

Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Kwan Phayao Lake, Phayao Province, Thailand Using Microscopic Technique Comparing Direct Wet Mount, Temporary Stain, and Permanent Stain

Touchchapol Mataradchakul* Kritpaphat Tantiamornkul*

ABSTRACT

Cryptosporidium spp. and *Giardia* spp. are intestinal protozoa contaminating food, water, and natural water resources worldwide especially among children under 5 years age leading to death with diarrheal disease. The present study aimed to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in 70 water samples from Kwan Phayao Lake and compare protozoa detection using different staining and standard microscopic methods. The positive results in detecting *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts were 52.86% (37/70) and 21.43% (15/70), respectively. The microscopic identification with DMSO stain was the most efficient for *Cryptosporidium* spp. oocysts while Trichrome

stain was the most efficient for *Giardia* spp. cysts, 42.86% (30/70) and 20% (14/70), respectively. The concordance of *Cryptosporidium* spp. detection under microscope was fair among the three staining methods (Kappa coefficient = 0.291-0.346) whereas detecting of *Giardia* spp. with temporary stain to permanent stain showed good agreement (Kappa coefficient = 0.70). The results of this study could be applied to develop suitable techniques of protozoa detection to survey water source infection.

Keywords: *Cryptosporidium*, *Giardia*, microscope, Kwan Phayao Lake, Phayao Province



บทนำ

คริปโตสปอริเดียม (*Cryptosporidium* spp.) และไกอาร์เดีย (*Giardia* spp.) เป็นโปรโตซัวที่อาศัยอยู่ในเซลล์ผนังลำไส้เล็กของคนและสัตว์¹ พบการปนเปื้อนอยู่ในวงจรอาหาร ในอุจจาระของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม² รวมถึงในธรรมชาติทั้งในแหล่งดินและน้ำ คนได้รับโปรโตซัวโดยการบริโภคอาหารสด น้ำที่มีการปนเปื้อนของโปรโตซัวระยะโอโอซิสต์ และซิสต์ ซึ่งเป็นระยะติดต่อ³ คริปโตสปอริเดียม และไกอาร์เดีย เป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของโรคอุจจาระร่วงและโรคนี้ทำให้เสียชีวิตอันดับ 2 ของโลกในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี⁴ การก่อโรคในผู้ที่ภูมิคุ้มกันปกติจะทำให้เกิดอาการท้องเสียที่ไม่รุนแรงและหายได้เอง ส่วนในผู้ที่ภูมิคุ้มกันบกพร่องจะทำให้เกิดอาการท้องเสียรุนแรงและเรื้อรัง จนทำให้เสียชีวิตได้

กว๊านพะเยาเป็นทะเลสาบน้ำจืดขนาดใหญ่ อันดับ 1 ในภาคเหนือ และอันดับ 3 ของประเทศ เป็นแหล่งน้ำที่สำคัญที่สุดของจังหวัดพะเยาที่ใช้ในการอุปโภค บริโภค และเป็นสถานที่ท่องเที่ยวที่ได้รับความนิยมของจังหวัดพะเยา⁵ จากผลการตรวจสอบและเฝ้าระวังคุณภาพน้ำอย่างต่อเนื่องของสำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 2 จังหวัดลำปาง พบว่า คุณภาพน้ำกว๊านพะเยา อยู่ในเกณฑ์ “เสื่อมโทรม” ถึง “เสื่อมโทรมมาก” เมื่อเทียบกับมาตรฐานคุณภาพแหล่งน้ำผิวดิน โดยสาเหตุส่วนใหญ่มาจากปริมาณสารอินทรีย์ในกว๊านพะเยาที่มีปริมาณมาก ซึ่งเหมาะกับการเป็นแหล่งสะสม และแพร่กระจายของจุลินทรีย์รวมถึงโปรโตซัวที่ก่อโรคทางการแพทย์ที่มีในแหล่งน้ำ เช่น คริปโตสปอริเดียมและไกอาร์เดียด้วย

เทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นเทคนิคสำคัญและเป็นเทคนิคมาตรฐานในการตรวจหาโปรโตซัวจากสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ⁶ โดยมีการย้อมสี

