



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การจำแนกจีโนไทป์/สปีชีส์ทางอณูชีวโมเลกุลของเชื้อ *Enterocytozoon bieneusi*
และ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรที่เลี้ยงในจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย
(Molecular characterization of genotype/species of *Enterocytozoon bieneusi* and
Cryptosporidium spp. from pig in Chon buri province, Thailand)

อุมพร ทาไธสง

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802123

สัญญาเลขที่ 100/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การจำแนกจีโนไทป์/สปีชีส์ทางอณูชีวโมเลกุลของเชื้อ *Enterocytozoon bieneusi*
และ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรที่เลี้ยงในจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย
(Molecular characterization of genotype/species of *Enterocytozoon bieneusi* and
Cryptosporidium spp. from pig in Chon buri province, Thailand)

อุมพร ทาไรสง
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงาน คณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 100/2559

บทคัดย่อ

เชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *Enterocytozoon bienersi* เป็นโปรโตซัวปรสิตฉวยโอกาสที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่รุนแรงในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยเฉพาะผู้ที่ติดเชื้อ HIV เชื้อทั้งสองชนิดนี้พบได้ทั้งคนและสัตว์หลายชนิด เชื่อว่าการติดต่อสามารถเกิดขึ้นได้ทาง fecal-oral route เหมือนกับโปรโตซัวชนิดอื่นๆ ในลำไส้ และมีรายงานว่าสัตว์เป็นรังโรคที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในคน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *E. bienersi* ในสุกรด้วยเทคนิค nested-PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน small subunit (SSU) rRNA และทำการจำแนกจีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ของยีน SSU rRNA โดยการศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างมูลสุกรจำนวน 245 ตัว จากฟาร์มจำนวน 11 ฟาร์ม ในเขตจังหวัดชลบุรี ผลการทดลองพบความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *E. bienersi* เท่ากับ 20.8% (51/245 ตัวอย่าง) และ 15.1% (37/245 ตัวอย่าง) ตามลำดับ เชื้อ *Cryptosporidium* spp. ที่พบในสุกร เป็นเชื้อ *Cryptosporidium* spp. pig genotype II 82.4% (42/51 ตัวอย่าง) และ *Cryptosporidium suis* 17.6% (9/51 ตัวอย่าง) การศึกษานี้เป็นรายงานแรกของการจำแนกจีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลในสุกรในประเทศไทย ซึ่งสุกรอาจเป็นรังโรคของการติดเชื้อมากกว่าในคน

คำสำคัญ: *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bienersi*, สุกร, nested-PCR, RFLP

Abstract

Cryptosporidium spp. and *Enterocytozoon bieneusi* are an important opportunistic protozoa parasite causing the severe diarrheal diseases in immunocompromised individuals especially HIV-infected patients. These two protozoa infections appear in both human and animals. Transmission of the protozoa believed to be the same as for other intestinal protozoa i.e. fecal oral route. It has been reported that animals may be a potential source of infection for human. This study were aimed to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *E. bieneusi* in pig by nested-PCR of small subunit (SSU) rRNA gene and to identify genotype/species of *Cryptosporidium* by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of SSU rRNA gene. A total of 245 fecal samples from pig in 11 farms, Chonburi province were enrolled in this study. The results showed that the prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *E. bieneusi* infection in pig were 20.8% (51/245 samples) and 15.1% (37/245 samples), respectively. Among 51 *Cryptosporidium* spp. isolates, *Cryptosporidium* spp. pig genotype II and *Cryptosporidium suis* were detected in 82.4% (42/51 samples) and 17.6% (9/51 samples). This is the first report of genetic identification of *Cryptosporidium* genotype/species in pig in Thailand. Pig may be a potential source of human infection.

Key words: *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi*, pig, nested-PCR, RFLP

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

bp	base pair
°C	degree Celsius
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Dexonucleotide triphosphate
et al.	Et.alli (Latin), and other things, and so on
i.e.	Ed est (Latin), that is
mM	milimolar
MW	molecular weight
PCR	Polymerase chain reaction
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
TBE	Tris-Borate EDTA
SSU	Small subunit
U	unit
μM	micromolar

สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญตาราง.....	๗
สารบัญภาพ.....	๙
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย.....	๑
บทนำ.....	1
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
ผลการวิจัย.....	17
อภิปรายผลการวิจัย.....	26
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	29
ผลผลิต.....	30
รายงานการเงิน.....	31
บรรณานุกรม.....	32
ภาคผนวก.....	38
ภาคผนวก ก ข้อมูลของตัวอย่างสุกรที่ทำการศึกษา.....	39
ภาคผนวก ข การเตรียมบัฟเฟอร์และ Reagent	46
ภาคผนวก ค ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp. และ <i>Enterocytozoon bieneusi</i> ในมูลสุกร	47
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนฟาร์มสุกรที่ทำการศึกษาและสถานที่ตั้ง.....	5
2	ลำดับนิวคลีโอไทป์ของ primer ที่ใช้จำแนกจีโนมไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	6
3	Reagent ที่เป็นส่วนประกอบของ PCR mixture ของ Primary PCR สำหรับเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.....	7
4	PCR condition ในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของ Primary PCR ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	7
5	Reagent ที่เป็นส่วนประกอบของ PCR mixture ของ Secondary PCR สำหรับเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.....	8
6	PCR condition ในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของ Secondary PCR ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.....	8
7	ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ สภาวะที่เหมาะสมและลำดับเบส ที่เป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด.....	11
8	Reaction mixture สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	11
9	ลำดับนิวคลีโอไทป์ของ primer ที่ใช้จำแนกจีโนมไทป์ของเชื้อ <i>E. bienersi</i>	13
10	Reagent ที่เป็นส่วนประกอบของ PCR mixture ของ Primary PCR สำหรับเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของเชื้อ <i>E. bienersi</i>	13
11	PCR condition ในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของ Primary PCR ของเชื้อ <i>E. bienersi</i>	14
12	Reagent ที่เป็นส่วนประกอบของ PCR mixture ของ Secondary PCR สำหรับเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของเชื้อ <i>E. bienersi</i>	14
13	PCR condition ในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของ Secondary PCR ของเชื้อ <i>E. bienersi</i>	15
14	ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน SSU rRNA ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp. กับฐานข้อมูล GenBank.....	18
15	ความชุกของการติดเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp. และ <i>E. bienersi</i> ในสุกรของแต่ละฟาร์ม	18
16	ความชุกของการติดเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp. และ <i>E. bienersi</i> ในสุกรแต่ละช่วงอายุ.....	20

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17	ความชุกของการติดเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp. และ <i>E. bienersi</i> ในสุกรเพศผู้และเมีย	20
18	ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน SSU rRNA ของเชื้อ <i>E. bienersi</i> กับฐานข้อมูล GenBank	22
18	จีโนมไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp. ที่พบในสุกร ในแต่ละฟาร์ม.....	24
19	เพศ อายุ และสายพันธุ์ของสุกรที่ทำการเก็บตัวอย่าง.....	32
20	ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp. และ <i>E. bienersi</i> ในมูลสุกรแต่ละตัวอย่าง.....	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขนาดของ PCR product ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	17
2	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ 10 กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank.....	19
3	ขนาดของ PCR product ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ <i>E. bienersi</i>	21
4	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ 81 กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank.....	23
5	รูปแบบ RFLP ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II และ <i>Cryptosporidium suis</i> ที่พบในมูลสุกร.....	25

