THJPH

A Survey of *Cryptosporidium* Species and *Giardia duodenalis* in Natural Water Sources in Khung Bang Kachao, Samut Prakan Province, Thailand

Ruthailak Chonwiriyakul[1], Mathuros Tipayamongkholgul[2], Aongart Mahittikorn[3], Varakorn Kosaisavee[1]

THJPH 2021; 51(3): 265-275

Correspondence:
Varakorn Kosaisavee, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Public Health, Mahidol University, Bangkok 10400, THAILAND.
E-mail: varakorn.kos@mahidol.edu

[1] Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Public Health, Mahidol University, THAILAND
[2] Department of Epidemiology, Faculty of Public Health, Mahidol University, THAILAND
[3] Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, THAILAND

Received: March 30 2021;
Revised: June 22 2021;
Accepted: July 6 2021

Extended Abstract

Intestinal waterborne protozoa typically cause diarrhea and persist as a public health problem. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* are mostly found in natural water sources, especially in agricultural areas. The transmission of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* occurs by ingesting (oo)cysts either by the fecal-oral route or via feces-associated contamination. These parasites can be found in both humans and animals. To date, there have been many reports of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* contamination in many areas of Thailand, such as natural ponds, rivers including Bang Pu recreational center (Brackish water) and Chao Phraya River, the main river of central Thailand. Khung Bang Kachao is one of the reserved areas that was formed by the curving of the Chao Phraya River. All canals in Khung Bang Kachao are connected within the area and the water goes in and out by sluices which depend on the tide of Chao Phraya River. As a result, the water inside this area could possibly collect dirt or contamination which may cause a waterborne protozoa epidemic. This led the researchers to question whether the water source in this area could possibly have *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* contamination and subsequently affect human health. Therefore, this research study aimed to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in natural water sources in Khung Bang Kachao, Samut Prakan Province, Thailand.

The water sampling collection sites were chosen by using a purposive sampling technique. From March to July 2020, 40 samples of surface water were collected from 29 of 47 canals in six sub-districts. The temperature and pH of all collected samples were measured at the collection sites. A total of 20L per sample was filtered using a cellulose acetate membrane. Sucrose flotation and sedimentation were used to concentrate oocysts of *Cryptosporidium* spp. and cysts of *G. duodenalis*, respectively. The suspension was made for cell lysis by five cycles of freezing and thawing followed by DNA extraction of the suspension. The researchers applied molecular techniques, namely Nested PCR targeting at 18S rRNA and gdh gene for *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis*, respectively. Temperature and pH were not different in each sample.

The study site was located near households, and the surrounding area was quite dirty and malodorous. Interestingly, only one sample (2.5%) of *G. duodenalis* was positive from Bon canal in Bang Kachao sub-district. No *Cryptosporidium*

spp. were found in this study. A previous study showed a high prevalence of *Cryptosporidium* spp. in the rainy season, but unfortunately sample collection was not performed throughout the year. Moreover, the study site was not an agricultural area with the presence of animal hosts that serve as reservoir for infection. Community volunteers routinely maintained water sources by cleaning the dirt and monitoring cleanliness. So, the contamination may be very low. As a result, natural water in this area is clean and can be used for watering plants and vegetables.

The results of this study could form the basis of a database for protozoa surveillance systems in the natural water sources in Khung Bang Kachao, Samut Prakan Province. However, the presence of potential sample collection sites in unreachable or inaccessible areas was a limitation in this study. Also, the volume of water samples may need to be increased to raise the chance of waterborne protozoa detection in future studies. Routine monitoring of waterborne pathogens could be performed to assess the risk for populations, as well as to maintain the quality of natural water sources and the quality of life of people in the nearby communities.

Keywords: Protozoa, *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, Khung Bang Kachao, Natural water

การสำรวจเชื้อ *Cryptosporidium spp.* และ *Giardia duodenalis* ในแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณพื้นที่คุ้งบางกะเจ้า จังหวัดสมุทรปราการ ประเทศไทย

ฤทัยลักษณ์ ชลวิริยะกุล[1], มธุรส ทิพยมงคลกุล[2], องอาจ มหิทธิกร[3], วรากร โกศัยเสวี[1]

THJPH 2021; 51(3): 265-275

[1] ภาควิชาปรสิตวิทยาและกีฏวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[2] ภาควิชาระบาดวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[3] ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

Cryptosporidium spp. และ *Giardia duodenalis* เป็นโปรโตซัวที่ติดต่อผ่านทางน้ำโดยการบริโภคอาหารหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนระยะติดต่อ จากการสำรวจแหล่งน้ำในประเทศไทย พบความชุกของเชื้อโปรโตซัวดังกล่าวในแม่น้ำเจ้าพระยา ซึ่งในพื้นที่คุ้งบางกะเจ้าเกิดจากการโค้งตัวของแม่น้ำเจ้าพระยา ทำให้คลองในพื้นที่มีการเชื่อมต่อกับแม่น้ำเจ้าพระยาโดยตรง อีกทั้งยังเป็นพื้นที่อนุรักษ์สำหรับการท่องเที่ยวเชิงธรรมชาติ งานวิจัยนี้จึงสำรวจความชุกของเชื้อชนิด *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* ในบริเวณพื้นที่คุ้งบางกะเจ้า

การศึกษานี้เก็บตัวอย่างน้ำ 20 ลิตร จากคลองในพื้นที่คุ้งบางกะเจ้าจำนวน 29 คลอง จาก 47 คลอง ในช่วงเดือนมีนาคมถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2563 โดยนำตัวอย่างน้ำกรองด้วย Cellulose acetate membrane และทำให้เข้มข้นโดยวิธีการลอยตัว และการตกตะกอน จากนั้นตรวจหาเชื้อโปรโตซัวโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (Nested PCR) สำหรับเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA และ gp60 และสำหรับเชื้อ *G. duodenalis* ที่ตำแหน่งยีน gdh จากผลการศึกษาไม่พบเชื้อชนิด *Cryptosporidium* spp. แต่พบเชื้อชนิด *G. duodenalis* จำนวน 1 (2.5%) ตัวอย่าง จากคลองบน ตำบลบางกอบัว โดยพบว่าพื้นที่ดังกล่าวมีชุมชนอาศัยอยู่หนาแน่นและน้ำมีกลิ่น จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบเชื้อดังกล่าวมากในฤดูฝนแต่ในการศึกษาครั้งนี้เก็บตัวอย่างน้ำเพียงแค่ฤดูกาลเดียวอาจจะทำให้พบการปนเปื้อนของเชื้อโปรโตซัวได้น้อย อีกทั้งในพื้นที่ศึกษาไม่พบสัตว์รังโรคอันเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนเชื้อในแหล่งน้ำ นอกจากนี้อาสาสมัครในพื้นที่ได้ช่วยดูแลและรักษาความสะอาดของแหล่งน้ำ ส่งผลให้น้ำในพื้นที่มีความสะอาดและสามารถใช้ได้อย่างปลอดภัย

