

บทที่ 2

สอบสวนเอกสาร

อนุกรมวิธานของเชื้อ *Cryptosporidium*

เชื้อ *Cryptosporidium* เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวชนิด eukaryote ซึ่งมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) แยกนิวเคลียสออกจากไซโตพลาสซึมชัดเจน สามารถจัดหมวดหมู่ในอนุกรมวิธานจากคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีววิทยา ตลอดจนปรีดิวิทยา ดังนี้

Phylum *Apicomplexa*

Class *Sporozoasida*

Subclass *Coccidiasina*

Order *Eucoccidiorida*

Suborder *Eimeriorina*

Family *Cryptosporidiidae*

Genus *Cryptosporidium*

Cryptosporidium จัดอยู่ใน Phylum *Apicomplexa* เนื่องจากในบางระยะของการเจริญเติบโตประกอบด้วย apical organelles ได้แก่ polar ring, rhoptries, micronemes, conoid, subpellicular microtubules จัดอยู่ใน Class *Sporozoasida* 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 เนื่องจากในอดีตไม่มี

การค้นพบระยะ 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 การเจริญเติบโตของเชื้อเกิดขึ้นภายในบริเวณเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ในลักษณะที่อยู่ในเซลล์ของโฮสต์ แต่อยู่ภายนอกไซโตพลาสซึม และเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเชื้อ *Cryptosporidium* อยู่ภายในส่วน microvilli ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ (Current & Garcia, 1991)

เชื้อ *Cryptosporidium* สามารถเข้าสู่ร่างกายโดยการกิน oocyst ซึ่งเป็นระยะติดต่อ ดังนั้นจึงมักเป็นการติดต่อแบบ fecal-oral transmission เมื่อ oocyst ที่เป็นระยะติดต่อผ่านไปถึงลำไส้เล็ก sporozoite ที่อยู่ภายใน oocyst จะออกมาลูกกลมเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ ทำให้ microvilli ขยายขนาดและโป่งพองออกเกิดเป็นก้อนกลมประมาณ 2-5 ไมครอน เรียกว่า parasitophorous vacuole (Hampton & Rosario, 1966) 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 ภายในไซโตพลาสซึมเดียวกัน เมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่เรียกระยะดังกล่าวว่า mature schizont มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 ถึง 5 ไมครอน ภายในประกอบไปด้วย merozoite 8 ตัว เรียกว่า first generation merozoite และเมื่อเยื่อหุ้ม schizont แตกออก merozoite ที่อยู่ภายในจะเคลื่อนที่ออกมาสู่เซลล์ข้างเคียงของโฮสต์ต่อไป ซึ่ง merozoite ที่เจริญเต็มที่จะมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับพระจันทร์เสี้ยว และถูกล้อมรอบด้วย เยื่อหุ้ม 2 ชั้น โดยบริเวณด้านหน้าของ merozoite ประกอบด้วย apical organelles ได้แก่ conoid polar ring rhoptries และ micronemes เชื่อว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการลูกกลมเข้าสู่เซลล์เช่นเดียวกับโปรโตซัวในกลุ่ม 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 ตามลำดับโดย 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 ได้อย่างชัดเจน 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 & Upton, 1986) ซึ่งรอยต่อดังกล่าวจะเป็นทางออกของ sporozoite จาก oocyst เพื่อลูกกลมเข้าเซลล์ต่อไป ลักษณะของ oocyst ที่พบมี 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีผนัง oocyst บาง และชนิดที่มีผนังหนา ส่วนใหญ่ oocyst ที่ถูกสร้างขึ้นเป็นชนิดที่มีผนังหนา oocyst ชนิดนี้มักถูกขับออกจากโฮสต์ป้อนออกมาที่อุจจาระ สำหรับ oocyst ที่มีผนังบางมักแตกภายในลำไส้ของโฮสต์ จึงทำให้ sporozoite ลูกกลมกลับเข้าไปในเยื่อลำไส้ใหม่อีกครั้ง (auto-infection) ดังนั้นจึงทำให้เชื้อมีการเพิ่มปริมาณในโฮสต์เป็นอย่างมาก การติดเชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้การดำเนินของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็วและมีพยาธิสภาพมากขึ้นโดยลำดับ ถึงแม้ว่าจะไม่ได้รับเชื้อใหม่เพิ่มขึ้นจากภายนอก กรณีดังกล่าวมีความสำคัญมากในผู้ป่วยที่มีสภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การที่ oocyst มีการเจริญและแบ่งตัวไปเป็นระยะติดต่อกันมี 4 sporozoite เรียกขบวนการดังกล่าวว่า sporogony สำหรับ oocyst ของ *Cryptosporidium* มีลักษณะที่ต่างจาก coccidia อื่นๆ คือ sporozoite จะถูกล้อมรอบด้วยผนัง oocyst โดยตรงและปราศจาก sporocyst (Upton, 1989) (รูปที่ 1)

ระยะของเชื้อ *Cryptosporidium* ในวงจรชีวิตที่มีความสำคัญสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ระยะที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular forms) ระยะที่อยู่ในเซลล์ (intracellular forms) และระยะ oocyst ที่อยู่ภายในสิ่งแวดล้อมภายนอกโฮสต์ ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อที่อยู่นอกเซลล์ ได้แก่ ระยะ sporozoite ระยะ merozoite และระยะ microgamete ระยะดังกล่าวมีวงจรชีวิตที่สั้น เชื้อมีความจำเป็นที่ต้องกลับเข้าสู่โฮสต์อย่างรวดเร็วเพื่อทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่ต่อไป ส่วนระยะที่อยู่ใน

เซลล์ ประกอบด้วยระยะ trophozoite ระยะschizont ระยะmerozoite ระยะmicrogametocyte ระยะmacrogametocyte และ zygote ส่วนระยะ oocyst ที่อยู่ภายในสิ่งแวดล้อมภายนอกโฮสต์ เป็นระยะที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้ที่ไม่เหมาะสมเป็นอย่างดี (Fayer et al., 2000)

ในวงจรชีวิตของเชื้อ *Cryptosporidium* ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มมีการติดเชื้อโดยได้รับระยะ sporozoite ซึ่งอยู่ภายใน oocyst เข้าไปจนกระทั่งเจริญเป็น oocyst ที่มี sporozoite ภายในอีกครั้ง ใช้เวลาเพียง 2 วัน แต่อย่างไรก็ตามภาวะการติดเชื้ออาจคงอยู่เพียงระยะเวลาสั้นๆ หรืออยู่ได้นานหลายเดือน ขึ้นอยู่กับสภาวะของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ สำหรับระยะฟักตัวของเชื้อ *Cryptosporidium* ในคนใช้ระยะเวลาประมาณ 4-12 วัน นับตั้งแต่ได้รับ oocyst เข้าไปในร่างกาย จนกระทั่งเกิดอาการของโรค สำหรับการติดเชื้อเกิดขึ้นในสัตว์ใช้ระยะเวลาประมาณ 2-14 วัน แต่ระยะเวลาที่สามารถตรวจพบ oocyst ในอุจจาระจะคงอยู่นานหลายวันจนกระทั่งหลายๆ เดือน แม้อาการจะหายไปแล้ว (Jokipii & Jokipii, 1986)