บทนำ

Enterocytozoon bienersi และ *Cryptosporidium* spp. เป็นโปรโตซัวปรสิตที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่สำคัญในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV การติดเชื้อในคนเกิดขึ้นได้หลายทาง เช่น การสัมผัสโดยตรงกับคนที่ติดเชื้อ (person-to-person transmission) หรือสัตว์ที่ติดเชื้อ (zoonotic transmission) การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ (foodborne transmission) และดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ (waterborne transmission) (Xiao, 2010) ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดถึงความสำคัญของการติดต่อเข้าสู่โฮสต์ในทางระบาดวิทยาของโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อทั้งสองชนิด เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการไม่สามารถจำแนกแหล่งที่มาของเชื้อได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อไม่นานมานี้มีการพัฒนาวิธีทางอณูชีวโมเลกุลขึ้นมาเพื่อทำการตรวจหาและจำแนกจีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *E. bienersi* และ *Cryptosporidium* spp. ซึ่งวิธีนี้ได้นำมาใช้ในการศึกษาด้านระบาดวิทยาของโรคอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุมาจากเชื้อดังกล่าวมากขึ้นทั้งในพื้นที่ที่เป็นถิ่นระบาดของโรคและพื้นที่ทั่วไป ทำให้เข้าใจการติดต่อของโรคที่เกิดจากเชื้อทั้งสองชนิดในคนมากยิ่งขึ้น

รายงานเมื่อเร็วๆ นี้พบว่าเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ที่พบทั้งในคนและสัตว์หลายชนิดมีอย่างน้อย 23 สปีชีส์ (Fayer, 2010; Traversa, 2010) และมีอย่างน้อย 8 สปีชีส์ (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* และ *C. ubiquitum*) และ 7 จีโนไทป์ (*C. hominis* monkey, *C. andersoni*-like และ *Cryptosporidium* chip munk I, skunk, horse, rabbit และ pig genotype II) เกี่ยวข้องกับโรคอุจจาระร่วงในคน (Kvac *et al.*, 2009a; Smith *et al.*, 2006) แต่จีโนไทป์/สปีชีส์ที่พบบ่อยในคนได้แก่ *C. parvum* และ *C. hominis* (Hunter & Thompson, 2005) ซึ่ง *C. hominis* พบเฉพาะในคน ส่วน *C. parvum* พบในสัตว์เลี้ยงหลายชนิด และเป็นสปีชีส์หลักที่ทำให้เกิดการติดต่อจากสัตว์มาสู่คน (zoonosis) ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในสัตว์เลี้ยงหลายชนิด ซึ่งส่งผลกระทบต่อทางเศรษฐกิจ นอกจากนี้สัตว์เลี้ยงที่เป็นโรคอุจจาระร่วงยังเป็นแหล่งในการแพร่เชื้อไปยังสิ่งแวดล้อม ทำให้สัตว์ป่าและคนติดเชื้อได้

E. bienersi และ *Encephalitozoon intestinalis* เป็นเชื้อกลุ่ม microsporidia ที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียที่พบในปัจจุบัน การติดเชื้อ microsporidia ที่มีรายงานในประเทศไทย พบเฉพาะ *E. bienersi* นอกจากนี้ในคนแล้วยังพบเชื้อ *E. bienersi* ได้ในสัตว์หลายชนิด คือ หมู วัว สุนัข แมว ลามา ไก่ และ macaque (Dengjel *et al.*, 2001) จากการศึกษาจีโนไทป์ของเชื้อโดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของ Internal Transcribed Spacer (ITS) ของ small-subunit rRNA gene พบว่ามีเชื้อ *E. bienersi* บางจีโนไทป์สามารถพบได้ทั้งในคนและในสัตว์ (จีโนไทป์ E, D, O และ PigEBITS7) คณะผู้วิจัยภาควิชาปรสิตวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ทำการตรวจแยกจีโนไทป์ของเชื้อนี้ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเอดส์ พบว่าจีโนไทป์ส่วนใหญ่เป็นจีโนไทป์ที่พบได้ในคนและสุกร (Leelayoova *et al.*, 2006)

จากการสำรวจสัตว์ในประเทศไทย พบว่ามีการติดเชื้อ *E. bienersi* ในสุกรเป็นจำนวน 20% และพบความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุนัข 1.5% (Inpankaew *et al.*, 2007) วัวนม 0.5-13% (Jittapalapong *et al.*, 2006; Inpankaew *et al.*, 2010, 2009; Nuchjangreed *et al.*, 2008) ดังนั้นอาจเชื่อได้ว่าการติดเชื้อทั้งสองชนิดน่าจะมีการติดต่อมาจากสัตว์ได้ (zoonotic

transmission) ส่วนรายงานการศึกษาจีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *E. bienersi* และ *Cryptosporidium* spp. ในสัตว์ชนิดต่างๆ มีน้อยมาก โดยตรวจพบ *C. parvum* ในมูลของวัวนมที่เลี้ยงในจังหวัดสระบุรี กาญจนบุรี นครปฐม (Inprankaew *et al.*, 2009) ชลบุรี (Nuchjangreed *et al.*, 2008) ราชบุรี (Inprankaew *et al.*, 2010) และตรวจพบ *E. bienersi* จีโนไทป์ D, ETMK2, ETMK3, และ ETMK4 ในมูลแมวจรจัด (Mori *et al.*, 2013) และพบจีโนไทป์ O E และ H ในมูลสุกรที่เลี้ยงในจังหวัดนครปฐม (Leelayoova *et al.*, 2009) อีกทั้งในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาจีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกร ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงเพื่อเป็นรายได้ ให้เสริมให้กับครอบครัว แหล่งที่มีการเลี้ยงกันมากได้แก่ แอบบริเวณภาคกลางและภาคตะวันออก ดังนั้นการศึกษาระดับอนุชีวโมเลกุล เพื่อหาจีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *E. bienersi* และ *Cryptosporidium* spp. จะมีประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากทำให้ทราบชนิดและจำนวนของจีโนไทป์/สปีชีส์ หลักของเชื้อที่พบในมูลสุกร ซึ่งสามารถนำมาอธิบายแหล่งของการติดเชื้อในคนว่ามาจากสัตว์หรือไม่ ประโยชน์ที่ได้รับจากการศึกษารุ่นนี้สามารถนำมาหาทางป้องกัน ให้คำแนะนำในการควบคุมการติดเชื้อ และแพร่กระจายของเชื้อ *E. bienersi* และ *Cryptosporidium* spp. จากสัตว์เลี้ยงสู่สิ่งแวดล้อมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อจำแนกจีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *E. bienersi* และ *Cryptosporidium* spp. ในมูลสุกรที่เลี้ยงในจังหวัดชลบุรี โดยใช้เทคนิคทางอนุชีวโมเลกุล

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการเก็บมูลสุกรในเขตจังหวัดชลบุรี จากนั้นทำการสกัด DNA และทำการจำแนกจีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *E. bienersi* และ *Cryptosporidium* spp. ซึ่งการจำแนกจีโนไทป์ของ *E. bienersi* ทำโดยการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ด้วยเทคนิค PCR และดูความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทป์ของยีน SSU rRNA ส่วนการจำแนกจีโนไทป์/สปีชีส์ของ *Cryptosporidium* spp. ทำโดยการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ด้วยเทคนิค PCR แล้วนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้น run agarose gel electrophoresis เพื่อดู banding pattern

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เนื่องจาก *E. bienersi* และ *Cryptosporidium* spp. บางจีโนไทป์สามารถพบได้ทั้งในคนและสัตว์ ดังนั้นจีโนไทป์เหล่านี้ที่พบในคนอาจได้เชื้อมาจากสัตว์ได้ การศึกษาทางระบาดวิทยาในระดับอนุชีวโมเลกุลของเชื้อ *E. bienersi* และ *Cryptosporidium* spp. จะทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญทางระบาดวิทยา ซึ่งจะนำมาสู่การควบคุมและป้องกันการติดเชื้อได้ อีกทั้งยังไม่มีข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ในสุกรที่เลี้ยงในจังหวัดชลบุรี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เมื่อทำโครงการวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์แล้ว (ระยะเวลาทำวิจัยต่อเนื่อง 2 ปี ของปีงบประมาณ 2559-2560) ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยปีที่ 1 และ 2 จะเป็นข้อมูลพื้นฐานของเชื้อ *E. bienersi* และ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรที่เลี้ยงในจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย และนำไปใช้อธิบายแหล่งของเชื้อดังกล่าวที่แพร่จากสัตว์สู่คน ซึ่งจะนำไปสู่การให้คำแนะนำในการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อได้ และสามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จสมบูรณ์แล้ว (ผลงานวิจัยของปีที่ 1 รวมกับของปีที่ 2) โดยตีพิมพ์งานวิจัย เรื่อง Molecular characterization of genotype/species of *Enterocytozoon bienersi* and *Cryptosporidium* spp. from pig in Chon buri province, Thailand ลงในวารสารระดับชาติหรือระดับนานาชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ขนาดตัวอย่าง