คำสำคัญ: โปรโตซัว, คริปโตสปอริเดียม, ไกอาร์เดีย ดูโอดินอลิส, คุ้งบางกะเจ้า, แหล่งน้ำธรรมชาติ

บทนำ

คริปโตสปอริเดียม (*Cryptosporidium* spp.) และไกอาร์เดีย *(Giardia duodenalis)* เป็นเชื้อโปรโตซัวที่ติดต่อผ่านทางน้ำ ก่อให้เกิดโรค Cryptosporidiosis และ Giardiasis ซึ่งทั่วโลกต่างให้ความสนใจ เนื่องจากมักมีการตรวจพบการปนเปื้อนของโปรโตซัวทั้งสองชนิดนี้ในแหล่งน้ำ นอกจากนั้นโปรโตซัวทั้งสองชนิดนี้มีสัตว์ที่เป็นรังโรคหลากหลายชนิด[1,2] โดย *Cryptosporidium* spp. เป็นโปรโตซัวที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก ปลา เป็นต้น ในปัจจุบันสายพันธุ์ของ *Cryptosporidium* มีประมาณ 40 สายพันธุ์[3] และมีรายงานการตรวจพบ *Cryptosporidium* 20 สายพันธุ์ในมนุษย์[4] โดยเฉพาะ *C. hominis* และ *C. parvum* ที่มักเป็นสายพันธุ์ที่มีการก่อโรคในมนุษย์[5] ส่วน *G. duodenalis* เป็นโปรโตซัวในกลุ่ม Flagellated protozoa[6] ซึ่งในปัจจุบันมีการจำแนกกลุ่มของโปรโตซัวชนิดนี้ได้เป็น 8 กลุ่ม (Assemblage) ซึ่งแบ่งได้เป็น Assemblage A ถึง Assemblage H อย่างไรก็ตาม Assemblage ที่มีการรายงานการตรวจพบในมนุษย์ คือ Assemblage A และ Assemblage B นอกจากมีรายงานการตรวจพบในมนุษย์แล้ว ยังมีรายงานการตรวจพบในแมวและสุนัขอีกด้วย[7]

การติดต่อของ *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* ส่วนมากเกิดจากการบริโภคน้ำหรืออาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อระยะติดต่อ (Oocyst ของ *Cryptosporidium* spp. และ cyst ของ *G. duodenalis*) เมื่อเข้าสู่ร่างกาย ทำให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อบริเวณลำไส้เล็ก จากนั้นจะมีการขับเชื้อระยะติดต่อออกมาทางอุจจาระและหากไม่มีสุขอนามัยส่วนบุคคลที่ดีหรือการจัดการสุขาภิบาลที่ถูกสุขลักษณะจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมต่อไป[8,9]

ในปัจจุบันการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ผ่านการย้อมสีพิเศษ Acid-fast dye และ Immunofluorescence สำหรับ *Cryptosporidium* spp.[5] ในส่วนของ *G. duodenalis* จะสามารถดูด้วยสไลด์สด (Direct wet mount) หรือการย้อมด้วยสี Trichrome ผ่านการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์[10] แต่อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจข้างต้นต้องอาศัยความเชี่ยวชาญในการตรวจ เนื่องจากโปรโตซัวทั้งสองชนิดนี้มีขนาดเล็ก อีกทั้งการตรวจด้วยวิธีดังกล่าวไม่สามารถระบุได้ถึงสายพันธุ์ก่อของเชื้อได้ จึงมีการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลคือ Polymerase Chain Reaction (PCR) มาใช้ในการตรวจหาเชื้อโปรโตซัวดังกล่าว โดยตำแหน่งยีนที่นิยมในการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium spp.* คือ 18S rRNA, Heat shock protein 70 (hsp70), 60 KDa glycoprotein (gp60) และ Dihyrofolate reductase inhibitor (dhfr)[5] ในขณะที่ *G. duodenalis* ยีนที่นิยมนำมาศึกษา ได้แก่ 18S rRNA, glutamate dehydrogenase (gdh), triosephosphate isomerase (tpi) and β-giardin genes[7] ซึ่งนอกจากความไวและความจำเพาะสูงซึ่งเป็นข้อดีของเทคนิค PCR แล้ว ยังสามารถระบุถึงสายพันธุ์ของเชื้อได้อีกด้วย