ที่แตกต่างกัน 3 แบบหลัก ๆ คือ วิธีการย้อมสีอย่างง่าย (Direct Wet Mount) เป็นวิธีตรวจที่ง่ายที่สุดซึ่งสามารถตรวจโอโอซิสต์ของคริปโตสปอริเดียม รูปร่างกลมใส ขนาด 4-5 ไมโครเมตร โดยใช้กล้องจุลทรรศน์รวมถึงซิสต์ คล้ายรูปไข่ ขนาด 7-12 ไมโครเมตร และโทรโพซอยต์ คล้ายลูกแพร์ ขนาด 5-14 ไมโครเมตรของไกอาร์เดีย ต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจของผู้ปฏิบัติงาน อีกทั้งไม่สามารถเห็นอวัยวะภายในของโปรโตซัวได้ชัดเจน วิธีการย้อมสีชั่วคราว (Temporary Stain) เป็นวิธีที่สามารถบ่งชี้ชนิดโปรโตซัวได้แม่นยำ เห็นส่วนประกอบของโครงสร้างภายในเซลล์ชัดเจนขึ้น แต่จะไม่เห็นระยะโทรโพซอยต์ และวิธีการย้อมสีถาวร (Permanent Stain) เพื่อให้เห็นส่วนประกอบภายในเซลล์อย่างละเอียด และทำให้สามารถบ่งชี้ชนิดของโปรโตซัวได้แม่นยำขึ้น เช่น คริปโตสปอริเดียม ใช้เทคนิคย้อมสีทกรด (DMSO Stain) ในการย้อมจะทำให้แยกออกจากโปรโตซัวอื่นได้ง่ายเพราะโปรโตซัวชนิดนี้มีความสามารถทนกรดของสีย้อม ส่วนไกอาร์เดียใช้สี Trichrome Stain เมื่อต้องการหาซิสต์ของโปรโตซัวเพื่อแยกชนิดโปรโตซัวในน้ำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทั้งสามวิธีดังกล่าวข้างต้นเป็นวิธีการย้อมสีที่นิยมใช้มากที่สุดเนื่องจากสามารถวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว ง่าย สะดวกและราคาถูกกว่าวิธีการวินิจฉัยอื่น แต่มีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน⁷⁻⁸

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหาความชุกของคริปโตสปอริเดียม และไกอาร์เดียในแหล่งน้ำกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการพบโปรโตซัวดังกล่าว เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันและควบคุม รวมถึงการเปรียบเทียบเทคนิคพื้นฐานในการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสีที่แตกต่างกัน เพื่อให้ทราบถึงวิธีย้อมสีที่ดีที่สุดในการพัฒนาการตรวจหาโปรโตซัวในสิ่งแวดล้อมต่อไป

วิธีการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงสำรวจแบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional Study) เพื่อศึกษาความชุกของคริปโตสปอริเดียม และไกอาร์เดียในแหล่งน้ำกวนพะเยา จังหวัดพะเยา ประเทศไทย และเปรียบเทียบความสอดคล้องกันของเทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยวิธีการย้อมสีอย่างง่าย การย้อมสีซัคราว และการย้อมสีถาวร การเก็บตัวอย่างดำเนินการตั้งแต่เดือนมีนาคม ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561 โครงการวิจัยนี้ไม่ต้องพิจารณาจริยธรรมการวิจัย (Exemption) ของกองจริยธรรมการวิจัยมหาวิทยาลัยพะเยา

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาในครั้งนี้เก็บตัวอย่างครอบคลุมบริเวณ 7 ตำบล รอบกว๊านพะเยา ได้แก่ ตำบลเวียง ตำบลบ้านต๋อม ตำบลสันป่าม่วง ตำบลบ้านสาข ตำบลบ้านต๋อน ตำบลแม่ใส และตำบลแม่ต๋ำ โดยขนาดตัวอย่างคำนวณจากสูตรเพื่องานสำรวจหาความชุกโดยไม่ทราบจำนวนประชากร คำนวณโดยใช้สูตรการหาขนาดตัวอย่างเพื่อประมาณค่าสัดส่วนประชากร⁹

$$n = \frac{[Z^2 \alpha / 2PQ]}{e^2}$$

โดย n = ขนาดตัวอย่าง

α = ความผิดพลาดของการสรุปลักษณะประชากรจากค่าสถิติตัวอย่าง

Z = Confidence Coefficient ได้จากค่าความเชื่อมั่นที่กำหนด ($1-\alpha$) ที่ระดับความเชื่อมน้อยละ 90

P = สัดส่วนอุบัติการณ์การตรวจพบคริปโตสปอริเดียมและไกอาร์เดียในฤดูร้อน เท่ากับร้อยละ 21 คิดเป็น 0.21¹⁰

$$Q = 1-P = (0.79)$$

e = ความกระชับของการประมาณค่ายอมรับการตรวจผิดพลาดได้ ± 10 ตัวอย่างจาก 100 ตัวอย่าง = 0.1

$$\text{จะได้ขนาดตัวอย่าง } (n) = \frac{(1.73)^2(0.21)(0.79)}{0.1^2} = 49.65$$

จากการคำนวณหาขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ทั้งหมดประมาณ 50 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากต้องการทราบการกระจายให้มากขึ้นในแต่ละตำบลรอบกว๊านพะเยา การศึกษาในครั้งนี้จึงได้เลือกศึกษา 70 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 7 ตำบล โดยแบ่งตัวอย่าง และใช้รหัสแทนแต่ละตำบล (ภาพที่ 1) ดังนี้