เพื่อหาความชุกของการติดเชื้อ *Enterocytozoon bieneusi* และ *Cryptosporidium* spp. ในสุกร

$$n = \frac{Z^2 P (1-P)}{d^2}$$

โดย P คือ อัตราที่จะหา

d คือ ความคลาดเคลื่อนของอัตราที่จะหา

กำหนดให้ P = 0.2 (จากความชุกของการติดเชื้อ *Enterocytozoon bieneusi* ในสุกรที่เลี้ยงในจังหวัดนครปฐมซึ่งสำรวจโดยภาควิชาปรสิตวิทยาวิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า)

$$d = 25\% \text{ ของ } P \text{ ได้ } 0.25 \times 0.2 = 0.05$$

ความเชื่อมั่น 95% ได้ค่า Z = 1.96

แทนค่า

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.2) (1-0.2)}{(0.05)^2} = 245 \text{ ตัวอย่าง}$$

2. การเก็บตัวอย่างมูลสุกร

เก็บตัวอย่างมูลสุกรที่สุกรถ่ายออกมาแล้ว (เพิ่งถ่าย) จำนวน 245 ตัวอย่าง จากสุกร 245 ตัว ทำการบันทึกเพศ อายุ และสายพันธุ์ของสุกร จากฟาร์มระบบเปิดในเขตอำเภอต่างๆ จังหวัดชลบุรี (ภาคผนวก ก) โดยทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มละไม่เกิน 20% ของจำนวนสุกรในฟาร์ม ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 เก็บตัวอย่างละประมาณ 10 กรัม ใส่กระป๋องพลาสติกปราศจากเชื้อ และใส่ลงในกล่องกักเก็บความเย็น (~4-10 °C) เพื่อขนส่งมายังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3. การสกัด DNA

ทำการสกัด DNA ของเชื้อ *E. bieneusi* และ *Cryptosporidium* spp. ในมูลสุกร โดยใช้ QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Germany) ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 ชั่งมูลสุกรแต่ละตัวอย่าง หนักประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วใส่หลอดลงในอ่างน้ำแข็ง

3.2 เติม InhibitEX buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอด microcentrifuge ที่มีมูลสุกรอยู่ จากนั้นทำให้ผสมกันด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 1 นาที

3.3 นำหลอดใส่ลงในเครื่อง Mini heating dry bath incubator (Major Science, USA) ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 15 วินาที

ตารางที่ 1 จำนวนฟาร์มสุกรที่ทำการศึกษาและสถานที่ตั้ง

ฟาร์มที่	สถานที่ตั้ง	จำนวนมูลสุกรที่เก็บ
1	ตำบลนาเริก อำเภอน้ำสนิคม	21 ตัวอย่าง
2	ตำบลนาเริก อำเภอน้ำสนิคม	17 ตัวอย่าง
3	ตำบลนาเริก อำเภอน้ำสนิคม	22 ตัวอย่าง
4	ตำบลหัวกุกญแจ อำเภอบ้านบึง	41 ตัวอย่าง
5	ตำบลหัวถนน อำเภอน้ำสนิคม	7 ตัวอย่าง
6	ตำบลหัวถนน อำเภอน้ำสนิคม	7 ตัวอย่าง
7	ตำบลหัวถนน อำเภอน้ำสนิคม	13 ตัวอย่าง
8	ตำบลหัวถนน อำเภอน้ำสนิคม	3 ตัวอย่าง
9	ตำบลบ้านช้าง อำเภอน้ำสนิคม	60 ตัวอย่าง
10	ตำบลหมอนนาง อำเภอน้ำสนิคม	30 ตัวอย่าง
11	ตำบลหมอนนาง อำเภอน้ำสนิคม	24 ตัวอย่าง

3.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง Microspin 12 (Biosan, Latvia) เป็นเวลา 1 นาที

3.5 ดูดเอนไซม์ Proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.6 ดูดส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.4 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ที่ใส่เอนไซม์ Proteinase K แล้ว

3.7 เติม buffer AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงไป แล้วทำให้ผสมกันด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 15 วินาที

3.8 นำหลอดไปใส่ในเครื่อง Mini heating dry bath incubator (Major Science, USA) ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที

3.9 เติม 100% Ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วทำให้ผสมกันด้วยเครื่อง vortex mixer

3.10 ดูดสารละลาย ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วใส่ QIAamp spin column ลงใน collection tube หลอดใหม่และทิ้ง collection tube หลอดเก่าซึ่งมีสารละลายที่ไหลผ่านกระดาษกรองของ QIAamp spin column แล้ว

3.11 เติม buffer AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วใส่ QIAamp spin column ลงใน collection tube หลอดใหม่และทิ้ง collection tube หลอดเก่าซึ่งมีสารละลายที่ไหลผ่านกระดาษกรองของ QIAamp spin column แล้ว

3.12 เติม buffer AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน QIAamp spin colum จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

3.13 ใส่ QIAamp spin colum ลงใน collection tube หลอดใหม่ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วทิ้ง collection tube ซึ่งมีสารละลายที่ไหลผ่านกระดาษกรองของ QIAamp spin colum แล้ว

3.14 ใส่ QIAamp spin colum ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม buffer ATE ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงใน QIAamp spin colum จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

3.15 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลาย DNA ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สกัดได้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นนำไปเก็บที่ -20°C เพื่อที่จะใช้เป็นแม่แบบในการทำ PCR

4. การจำแนกจีโนมไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp.

4.1 การเพิ่มจำนวนยีน Small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA)

ทำการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ด้วยวิธี nested-PCR ซึ่งประกอบด้วย primary PCR และ secondary PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าว (ตารางที่ 2) (Xiao *et al.*, 1999) และใช้ DNA ที่สกัดได้เป็นแม่แบบ

4.1.1 Primary PCR

(1) ทำการเตรียม PCR mixture ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 3 (ยกเว้น DNA) แล้วแบ่งใส่หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ 22 ไมโครลิตร แล้วเติม DNA ของแต่ละตัวอย่างลงไปในแต่ละหลอด หลอดละ 3 ไมโครลิตร โดยปริมาตรสุดท้ายของ PCR mixture ในแต่ละหลอด เท่ากับ 25 ไมโครลิตร

(2) นำหลอด PCR เข้าเครื่อง PCR (DNA thermal cycler) (Biometra[®], TGradient, Germany) โดย PCR condition แสดงดังตารางที่ 4

(3) นำ 1st PCR product ที่ได้ไปใช้เป็น DNA แม่แบบในการทำ secondary PCR

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของ primer ที่ใช้จำแนกจีโนมไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp.

ชื่อ primer	ลำดับนิวคลีโอไทป์ (5'→3')
18SFor1	TTCT AGAGCTAATACATGCG
18SRev1	CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA
18SFor2	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG
18SRev2	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA

ตารางที่ 3 Reagent ที่เป็นส่วนประกอบของ PCR mixture ของ Primary PCR สำหรับเพิ่มจำนวน ยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp.