ที่ผ่านมามีการรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* ในหลากหลายพื้นที่ เช่น ประเทศกรีซ มีรายงานการพบการปนเปื้อนในแหล่งน้ำของ *Cryptosporidium* spp. 47.1% และ *G. duodenalis* 66.2%[11] รวมไปถึงในประเทศจีนที่มีรายงานการพบเชื้อ *Cryptosporidium oocyst* 82.7% และ *G. duodenalis* 98.1% ในแหล่งน้ำสาธารณะที่มีพื้นที่ใกล้กับบริเวณสวนสัตว์[12] ในขณะเดียวกันประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* ในแหล่งน้ำหลากหลายพื้นที่ ได้แก่ บริเวณเขื่อนแม่กวง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการทำเกษตรกรรมมากถึง 1 ใน 3 ของพื้นที่พบความชุกของเชื้อ *G. duodenalis* 51.9 % และพบความชุกของเชื้อ *Cryptosporidum* spp. 25%[13] นอกจากนี้ยังมีการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในบริเวณทางภาคกลางของประเทศไทยคือ แม่น้ำเจ้าพระยา และบางปู โดยแหล่งน้ำบริเวณบางปูเป็นบริเวณที่มีนกนางนวล ซึ่งเป็นสัตว์รังโรคของ *Cryptosporidium* spp. อาศัยอยู่มาก ส่งผลให้พบความชุก 6% และในแม่น้ำเจ้าพระยาพบความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. สูงถึง 11% โดยสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด คือ *C. parvum*[14] จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่ามีรายงานการตรวจพบ *Cryptosporidium* spp. ในแม่น้ำเจ้าพระยา ส่งผลให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะทำการสำรวจแหล่งน้ำที่มีต้นกำเนิดมาจากแม่น้ำเจ้าพระยา ได้แก่ คลองในแหล่งน้ำบริเวณพื้นที่คุ้งบางกะเจ้า ซึ่งงานวิจัยนี้ยังได้ทำการสำรวจเชื้อ *G. duodenalis* ร่วมด้วย เนื่องจากเป็นโปรโตซัวที่สำคัญอีกหนึ่งชนิดที่มีรายงานพบการระบาดในแหล่งน้ำร่วมกับเชื้อ *Cryptosporidium* spp.[15]

คุ้งบางกะเจ้าเป็นบริเวณที่เกิดจากการโค้งตัวของแม่น้ำเจ้าพระยาเป็นระยะทางกว่า 20 กิโลเมตร แบ่งออกเป็น 6 ตำบล ได้แก่ บางกะเจ้า บางกระสอบ ทรงคนอง บางน้ำผึ้ง บางยอ และบางกอบัว ซึ่งคนในพื้นที่ส่วนมากประกอบอาชีพเกษตรกรรม และพื้นที่แห่งนี้เป็นพื้นที่อนุรักษ์ โดยแหล่งน้ำที่เข้าสู่พื้นที่มาจากแม่น้ำเจ้าพระยาเป็นหลักและได้รับอิทธิพลจากน้ำทะเลหนุน เนื่องจากอยู่ใกล้กับปากแม่น้ำ จึงทำให้พื้นที่เป็นแบบ 3 น้ำ คือ น้ำเค็ม น้ำจืด และน้ำกร่อย ส่งผลให้พื้นที่แห่งนี้มีระบบนิเวศที่หลากหลาย ซึ่งมีคลองในพื้นที่มากถึง 47 คลอง ที่เชื่อมติดต่อกันและไหลเข้าออกแม่น้ำเจ้าพระยาอยู่ตลอดเวลา[16] ในปัจจุบันมีการเคลื่อนย้ายประชากรของแรงงานต่างด้าวเข้ามาอาศัยอยู่ในพื้นที่ของคุ้งบางกะเจ้า ซึ่งอาจจะมีการปนเปื้อนเชื้อโปรโตซัวก่อโรค อีกทั้งผู้คนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่มีความใกล้ชิดกับแหล่งน้ำ ทำให้อาจมีการปนเปื้อนเชื้อโปรโตซัวดังกล่าวในแหล่งน้ำบริเวณคุ้งบางกะเจ้าได้ ในพื้นที่คุ้งบางกะเจ้ามีการใช้ประโยชน์จากน้ำคลองในการทำการเกษตรและใช้อุปโภค แต่ไม่มีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคที่ผ่านทางน้ำในพื้นที่นี้ ทางผู้วิจัยและผู้ดูแลการจัดการแหล่งน้ำธรรมชาติของพื้นที่ได้ตระหนักเห็นถึงความสำคัญของการมีข้อมูลพื้นฐานด้านเชื้อก่อโรคในแหล่งน้ำของพื้นที่ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* ในแหล่งน้ำบริเวณ

พื้นที่คุ้งบางกะเจ้า สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการบริหารจัดการแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่คุ้งบางกะเจ้าต่อไป

วิธีการศึกษา

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยแบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional study) โดยใช้การสุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive sampling) จากทั้ง 6 ตำบลในบริเวณพื้นที่คุ้งบางกะเจ้า ในช่วงระหว่างเดือนมีนาคมถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2563 จำนวน 55 ตัวอย่าง จากการคำนวณโดยใช้สูตรการหาขนาดตัวอย่างเพื่อประมาณค่าจำนวนประชากร[17] โดยคำนวณจากค่าความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในแม่น้ำเจ้าพระยาปี พ.ศ. 2555[14]

$$n = \frac{Z^2_{\frac{\alpha}{2}} P(1-P)}{e^2}$$

ซึ่ง n = จำนวนตัวอย่าง

Z = Standard normal score

α = ระดับนัยสำคัญทางสถิติ

P = ความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ที่สูงที่สุดบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา มีค่าเท่ากับ 0.17% [14]

e = ความผิดพลาดในการประมาณค่าความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* สูงสุดที่ยอมรับได้ 10%

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

โครงการนี้ได้รับการยกเว้นการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อวันที่ 8 พฤศจิกายน พ.ศ. 2562

การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง

จากการสำรวจได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากคลองทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ที่สามารถเข้าถึงพื้นที่ได้ โดยเก็บน้ำตัวอย่างละ 20 ลิตร วัดอุณหภูมิ pH และความเค็มของน้ำในแต่ละจุด ตัวอย่างน้ำจะถูกเก็บในตอนเช้า เพียงจุดละ 1 ครั้ง ตามพื้นที่ตำบล ตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2563 โดยแต่ละตำบลจะเก็บตัวอย่างน้ำ 5-9 จุด (Figure 1) ดังนี้ ต.บางกระสอบ เก็บตัวอย่างน้ำจาก คลองวัดบางกระสอบ คลองบางกระสอบ คลองตาแดง คลองตาสัก และคลองลัดบางยอ ต.ทรงคนอง เก็บตัวอย่างน้ำจาก คลองลัดโพธิ์ คลองวัดป่าเกตุ คลองยายบ่าย ต.บางน้ำผึ้ง เก็บตัวอย่างน้ำจาก คลองตาเยื้อน คลองทรง คลองวัดบางน้ำผึ้งนอก คลองบางกะเจ้า ต.บางยอ เก็บตัวอย่างน้ำจาก คลองตาแหวง คลองครูไปร์ คลองบางกะเจ้า คลองมอญ คลองลัดบางยอ ต.บางกะเจ้า เก็บตัวอย่างน้ำจาก คลองสวนหมาก คลองตาหล่อ คลองยายขาบ คลองตาชู คลองตาลิ คลองบางกระเบื้องล่าง คลองบางกระเบื้องบน และ ต.บางกอบัว เก็บตัวอย่างน้ำจาก คลองยายกี คลองแพ คลองบางกะเจ้า คลองหมอสี คลองบน คลองยายเอ็ด คลองเขตเรือบิน คลองบางกอบัว โดยตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างน้ำขึ้นอยู่กับจำนวนคลองในแต่ละตำบลและสภาพพื้นที่ที่สามารถเข้าถึงได้ ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้เลือกจุดเก็บตัวอย่างโดยพิจารณาจากความหนาแน่นของประชากรในบริเวณนั้น ๆ [18] และความลึกของแหล่งน้ำ (ลึกอย่างน้อย 20 เซนติเมตร)[19]