1. ตำบลเวียง 10 ตัวอย่าง (รหัส 1WN1-10)
2. ตำบลบ้านต๋อม 11 ตัวอย่าง (รหัส 2BM1-11)
3. ตำบลสันป่าม่วง 10 ตัวอย่าง (รหัส 3SM1-10)
4. ตำบลบ้านสาข 10 ตัวอย่าง (รหัส 4BS1-10)
5. ตำบลบ้านต๋อน 10 ตัวอย่าง (รหัส 5BT1-10)
6. ตำบลแม่ใส 16 ตัวอย่าง (รหัส 6MS1-16)
7. ตำบลแม่ต๋ำ 3 ตัวอย่าง (รหัส 7MT1-3)

การเก็บตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทั้งหมด 70 ตัวอย่างให้ครอบคลุมทั้ง 7 ตำบลรอบกว๊านพะเยา แต่ละจุดที่เก็บมีระยะห่าง 100-1,500 เมตร (ภาพที่ 1) (โดยบางจุดมีระยะห่างกันมาก เนื่องจากเป็นเขตพื้นที่ส่วนบุคคล และพื้นที่ที่ยากต่อการเข้าถึง ไม่สามารถเข้าไปเก็บตัวอย่างน้ำได้) และทำการระบุตำแหน่ง GPS ด้วยมือถือแอปพลิเคชัน Google Map วัน เวลา และสถานที่ให้ชัดเจน ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพเบื้องต้น คือ ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย

ในน้ำ (Dissolved Oxygen: DO) พีเอช (pH) ค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) และอุณหภูมิ (Temperature) โดยใช้เครื่อง Multimeter (PCD650) เก็บตัวอย่างน้ำจุดละ 5 ลิตร โดยเก็บใส่ขวดพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ นำตัวอย่างน้ำมาทดสอบหาโปรโตซัวภายใน 1-2 ชั่วโมง ที่ห้องปฏิบัติการ

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ตัวอย่างน้ำที่ได้นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนปริมาณ 1 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

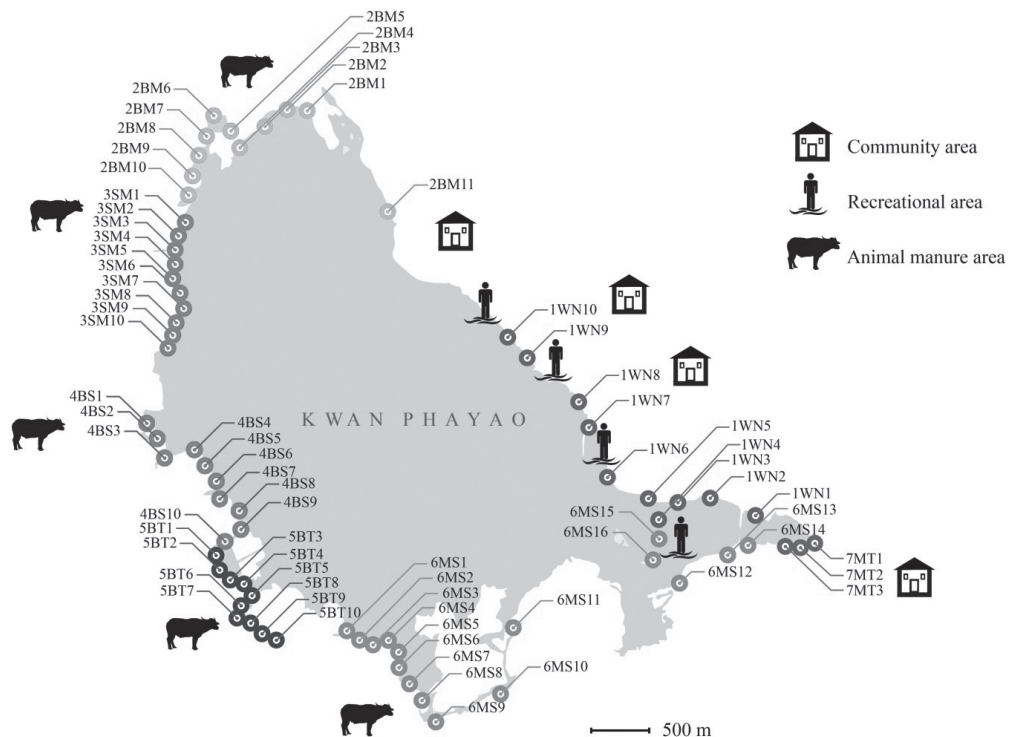


Figure 1 The Study Sites for the Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Water Samples from Kwan Phayao Lake, Phayao Province.

