, Robertson I, Ng J, Yang R, Ryan U. Prevalence of *Giardia* spp. infection in pre-weaned and weaned calves in relation to management factors. *Veterinary Journal*. 2012; 191:135-137.
- Nguyen ST, Nguyen DT, Le DQ, Le Hua LN, Van Nguyen T, Honma H, Nakai Y. Prevalence and first genetic identification of *Cryptosporidium* spp. in cattle in central Viet Nam. *Vet Parasitol*. 2007; 150:357-61.
- Nizeyi, J.B., Sebunya, D., Dasilva, A.J. 2002. Cryptosporidiosis in people sharing habitats with free ranging mountain Gorillas (*Gorilla gorilla beringei*), Uganda. *Am.J. Trop. Med. Hyg.*66:442-4
- Nuchjangreed C, Boonrod K, Ongerth J, Karanis P. Prevalence and molecular characterization of human and bovine *Cryptosporidium* isolates in Thailand. *Parasitology Research*. 2008; 103:1347-1353.
- Nuchprayoon S, Siriyasatien P, Kraivichian K, Porksakorn C, Nuchprayoon I. Prevalence of intestinal parasitic infection among Thai patients at the King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand. *J Med assoc Thai Jun 2002*; 85(suppl1):S415-23.
- O'Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*.1999; 214(3):391-6.
- O'Handley RM, Olson ME, Fraser D, Adams P, Thompson RC. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Vet Parasitol*. 2000 Jun 27;90(3):193-200.
- Qkhuysen, P.C., Chappell, C.L. 2002. *Cryptosporidium* virulence determinants-are we there yet?. *Inter. J. Parasitol*. 32:517-25

- Olson ME, O'Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson RCA. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. Trends Parasitol 2004;20(4):185-91.
- Ortega-Mora, L.M., Requejo-Fernandez, J.A., Pilar-Izquierdo. 1999. Role of adult sheep in transmission of infection by *Cryptosporidium parvum* to lambs: confirmation of periparturient rise. Inter. J. Parasitol.29:1261-8
- Read CM, Walters J, Robertson ID, Thompson RCA. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. Int J Parasitol 2002;32(2):229-31.
- Sakai H, Tsushima Y, Nagasawa H, Ducusin RJ, Tanabe S, Uzuka Y, Sarashina T. *Cryptosporidium* infection of cattle in the Tokachi district, Hokkaido. The Journal of Vet Med Sci. 2003; 17:2142-49.
- Saksirisampant, W., Eampokalap, B., Rattanasrithong, M., Likanonsakul, S., Wiwanitkit, V., Nasingkam, A., Denmasae, N. 2002. A prevalence of *Cryptosporidium* infections among Thai HIV-infected patients. J Med Assoc Thai. 85 Suppl 1: s424-8.
- Sharma, G.L. and Bhutani, K.K. 1988. Plant based antiameobic drugs; Past II Amoebicidal Activity of Parthenin isolated from *Partherium hysterophorus*. Planta Medica.54:120-2
- Sirivichayakul C, Pojjaroen-anant C, Wisetsing P, Siripanth C, Chanthavanich P, Pengsaa K. Prevalence of intestinal parasitic infection among Thai people with mental handicaps. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003;34(2):259-63.
- Sulaiman, I.M., Xiao, L., Lal, A.A. 1999. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. Applied and Environmental Microbiol.65:4431-5
- Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L. Triosephosphate Isomerase Gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. Emerging infectious Diseases. 2003;11(9):1444-52.
- Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. Int J Parasitol 2000;30(12-13):1259-67.

- Thompson RCA, Hopkins RA, Homan WL. Nomenclature and genetic grouping of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today* 2000;16(5):210-8.
- Traub RJ, Monis PT, Robertson TD, Irwin P, Mencke N. and Thompson RCA. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology* 2004;128(Pt3):253-262.
- Trotz WLA, Jarvie BD, Martin SW, Leslie KE, Peregrine AS. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in Southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Can Vet J.* 2005; 46:349-51.
- Trout JM, Santín M, Fayer R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows. *Vet Parasitol.* 2007 Jul 20;147(3-4):205-9.
- Waikagul J, Krudsood S, Radomyos P, Chalemrut K, Jonsuksuntigul P, Kojima S, *et al.* A cross-sectional study of intestinal parasitic infections among schoolchildren in Nan province, Northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002;33(2):218-23.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the Small-Subunit rDNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiol.*65:1578-83