ตัวอย่างน้ำ 20 ลิตร จะถูกนำมากรองผ่าน Cellulose acetate membrane (CA filter) ขนาด 1.2 µm (Sartorius Lab Instruments, Germany) จากนั้นทำการล้างภาชนะที่บรรจุน้ำด้วย Washing buffer pH 7.2 จำนวน 1 ลิตร นำมากรองอีกครั้งด้วย CA filter ทำการล้างกระดาษกรองด้วย Washing buffer pH 7.2 หลังจากนั้นนำตะกอนทั้งหมดมาทำให้เข้มข้นโดยใช้หลักการของการลอยตัว (Flotation) และการตกตะกอน (Sedimentation) ซึ่งอธิบายโดยสรุปดังนี้ นำตะกอนทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายซูโครสที่มีค่าความถ่วงจำเพาะ (ถ.พ.) เท่ากับ 1.3 ในหลอดทดลองตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 1,000 g อุณหภูมิ 8 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายด้านบนปริมาตร 15 มิลลิลิตร มาทำการตกตะกอนโดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,700 g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที[14] โดยปรับปรุงมาจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำตามคำแนะนำของ U.S. Environmental Protection Agency (EPA) method 1623[20] จากนั้นเก็บเฉพาะตะกอนที่บริเวณก้นหลอดทดลองที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

นำตะกอนไปทำให้เซลล์แตก (Cell lysis) โดยกระบวนการทำให้อุณหภูมิสูงและต่ำสลับกัน (Freeze-thaw) ซึ่งทำที่อุณหภูมิ -83°C เป็นเวลา 10 นาที และ 56°C เป็นเวลา 5 นาที สลับกันทั้งหมด 5 รอบ จากนั้นนำตะกอนไปสกัด DNA ตามคู่มือของชุดสกัด (FavorPrep™ Soil DNA Isolation Mini Kit, FAVORGEN) นำ DNA ที่สกัดได้ไปตรวจหา *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลต่อไป

วิธีการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium spp.* และ *G. duodenalis*

ทำการตรวจหา DNA เชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* ด้วยวิธี Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR) โดยทำการหา *Cryptosporidium* spp. ที่ตำแหน่ง 18S rRNA3 และหา *G. duodenalis* ที่ตำแหน่ง Glutamate dehydrogenase (gdh)[21] ซึ่งเป็นตำแหน่งยีนและวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาเชื้อโปรโตซัวทั้งสองชนิดนี้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ[11,22,23] โดยการทำ PCR จะทำ 20 µl / reaction ซึ่งจะใส่ DNA template 1 µl และทำการใส่ KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystem, USA) 10 µl และใส่ primer ความเข้มข้น 10 µM ลงไปเส้นละ 1µl โดยการทำ PCR รอบที่ 2 ก็เตรียมเช่นเดียวกันกับรอบแรกเพียงแต่เปลี่ยนจากการใส่ DNA template เป็นการใส่ PCR product จำนวน 1 µl

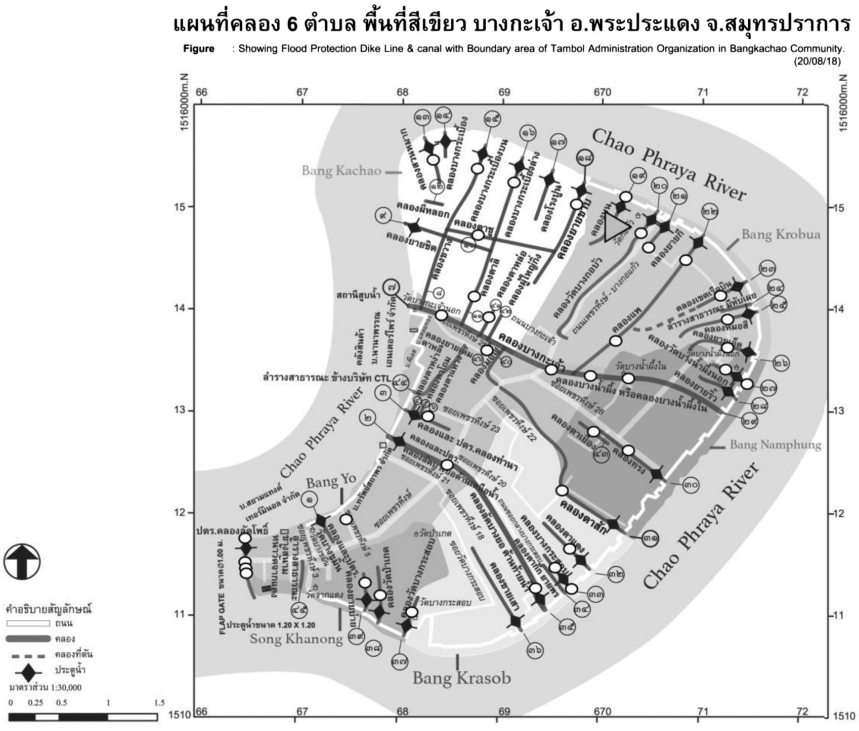

Figure 1 Map of Khung Bang Kachao, Samut Prakan Province, showing the locations of collected water samples (dot) from each canal. The *Giardia duodenalis* positive sample is depicted by the triangular shape[38].

ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA มีอุณหภูมิและขั้นตอนที่เหมือนกันทั้ง 2 รอบ ดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 64 °C เป็นเวลา 15 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย Final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจการเพิ่มจำนวนของ DNA ด้วยวิธี วิธีอะกาโรสเจลอีเล็คโตรโฟริซีส (Agarose gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย SERVA DNA stain G (Serving Scientist, Germany) ใช้ความต่างศักย์คงที่ 110 โวลต์ นาน 45 นาที แล้วทำการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของ DNA เป้าหมายด้วยเครื่อง UV-Transilluminator เพื่อทำการวิเคราะห์ผล

ผลการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวนทั้งสิ้น 29 คลอง จากทั้งหมด 47 คลองในคุ้งบางกะเจ้า โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำ 40 ตัวอย่าง จากการวัดอุณหภูมิและค่า pH ของน้ำพบว่า มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 28.0 °C ถึง 30.0 °C และมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.60 ถึง 6.80 ตามลำดับ ค่าความเค็มของน้ำจากที่วัดได้อยู่ในช่วง 2-3 ppt ซึ่งประชาชนในพื้นที่กล่าวว่า สามารถนำไปรดน้ำต้นไม้ได้ ตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำในการศึกษาครั้งนี้ส่วนมากเป็นคลองที่สะอาด อย่างไรก็ตามคลองในบริเวณพื้นที่ที่ใกล้กับชุมชนบางแห่งมีความสกปรกเนื่องจากพบเศษขยะลอยอยู่ในบริเวณผิวน้ำ ในการเก็บตัวอย่างมีบางตำแหน่งที่ไม่สามารถเข้าไปเก็บตัวอย่างได้ เนื่องจากเป็นพื้นที่ส่วนบุคคลและบางพื้นที่มีความยากลำบากต่อการเข้าถึง ดังนั้นทำให้บางตัวอย่างที่ทำการศึกษาเก็บมาจากแหล่งน้ำที่มีความห่างไกลจากชุมชน โดยตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่างในงานวิจัยนี้มีลักษณะดังแสดงใน Figure 2

ความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *Giardia duodenalis*

จากการตรวจตัวอย่างน้ำ 40 ตัวอย่าง (Figure 1) โดยใช้เทคนิค Nested PCR ผลการศึกษาไม่พบเชื้อ *Cryptosporidium* spp. แต่พบเชื้อ *Giardia duodenalis* 1 ตัวอย่าง จากจำนวนทั้งสิ้น 40 ตัวอย่าง คิดเป็น 2.5% ผลการศึกษาแสดงใน Figure 3 และบริเวณที่ทำการตรวจพบเชื้อชนิดนี้แสดงใน Figure 4 ซึ่งตำแหน่งที่มีการพบเชื้อ *G. duodenalis* อยู่บริเวณคลองบนในพื้นที่ตำบลบางกอบัว อีกทั้งคลองดังกล่าวเป็นคลองที่มีประตูน้ำ ทำให้ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างน้ำจำนวน 2 ตัวอย่าง แต่ตรวจพบเชื้อ *G. duodenalis* เพียงตัวอย่างเดียว โดยเป็นตัวอย่างน้ำที่เก็บในบริเวณหลังประตูน้ำ

Figure 2 Sample collection study sites

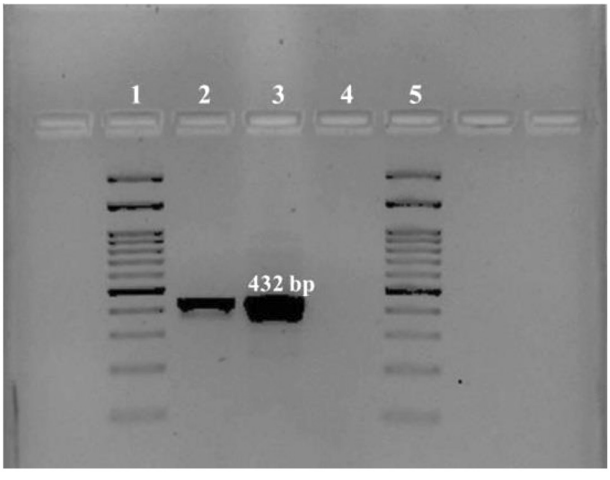

Figure 3 Gel electrophoresis of gdh nested PCR for *G. duodenalis,* PCR product is 432 bp: Lane 1 and 5; 100 bp marker, Lane 2; positive sample, Lane 3; positive control, and Lane 4; negative control.

Figure 4 Study site for *Giardia duodenalis* positive sample (Bon canal, behind sluice, Bang Korbua sub-district, Samut Prakan Province)

อภิปรายผล

จากผลการศึกษาความชุกของ *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* ในแหล่งน้ำธรรมชาติจากทั้ง 6 ตำบล ใน บริเวณคุ้งบางกะเจ้า จังหวัดสมุทรปราการ ระหว่างช่วงเดือนมีนาคม ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2563 เนื่องจากข้อจำกัดทางด้านการเข้าถึงจุดเก็บน้ำและงบประมาณ จึงทำให้ในการศึกษานี้เก็บตัวอย่างน้ำทั้งหมด 40 ตัวอย่างพบว่า ในตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการศึกษาไม่พบความชุกของ *Cryptosporidium* spp. แต่พบความชุกของ *G. duodenalis* 1 (2.5%) ตัวอย่าง จากตัวอย่างน้ำทั้งหมด 40 ตัวอย่าง โดยผลจากงานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากงานวิจัยของ Chuah CJ และคณะ ที่ศึกษาหาความชุกของโปรโตซัวทั้งสองชนิดนี้ทางภาคเหนือของประเทศไทยบริเวณเขื่อนแม่กวง โดยพบความชุกของ *Cryptosporidium* spp. 25% และ *G. duodenalis* สูงถึง 51.9%[13] เนื่องจาก ในพื้นที่มีฟาร์มปศุสัตว์ อีกทั้งยังมีงานวิจัยที่ศึกษาหาความชุกของ *Cryptosporidium* spp. ในแหล่งน้ำทางภาคกลางของประเทศไทยคือ แม่น้ำเจ้าพระยา โดยการศึกษานี้พบความชุกของ *Cryptosporidium* spp. สูงถึง 11.1%[14] จากตัวอย่างน้ำจุดละ 20 ลิตร ซึ่งเก็บน้ำในปริมาตรที่เท่ากันกับการสำรวจในครั้งนี้ การพบความชุกของเชื้อโปรโตซัวทั้ง 2 ชนิดในปริมาณที่น้อยอาจมีสาเหตุมาจากในพื้นที่ดังกล่าวไม่มีการทำฟาร์มปศุสัตว์ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Breternitz BS. และคณะในปี ค.ศ. 2020 ที่ได้อธิบายว่าการทำฟาร์มปศุสัตว์มีความสัมพันธ์กับการปนเปื้อนเชื้อโปรโตซัวในบริเวณผิวน้ำ[24] รวมไปถึงตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่างมีความห่างไกลจากชุมชนและแหล่งที่อยู่อาศัย และมีการเปิดปิดประตูน้ำทำให้มีการไหลของน้ำเข้าออกในพื้นที่ ส่งผลให้ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อโปรโตซัวดังกล่าวหรืออาจจะมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีมาตรฐาน ทั้งนี้ถ้ามีเชื้อปริมาณน้อยมากก็จะไม่สามารถแพร่กระจายโรคได้เช่นกัน