เทคนิคการย้อมสีและการตรวจตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจหาคริปโตสปอริเดียม และไกอาร์เดีย โดยทำการตรวจตัวอย่างด้วยการย้อมสีทั้ง 3 วิธี ยืนยัน 5 ซ้ำของแต่ละตัวอย่าง และทำกลุ่มควบคุมผลบวก (ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่ยืนยันผลทางอนุชีวโมเลกุลแล้ว) และผลลบ (ตัวอย่างน้ำกลั่น

ปราศจากเชื้อ) แต่ละชนิดของการย้อม โดยมีข้อแตกต่างกันที่การย้อมสีถาวร คริปโตสปอริเดียมใช้สี DMSO (Modified Acid-fast Stain) เพราะโปรโตซัวกลุ่มนี้ทนกรด ส่วนไกอาร์เดียใช้สี Trichrome Stain เพื่อให้เห็นส่วนประกอบภายในเซลล์อย่างละเอียด ทำให้สามารถบ่งชี้ชนิดของโปรโตซัวได้แม่นยำขึ้น

- การย้อมสีอย่างง่าย (Direct Wet Mount)

ทำการหยดสารละลายน้ำเกลือ 1 หยดลงบนแผ่นสไลด์ และใช้หลอดหยดดูดตะกอนประมาณ 1-2 หยด หยดตะกอนลงบริเวณที่ได้หยดสารละลายน้ำเกลือไว้ ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทันที

- การย้อมสีชั่วคราว (Temporary Stain)

ทำการหยดกลูคอลีโอไดน 1 หยดลงบนแผ่นสไลด์ และใช้หลอดหยดดูดตะกอนประมาณ 1-2 หยด หยดตะกอนลงบริเวณที่ได้หยดกลูคอลีโอไดนไว้ ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทันที

- การย้อมสีถาวร (Permanent Stain)

DMSO (Modified Acid-fast Stain)

นำตะกอนตัวอย่างมาสเมียร์ลงบนแผ่นสไลด์ เมื่อรอยสเมียร์แห้งแล้วให้เอาด้านหลังของสไลด์ที่ไม่มีรอยสเมียร์ลงผ่านเปลวไฟ 3 ครั้ง หยดด้วยเมทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า ตามด้วยหยด Carbol Fuchsin DMSO 7 นาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า หลังจากนั้นหยดด้วย Malachite Green DMSO 3 นาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

Trichrome Stain

นำตะกอนตัวอย่างมาสเมียร์ลงบนแผ่นสไลด์ พร้อมกับไขขาว เมื่อรอยสเมียร์แห้งแล้วให้เอาด้านหลังของสไลด์ที่ไม่มีรอยสเมียร์ลงผ่านเปลวไฟ 3 ครั้ง ย้อมทับด้วย Schaudinn's Fixative 30 นาที ตามด้วย Tincture of Iodine 1 นาที แล้วล้างออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที 2 ครั้ง หลังจากนั้นย้อมทับด้วย Trichrome Stain 8-10 นาที ตามด้วย Destaining Solution (Acid Alcohol) 5-10 วินาที ล้างออกด้วยเอทิล

แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 1 นาที 2 ครั้ง สุดท้ายนำไปแช่ Xylene เป็นเวลา 1 นาที และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 20.0 โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ค่าเฉลี่ย และร้อยละ การวิเคราะห์ความไว ความจำเพาะของเทคนิคการตรวจวินิจฉัย และหาความสัมพันธ์กันของวิธีการย้อมสีด้วยสัมประสิทธิ์แคปปา (Cohen's Kappa-coefficient)¹¹

ผลการศึกษา

คุณภาพน้ำทางกายภาพของก๊วนพะเยา

ตัวอย่างแหล่งน้ำก๊วนพะเยา ที่ทำการศึกษาทั้งสิ้น 70 ตัวอย่าง จาก 7 ตำบล อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 29 องศาเซลเซียส ค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยเท่ากับ 162.37 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ค่าพีเอชเฉลี่ยเท่ากับ 8.26 และค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำเฉลี่ยเท่ากับ 6.11 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1)

ความชุกของคริปโตสปอริเดียมและไกอาร์เดียในแหล่งน้ำก๊วนพะเยา

ผลการศึกษาพบความชุกของคริปโตสปอริเดียมทั้งหมด 37 ตัวอย่าง (ร้อยละ 52.86) ด้วยวิธีการย้อมสีถาวร (DMSO) มากที่สุด 30 ตัวอย่าง (ร้อยละ 42.86) รองลงมาคือ วิธีการย้อมสีอย่างง่าย 20 ตัวอย่าง (ร้อยละ 28.57) และการย้อมสีชั่วคราว 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.29) ส่วนผลการศึกษาความชุกของไกอาร์เดีย พบ 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ 21.43) โดยการย้อมสีถาวร (Trichrome) พบมากที่สุด 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20) รองลงมาคือ การย้อมสีชั่วคราว 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.29) และการย้อมสีอย่างง่าย 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8.57) (ตารางที่ 2)



Table 1 Physical Parameters of Water from Difference Water Sources in Kwan Phayao Lake, Phayao Province.