การแพร่กระจายของเชื้อในโฮสต์ต่างๆ

การติดเชื้อ *Cryptosporidium* สามารถเกิดได้กับโฮสต์หลายชนิด ดังนั้นการแพร่กระจายของโรคจึงครอบคลุมพื้นที่ที่กว้าง โดยพบการกระจายของเชื้อระหว่างเส้นรุ้งที่ 64 องศาเหนือ ถึงเส้นรุ้งที่ 32 องศาใต้ และครอบคลุมพื้นที่ซึ่งอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำทะเล 400 เมตร จนถึงสูงสุดที่ระดับน้ำทะเล 2,600 เมตร มีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 16 ถึง 38 องศาเซลเซียส โดยสามารถพบเชื้อได้ทั่วทุกภูมิภาคของโลก แต่ในการระบาดส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นในแถบภูมิภาคทางตอนเหนือของอเมริกา หรือประเทศในเขตอบอุ่น (Griffiths, 1998)

Cryptosporidium ทำให้เกิดโรคหรือเกิดการติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีทั้งหมด 79 species สามารถจัดหมวดหมู่ได้ดังนี้ Subclass *Eutheria* มี 6 Order คือ Order *Primates* เช่น สัตว์จำพวกลิง Order *Artiodactyls* เช่น แกะและหมู Order *Perissodactyls* เช่น ม้า Order *Carnivores* ได้แก่ แมวและสุนัข Order *Lagomorphs* เช่น กระต่าย และ Order *Rodentia* ได้แก่ สัตว์จำพวกฟันแทะ เช่น หนู ใน Subclass *Marsupialia* มี 1 Order คือ Order *Diprotodonts* ได้แก่ สัตว์ประเภทหมีและจิงจี้

โดยธรรมชาติในการติดต่อเกิดขึ้นได้ทั้งในสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และสัตว์ที่ถูกกักขัง จากการศึกษาลงทุนใหญ่พบการติดเชื้อในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ สุนัข สัตว์เลี้ยง และสัตว์ในห้องทดลอง การติดเชื้อส่วนใหญ่เชื่อว่าเกิดจาก *C. parvum* โดยพบเชื้อในบริเวณลำไส้เล็ก และการติดเชื้อดังกล่าวมักทำให้สัตว์เกิดการเจ็บป่วย สำหรับการติดเชื้อในหนูขาว หนูขาว หนูตะเภา ลูกวัว กวางภูเขา และในอูฐ มักพบในบริเวณเยื่อบุกระเพาะอาหาร อย่างไรก็ตาม *C. parvum* จากสัตว์

ชนิดหนึ่งสามารถติดต่อสู่สัตว์ต่างชนิดกันได้ เช่น *C. parvum* ที่ได้จาก หนูตะเภา สามารถติดต่อ
ในลูกแกะ สุกร และหนูถีบจักรได้ โดยการติดต่อดังกล่าวมักพบในโฮสต์ที่มีอายุน้อยโดยเฉพาะใน
สัตว์เคี้ยวเอื้อง รายละเอียดเกี่ยวกับการติดต่อของ *Cryptosporidium* ระหว่างสัตว์ต่างชนิดกัน
แสดงในตารางที่ 1

แหล่งที่มาของเชื้อ	โฮสต์ที่ติดต่อได้
สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	
คน	ลูกแกะ แพะ ลูกวัว สุกร สุนัข แมว หนูขาว หนู ตะเภา ไก่
ลูกวัว	ลูกแกะ คน แพะ ลูกม้า สุกร สุนัข หนูถีบจักร หนู แฮมสเตอร์ หนูขาว กระท่าย
หนูถีบจักร	แพะ ลูกวัว
หนูขาว	แมว สุนัข กระท่าย หนูตะเภา หนูถีบจักร ลูกแกะ
หนูตะเภา	สุกร หนูถีบจักร
ลูกแกะ	หนูถีบจักร
แพะ	สุกร
สุกร	หนูถีบจักร
ม้า อูฐ กวาง	แมว
แมว	ลูกไก่ ไก่วง เป็ด ห่าน ไก่ฟ้า นกกระทา
สัตว์ปีก	
ไก่	ลูกไก่ ไก่วง เป็ดห่าน ไก่ฟ้า นกกระทา
นกคุ้ม	นกคุ้ม ลูกไก่
ไก่วง	ไก่วง ลูกไก่ เป็ด
ไก่ฟ้า	ลูกไก่ เป็ด

ตารางที่ 1 การติดต่อของเชื้อ *Cryptosporidium* ระหว่างโฮสต์ต่าง ๆ (cross-transmission)
(O'Donoghue, 1995)

การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในสัตว์ปีกมีมากกว่า 30 species ข้อมูลดังกล่าวได้จากการ
การตรวจวินิจฉัยในกลุ่มนกที่เลี้ยงไว้ในบ้าน ในสวนนกและในกลุ่มประชากรนกในป่า มีรายงาน
การระบาดของโรคอย่างรุนแรงอย่างมากในกลุ่มของสัตว์ปีกเศรษฐกิจ 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 ยังคงคุณลักษณะบางประการไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน แม้ว่าตำแหน่งของการติดเชื้อของ *C. meleagridis* อยู่ในลำไส้ bursa และ cloaca ของไก่วง ลูกไก่ และเปิด ส่วน *C. baileyi* พบการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ของไก่วง ลูกไก่ และเปิด ทั้งนี้ความรุนแรงของการเกิดโรคนั้นขึ้นอยู่กับ species ของเชื้อ อายุของโฮสต์ และระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Current et al., 1986)

การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในสัตว์เลื้อยคลานมีการศึกษาครั้งแรกในระหว่างปี ค.ศ. 1925 ถึง ค.ศ. 1969 พบ 5 species ที่ก่อโรคในสัตว์เลื้อยคลานได้แก่ *C. crotali* *C. lampropeltis* *C. ameivae* *C. ctenosauris* และ *C. serpentis* หลังจากนั้นมีการรายงานของการติดเชื้อในสัตว์เลื้อยคลานมากกว่า 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 ที่พบในสัตว์เลื้อยคลานมีความแตกต่างกับการติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและในสัตว์ปีก กล่าวคือ การติดเชื้อทั้งหมดในสัตว์เลื้อยคลานเกิดขึ้นในกระเพาะอาหาร ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีกเกิดขึ้นในระบบลำไส้และในระบบทางเดินหายใจตามลำดับ การติดเชื้อในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่พบในสัตว์ที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ ส่วนในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม และในสัตว์ปีกมักพบการติดเชื้อในสัตว์แรกเกิด และในกลุ่มที่มีอายุน้อยๆ ระยะเวลาในการติดเชื้อจนกระทั่งมีการสร้าง oocyst ในสัตว์เลื้อยคลานมีระยะเวลานานหลายเดือนหรือยาวนานมากกว่า 2 ปี (Upton et al., 1989) นอกจากนี้การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ยังพบอย่างน้อยในปลา 9 species โดยสามารถพบได้ในปลาทะเลและในปลาน้ำจืด ส่วนใหญ่พบในปลาที่อยู่ในการเพาะเลี้ยงเชิงเศรษฐกิจ ปลาที่มีการกักขังบริเวณและในปลาสวยงามที่เลี้ยงไว้ในตู้ (Hefnawy 1989; Rush et al., 1990)

การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ในคนพบรายงานเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 โดย Nime และคณะ และ Meisel และคณะ หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจ oocyst ในอุจจาระจึงมีการสำรวจอุจจาระที่มาตรวจในห้องปฏิบัติการโดยการใส่ตัวอย่างอุจจาระในผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสีย 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; Garcia & Current, 1989; Ungar, 1990; Current & Garcia, 1991) และจากการสำรวจในกลุ่มผู้ที่ไม่มี