ตัวอย่างน้ำที่เก็บมาทั้งหมดค่อนข้างมีความใสและสะอาด แต่มีบางตำแหน่งที่แหล่งน้ำมีความสกปรก ตัวอย่างน้ำทั้งหมดถูกกรองผ่าน CA filter ที่มีขนาดรูพรุน 1.2 µm โดยขนาดรูพรุนดังกล่าวสามารถที่จะกรองโปรโตซัวทั้งสองชนิดนี้เนื่องจากเชื้อ *Cryptosporidium* spp.มีขนาด 4-6 µm[8] และเชื้อ *G. duodenalis* มีขนาด 8-14 µm[9] ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนที่นำมาใช้ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการกรอง (Oo)cyst ของเชื้อ นอกจากนี้กระบวนการเตรียมตัวอย่างในงานวิจัยนี้ได้มีการปรับการเตรียมตัวอย่างตามคำแนะนำของ U.S. Environmental Protection Agency (EPA) method 1623[20] ซึ่งงานวิจัยนี้น้ำตาลอิ่มตัวค่าความถ่วงจำเพาะของน้ำตาลที่ใช้มีค่า 1.30 เป็นค่าความถ่วงที่สามารถทำให้เชื้อโปรโตซัวสามารถลอยตัวเพื่อทำการกำจัดตะกอนหรือเศษดินออกจากตัวอย่างได้ (Purification) เนื่องจาก *Cryptosporidium* spp. มีค่า ถ.พ. ที่ 1.080 และ *G. duodenalis* มีค่า ถ.พ. ที่ 1.18[25,26] แสดงให้เห็นว่าวิธีการดังกล่าวสามารถกำจัดตะกอนโดยอาศัยค่าความถ่วงจำเพาะได้ และการตรวจหา *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* โดยใช้วิธี Nested PCR ซึ่งใช้วิธีเดียวกับ Koompapong K and Sukthana ที่เก็บตัวอย่างน้ำมาผ่านการกรอง[14] นอกจากนี้วิธีการตรวจโดย Nested PCR เทียบกับวิธีกล้องจุลทรรศน์ พบว่า Nested PCR เป็นวิธีที่มีความไว (Sensitivity) ที่สูงถึง 100% ในการตรวจหา *Cryptosporidium* spp.[27] และสำหรับการตรวจหา *G. duodenalis* มีความไวอยู่ที่ 80-100%[28] โดยวิธีการนี้นิยมใช้ในการตรวจหาเชื้อทั้งสองชนิดนี้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ อีกทั้งวิธีการดังกล่าวยังสามารถตรวจได้ถึงระดับสายพันธุ์รวมไปถึงแหล่งรังโรคได้[3,21] แต่มีงานวิจัยบางแห่งเสนอแนะว่าการเก็บน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาตรวจหาความชุกของเชื้อโปรโตซัวที่ติดต่อผ่านน้ำ อาจจะต้องเก็บน้ำที่มีปริมาตรมากถึง 30-40 ลิตร[29] เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบโปรโตซัวที่มากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตามฤดูกาลยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พบการปนเปื้อนของโปรโตซัวในระดับต่ำในบริเวณที่ทำการศึกษา เนื่องจากงานวิจัยนี้ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูร้อน แต่มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้มีรายงายการพบความชุกของ *Cryptosporidium* spp. ในช่วงฤดูฝน แต่ไม่พบความชุกในช่วงฤดูร้อน[13] ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Koompapong K. และคณะ ที่พบความชุกของ *Cryptosporidium* spp. ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำในช่วงฤดูฝนมากกว่าฤดูร้อน[14] จากงานวิจัยของ Aguirre J. และคณะ ได้มีการกล่าวว่าความหนาแน่นของเชื้อโปรโตซัวจะมีความหนาแน่นที่มากขึ้นภายหลังจากที่ฝนมีการตกและมีการไหลของน้ำเกิดขึ้น[30] ดังนั้นปัจจัยในเรื่องของฤดูกาลและการไหลของน้ำ รวมไปถึงการศึกษาในเชิงปริมาณของการปนเปื้อนเชื้อโปรโตซัวในแหล่งน้ำอาจถูกนำมาศึกษาเป็นลำดับต่อไป