Reagent	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
20 μ M primer 18sF1	0.5	0.4 μ M
20 μ M primer 18sR1	0.5	0.4 μ M
10x PCR buffer	2.5	1x
10 mM dNTPs	2	200 μ M (แต่ละชนิด)
50 mM MgCl ₂	1.5	3 mM
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/ μ l)	0.2	1 U
ddH ₂ O	14.8	-
DNA แม่แบบ	3	-
ปริมาตรรวม	25	-

ตารางที่ 4 PCR condition ในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของ Primary PCR ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp.

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	} 35
Annealing	59	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1

4.1.2 Secondary PCR

(1) ทำการเตรียม PCR mixture ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 5 (ยกเว้น 1st PCR product) แล้วแบ่งใส่หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ 49 ไมโครลิตร แล้วเติม 1st PCR product ของแต่ละตัวอย่างลงไปในแต่ละหลอด หลอดละ 1 ไมโครลิตร โดยปริมาตรสุดท้ายของ PCR mixture ในแต่ละหลอด เท่ากับ 50 ไมโครลิตร

(2) นำหลอด PCR เข้าเครื่อง PCR (DNA thermal cycler) (Biometra[®], TGradient, Germany) โดย PCR condition แสดงดังตารางที่ 6

(3) นำ 2nd PCR product ที่ได้มาตรวจหา PCR product ซึ่งมีขนาดของยีน SSU rRNA เท่ากับ 825 bp ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1%

ตารางที่ 5 Reagent ที่เป็นส่วนประกอบของ PCR mixture ของ Secondary PCR สำหรับเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp.

Reagent	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
20 μ M primer 18sF2	1	0.4 μ M
20 μ M primer 18sR2	1	0.4 μ M
10x PCR buffer	5	1x
10 mM dNTPs	4	200 μ M (แต่ละชนิด)
50 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/ μ l)	0.2	1 U
ddH ₂ O	36.3	-
1 st PCR Product	1	-
ปริมาตรรวม	50	-

ตารางที่ 6 PCR condition ในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของ Secondary PCR ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp.

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 40
Annealing	58	90 วินาที	
Extension	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1

4.2 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.2.1 การเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% (Agarose Molecular Biology Grade) (Invitrogen, USA)

(1) ชั่งอะกาโรสจำนวน 1 กรัมใส่ลงในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.5x TBE buffer (Vivantis, Malasia) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

(2) นำเข้าไมโครเวฟเพื่อทำให้อะกาโรสละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิ 50-55°C

(3) เติมสีย้อม SYBR[®] Safe in DMSO (Invitrogen, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทลงภาชนะที่ใส่ซีวีวีไว้แล้วให้ได้ความหนาที่เหมาะสม รอให้เจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหัวออก

4.2.2 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

(1) นำเจลที่เตรียมไว้ ใส่ลงใน electrophoresis chamber (Mupid CO., LTD., Japan) แล้วเท 0.5x TBE buffer (Vivantis, Malasia) (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมเจล

(2) ผสม 2nd PCR Product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับ 5X Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายทั้งหมด 6 ไมโครลิตร ลงในหลุมของเจล โดยหลุมแรกเติม VC 100bp Plus DNA Ladder (0.1 µg/µl) (Vivantis, Malasia) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร

(3) ทำการรันเจลที่ความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์ นาน 45 นาที นำไปตรวจสอบแถบของ DNA ด้วยเครื่อง UV transilluminator (SPECTROLINE[®], Model TVC-312A, USA)

และบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

4.3 DNA sequencing และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4.3.1 นำ PCR product ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 10, 12, 18, 24 และ 35 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick[®] Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

(1) ตัดชิ้นเจลที่มีแถบ DNA ขนาด 825 bp ด้วยใบมีดที่สะอาด

(2) ชั่งน้ำหนักชิ้นเจล แล้วเติม buffer QC ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล

(3) นำหลอดไปใส่ในเครื่อง Mini heating dry bath incubator (Major Science, USA) ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที โดยนำออกมาเขย่าทุกๆ 2-3 นาที โดยใช้เครื่อง vortex mixer เมื่อชิ้นเจลละลายหมดแล้วจะได้สารละลายสีเหลือง

(4) เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล จากนั้นทำให้ผสมกันด้วยเครื่อง vortex mixer

(5) ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน QIAquick spin column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งสารละลายที่ไหลผ่านกระดาษกรองของ QIAquick spin column

(6) เติม buffer QC ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ไหลผ่านกระดาษกรองของ QIAquick spin column

(7) เติม buffer PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ไหลผ่านกระดาษกรองของ QIAquick spin column ที่ตั้ง

(8) ใส่ QIAquick spin column ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรและเติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงใน QIAamp spin column จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

(9) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลาย DNA ที่อยู่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่

(10) นำ PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์

4.3.2 ส่งตัวอย่าง PCR product ของยีน SSU rRNA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปทำ DNA sequencing ที่บริษัท FirstBASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย ซึ่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้านของสาย DNA โดยใช้ไพรเมอร์ 18sF2 และ 18sR2 (two directional nucleotide sequencing)

4.3.3 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ใน GenBank ของฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information โดยใช้ BLAST network service เพื่อยืนยันว่าเป็นยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp.

4.4 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis

4.4.1 ตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes)

นำ 2nd PCR product ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการทำ PCR ของยีน SSU rRNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ SspI (Promega, USA) และ VspI (Promega, USA) ซึ่งแสดงบัฟเฟอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมและลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์แต่ละชนิดในตารางที่ 7 โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้

(1) เตรียม Reaction mixture สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 8 (ยกเว้น 2nd PCR product) แล้วแบ่งใส่หลอดขนาด 0.6 มิลลิลิตร หลอดละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 2nd PCR product ของแต่ละตัวอย่างลงไปในแต่ละหลอด หลอดละ 10 ไมโครลิตร โดยปริมาตรสุดท้ายของ Reaction mixture ของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดในหลอด เท่ากับ 20 ไมโครลิตร

(2) ผสม reaction mixture ให้เข้ากัน แล้วนำหลอดไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(3) นำ PCR product ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% เพื่อดูรูปแบบ RFLP และจำแนกเชื้อ *Cryptosporidium* ออกเป็น สปีชีส์/จีโนไทป์

ตารางที่ 7 ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ สภาวะที่เหมาะสมและลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด

เอนไซม์	บัฟเฟอร์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งตัด
Sspl	Buffer E	37	5' -AAT ↓ ATT-3'
Vspl	Buffer D	37	5' -AT ↓ TAAT-3'

ตารางที่ 8 Reaction mixture สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Reagent	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
2 nd PCR product (DNA ~0.1-0.5 µg)	10
Nuclease-free water	7.6
10x buffer	2
Restriction enzyme (10 U/µl)	0.2
BSA (10 mg/ml)	0.2
ปริมาตรรวม	20

4.4.2 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.4.2.1 เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% (NuSieve™ 3:1 Agarose) (Lonza, Switzerland)

(1) ชั่งอะกาโรสจำนวน 2 กรัมใส่ลงในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิตร แล้วเติม 0.5x TBE buffer (Vivantis, Malasia) ปริมาตร 100 มิลลิตร

(2) นำเข้าไมโครเวฟเพื่อทำให้อะกาโรสละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิ 50-55 °C

(3) เติมสีย้อม SYBR® Safe in DMSO (Invitrogen, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทลงถาดเจลที่ใส่ซี่หัวไว้แล้วให้ได้ความหนาที่เหมาะสม รอให้เจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหัวออก

4.4.2.2 ทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

(1) นำเจลที่เตรียมไว้ใส่ลงใน electrophoresis chamber (Mupid CO., LTD., Japan) แล้วเท 0.5x TBE buffer (Vivantis, Malasia) ให้ท่วมเจล

(2) ผสม PCR product ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับ 5x Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega, USA) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายทั้งหมด 12 ไมโครลิตร ลงใน

หลุมของเจลโดยหลุมแรกเติม VC 100bp Plus DNA Ladder (0.1 µg/µl) (Vivantis, Malasia) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร

(3) ทำการรันเจลที่ความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง นำไปตรวจสอบแถบของ DNA ด้วยเครื่อง UV transilluminator (SPECTROLINE[®], Model TVC-312A, USA) และบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

5. การเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Enterocytozoon bieneusi*

ทำการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ด้วยวิธี nested-PCR ซึ่งประกอบด้วย primary PCR และ secondary PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าว (ตารางที่ 9) (Katzwinkel-Wladarsch *et al.*, 1996) และใช้ DNA ที่สกัดได้เป็นแม่แบบ

5.1 Primary PCR

(1) ทำการเตรียม PCR mixture ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 10 (ยกเว้น DNA) แล้วแบ่งใส่หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ 20 ไมโครลิตร แล้วเติม DNA ของแต่ละตัวอย่างลงไปในแต่ละหลอด หลอดละ 5 ไมโครลิตร โดยปริมาตรสุดท้ายของ PCR mixture ในแต่ละหลอด เท่ากับ 25 ไมโครลิตร

(2) นำหลอด PCR เข้าเครื่อง PCR (DNA thermal cycler) (Biometra[®], TGradient, Germany) โดย PCR condition แสดงดังตารางที่ 11

(3) นำ 1st PCR product ที่ได้ไปใช้เป็น DNA แม่แบบในการทำ secondary PCR

5.2 Secondary PCR

(1) ทำการเตรียม PCR mixture ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 12 (ยกเว้น 1st PCR product) แล้วแบ่งใส่หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ 24.5 ไมโครลิตร แล้วเติม 1st PCR product ของแต่ละตัวอย่างลงไปในแต่ละหลอด หลอดละ 0.5 ไมโครลิตร โดยปริมาตรสุดท้ายของ PCR mixture ในแต่ละหลอด เท่ากับ 25 ไมโครลิตร

(2) นำหลอด PCR เข้าเครื่อง PCR (DNA thermal cycler) (Biometra[®], TGradient, Germany) โดย PCR condition แสดงดังตารางที่ 13

(3) นำ 2nd PCR product ที่ได้มาตรวจหา PCR product ซึ่งมีขนาดของยีน SSU rRNA เท่ากับ ~530 bp ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1%

5.3 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

5.3.1 การเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% (Agarose Molecular Biology Grade) (Invitrogen, USA)

(1) ชั่งอะกาโรสจำนวน 1 กรัมใส่ลงในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.5x TBE buffer (Vivantis, Malasia) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

(2) นำเข้าไมโครเวฟเพื่อทำให้อะกาโรสละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิ 50-55°C

(3) เติมสีย้อม SYBR[®] Safe in DMSO (Invitrogen, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทลงถาดเจลที่ใส่ซีหัวไว้แล้วให้ได้ความหนาที่เหมาะสม รอให้เจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหัวออก

5.3.2 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

(1) นำเจลที่เตรียมไว้ใส่ลงใน electrophoresis chamber (Mupid CO., LTD., Japan) แล้วเท 0.5x TBE buffer (Vivantis, Malasia) ให้ท่วมเจล

(2) ผสม 2nd PCR Product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับ 5X Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตรแล้วเติมสารละลายทั้งหมด 6 ไมโครลิตร ลงในหลุมของเจล โดยหลุมแรกเติม VC 100bp Plus DNA Ladder (0.1 µg/µl) (Vivantis, Malasia) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร

(3) ทำการรันเจลที่ความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์ นาน 45 นาที นำไปตรวจสอบแถบของ DNA ด้วยเครื่อง UV transilluminator (SPECTROLINE[®], Model TVC-312A, USA) และบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

ตารางที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของ primer ที่ใช้จำแนกจีโนมไทป์ของเชื้อ *E. bieneusi*

ชื่อ primer	ลำดับนิวคลีโอไทป์ (5'→3')
MSP-1	TGA ATG (G,T)GT CCC TGT
MSP-2B	GTT CAT TCG CAC TAC T
MSP-3	GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G)(C,T) TAT
MSP-4B	CA AGC TTA TGC TTA AGT CCA GGG AG

ตารางที่ 10 Reagent ที่เป็นส่วนประกอบของ PCR mixture ของ Primary PCR สำหรับเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของเชื้อ *E. bieneusi*

Reagent	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
20 µM primer MSP-1	0.5	0.4 µM
20 µM primer MSP-2B	0.5	0.4 µM
10x PCR buffer	2.5	1x
10 mM dNTPs	2	200 µM (แต่ละชนิด)
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/µl)	0.2	1 U
ddH ₂ O	15.3	-
DNA แม่แบบ	3	-
ปริมาตรรวม	25	-

ตารางที่ 11 PCR condition ในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของ Primary PCR ของเชื้อ *E. bieneusi*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	10 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 35
Annealing	58	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	10 นาที	1

ตารางที่ 12 Reagent ที่เป็นส่วนประกอบของ PCR mixture ของ Secondary PCR สำหรับเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของเชื้อ *E. bieneusi*

Reagent	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
20 μ M primer MSP-3	0.5	0.4 μ M
20 μ M primer MSP-4B	0.5	0.4 μ M
10x PCR buffer	2.5	1x
10 mM dNTPs	2	200 μ M (แต่ละชนิด)
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/ μ l)	0.2	1 U
ddH ₂ O	17.8	-
1 st PCR Product	0.5	-
ปริมาตรรวม	25	-

ตารางที่ 13 PCR condition ในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของ Secondary PCR ของเชื้อ *E. bieneusi*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	10 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 35
Annealing	58	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	10 นาที	1

5.4 DNA sequencing และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

5.4.1 นำ PCR product ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ *E. bieneusi* จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 79, 81, 83, 88 และ 89 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick® Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

(1) ตัดชิ้นเจลที่มีแถบ DNA ขนาด 530 bp ด้วยใบมีดที่สะอาด
 (2) ชั่งน้ำหนักชิ้นเจล แล้วเติม buffer QC ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล
 (3) นำหลอดไปใส่ในเครื่อง Mini heating dry bath incubator (Major Science, USA) ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที โดยนำออกมาเขย่าทุกๆ 2-3 นาที ด้วยเครื่อง vortex mixer เมื่อชิ้นเจลละลายหมดแล้วจะได้สารละลายสีเหลือง

(4) เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล จากนั้นทำให้ผสมกันด้วยเครื่อง vortex mixer

(5) ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน QIAquick spin column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งสารละลายที่ไหลผ่านกระดาษกรองของ QIAquick spin column

(6) เติม buffer QC ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ไหลผ่านกระดาษกรองของ QIAquick spin column

(7) เติม buffer PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ไหลผ่านกระดาษกรองของ QIAquick spin column

(8) ใส่ QIAquick spin column ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงใน QIAamp spin column จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

(9) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลาย DNA ที่อยู่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่

(10) นำ PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์

5.4.2 ส่งตัวอย่าง PCR product ของยีน SSU rRNA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปทำ DNA sequencing ที่บริษัท FirstBASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย ซึ่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสอง ด้านของสาย DNA โดยใช้ไพรเมอร์ MSP-3 และ MSP-4B (two directional nucleotide sequencing)

5.4.3 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ *E. bienersi* มาเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *E. bienersi* ใน GenBank ของฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information โดยใช้ BLAST network service เพื่อยืนยันว่าเป็นยีน SSU rRNA ของเชื้อ *E. bienersi*