อาการแสดงจากการติดเชื้อ พบอัตราการติดเชื้อถึงร้อยละ 2 (ค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.3) ในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วจากการสำรวจ 12 ประเทศ เปรียบเทียบกับในประเทศกำลังพัฒนาที่ไม่แสดงอาการพบการติดเชื้อ ถึงร้อยละ 9.8 (ค่าเฉลี่ยร้อยละ 1.6) ดังผลการสำรวจ 20 ประเทศ จากการสำรวจเห็นได้ว่าในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาพบการติดเชื้อสูงกว่ากลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วแสดงว่าการติดเชื้อชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับระบบการสุขาภิบาลที่ด้อยคุณภาพ การปนเปื้อนในน้ำดื่ม น้ำใช้ หรือจากคลุกคลีกับสัตว์เลี้ยงซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญที่ทำให้พบการติดเชื้อที่สูง (Ungar, 1990)

ที่มาของการระบาดของเชื้อ *Cryptosporidium* ได้แก่

การติดต่อจากคนสู่คน (person to person) เป็นการระบาดของเชื้อที่สามารถเกิดขึ้นในศูนย์รับเลี้ยงเด็กรายวันซึ่งเกิดขึ้นได้บ่อย จากการศึกษาพบว่าเด็กที่มีการติดเชื้อส่วนหนึ่งไม่ปรากฏอาการ อีกทั้งยังสามารถเป็นพาหะของการแพร่เชื้อ ทำให้การระบาดของโรคมีแนวโน้มเกิดขึ้นได้สูงในศูนย์รับเลี้ยงเด็กรายวัน ในสถานกักกันนักโทษ และในชุมชนแออัดมากขึ้น รวมทั้งบุคลากรในโรงพยาบาลนอกจากนี้มียางานพบว่าผู้ป่วย AIDS หลายรายที่มารักษาในโรงพยาบาลมีการติดเชื้อดังกล่าวเกิดขึ้นภายในโรงพยาบาลทำให้ผู้ป่วยหลายราย เสียชีวิตจากการเกิดโรค cryptosporidiosis ข้อควรระวังโดยทั่วไปที่สำคัญคือ ควรทำการแยกผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องออกจากผู้ป่วยโรคอื่นๆ เพื่อป้องกันการระบาดของโรค (Casemore, 1990)

การติดต่อจากสัตว์สู่คน (animal to man) เป็นการติดเชื้อจากการเลี้ยงสัตว์ภายในบ้าน ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ สัตว์ป่า และสัตว์ในสวนสัตว์ต่างๆ รวมทั้งในสัตว์เลี้ยงที่ใช้เป็นอาหารจากโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งสามารถเป็นพาหะในการติดเชื้อสู่คนได้ โดยมีรายงานผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อดังกล่าวหลังจากการเข้าไปสำรวจ ตลอดจนการทำวิจัยในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่เป็นโรค จึงมีโอกาสเสี่ยงในการได้รับเชื้อได้ถ้าไม่มีระบบการป้องกันที่ดี อย่างไรก็ตามไม่มีข้อมูลชัดเจนเกี่ยวกับอัตราส่วนที่แน่นอนของการเกิดโรค cryptosporidiosis ในคนที่เกิดจากการได้รับเชื้อจากสัตว์ (Lengerich et al., 1993)

การติดต่อจากแหล่งน้ำต่างๆ (water-borne) มักเป็นการระบาดของเชื้อจากการปนเปื้อนของ oocyst ในสิ่งแวดล้อม การระบาดของเชื้อส่วนใหญ่เกิดขึ้นอันมีสาเหตุจากแหล่งน้ำ เช่น ในปี ค.ศ.1993 พบการระบาดครั้งใหญ่ในมลรัฐ Wisconsin เมือง Milwaukee สหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นพื้นที่อุตสาหกรรมฟาร์มโคนม และก่อนที่มีการระบาดมีฝนตกลงมาอย่างหนัก จากการสำรวจพบการติดเชื้อประมาณ 403,000 คน โดยคาดว่าแหล่งที่มาการติดเชื้อเกิดจากการปนเปื้อนของ oocyst ในระบบน้ำของเทศบาลเป็นสำคัญ (Mackenzie et al., 1994) สำหรับการระบาดที่เกี่ยวข้องกับแหล่งน้ำ ได้แก่ การเล่นน้ำในทะเลสาบ สระว่ายน้ำ แม่น้ำ การใช้น้ำประปามาทำ

น้ำแข็ง การดื่มนมสดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งส่วนใหญ่ประชากรที่มีการติดเชื้อมีอาการท้องเสียและเกิดขึ้นรุนแรงในกลุ่มประชากรที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องจนอาจถึงแก่ชีวิตได้ (Osewe et al., 1996) นอกจากนี้การปนเปื้อนของ oocyst ไปกับระบบส่งน้ำในเมืองอันมีสาเหตุจากสิ่งขับถ่ายของคนลงสู่ท่อระบายน้ำ หรือปัญหาจากการกำจัดอุจจาระ (Joce et al., 1991) จากการสืบสวนถึงสาเหตุของการระบาดพบรอยแตกรั่วของระบบท่อต่างๆ ในอาคารบ้านเรือนและในสระว่ายน้ำซึ่งเป็นที่ยอมรับว่ามีสิ่งปฏิภูลหรือน้ำโสโครก สามารถเข้าไปปนเปื้อน (ตารางที่ 2)

การแพร่กระจายเชื้อโรคต่างๆ ทางอากาศ ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นในเด็ก จากการศึกษาถึงแหล่งที่มาของการติดเชื้อมีการตั้งข้อสังเกตว่า oocyst ของ *Cryptosporidium* มีโอกาสแพร่กระจายทางอากาศและเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ และผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อกลืนระยะ oocyst เข้าสู่ระบบทางเดินอาหารต่อไป อย่างไรก็ตามการแพร่กระจายของเชื้อทางอากาศเกิดขึ้นสำหรับ *C. meleagridis* และ *C. baileyi* ในสัตว์ปีกได้เช่นกันมีข้อเสนอแนะมากมายถึงการติดเชื้อแต่ก็ไม่มีข้อพิสูจน์อย่างเด่นชัดว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อในอากาศ

อาการทางคลินิก (Clinical manifestation)

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 (Robert, 1989)

2. อาการท้องเสียอย่างเฉียบพลัน และสามารถหายได้เอง (*acute self-limited diarrhea*) ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสียมีระยะเวลาเฉลี่ยประมาณ 6 วัน หรืออยู่ในช่วง 2 ถึง 30 วัน อาการที่พบบ่อยที่สุดคือ อาการถ่ายเหลวเป็นน้ำ เบื่ออาหาร ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ไอ และในบางครั้งมีไข้ร่วมด้วย ในปี ค.ศ.1992 Blansharol รายงานการสำรวจในอังกฤษ พบอาการดังกล่าวในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส HIV ที่มีระดับภูมิคุ้มกันยังไม่บกพร่องมากโดยมีค่าของ CD4+lymphocyte มากกว่าหรือเท่ากับ $250/\text{mm}^3$ อาการเหล่านี้สามารถหายได้เอง สำหรับผู้ที่มีภูมิคุ้มกันปกติจากการศึกษาในอาฟริกาตะวันตก ประเทศกัวเตมาลา อเมริกาใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่าผู้ป่วยเด็กที่มีอาการเกี่ยวกับโรค cryptosporidiosis มีอัตราการเสียชีวิตประมาณร้อยละ 2 ถึง ร้อยละ 4 สูงกว่าที่พบในเด็กที่มีอาการท้องเสียจากการติดเชื้ออื่นๆ (Lima et al., 1992)