จากการสำรวจในพื้นที่ดังกล่าวพบการปนเปื้อนของเชื้อ *G. duodenalis* จำนวน 1 (2.5%) ตัวอย่าง อาจมีสาเหตุมาจากแหล่งน้ำนี้มีที่อยู่อาศัยและสิ่งปลูกสร้างใกล้กับแหล่งน้ำ โดยมีการปนเปื้อนน้ำเสียจากอาคารบ้านเรือนลงไปสู่แหล่งน้ำ ที่ทำการสำรวจส่งผลให้ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อโปรโตซัวดังกล่าว[31] รวมไปถึงแหล่งน้ำดังกล่าวมีเศษขยะลอยอยู่จำนวนมาก อาจส่งผลให้มีการสะสมของเชื้อ *G. duodenalis* ในพื้นที่ดังกล่าว จากงานวิจัยที่ทำการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis* มักพบการปนเปื้อนของเชื้อ *G. duodenalis* ในปริมาณที่สูงกว่าเชื้อ *Cryptosporidium* spp.[32,33] อันเนื่องมาจากข้อจำกัดในเรื่องความไว ในการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ของวิธี US EPA method 1623[34] รวมไปถึงในปัจจุบันที่มักมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *G. duodenalis* ในคนและสัตว์เลี้ยงมากกว่า *Cryptosporidium* และอาจเป็นสาเหตุให้มีการรายงานการปนเปื้อนในแหล่งน้ำของเชื้อ *G. duodenalis* ในปริมาณที่มากกว่า *Cryptosporidium* นั่นเอง[35,36]

ถึงแม้พบการปนเปื้อนของเชื้อ *G. duodenalis* จำนวน 1 ตัวอย่าง แต่ผลจากการสำรวจครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า คนในพื้นที่ยังคงมีความเสี่ยงในการได้รับเชื้อโปรโตซัวดังกล่าวผ่านการอุปโภคและบริโภค เช่น การรับประทานผักที่มีการปนเปื้อนเชื้อมาจากน้ำที่ใช้ในการรดแปลงผัก[37] หรือได้รับเชื้อจากการลงไปเล่นในแหล่งน้ำ ส่งผลให้เชื้อโปรโตซัวดังกล่าวผ่านเข้าไปในร่างกายและก่อโรคได้ ดังนั้นในพื้นที่ควรมีการจัดการในเรื่องของการกำจัดสิ่งปฏิกูลและขยะมูลฝอยรวมไปถึงการปล่อยน้ำเสียจากอาคารบ้านเรือนเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อโปรโตซัวในแหล่งน้ำ

สรุปผลการศึกษา

พบความชุกของ *G. duodenalis* 2.5% แต่ไม่พบความชุกของ *Cryptosporidium* spp. โดยวิธี Nested PCR ในตัวอย่างน้ำที่เก็บได้จากน้ำคลองในพื้นที่คุ้งบางกะเจ้า สาเหตุที่พบการปนเปื้อนของโปรโตซัวที่น้อย อาจมาจากฤดูกาลที่ทำการเก็บตัวอย่าง รวมไปถึงในพื้นที่ดังกล่าวไม่มีการทำปศุสัตว์ และคนในพื้นที่มีการรักษาความสะอาดในแหล่งน้ำ ส่งผลให้แหล่งน้ำนี้มีความสะอาดสามารถใช้น้ำในการรดน้ำต้นไม้และพืชผักสวนครัวได้ การสำรวจเชื้อโปรโตซัวก่อโรคในแหล่งน้ำธรรมชาติยังไม่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง และต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้การประยุกต์วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำและวิธีการตรวจสามารถใช้เป็นแนวทางในการตรวจหาเชื้อโปโตซัวและเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ๆ ในพื้นที่คุ้งบางกะเจ้าเป็นประจำเพื่อให้สอดคล้องกับการเป็นพื้นที่อนุรักษ์และยังปลอดจากเชื้อก่อโรคอีกด้วย

การมีส่วนร่วมของผู้นิพนธ์

วรากร โกศัยเสวี มธุรส ทิพยมงคลกุล และ องอาจ มหิทธิกร ออกแบบกระบวนการวิจัย ให้คำปรึกษา และแก้ไขร่างบทความวิจัย ฤทัยลักษณ์ ชลวิริยะกุล ดำเนินงานวิจัย เก็บตัวอย่าง ตรวจหาเชื้อทางห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์ผลและเขียนร่างบทความ ผู้นิพนธ์ทุกคนอ่านและตรวจสอบบทความวิจัยก่อนส่งตีพิมพ์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณองค์การบริหารส่วนตำบลทั้ง 6 ตำบล ในบางกะเจ้า ได้แก่ ตำบลทรงคนอง ตำบลบางกระสอบ ตำบลบางน้ำผึ้ง ตำบลบางยอ ตำบลบางกะเจ้า และตำบลบางกอบัว ในการอนุญาตให้เข้าเก็บตัวอย่างน้ำในพื้นที่ ขอขอบคุณ คุณประกิจ รอดเจริญ อาสาสมัครด้านแหล่งน้ำในพื้นที่สำหรับคำแนะนำและพาสำรวจพื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง รวมทั้ง คุณพัฒนจรินทร์ สวนแก้วมณี และ เครือข่ายงานวิจัยเพื่อสังคมอยู่เย็นเป็นสุข (ไอร่าห์) สำหรับแผนที่คลอง 6 ตำบล พื้นที่สีเขียว บางกะเจ้า อ.พระประแดง จ.สมุทรปราการ

แหล่งทุนวิจัย

ไม่มี

ผลประโยชน์ทับซ้อน

ผู้นิพนธ์ทุกคนไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อนจากงานวิจัยนี้