Sampling site	Parameter (Mean)			
	Temp. (°C)	Cond. (µs/cm)	pH	DO (mg/L)
1WN (10)	29.06	163.06	8.23	5.14
2BM (11)	29.92	143.01	8.20	6.48
3SM (10)	28.82	147.91	8.21	5.55
4BS (10)	28.59	167.57	8.28	6.18
5BT (10)	29.06	168.09	8.31	6.23
6MS (16)	30.36	178.72	8.31	7.04
7MT (3)	28.90	155.63	8.33	4.20
Total 70	29.38	162.37	8.26	6.11

Note: Temp.; Temperature, Cond.; Conductivity, pH; Potential of Hydrogen ion, DO; Dissolved oxygen

Table 2 Detection Rates of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. by Microscopic Techniques from Difference Water Sources in Kwan Phayao Lake, Phayao Province.

Sampling site (Total)	<i>Cryptosporidium</i> spp.			<i>Giardia</i> spp.		
	Direct wet mount	Temporary stain	DMSO stain	Direct wet mount	Temporary stain	Trichrome stain
	P (%)	P (%)	P (%)	P (%)	P (%)	P (%)
1WN (10)	3 (30)	2 (20)	4 (40)	1 (10)	2 (20)	3 (30)
2BM (11)	4 (36.36)	2 (18.18)	7 (63.64)	1 (9.09)	1 (9.09)	2 (18.18)
3SM (10)	3 (30)	2 (20)	7 (70)	1 (10)	2 (20)	3 (30)
4BS (10)	2 (20)	0 (0)	4 (40)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
5BT (10)	3 (30)	2 (20)	1 (10)	0 (0)	1 (10)	1 (10)
6MS (16)	5 (31.25)	2 (12.50)	7 (43.75)	3 (18.75)	4 (25)	5 (31.25)
7MT (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total 70	20 (28.57)	10 (14.29)	30 (42.86)	6 (8.57)	10 (14.29)	14 (20)

Note: P (%); Positive samples (Percentage of positive samples)

เทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการย้อมสียืนยันผล

การเปรียบเทียบเทคนิคการย้อมสีทั้ง 3 วิธีของคริปโตสปอริเดียมพบว่า เทคนิคการย้อมสีอย่างง่ายต่อการย้อมสีชั่วคราวมีความไว (Sensitivity) มากที่สุดร้อยละ 70 ส่วนความจำเพาะ (Specificity) พบว่าการย้อมสีชั่วคราวต่อการย้อมสีถาวรมากที่สุดร้อยละ 97.50 โกอาร์เดียวพบว่า การย้อมสีชั่วคราวต่อการย้อมสีถาวรมีความไว (Sensitivity) มากที่สุด ร้อยละ 64.29 ส่วนความจำเพาะ (Specificity) พบว่าการย้อมสี

อย่างง่ายต่อการย้อมสีถาวรมากที่สุด ร้อยละ 100 (ตารางที่ 3-4)

ผลการศึกษาความสอดคล้องกันในการตรวจคริปโตสปอริเดียม พบว่า มีความสอดคล้องกันระดับพอใช้ในการย้อมสีทั้ง 3 วิธี สัมประสิทธิ์แคปปาเท่ากับ 0.291-0.346 ในทางตรงกันข้ามพบว่า การตรวจโกอาร์เดียวด้วยการย้อมสีชั่วคราวต่อการย้อมสีถาวรมีความสอดคล้องกันในระดับดีที่ค่าสัมประสิทธิ์แคปปาเท่ากับ 0.70 (ตารางที่ 3-4)

Table 3 Statistical Analysis of Concordance of Three Stains for *Cryptosporidium* spp.

	Direct wet mount vs. Temporary stain			Direct wet mount vs. Permanent stain			Temporary stain vs. Permanent stain		
	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total
Positive	7	12	19	13	7	20	9	1	10
Negative	3	48	51	16	34	50	21	39	60
Total	10	60	70	29	41	70	30	40	70
Concordance of results;									
Percentage[%]/number of samples		78.57	55		67.14	47		68.57	48
Kappa coefficient			0.35			0.29			0.30
Sensitivity %			70			44.83			30
Specificity %			80			82.93			97.50
Positive likelihood ratio			3.50			2.63			12
Negative likelihood ratio			0.38			0.67			0.72
Conclusion	The strength of agreement is considered to be fair.			The strength of agreement is considered to be fair.			The strength of agreement is considered to be fair.		