3. อาการท้องเสียเรื้อรัง (*chronic disease*) การเกิดโรค cryptosporidiosis อย่างเรื้อรัง มักพบในผู้ป่วย AIDS ที่มีภูมิคุ้มกันมากโดยมีค่า CD4+lymphocyte ต่ำกว่า $250/\text{mm}^3$ ระยะเวลาที่มีอาการประมาณ 20 ถึง 30 สัปดาห์ (Blansharol et al., 1992) ปัญหาที่พบจากอาการท้องเสียเรื้อรังคือ ทำให้ผู้ป่วยมีภาวะการขาดน้ำ (dehydration) ผอมแห้งและน้ำหนักลด ตลอดจนเกิดภาวะการดูดซึมสารอาหารบกพร่อง (malabsorption) (Macgowan, 1993)

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

อาการแสดงและพยาธิสภาพในการติดเชื้อภายนอกลำไส้ร่วมด้วย

พบได้น้อยมาก มักพบในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะโรค AIDS สามารถพบการติดเชื้อเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ อาการสำคัญคือ อาการไอ หายใจขัด และการมีสารคัดหลั่งบริเวณหลอดลมออกมาเป็นจำนวนมาก อาการเหล่านี้คล้ายกับอาการที่พบในสัตว์ปีก อาการแสดงของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นก่อนที่ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสียและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในผู้ใหญ่ได้ โรค cryptosporidiosis ที่มีการติดเชื้อในระบบหายใจที่ปรากฏให้เห็นในกลุ่มผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันอื่นๆ เช่นในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งของต่อมไทรอยด์ หรือในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูกในขณะที่ต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกัน

จากการศึกษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในหนูทดลองพบว่าหนูมีความผิดปกติในระบบทางเดินหายใจเป็นอย่างมาก น้ำหนักลด และมีการขยายตัวของปอดเนื่องจากความยืดหยุ่นเสียไป มีการหลุดลอกของเซลล์ และการตายของเนื้อเยื่อทำให้มีการสะสมของเยื่อเมือกในระบบทางเดินหายใจเป็นจำนวนมากและมีการอักเสบของถุงลม (Forgacs et al., 1983)

การเกิดโรค cryptosporidiosis ติดต่อกันเป็นเวลานานในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องอาจมีการลุกลามของเชื้อจากลำไส้เข้าสู่ตับและท่อน้ำดีตลอดจนท่อของตับอ่อนทำให้ผู้ป่วยเกิดการอักเสบของถุงน้ำดี (cholecystitis) การอักเสบของท่อน้ำดี (cholangitis) และตับอ่อนอักเสบ (pancreatitis) นอกจากนี้การระบาดของโรค cryptosporidiosis ครั้งใหญ่ในเมือง Milwaukee สหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1993 ภายหลังจากการระบาด 1 ปี พบผู้ป่วยที่มีอาการของโรคทางเดินน้ำดีร่วมด้วยมีอัตราการเสียชีวิตสูงกว่าที่มีการติดเชื้อที่ลำไส้เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผู้ที่เสียชีวิตส่วนใหญ่มีระดับ CD4+lymphocyte ต่ำกว่า $50/\text{mm}^3$

วิธีการตรวจเพื่อการวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium*

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

การตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* ในอุจจาระ

การตรวจหา oocyst ในอุจจาระเริ่มขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ.1978 โดย Polenz และคณะได้ทำการย้อมสีอุจจาระลูกวัวที่เป็นโรคด้วยสี giemsa ต่อมาในปี ค.ศ. 1980 Tgipori และคณะได้ใช้สีชนิดเดียวกันย้อมสีอุจจาระจากผู้ป่วยแม้ว่าสี giemsa จะแยกความแตกต่างของ oocyst ออกจากส่วนอื่นๆ ของอุจจาระได้ แต่ความชัดเจนในการตรวจหายังมีจำกัด อย่างไรก็ตามภายหลังมีผู้พัฒนาวิธีย้อมสีหลากหลายชนิด ซึ่งสีที่นิยมใช้มากที่สุดคือ การย้อมด้วยวิธี modified acid fast ซึ่งสีดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างของ oocyst ออกจาก yeast ซึ่งมีขนาดรูปร่างใกล้เคียงกันได้ได้อย่างชัดเจน 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 แล้วยังมีผู้คิด

วิธีย้อมสี 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, 1984) นอกจากนี้สีอื่นๆ ที่มีผู้ทดลองย้อม oocyst แต่ให้ผลไม่ดีแม้จะแยก oocyst ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ในอุจจาระได้ เช่นสี periodic acid-Schiff (Garcia, 1983) สี trichrome สี methylene-eosin สี Gram (Angus et al., 1981) เป็นต้น สำหรับการย้อมด้วยสีเรืองแสง (fluorochrome stains) นั้นเนื่องจากไม่สามารถเห็นรายละเอียดภายใน oocyst ได้ ดังนั้นในบางครั้งจำเป็นต้องใช้สีย้อมชนิด acid-fast ตรวจสอบยืนยันอีกครั้ง (Kawamoto et al., 1987) สำหรับการย้อมสีพิเศษสามารถทำการย้อมอุจจาระที่ยังสดและที่มีการทำให้คงสภาพเดิมโดยการเติมสารละลายยาล้าง 10% formalin และ sodium acetate-acetic acid-formalin (SAF) หรือ polyvinyl alcohol (PVA) แต่ไม่นิยมใช้เพราะไม่สามารถเข้ากันได้กับขั้นตอนในการย้อมสีพิเศษ

การตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* จากการตัดชิ้นเนื้อเยื่อ

การตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* โดยการตัดชิ้นเนื้อเยื่อเป็นการตรวจหาระยะการเจริญเติบโตของเชื้อภายในเซลล์ (endogenous developmental stages) การติดเชื้อ *Cryptosporidium* ที่มีการวินิจฉัยในสัตว์และในคน ดังนั้นในระยะแรกๆ ที่ยังไม่ทราบการย้อมสีเพื่อหา oocyst ในอุจจาระจำเป็นต้องอาศัยวิธีนี้โดยการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสีทนกรด สีของ hematoxylin และ eosin หรือ ย้อมด้วยสี giemsa อย่างไรก็ตามการใช้สีย้อมอื่นๆ ที่มีการทดสอบนั้นก็ไม่ได้ให้ผลวินิจฉัยระยะต่างๆ ของเชื้อดีขึ้น ดังนั้นในการศึกษารายละเอียดของเชื้อ ต้องอาศัยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Lager & Landas, 1991)

อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จำเป็นต้องทำให้เซลล์คงสภาพเดิมมากที่สุด จึงต้องผ่านขั้นตอนการรักษาสภาพเซลล์ที่ค่อนข้างยุ่งยาก นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการวินิจฉัยที่สูง ใช้เวลานานในการวินิจฉัย และขาดความไวในการตรวจ เพราะระยะต่างๆ ของเชื้อในเนื้อเยื่อมีขนาดเล็กมากในขณะที่เดียวกันการตรวจวินิจฉัยแบบนี้ไม่สามารถแยก species ของเชื้อได้ ดังนั้นการใช้เทคนิคการตรวจดังกล่าวเหมาะสำหรับการศึกษาทางพยาธิวิทยาของโรค และเกี่ยวกับการศึกษาทางโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ จึงไม่เหมาะกับการตรวจวินิจฉัยทั่วไป

การตรวจโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

การวินิจฉัยการติดเชื้อ *Cryptosporidium* โดยการตรวจทางอิมมูโนวิทยาเพื่อหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองต่อเชื้อ *Cryptosporidium* อย่างไรก็ตามการตรวจพบแอนติบอดีไม่เป็นเครื่องแสดงถึงการติดเชื้อในขณะที่ตรวจพบแอนติบอดีดังกล่าวเนื่องจากระดับแอนติบอดีจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อโรคได้ดำเนินไประยะหนึ่งแล้วและแอนติบอดีดังกล่าวสามารถคงอยู่ได้นานมากกว่า 12 เดือน ดังนั้นวิธีทางอิมมูโนวิทยาจึงมีประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยามากกว่าการวินิจฉัยผู้ที่กำลังติดเชื้อ วิธีที่ใช้ในการตรวจมีได้หลายวิธี เช่น immunofluorescence (IF) (Sterling, 1986), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Whitmir, 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, 1990) เทคนิคในการลอยตัวนั้น ถ้าให้ได้ผลดีให้ใช้สารละลายอิ่มตัวที่มีความถ่วงจำเพาะสูง แต่ต้องทำการทดสอบทันทีหลังจากเตรียมสารละลายเสร็จ เพราะถ้าทิ้ง oocyst ไว้ในสารละลายนานจะมีผลทำให้ลักษณะของ oocyst มีลักษณะผิดปกติไปได้ยากแก่การวินิจฉัย หลังจากทำให้ปริมาณของ oocyst มีความเข้มข้นขึ้นแล้ว นำมาตรวจวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase-contrast โดยใช้กำลังขยาย 200-400 เท่า ซึ่งจะทำให้เห็นรูปร่าง oocyst ของ *Cryptosporidium* มีลักษณะแวววาว ตรงกันข้ามกับพื้นหลัง โดยทั่วไปในแต่ละ oocyst มี granule บรรจุอยู่ภายใน ซึ่งจะเห็นเป็นสีดำวาว สำหรับการศึกษารูปร่างของ oocyst ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด interference-contrast พบว่าเหมาะสมกับการศึกษาโครงสร้างภายใน

ของ oocyst โดยพบลักษณะของ sporozoite และ residual bodies การตรวจหา oocyst ในอุจจาระสามารถทำการตรวจวินิจฉัยหลังจากกระบวนการ floatation หรือ sedimentation ได้โดยนำอุจจาระที่ผ่านการ flotation หรือ sedimentation ดังกล่าวมาทำการย้อมสีต่างๆ เช่น สี acid-fast จะทำให้มีความไวในการตรวจสูงยิ่งขึ้น

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 ซึ่งต่อมามีการศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเพิ่มมากขึ้น 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 โดยทั่วไปลักษณะโครงสร้างของโครโมโซมที่ปลายทั้งสองข้าง ประกอบด้วย telomere ที่มีคล้ายคลึงกับโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสอื่นๆ ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบสที่ซ้ำกันเป็นชุดเรียงต่อกัน (tandem repeated sequence)

สำหรับการวิเคราะห์ยีนของ *Cryptosporidium* ยังมีการศึกษาค่อนข้างจำกัดอย่างไรก็ตามยีนที่พบส่วนใหญ่ เป็นยีนที่มีชุดเดียวต่อ genome (single copy gene) เช่น thrombospondin-related adhesion protein (TRAP-C1) (Sulaiman, 1998) *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) (Spano, 1979) เป็นต้น สำหรับยีนที่มีหลายชุด ต่อ genome ที่สำคัญและมักใช้ในการหาชนิดของเชื้อตลอดจนการวินิจฉัยคือ small subunit ribosomal RNA หรือ 18S rRNA (SSU rRNA) gene (Morgan et al., 1997)

ในระหว่างการสังเคราะห์โปรตีน ข้อมูลทางพันธุกรรมถูกส่งผ่านมาในรูปของ mRNA และการสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้นบน intracellular particle ที่เรียกว่า ribosome ซึ่งเป็น nucleoprotein ประกอบด้วยเอ็นไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีน ribosome ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย และถูกกำหนดชนิดจากตัวเลขที่แสดงถึงระดับความเร็วที่ใช้ในการตกตะกอน ribosome ของ eukaryotic cell ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยคือ 40S และ 60S

40S ประกอบด้วย 18S rRNA และโปรตีนอีก 30 ชนิด

60S ประกอบด้วย 5.8S และ 28S rRNA รวมทั้งโปรตีนอีก 50 ชนิด

เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อ *Cryptosporidium* species ต่างๆ ในส่วนของ SSU rRNA gene พบว่าประกอบด้วยส่วนที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสสูง (conserved regions) และส่วนที่มีความแตกต่างของลำดับเบส (variable regions) ระหว่าง species ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับเบสของ SSU rRNA gene นอกจากจะมีประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อ *Cryptosporidium* แล้วยังสามารถใช้ส่วนของ gene ดังกล่าวในการจำแนก species ของเชื้อ *Cryptosporidium* เพื่อการวิจัยต่อไป

การตรวจวินิจฉัยสารพันธุกรรมของเชื้อ *Cryptosporidium* ทำได้โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยทั่วไป DNA มีลักษณะเป็นสายคู่ ซึ่งแต่ละสายจับคู่กันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่มีความจำเพาะต่อกัน (complementary) โดยเบสชนิด thymine สามารถจับคู่กับเบสชนิด adenine และเบสชนิด cytosine มีความจำเพาะกับเบสชนิด guanine ความสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาย DNA แบบจำเพาะนี้ ทำให้สามารถสร้าง DNA สายใหม่ โดยลอกแบบ DNA ต้นแบบได้เหมือนกับสายเดิมทุกประการ วิธี PCR สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองได้อย่างมาก ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (Saiki et al, 1988) โดยใช้ DNA ต้นแบบจำนวนเล็กน้อยเท่านั้น โดยในแต่ละขั้นตอน (แต่ละรอบ) ของปฏิกิริยาจะมีการเพิ่มปริมาณ DNA เท่ากับ 2^n โดย n เท่ากับจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าเริ่มปฏิกิริยาโดยใช้ DNA ต้นแบบ 1 สาย จะได้ผลิตผล DNA จำนวน 3.4×10^{40} สาย

หลักการของวิธี PCR นี้โดยเริ่มจากการแยกสาย DNA สายคู่ให้เป็น DNA สายเดี่ยวด้วยความร้อน เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบส หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงในระดับที่ primer ซึ่งเป็น oligonucleotide สายเดี่ยวมาจับอย่างจำเพาะกับ DNA ต้นแบบ ในตำแหน่งที่มีลำดับเบสที่ complementary กับ primer และอาศัยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในการสร้างสาย DNA สายใหม่ที่มีลำดับเบสเหมือนกับสาย DNA ต้นแบบ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติพิเศษคือ สามารถทนความร้อนและทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิสูงประมาณ $65-75^{\circ}\text{C}$ โดยที่เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ได้จากแบคทีเรียชื่อ *Thermus aquaticus* (Brock & Freeze, 1969) นอกจากนี้การประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อเพิ่มและลดอุณหภูมิโดยอัตโนมัติ (automated thermal cycler) ทำให้วิธี PCR ได้รับการประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวาง

เทคนิคการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR จำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

1. DNA เป้าหมาย (target DNA)
2. Thermostable DNA polymerase
3. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)
4. Oligonucleotide primer 1 คู่
5. สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ในการสังเคราะห์ DNA โดยวิธี PCR เป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆ รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การแยกสาย DNA ต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิ 90-95° C

ขั้นตอนที่ 2 digonudeotide primer จับคู่กับ DNA ต้นแบบ (primer annealing) ตรงบริเวณที่มีลำดับเบสที่ complementary กัน โดยต้องมีการลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับเหมาะสม

ขั้นตอนที่ 3 การสร้าง DNA สายใหม่ (primer extension) โดยสร้างในทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยเอ็นไซม์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้เกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 70-74° C

สิ่งสำคัญในการออกแบบใช้ primer คือ ต้องคำนึงถึงความยาวของ primer ซึ่งควรมีความยาว 20-30 nucleotide ประกอบด้วยเบสชนิด guanine และ cytosine ประมาณร้อยละ 50-60 ควรหลีกเลี่ยงการใช้ primer ที่มี polypyrimidine หรือ polypurine การเรียงลำดับของ nucleotide ต้องมีความจำเพาะ และในส่วนของบริเวณปลาย 3' ของ primer ไม่ควรมีลำดับเบสที่เป็น complementary กัน เพื่อป้องกันการเกิดจับคู่กันเองของ primer (primer-dimer) การเรียงลำดับ nucleotide ของ primer แต่ละส่วนไม่ควรมีลำดับเบสที่เหมือนกันเมื่ออ่านจากทิศทาง 5' ไปทาง 3' และ 3' ไปทาง 5' (palirndromec sequence) เพื่อป้องกันปลาย 3' งอมาจับกับ primer สายเดี่ยวกันเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิของ primer อุณหภูมิหลอมตัว (melting temperature, T_m) ของ primer ควรใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วง 50-80° C ค่า T_m สามารถคำนวณโดยใช้สูตรง่ายๆ คือ T_m เท่ากับ $4(G+C) + 2(A+T)$ สุดท้ายเป็นการปรับระดับความเข้มข้นของ primer ให้เหมาะสมซึ่งควรอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 ไมโครโมล ถ้ามากเกินไปทำให้โอกาสการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) เพิ่มขึ้นหรือทำให้เกิดผลผลิตจากวิธี PCR ที่ต้องการลดลง

Taq DNA polymerase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1.0-2.5 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตร การใช้ปริมาณเอ็นไซม์สูงเกินไป นอกจากสิ้นเปลืองแล้วยังก่อให้เกิดผลผลิตจากวิธี PCR ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น

Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ที่ใช้ในวิธี PCR ควรมีค่า pH เท่ากับ 7 และความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดอยู่ในช่วง 50-200 ไมโครโมล

บัฟเฟอร์สำหรับ PCR ที่นิยมใช้คือ 10-15 มิลลิโมล Tris-HCl pH 8.3-8.8 และ KCl มีความเข้มข้นประมาณ 50 มิลลิโมล KCl ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งในการเกิด primer annealing ซึ่งถ้ามีปริมาณของ KCl มากเกินไปทำให้ไปลดการทำงานของ *Taq* DNA polymerase

การเลือกใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้น primer annealing ขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนของ nucleotide ที่เป็นองค์ประกอบของ primer อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า T_m ประมาณ 5°C และควรคำนึงถึง *Taq* DNA polymerase สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ $68-85^\circ\text{C}$ อุณหภูมิไม่ควรต่ำเกินไป ถึงแม้ว่าสามารถเกิด primer annealing ได้ แต่อาจก่อให้เกิด mispriming หรือ misextension ได้สำหรับระยะเวลาของการ annealing ใช้ระยะเวลาเพียงไม่กี่วินาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างสาย DNA ใหม่ขึ้นอยู่กับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของ DNA ต้นแบบ โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ 72°C เนื่องจากเป็นระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ *Taq* DNA polymerase โดยอัตราการสร้างสาย อยู่ในช่วง 35-100 nucleotide ต่อวินาที ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของ nucleotide เป้าหมาย ความเข้มข้นของเกลือ และระดับความเบกรดต่างของบัฟเฟอร์

การตั้งอุณหภูมิต่ำหรือใช้ระยะเวลาน้อยไปในขั้นตอนการแยกสายคู่ของ DNA ให้เป็นสายเดี่ยวทำให้เกิดไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้ปริมาณผลผลิตจาก PCR ที่ควรได้ลดลง แต่ถ้าใช้อุณหภูมิที่สูงและเวลาที่ใช้มากเกินไปทำให้เอ็นไซม์เสียสภาพได้ ช่วงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมประมาณ $90-95^\circ\text{C}$ เวลา 30 วินาที แต่ถ้า DNA ต้นแบบมี guanine และ cytosine จำนวนมาก อาจต้องใช้อุณหภูมิสูงขึ้น

ปัจจัยอื่นๆ ที่สามารถมีผลกระทบต่อ PCR เช่น ความสะอาดของอุปกรณ์ น้ำที่ใช้ควรมีความบริสุทธิ์สูง ในขั้นตอนการตกตะกอน DNA ถ้ามี ethanol ปนเปื้อนมีผลยับยั้งการทำงานของ *Taq* DNA polymerase โดย ethanol ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 สามารถยับยั้งการทำงานของ *Taq* DNA polymerase ได้ร้อยละ 90

ต่อมาได้มีการประยุกต์การทำปฏิกิริยา PCR เช่น Nested PCR เป็นการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR จำนวน 2 ครั้ง โดยในการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 2 อาศัยผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาในครั้งแรกเป็น DNA ต้นแบบ และใช้ primer ที่สามารถจับอย่างจำเพาะ กับ DNA ในบริเวณที่ถัดเข้ามา ด้านในจาก primer คู่แรก ผลผลิตที่ได้จะมีความจำเพาะมากขึ้นและสามารถลดผลผลิตที่ไม่มีความจำเพาะ (non-specific product) สำหรับวิธี Semi-nested PCR เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR 2 ครั้งเช่นกันโดยในการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 2 ใช้ primer ที่สามารถจับถัดเข้ามาด้านในจาก primer ในปฏิกิริยาครั้งแรก

การวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA (DNA sequencing)

วิธีการหาลำดับเบสของ DNA มีหลักการวิเคราะห์ 2 วิธีได้แก่

1. การหาลำดับเบสโดยการติดฉลากที่ปลาย DNA และใช้สารเคมีทำลาย nucleotide ในตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อชนิดของเบส (sequencing of end-labelled DNA by base-specific chemical cleavage)