ผลการวิจัย

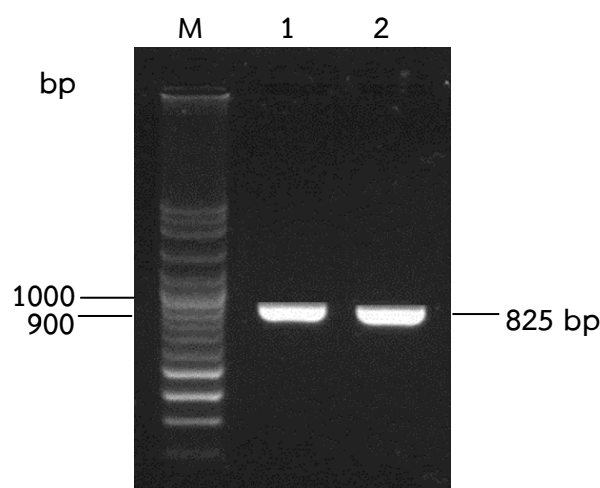
1. ความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในมูลสุกร

เมื่อทำการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกร โดยนำ DNA ของเชื้อที่สกัดได้จาก มูลสุกรจำนวน 245 ตัวอย่าง มาใช้เป็น DNA แม่แบบในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ด้วยวิธี nested-PCR พบว่าตัวอย่างจำนวน 51 ตัวอย่าง (20.8%) ให้ผลบวกจากการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA (ภาคผนวก ค) ซึ่ง PCR product ของยีนดังกล่าว มีขนาดเท่ากับ 825 bp ดังภาพที่ 1 เมื่อนำ PCR product ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. จำนวน 5 ตัวอย่าง มาทำให้บริสุทธิ์แล้วส่งตัวอย่างดังกล่าวไปทำ DNA sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 5 ตัวอย่าง ซึ่งมีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ 820 bp กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 5 ตัวอย่าง มีความเหมือน (identity) 99-100% ระหว่างยีน SSU rRNA ในการศึกษาครั้งนี้กับยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 14 และภาพที่ 2)

การศึกษานี้ตรวจพบเชื้อ *Cryptosporidium* spp. จากสุกรในฟาร์มจำนวน 10 ฟาร์ม ยกเว้น ฟาร์มที่ 3 ซึ่งฟาร์มที่พบความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรมากที่สุดคือ ฟาร์มที่ 4 (46.3%) ดังแสดงในตารางที่ 15

เมื่อพิจารณาความชุกของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรแต่ละช่วงอายุ (ตารางที่ 16) พบว่าสุกรอายุ >2-4 เดือน (45.10%) และ >4-6 เดือน (41.48%) มีความชุกของการติดเชื้อสูง อีกทั้งไม่พบการติดเชื้อในสุกรในช่วงอายุ >8 เดือน

เมื่อพิจารณาความชุกของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรเพศผู้และเมีย พบว่า สุกรเพศเมีย (62.75%) มีความชุกของการติดเชื้อสูงกว่าเพศผู้ (37.25%) (ตารางที่ 17)



ภาพที่ 1 ขนาดของ PCR product ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp.

Lane M คือ 100bp DNA marker

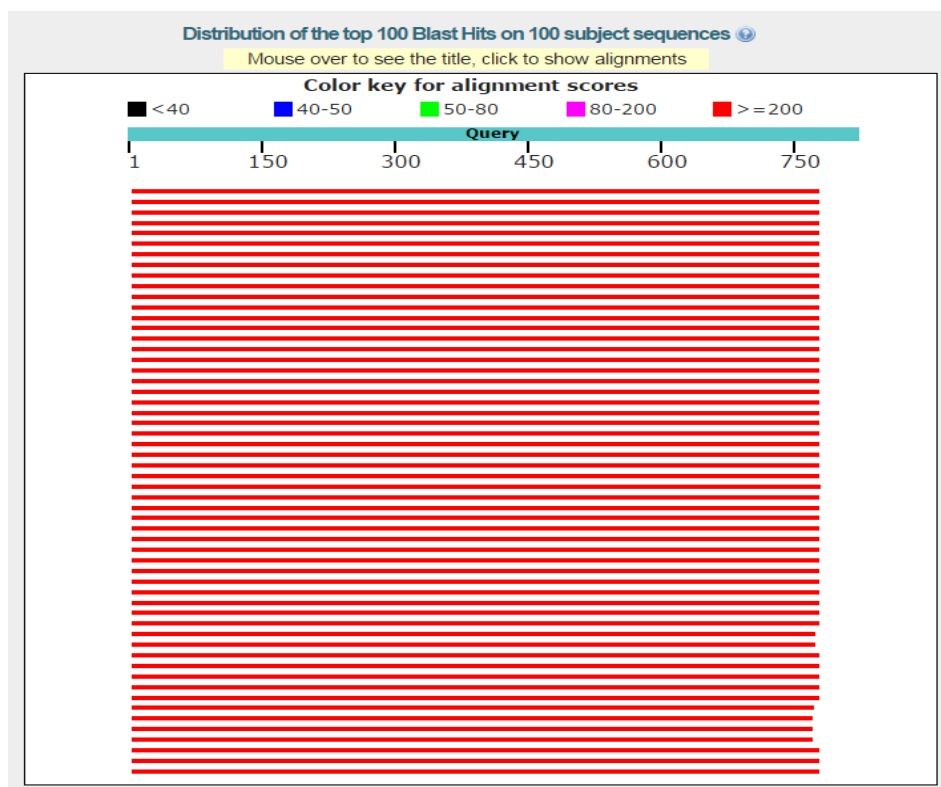
Lane 1-3 คือ PCR product ขนาด 825 bp

ตารางที่ 14 ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. กับฐานข้อมูล GenBank

ตัวอย่างที่	Identity	Coverage	Description of the maximum similarity
10	99%	94%	<i>Cryptosporidium</i> sp. pig genotype II isolate ZJ-25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: KX964622.1
12	99%	94%	<i>Cryptosporidium</i> sp. pig genotype II isolate ZJ-25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: KX964622.1
18	100%	93%	<i>Cryptosporidium suis</i> isolate HLJ-P9-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: KC481228.1
24	99%	95%	<i>Cryptosporidium</i> sp. pig genotype II isolate QP19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: JQ936508.1
35	100%	95%	<i>Cryptosporidium</i> sp. pig genotype II gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: E-1217-01 Sequence ID: AB449825.1

ตารางที่ 15 ความชุกของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *E. bieneusi* ในสุกรของแต่ละฟาร์ม

ฟาร์มที่	จำนวนสุกรที่นำมาศึกษา	จำนวนสุกรที่ติดเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp. (%)	จำนวนสุกรที่ติดเชื้อ <i>E. bieneusi</i> (%)
1	21	4 (19.0)	1 (4.8)
2	17	3 (17.6)	5 (29.4)
3	22	1 (4.5)	2 (9.1)
4	41	19 (46.3)	13 (31.7)
5	7	3 (42.9)	0
6	7	1 (14.3)	0
7	13	1 (7.7)	1 (7.7)
8	3	0	0
9	60	7 (11.7)	7 (11.7)
10	30	8 (26.7)	4 (13.3)
11	24	4 (16.7)	4 (16.7)
รวม	245	51 (20.8)	37 (15.1)



Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Cryptosporidium sp. pig genotype II isolate ZJ-25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	94%	0.0	99%	KX964622.1
Cryptosporidium sp. pig genotype II isolate QLO1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	94%	0.0	99%	KU668897.1
Cryptosporidium sp. pig genotype II isolate DY03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	94%	0.0	99%	KU668895.1
Cryptosporidium sp. pig genotype II isolate DY01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	94%	0.0	99%	KU668894.1
Cryptosporidium sp. pig genotype II isolate HY01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	94%	0.0	99%	KU668893.1
Cryptosporidium sp. pig genotype II isolate OP19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	94%	0.0	99%	JQ936508.1
Cryptosporidium sp. pig genotype II isolate OP18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	94%	0.0	99%	JQ936507.1
Cryptosporidium sp. pig genotype II isolate OP15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	94%	0.0	99%	JQ936504.1
Cryptosporidium sp. pig genotype II isolate OP13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1421	94%	0.0	99%	JQ936503.1

ภาพที่ 2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ 10 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank มีความเหมือน (identity) 99% กับยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. (accession numbers: KX964622.1, KU668897.1, KU668895.1 และ KU668894.1)