Note: Kappa coefficient; Strange of agreement (<0.00 Poor, 0.00-0.20 Slight, 0.21-0.40 Fair, 0.41-0.60 Moderate, 0.61-0.80 Good, 0.81-1.00 Almost perfected)



Table 4 Statistical Analysis of Concordance of Three Stains for *Giardia* spp.

	Direct wet mount vs. Temporary stain			Direct wet mount vs. Permanent stain			Temporary stain vs. Permanent stain		
	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total
Positive	5	1	6	6	0	6	9	1	10
Negative	5	59	64	8	56	64	5	55	60
Total	10	60	70	14	56	70	14	56	70
Concordance of results;									
Percentage[%]/number of samples		91.43	64		88.57	62		91.43	64
Kappa coefficient			0.58			0.55			0.70
Sensitivity			50			42.86			64.29
Specificity			98.33			100			98.21
Positive likelihood ratio			30			Infinity			36
Negative likelihood ratio			0.51			0.55			0.36
Conclusion	The strength of agreement is considered to be moderate.			The strength of agreement is considered to be moderate.			The strength of agreement is considered to be good.		

Note: Kappa coefficient; Strange of agreement (<0.00 Poor, 0.00-0.20 Slight, 0.21-0.40 Fair, 0.41-0.60 Moderate, 0.61-0.80 Good, 0.81-1.00 Almost perfected)

อภิปรายผล

จากการศึกษาคุณภาพน้ำต่อการตรวจพบ คริปโตสปอริเดียมและไกอาร์เดีย พบว่า น้ำในแต่ละตำบลมีคุณภาพเสื่อมโทรมมาก โดยให้ผลตรงกับการรายงานของสำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 2 จังหวัดลำปาง พ.ศ. 2559 ที่ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำกว๊านพะเยา รายงานว่า น้ำในพื้นที่นี้จัดอยู่มาตรฐานแหล่งน้ำประเภทที่ 5 คือ เสื่อมโทรมมาก พื้นที่ในแต่ละแหล่งเก็บน้ำมีการเกษตร ปศุสัตว์ และพื้นที่อยู่อาศัยแออัด โดยเฉพาะตำบลเวียง ตำบลบ้านด้อม ตำบลสันป่าม่วง และตำบลแม่ใส ซึ่งตรวจพบ คริปโตสปอริเดียมด้วยวิธีการย้อมสีถาวร (DMSO)

ร้อยละ 42.86 และไกอาร์เดียโดยการย้อมสีถาวร (Trichrome Stain) ร้อยละ 20 สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ได้ทำการสำรวจคริปโตสปอริเดียมจากแหล่งน้ำโดยมีการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพพบว่า สามารถตรวจพบโปรโตซัวในแหล่งน้ำคุณภาพเสื่อมโทรม อีกทั้งยังพบมากที่สุดในบริเวณใกล้กับแหล่งปศุสัตว์ ร้อยละ 32¹²

ผลการศึกษาพบความชุกของคริปโตสปอริเดียม ร้อยละ 52.86 และไกอาร์เดีย ร้อยละ 21.43 ซึ่งมีอัตราความชุกของคริปโตสปอริเดียมสูงกว่างานวิจัยที่ผ่านมาในประเทศไทย เช่น การสำรวจที่แม่น้ำกวังประเทศไทย ที่พบร้อยละ 25¹⁰ รวมถึงการศึกษา

ทางภาคใต้ของประเทศไทย พบเพียงร้อยละ 12.70¹³ และงานวิจัยที่ศึกษาในแม่น้ำเจ้าพระยา และท่าเรือบางปูพบร้อยละ 29¹⁴ ส่วนโกอาร์เดียตรวจพบมากกว่างานวิจัยที่ผ่านมาจากการสำรวจทางภาคใต้ของประเทศไทยที่พบร้อยละ 7.6¹³ ในทางตรงกันข้ามจากการสำรวจที่แม่น้ำกวัง ประเทศไทย สามารถตรวจพบมากกว่าของงานวิจัยนี้ที่ร้อยละ 50¹⁰ สำหรับจังหวัดพะเยามีการศึกษาเพียงอะแคนทามีบาที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำบริเวณชุมชนรอบมหาวิทยาลัยพะเยาเท่านั้น¹⁵ การพบความชุกของโปรโตซัวที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากวิธีการตรวจวินิจฉัย และปัจจัยที่แตกต่างกัน เช่น สภาพภูมิอากาศ และภูมิประเทศในการสำรวจ กิจกรรมทางน้ำ ชุมชนบริเวณรอบแหล่งน้ำ รวมถึงการปนเปื้อนของมูลสัตว์ที่นำมาเลี้ยงบริเวณรอบแหล่งน้ำด้วย^{12, 16-18} จากผลการศึกษาเบื้องต้นของแหล่งน้ำกวังพะเยาพบว่าส่วนใหญ่จะพบตรงแหล่งน้ำที่มีปัจจัยเอื้อนี้ (ภาพที่ 1)

เทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ของตัวอย่างน้ำเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ ถือเป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยโปรโตซัว การศึกษารังนี้ได้ทำการเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสี 3 วิธีคือ การย้อมสีอย่างง่าย การย้อมสีชั่วคราว และการย้อมสีถาวร ซึ่งความจำเพาะทั้ง 3 วิธีมีความแตกต่างกันคือ วิธีการย้อมสีอย่างง่าย ใช้วิธี Fresh Smear เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาระยะโทรโพซอยต์ ส่วนวิธีการย้อมสีชั่วคราวใช้วิธีย้อมด้วยโอโอดิน เป็นวิธีที่สามารถมองเห็นองค์ประกอบภายในชัดเจนขึ้น แต่ไม่สามารถตรวจหาระยะโทรโพซอยต์ได้ และวิธีการย้อมสีถาวรโดยการย้อมสี DMSO (Modified Acid-fast Stain) สามารถตรวจหาระยะโอโอซิสต์ของคริปโตสปอริเดียม และการย้อมสี Trichrome Stain เป็นการตรวจหาซิสต์

ของโกอาร์เดีย ซึ่งวิธีการย้อมอย่างง่าย และการย้อมสีชั่วคราว เป็นวิธีที่ง่าย ประหยัดเวลา และสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็วกว่าการย้อมสีถาวร แต่หากขาดบุคลากรที่ได้รับการฝึกฝนอบรมทักษะอย่างชำนาญในการใช้กล้องจุลทรรศน์ ผลลัพธ์ที่ได้อาจจะไม่แน่นอน และเทคนิคการย้อมสีถาวรเป็นวิธีที่จำเพาะเมื่อเปรียบเทียบกัน 3 วิธี แต่อาจจะต้องใช้เวลาในการย้อมสีนาน รวมถึงใช้สารเคมีที่มีราคาแพง และเป็นสารก่อมะเร็งมากกว่าสองเทคนิคแรก

อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยคริปโตสปอริเดียมและโกอาร์เดียด้วยเทคนิคการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อาจใช้เวลานาน และอาจได้ผลไม่แน่นอน หากขาดทักษะ ความชำนาญ¹⁹⁻²⁰ ดังนั้นเพื่อผลลัพธ์ที่แม่นยำขึ้นควรทำควบคู่ไปกับเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล เช่น Polymerase Chain Reaction (PCR), Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) หรือ Loop Mediated isothermal Amplification (LAMP) เป็นต้น รวมถึงเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เช่น Immunofluorescence Assay ที่เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาโปรโตซัวในสิ่งแวดล้อมของอเมริกา⁶ จะทำให้สามารถวินิจฉัยโรค เพื่อการควบคุมและป้องกันโรคได้ดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยาที่ให้การสนับสนุนสถานที่ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณนางสาวภาวดี สอยดาว และนางสาวกาญจนา อุ่นนันท์ ในการดำเนินการเก็บตัวอย่าง และการทำวิจัย และขอขอบคุณทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560-2561



เอกสารอ้างอิง

1. Slapeta J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? Int J Parasitol 2013; 43(12-13): 957-70.
2. Koompapong K, Mori H, Thammasonthijareern N, Prasertbun R, Pintong AR, Popruk S, et al. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in seagulls, pigeons, dogs, and cats in Thailand. Parasite 2014; 21: 52.
3. Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Plutzer J, Noack MJ, Mahmoudi MR, Karanis P. *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. dissemination during wastewater treatment and comparative detection via immunofluorescence assay (IFA), nested polymerase chain reaction (nested PCR) and loop mediated isothermal amplification (LAMP). Acta Trop 2016; 158: 43-51.
4. World Health Organization. Diarrhoeal disease. Available at <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>, accessed August 20, 2018.
5. Kaewsri K, Traichaiyaporn S. Monitoring on water quality and algae diversity of Kwan Phayao, Phayao Province, Thailand. IJAT 2012; 8(2): 537-50.
6. International Organization for Standardization. ISO 15553: Water quality-isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water, 2006.
7. Neimeister R, Logan AL, Egleton JH, Kleger B. Evaluation of direct wet mount parasitological examination of preserved fecal specimens. J Clin Microbiol 1990; 28(5): 1082-4.
8. Menezes CB, Mello Mdos S, Tasca T. Comparison of permanent staining methods for the laboratory diagnosis of Trichomoniasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2016; 58: 5.
9. Meeker WQ, Hahn GJ, Escobar LA. Statistical intervals: A guide for practitioners and researchers. 2nd ed. New Jersey, John Wiley & Sons. Inc. 2017.
10. Chuah CJ, Mukhaidin N, Choy SH, Smith GJD, Mendenhall IH, Lim YAL, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the water resources of the Kuang River catchment, Northern Thailand. Sci Total Environ 2016; 562: 701-13.
11. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. Educ Psychol Meas 1960; 20(1): 37-46.
12. Sturdee A, Foster I, Bodley-Tickell AT, Arch A. Water quality and *Cryptosporidium* distribution in an upland water supply catchment, Cumbria, UK. Hydrol proces 2007; 21: 873-85.