ในปี 1977 Maxam และ Gilbert เป็นผู้ริเริ่มวิเคราะห์การหาลำดับเบส โดยอาศัยหลักการใช้สารเคมีทำลายเบสของ DNA ในตำแหน่งของเบสจำเพาะบางตำแหน่งเหลือเพียง deoxyribose ซึ่งต่อมาจะเกิดการขาดของสาย DNA ดังกล่าว ในตำแหน่งของเบสที่จำเพาะ ในการติดตาม DNA โดยการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น ^{32}P ที่ปลายด้านหนึ่งของ DNA ต้นแบบ ซึ่งขนาดของ DNA สามารถแยกโดยใช้ไฟฟ้ากระแสตรงใน polyacrylamide gel และอ่านลำดับเบสจากแถบที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม X-ray

2. การหาลำดับเบสโดยใช้เอ็นไซม์เพื่อสร้าง DNA สายใหม่ จาก DNA ต้นแบบ (DNA sequencing by enzymatic synthesis) เป็นการพัฒนากการหาลำดับเบสโดย Sanger และ Coulson' (1977) ซึ่งเป็นที่แพร่หลายในปัจจุบันโดยอาศัยหลักการสร้าง DNA สายใหม่ จาก DNA ต้นแบบ (template) สายเดี่ยวโดยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase และ nucleotide ที่ติดฉลากกัมมันตรังสี การสิ้นสุดการสร้าง DNA สายใหม่เกิดขึ้นในตำแหน่งของ dideoxy nucleotide ดังนั้นจึงเรียกวิธีการหาลำดับเบสวิธีนี้ว่าเทคนิค dideoxy chain termination

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยอาศัยหลักการของ dideoxy chain termination สามารถประยุกต์ใช้ในขั้นตอนการติดฉลาก DNA เช่นการใช้ ^{32}P หรือ ^{35}S α -dNTP เข้าไปในสาย DNA ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ และอาศัยคุณสมบัติของปฏิกิริยา PCR โดยวิธีการเปลี่ยนอุณหภูมิ การหาลำดับเบสด้วยวิธี PCR ใช้ primer เพียงด้านเดียว ดังนั้นปริมาณ DNA ไม่เกิดขึ้นแบบ exponential ข้อดีของการหาลำดับเบสโดยวิธีนี้คือ สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องผ่านขั้นตอน recombinant DNA สามารถใช้กับ DNA ที่มีโครงสร้างทุติยภูมิเนื่องจากในปฏิกิริยาใช้อุณหภูมิสูงในการแยกสาย สำหรับข้อเสีย คือ ไม่สามารถแยกลำดับเบสของ DNA ที่มีภาวะปะปนของหลาย allele ออกจากกันได้จากตัวอย่างเดียวกัน

การวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (automated DNA sequencing) เป็นการหาลำดับเบสของ DNA โดยอาศัยหลักการของ dideoxy chain termination ยกเว้นการติดฉลาก DNA จะใช้สารเรืองแสง เช่น dRhodamine dye terminator โดยอาศัยการติดตามการเรืองแสงของสีต่างๆ กัน 4 ชนิด สำหรับเบส 4 ตัว คือ A C G T สีที่ใช้ในการติดฉลากแต่ละตัว จะเรืองแสงในช่วงความยาวคลื่นต่างกัน เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ โดยเบส A สีที่ใช้ในการติด

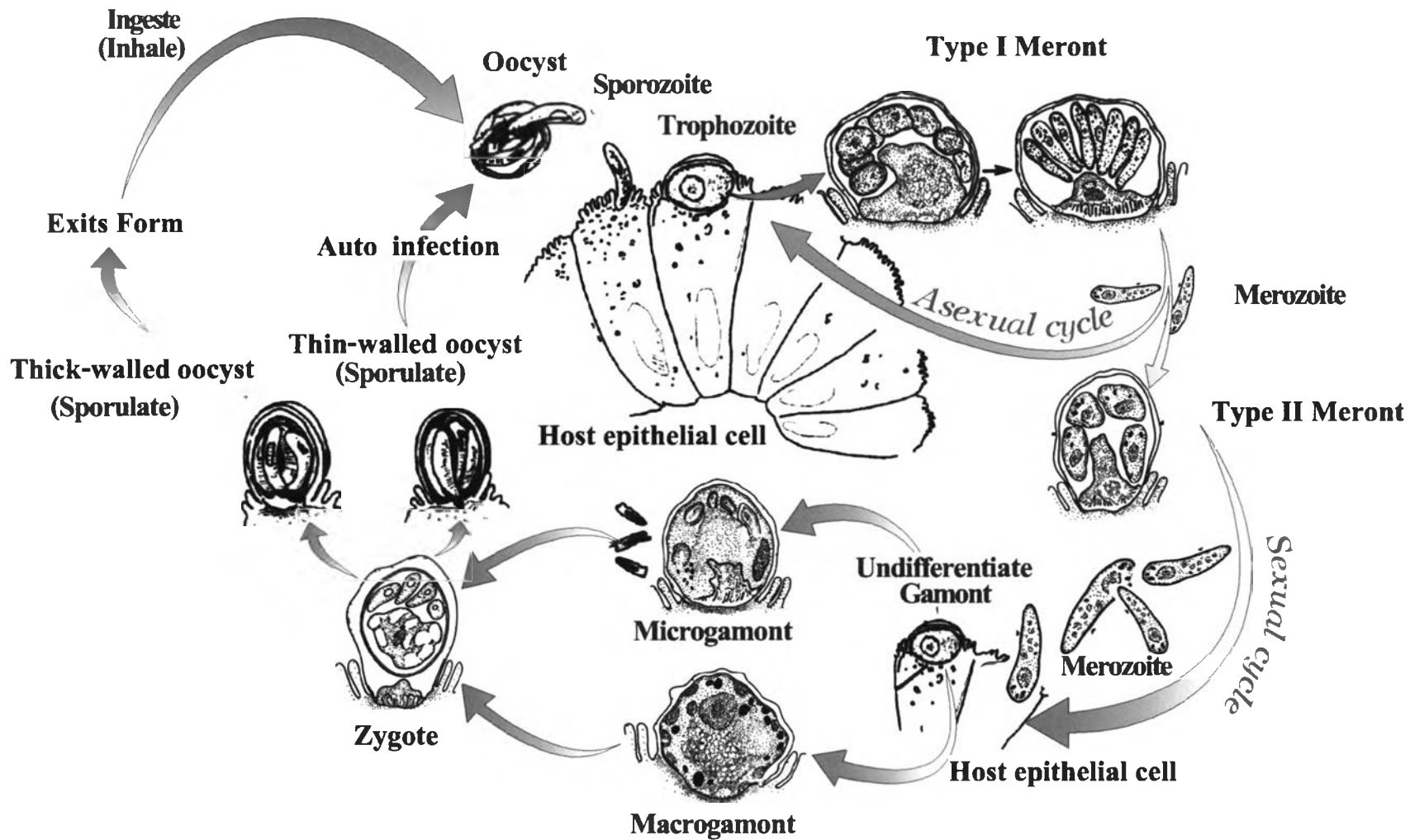
ฉลากคือ dichloro (RbG) ส่วนเบส C สีที่ใช้ในการติดฉลากคือ dichloro (TAMRA) สำหรับเบส G สีที่ใช้ในการติดฉลากคือ dichloro (R110) และเบส T สีที่ใช้ในการติดฉลากคือ dichloro (ROX) และแสงที่ปรากฏจะเห็นเป็นสีเขียว สีดำ สีน้ำเงิน และสีแดง ตามลำดับ ซึ่งโครงสร้างของ dRhodamine dye terminator ดังรูปที่ 2