References

1. Hamilton KA, Waso M, Reyneke B, Saeidi N, Levine A, Lalancette C, et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and surface water environments. J Environ Qual 2018; 47(5): 1006-23.
2. Rousseau A, La Carbona S, Dumètre A, Robertson LJ, Gargala G, Escotte-Binet S, et al. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis, Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii:* A review of methods. Parasite 2018; 25: 14.
3. Roellig DM, Xiao L. *Cryptosporidium* genotyping for epidemiology tracking. Methods Mol Biol 2020; 2052: 103-16.
4. Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: Current understanding and research needs. Parasitology 2014; 141(13): 1667-85.
5. Xiao L, Ryan UM. Cryptosporidiosis: An update in molecular epidemiology. Curr Opin Infect Dis 2004; 17(5): 483-90.
6. Garcia LS. Flagellates and ciliates. Clin Lab Med 1999; 19(3): 621-38.
7. Fantinatti M, Bello AR, Fernandes O, Da-Cruz AM. Identification of *Giardia lamblia* assemblage E in humans points to a new anthropozoonotic cycle. J Infect Dis 2016; 214(8): 1256-9.
8. CDC. Cryptosporidiosis. Available from https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html, accessed 20 May, 2019.
9. CDC. Giardiasis. Available from https://www.cdc.gov/parasites/giardia/index.html, accessed 15 September, 2020.
10. Touchchapol M, Tantiamornkul K. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Kwan Phayao lake,Phayao province, Thailand using microscopic technique comparing direct wet mount, temporary stain, and permanent stain. Thai Journal of Public Health 2018; 48(3): 407-17. (In Thai)
11. Ligda P, Claerebout E, Kostopoulou D, Zdragas A, Casaert S, Robertson LJ, et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water and drinking water: Animal sources and towards the use of a machine-learning approach as a tool for predicting contamination. Environ Pollut 2020; 264: 114766.
12. Xiao S, Zhang Y, Zhao X, Sun L, Hu S. Presence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational lake water in Tianjin, China: A preliminary study. Sci Rep 2018; 8(1): 2353.
13. 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.
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. Carmena D. Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: Detection, surveillance and implications for public health. In: Mendez-Vilas A, ed. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Badajoz: Formatex Research Center; 2010. p. 3-14.
16. Culture trip. Bang Krachao: Exploring Bangkok's Hidden Jungle Oasis 2018. Available from: https://theculturetrip.com/asia/thailand/articles/bang-krachao-exploring-bangkoks-hidden-jungle-oasis/, accessed 25 November, 2020.
17. Parker P. Sample size requirements for confidence intervals on distribution parameters. In Meeker WQ, Hahn GJ, Escobar LA, eds. Statistical intervals: A guide for practitioners and researchers. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons. Inc.; 2017. p. 284-307.
18. National Statistical Office (NSO). Number of population and housing by District and Sub-district, Samut Prakan Province. Available from http://service.nso.go.th/nso/ nsopublish/districtList/S010107/th/3/htm, accessed 28 June, 2020. (In Thai)
19. Pollution Control Department. Guidelines for collecting water samples from water sources. Bangkok, 2010. (In Thai)
20. EPA. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Available from https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-1623.pdf, accessed 28 October, 2020.
21. Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect Genet Evol 2004; 4(2): 125-30.
22. Guy RA, Payment P, Krull UJ, Horgen PA. Real-Time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. Appl Environ Microbiol 2003; 69(9): 5178-85.
23. Nguyen TT, Traub R, Pham PD, Nguyen HV, Nguyen KC, Phung CD, et al. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in environmental samples in Hanam Province, Vietnam. Food Waterborne Parasitol 2016; 3: 13-20.
24. Breternitz BS, Barbosa da Veiga DP, Pepe Razzolini MT, Nardocci AC. Land use associated with *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. in surface water supply in the state of São Paulo, Brazil. Environ Pollut 2020; 266: 115143.
25. Bilung LM, Tahar AS, Yunos NE, Apun K, Lim YL, Nillian E, et al. Detection of *Cryptosporidium* and *Cyclospora* oocysts from environmental water for drinking and recreational activities in Sarawak, Malaysia. Biomed Res Int 2017; 2017: 4636420.
26. Dryden MW, Payne PA, Smith V. Accurate diagnosis of *Giardia* spp. and proper fecal examination procedures. Vet Ther 2006; 7(1): 4-14.
27. Bairami Kuzehkanan A, Rezaeian M, Zeraati H, Mohebali M, Meamar AR, Babaei Z, et al. A sensitive and specific PCR based method for identification of *Cryptosporidium* sp. using new primers from 18S ribosomal RNA. Iran J Parasitol 2011; 6(4): 1-7.
28. Miller KM, Sterling CR. Sensitivity of nested PCR in the detection of low numbers of *Giardia lamblia* cysts. Appl Environ Microbiol 2007; 73(18): 5949.
29. Bonilla JA, Bonilla TD, Abdelzaher AM, Scott TM, Lukasik J, Solo-Gabriele HM, et al. Quantification of protozoa and viruses from small water volumes. Int J Environ Res Public Health 2015; 12(7): 7118-32.
30. Aguirre J, Greenwood SJ, McClure JT, Davidson J, Sanchez J. Effects of rain events on *Cryptosporidium* spp. levels in commercial shellfish zones in the Hillsborough River, Prince Edward Island, Canada. Food Waterborne Parasitol 2016; 5: 7-13.
31. Schets FM, van Wijnen JH, Schijven JF, Schoon H, de Roda Husman AM. Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam, the Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these waters. Appl Environ Microbiol 2008; 74(7): 2069-78.
32. Júlio C, Sá C, Ferreira I, Martins S, Oleastro M, Ângelo H, et al. Waterborne transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* at river beaches in Southern Europe (Portugal). J Water Health 2012; 10(3): 484-96.
33. Adamska M, Sawczuk M, Kolodziejczyk L, Skotarczak B. Assessment of molecular methods as a tool for detecting pathogenic protozoa isolated from water bodies. J Water Health 2015; 13(4): 953-9.
34. Ehsan A, Casaert S, Levecke B, Van Rooy L, Pelicaen J, Smis A, et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational water in Belgium. J Water Health 2015;

13(3): 870–8.

35. Moore CE, Elwin K, Phot N, Seng C, Mao S, Suy K, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* Species and *Giardia duodenalis* from symptomatic Cambodian children. PLoS Negl Trop Dis 2016; 10(7): e0004822.
36. Tangtrongsup S, Scorza AV, Reif JS, Ballweber LR, Lappin MR, Salman MD. Prevalence and multilocus genotyping analysis of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from dogs in Chiang Mai, Thailand. Vet Sci 2017; 4(2): 26.
37. Tram NT, Dalsgaard A. Water used to moisten vegetables is a source of *Escherichia coli* and protozoan parasite contamination at markets in Hanoi, Vietnam. J Water Health 2014; 12(4): 896-900.
38. Kittiprapas S, Suankeawmanee P, Rodcharoen P, Sankarak T, Plubchang S, Pheaukwattana B. Water management in Khung Bang Kachao (Phase 1, August 2017 - July 2018). In: Kittiprapas S, ed. Water and Life. Thailand: International Research Associated for Happy Societies; 2018. p. 22. (In Thai)