13. Srisuphanunt M, Karanis P, Charoenca N, Boonkhao N, Ongerth JE. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in environmental waters of southwest coastal areas of Thailand. *Parasitol Res* 2010; 106(6): 1299-306.
14. Koompapong K, Sukthana Y. Seasonal variation and potential sources of *Cryptosporidium* contamination in surface waters of Chao Phraya River and Bang Pu Nature Reserve pier, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012; 43(4): 832-40.
15. Suwancharoen C, Srichoom W. Survey of *Acanthamoeba* in natural water sources in communities around the University of Phayao, Phayao Province, Thailand. *J Public Health* 2017; 47(3): 255-63.
16. Ferguson C, Husman AMDR, Altavilla N, Deere D, Ashbolt N. Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2003; 33(3): 299-361.
17. Pachepsky YA, Sadeghi AM, Bradford SA, Shelton DR, Guber AK, Dao T. Transport and fate of manure-borne pathogens: modeling perspective. *Agric Water Manag* 2006; 86(1-2): 81-92.
18. Tyrrel SF, Quinton JN. Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. *J Appl Microbiol* 2003; 94 Suppl: S87-S93.
19. Goka AK, Rolston DD, Mathan VI, Farthing MJ. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84(1): 66-7.
20. Utzinger J, Botero-Kleiven S, Castelli F, Chiodini PL, Edwards H, Kohler N, et al. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: a comparison among European reference laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(3): 267-73.



ความชุกของคริปโตสปอริเดียม และโกอาร์เดีย ในแหล่งน้ำก๊วนพะเยา จังหวัดพะเยา ประเทศไทย ด้วยเทคนิคการตรวจหาไตกล้องจุลทรรศน์ โดยเปรียบเทียบ วิธีการย้อมสีอย่างง่าย การย้อมสีชั่วคราว และการย้อมสีถาวร

ธัชพล เมธารักษ์กุล* กฤตปภัช ดันตอมรกุล*

บทคัดย่อ

คริปโตสปอริเดียม และโกอาร์เดีย เป็นโปรโตซัวในลำไส้ ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในอาหาร น้ำ รวมถึงในแหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อทั่วโลก เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตด้วยโรคอุจจาระร่วงในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความชุกของคริปโตสปอริเดียมและโกอาร์เดียในตัวอย่างน้ำก๊วนพะเยา จังหวัดพะเยา รวมทั้งสิ้น 70 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบเทคนิคมาตรฐานการตรวจหาโปรโตซัวด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสีที่แตกต่างกัน ผลการศึกษาพบโอโอซิสต์ของคริปโตสปอริเดียมทั้งหมด 37 ตัวอย่าง (ร้อยละ 52.86) โดยวิธีการย้อมสีถาวร (DMSO) พบโปรโตซัวมากที่สุด 30 ตัวอย่าง (ร้อยละ 42.86) ส่วนซิสต์ของโกอาร์เดียตรวจพบ 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ 21.43) โดยการย้อมสีถาวร

(Trichrome) พบโปรโตซัวมากที่สุด 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20) ความสอดคล้องกันในการตรวจหาโอโอซิสต์ของคริปโตสปอริเดียมพบว่า มีความสอดคล้องกันระดับพอใช้ในการย้อมสีทั้ง 3 วิธี สัมประสิทธิ์แคปปาเท่ากับ 0.29-0.35 ในขณะที่การตรวจหาซิสต์ของโกอาร์เดียพบว่า การย้อมสีชั่วคราวต่อการย้อมสีถาวร มีความสอดคล้องกันในระดับดี สัมประสิทธิ์แคปปาเท่ากับ 0.70 ผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการค้นหาโปรโตซัว และพัฒนาเทคนิคที่เหมาะสมเพื่อเฝ้าระวังการติดต่อของโรคจากแหล่งน้ำต่อไป

คำสำคัญ: คริปโตสปอริเดียม, โกอาร์เดีย, กล้องจุลทรรศน์, ก๊วนพะเยา, จังหวัดพะเยา