การติดฉลากสีในสาย DNA จำทำในช่วงการสังเคราะห์สาย DNA โดยติดฉลากที่ปลาย 5' ของ primer (dye primer) หรือที่ปลาย 3' ของ dideoxynucleotide triphosphate (dye terminator) DNA template สามารถใช้ได้ทั้งสายเดี่ยวและสายคู่ และจากผลิตภัณฑ์ของ PCR วิธีนี้จึงสะดวกในการใช้และอันตรายน้อยกว่า เนื่องจากไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี ดังนั้นวิธีการหาลำดับเบสวิธีนี้จะสะดวกรวดเร็ว

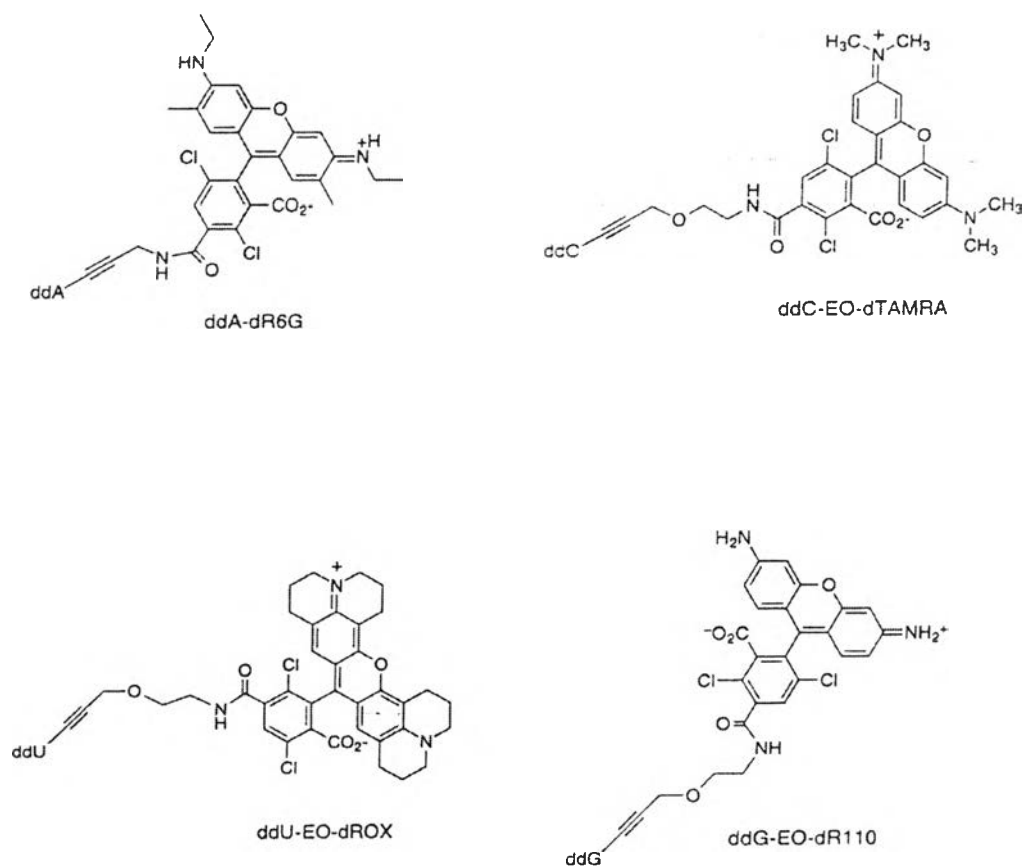
จากการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* มีหลายวิธี เช่น การตรวจหา oocyst ในอุจจาระโดยการย้อมสีพิเศษ หรือจากการตรวจชิ้นเนื้อ เป็นต้น วิธีการดังกล่าวไม่สามารถแยก species ของเชื้อได้ การใช้วิธี PCR นี้เหมาะสมสำหรับการตรวจในรายที่มีเชื้อจำนวนน้อย และการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี การหาลำดับเบส DNA ในส่วนของ SSU rRNA gene สามารถบอกถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *Cryptosporidium* ในระดับ species (Xiao, 1999) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรม ของเชื้อ *Cryptosporidium* ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส HIV ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยใช้เทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับ DNA จากผลการศึกษาจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำคัญในการศึกษาถึงแหล่งที่มาของการติดเชื้อ รวมทั้งทำให้ทราบถึงการแพร่กระจายของเชื้อซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการควบคุมโรคต่อไป

ปี ค.ศ.	ท้องที่ที่มีการระบาด	จำนวนคน(คน)	แหล่งที่มาของเชื้อ
1984	Braun station, TX	2,006	การปนเปื้อนของน้ำเสียในบ่อบาดาล
1987	Carrolton, GA	12,960	น้ำในแม่น้ำที่ขาดการบำบัดรักษา
1989	Swindon/Oxfordshire, UK	516	น้ำในแม่น้ำที่ขาดการบำบัดรักษา
1990	Loch Lamond, UK	442	น้ำในทะเลสาบที่ขาดการบำบัดรักษา
1991	Berks county, US	551	น้ำที่ขาดการบำบัดรักษา
1992	South-west UK	108	การปนเปื้อนในน้ำดื่ม
1992	Jackson county, OR	15,000	น้ำในแม่น้ำที่ขาดการบำบัดรักษา
1992	Yorkshir, UK	125	การปนเปื้อนในน้ำประปา
1992	Brodford, UK	125	การปนเปื้อนในน้ำประปา
1993	Milwaukee, US	403000	น้ำในทะเลสาบที่ขาดการบำบัดรักษา
1993	Waterloo, Canada	มากกว่า 1,000	การปนเปื้อนในน้ำประปา
1993	Central Maine	มากกว่า 150	การปนเปื้อนในน้ำแอมป์เปิล
1994	Kanagawa, Japan	461	การปนเปื้อนในน้ำดื่ม
1994	Walla, US	104	การปนเปื้อนของน้ำเสียในน้ำดี
1994	Oxford, UK	224	การปนเปื้อนในน้ำประปา
1995	Devon, UK	575	ที่เก็บน้ำในชุมชน
1995	Northern Italy	294	ที่เก็บน้ำในชุมชน
1995	South-west UK	575	การปนเปื้อนในน้ำประปา
1996	Kelowna, Columbia	ประมาณ 14,500	น้ำจากทะเลสาบที่ไม่ผ่านการกรอง
1996	Cranbrook, Columbia	ประมาณ 2,097	น้ำจากบ่อที่ไม่ผ่านการกรอง
1996	Northern England	ประมาณ 126	น้ำจากน้ำพุและน้ำบาดาลที่ไม่ผ่านการกรอง
1996	Collingwood, Ontario	ประมาณ 182	ที่เก็บน้ำในชุมชนที่ไม่ผ่านการกรอง
1997	England และ Wales, UK	มากกว่า 4,321	แหล่งน้ำดื่มน้ำใช้หลายแหล่ง (จากการ ระบาดหลายครั้ง)
1999	North-west England, UK	ประมาณ 360	น้ำดื่มน้ำใช้ที่ไม่ผ่านการกรอง

ตารางที่ 2 แสดง การระบาดของเชื้อ *Cryptosporidium* จากแหล่งน้ำต่าง ๆ (Fayer et al., 2000)



รูปที่ 1 แสดงวงจรชีวิตของ *Cryptosporidium* spp. (ดัดแปลงมาจาก Fayer, 1986)



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของ dRhodamine dye terminators