ตารางที่ 16 ความชุกของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *E. bieneusi* ในสุกรแต่ละช่วงอายุ

อายุของสุกร	สุกรที่ติดเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.		สุกรที่ติดเชื้อ <i>E. bieneusi</i>	
	จำนวนสุกร (ตัว)	ความชุก (%)	จำนวนสุกร (ตัว)	ความชุก (%)
<2 เดือน	6	11.76	1	2.70
>2-4 เดือน	23	45.10	19	51.35
>4-6 เดือน	21	41.18	16	43.25
>6-8 เดือน	1	1.96	0	0
>8-12เดือน	0	0	0	0
>1 ปี	0	0	1	2.70

ตารางที่ 17 ความชุกของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *E. bieneusi* ในสุกรเพศผู้และเมีย

เพศของสุกร	สุกรที่ติดเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.		สุกรที่ติดเชื้อ <i>E. bieneusi</i>	
	จำนวนสุกร (ตัว)	ความชุก (%)	จำนวนสุกร (ตัว)	ความชุก (%)
ผู้	19	37.25	14	37.84
เมีย	32	62.75	23	62.16

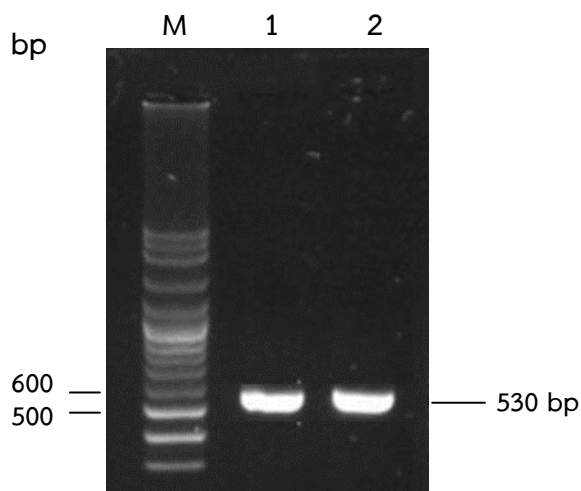
2. ความชุกของเชื้อ *Enterocytozoon bieneusi* ในมูลสุกร

เมื่อทำการตรวจหาเชื้อ *E. bieneusi* ในมูลสุกร โดยนำ DNA ของเชื้อที่สกัดได้จากมูลสุกร จำนวน 245 ตัวอย่าง มาใช้เป็น DNA แม่แบบในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ส่วน ITS ของเชื้อ *E. bieneusi* ด้วยวิธี nested-PCR พบว่าตัวอย่างจำนวน 37 ตัวอย่าง (15.1%) ให้ผลบวกจากการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA (ภาคผนวก ค) ซึ่ง PCR product ของยีนดังกล่าว มีขนาดเท่ากับ 530 bp ดังภาพที่ 3 เมื่อนำ PCR product ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ *E. bieneusi* จำนวน 5 ตัวอย่าง มาทำให้บริสุทธิ์แล้วส่งตัวอย่างดังกล่าวไปทำ DNA sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 5 ตัวอย่าง ซึ่งมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 520 bp กับลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 5 ตัวอย่าง มีความเหมือน (identity) 98-99% ระหว่างยีน SSU rRNA ในการศึกษาครั้งนี้กับยีน SSU rRNA ของเชื้อ *E. bieneusi*. ในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 18 และภาพที่ 4)

ผลการทดลองนี้ตรวจพบเชื้อ *E. bieneusi* จากมูลสุกรในฟาร์มจำนวน 8 ฟาร์ม ยกเว้นฟาร์มที่ 5, 6 และ 8 ซึ่งฟาร์มที่พบความชุกมากที่สุดคือ ฟาร์มที่ 4 (31.7%) ดังแสดงในตารางที่ 15

เมื่อพิจารณาความชุกของการติดเชื้อ *E. bieneusi* ในสุกรแต่ละช่วงอายุ (ตารางที่ 16) พบว่าสุกรอายุ >2-4 เดือน (51.35%) มีความชุกของการติดเชื้อสูงที่สุด รองลงมาคือ >4-6 เดือน (43.25%) ส่วนช่วงอายุ <2 เดือน และ >1 ปี ความชุกของการติดเชื้อต่ำ คือ 2.70% และไม่พบการติดเชื้อในสุกรในช่วงอายุ >6-8 เดือน และ >8-12 เดือน

เมื่อพิจารณาความชุกของการติดเชื้อ *E. bieneusi* ในสุกรเพศผู้และเมีย พบว่าสุกรเพศเมีย (62.16%) มีความชุกของการติดเชื้อสูงกว่าเพศผู้ (37.84%) (ตารางที่ 17)



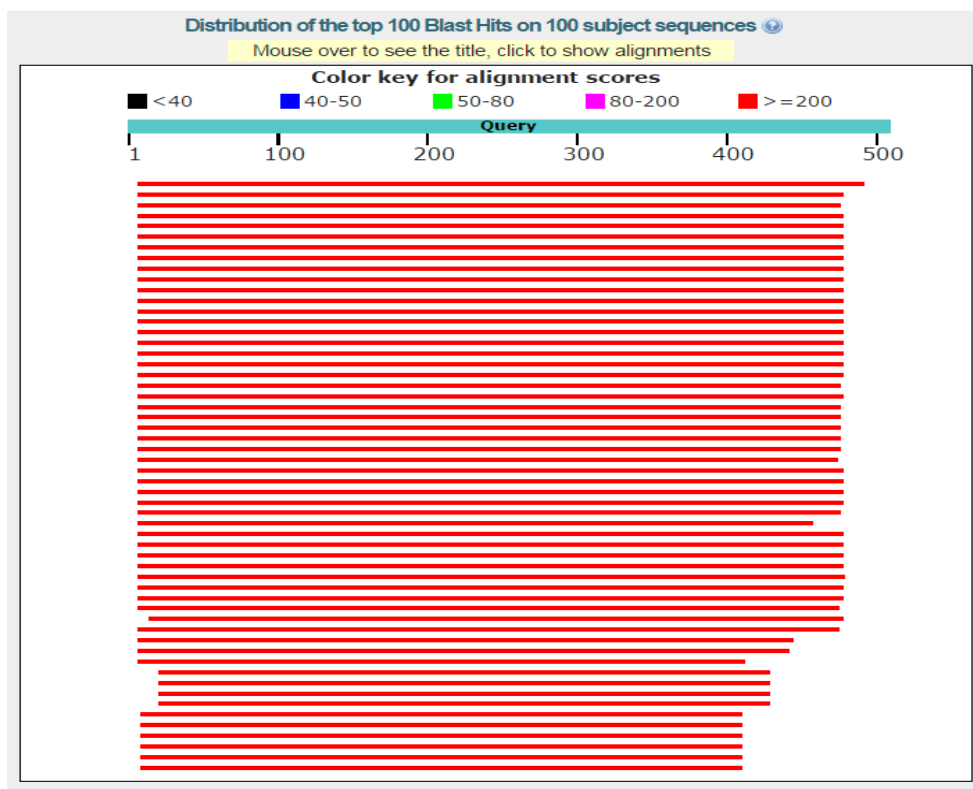
ภาพที่ 3 ขนาดของ PCR product ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ *E. bieneusi*

Lane M คือ 100bp DNA marker

Lane 1-3 คือ PCR product ขนาด 530 bp

ตารางที่ 18 ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน SSU rRNA ของเชื้อ *E. bieneusi* กับฐานข้อมูล GenBank

ตัวอย่างที่	Identity	Coverage	Description of the maximum similarity
79	98%	88%	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> genotype F small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: AF135833.1
81	99%	94%	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> small subunit ribosomal RNA gene and intergenic spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: AF023245.1
83	99%	90%	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> genotype E small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: AF135832.1
88	99%	94%	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> genotype E small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: AF135832.1
89	99%	92%	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> genes for small subunit ribosomal RNA and internal transcribed spacer 1, partial sequence, note: genotype: E1 Sequence ID: AB897499.1



Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Enterocytozoon bienersi small subunit ribosomal RNA gene and intergenic spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	857	857	95%	0.0	99%	AF023245.1
Enterocytozoon bienersi genotype E small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	852	852	92%	0.0	99%	AF135832.1
Enterocytozoon bienersi genes for small subunit ribosomal RNA and internal transcribed spacer 1, partial sequence, note: genotype: E1	850	850	92%	0.0	99%	AB897499.1
Enterocytozoon bienersi genotype K small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	841	841	92%	0.0	99%	AF267141.1
Enterocytozoon bienersi isolate Tn.42 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	92%	0.0	99%	JF797334.1
Enterocytozoon bienersi genotype G small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	92%	0.0	99%	AF135834.1
Enterocytozoon bienersi genotype P small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	92%	0.0	99%	AF267146.1
Enterocytozoon bienersi genotype A small subunit ribosomal RNA, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	92%	0.0	99%	AF101197.1
Enterocytozoon bienersi isolate Cha022 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	832	832	92%	0.0	99%	FJ469815.1

ภาพที่ 4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ 81 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank มีความเหมือน (identity) 99% กับยีน SSU rRNA ของเชื้อ *E. bienersi* (accession numbers: AF023245.1, AF135832.1, AF135832.1 และ AF267141.1)

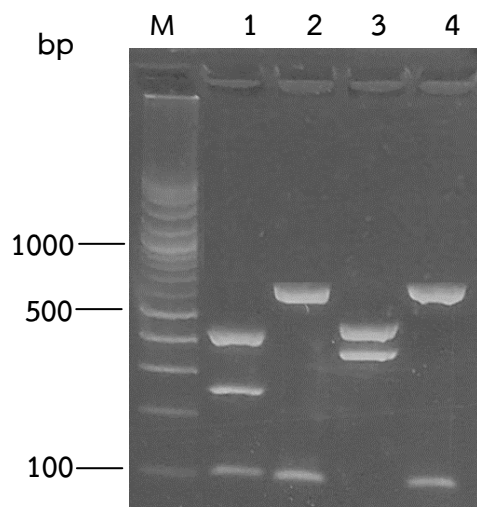
3. จีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ที่พบในมูลสุกร

เมื่อนำ PCR product ของยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp จำนวน 51 ตัวอย่าง มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ SspI และ VspI แล้วนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อดูรูปแบบ RFLP และจำแนกเชื้อ *Cryptosporidium* ออกเป็นสปีชีส์/จีโนไทป์ พบว่าตัวอย่างจำนวน 42 ตัวอย่าง (82.4%) เป็น *Cryptosporidium* spp. pig genotype II ส่วนตัวอย่างจำนวน 9 ตัวอย่าง (17.6%) เป็น *Cryptosporidium suis* (ตารางที่ 19) โดยตรวจพบเชื้อทั้งสองชนิดในสุกรจากฟาร์มที่ 1, 4, 9, 10 และ 11 ซึ่งพบความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. pig genotype II สูงกว่า *C. suis* ส่วนสุกรจากฟาร์มที่ 2, 3, 5, 6 และ 7 ตรวจพบเฉพาะเชื้อ *Cryptosporidium* spp. pig genotype II

รูปแบบ RFLP ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. pig genotype II แสดงดังภาพที่ 2 โดย PCR product ของยีน SSU rRNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ SspI ได้ DNA 4 ชิ้น ขนาด 413 bp, 268 bp, 103 bp และ 19 bp และ PCR product ที่ตัดด้วย VspI ได้ DNA 2 ชิ้น ขนาด 589 bp และ 104 bp ส่วนรูปแบบ RFLP ของเชื้อ *C. suis* พบว่าเมื่อตัด PCR product ของยีน SSU rRNA ด้วยเอนไซม์ SspI ได้ DNA 4 ชิ้น ขนาด 453 bp, 379 bp, 11 bp และ 9 bp ส่วน PCR product ที่ตัดด้วย VspI ได้ DNA 2 ชิ้น ขนาด 603 bp และ 104 bp (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 19 จีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ที่พบในสุกรในแต่ละฟาร์ม

ฟาร์มที่	จีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	
	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II (%)	<i>Cryptosporidium suis</i> (%)
1	3 (75)	1 (25)
2	3 (100)	0
3	1 (100)	0
4	16 (84.2)	3 (15.8)
5	3 (100)	0
6	1 (100)	0
7	1 (100)	0
8	0	0
9	6 (85.7)	1 (14.3)
10	5 (62.5)	3 (37.5)
11	3 (75)	1 (1)
รวม	42 (82.4)	9 (17.6)



ภาพที่ 5 รูปแบบ RFLP ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. pig genotype II (Lane 1-2) และ *C. suis* (Lane 3-4) ที่พบในมูลสุกร

Lane M คือ 100bp DNA marker

Lane 1, 3 คือ PCR product ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ SspI

Lane 2, 4 คือ PCR product ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ VspI

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. ความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกร เท่ากับ 20.8% (51/245 ตัวอย่าง) จากการตรวจหายีน SSU rRNA ด้วยวิธี nested-PCR
2. เชื้อ *Cryptosporidium* spp. ที่พบในสุกร เป็นเชื้อ *Cryptosporidium* spp. pig genotype II 82.4% (42/51 ตัวอย่าง) และ *Cryptosporidium suis* 17.6% (9/51 ตัวอย่าง) จากการจำแนกด้วยวิธี RFLP
3. ความชุกของเชื้อ *Enterocytozoon bieneusi* ในสุกร เท่ากับ 15.1% (37/245 ตัวอย่าง) จากการตรวจหายีน SSU rRNA ด้วยวิธี nested-PCR
4. ความชุกของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *E. bieneusi* พบสูงที่สุดในสุกรช่วงอายุ >2-4 เดือน และพบความชุกในเพศเมียสูงกว่าเพศผู้

ข้อเสนอแนะ

การทดลองขั้นต่อไปเป็นการจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อ *E. bieneusi* โดยทำการเตรียมตัวอย่าง PCR product ของยีน SSU rRNA ของ *E. bieneusi* เพื่อส่งไปทำ DNA sequencing และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์เพื่อจำแนกออกเป็นจีโนไทป์ และทำการยืนยันจีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ของยีน SSU rRNA

ผลผลิต

อยู่ในระหว่างการเขียน Manuscript เพื่อตีพิมพ์ผลงานเรื่อง First report on *Cryptosporidium* pig genotype II and *Cryptosporidium suis* in pig in Chon buri province, Thailand ลงในวารสารระดับนานาชาติ หรือในรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการ (Proceeding) ระดับชาติ

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานของเชื้อ *Enterocytozoon bieneusi* และ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรที่เลี้ยงในจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย และสามารถนำไปใช้อธิบายแหล่งของเชื้อดังกล่าวที่แพร่จากสัตว์สู่คน ซึ่งจะนำไปสู่การให้คำแนะนำในการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อได้

อภิปรายผลการวิจัย

Cryptosporidium spp. เป็นเชื้อโปรโตซัวปรสิต รายงานปัจจุบันพบว่าประกอบด้วย 27 สปีชีส์และมากกว่า 70 จีโนไทป์ที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในคนและสัตว์หลายชนิด ได้แก่สัตว์เคี้ยวเอื้องสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และนก เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง มีผลทำให้โฮสต์ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องและสัตว์แรกเกิดเสียชีวิต (Jex *et al.*, 2008; Tomazic *et al.*, 2013; Xiao, 2010) ในบรรดาสัตว์ชนิดต่างๆ สุกรถือว่าเป็นโฮสต์กักตุน (reservoir host) ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. (Leoni *et al.*, 2006) สปีชีส์/จีโนไทป์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ที่มีรายงานในสุกร ได้แก่ *C. suis*, *C. parvum*, *C. muris*, *C. andersoni*, *Cryptosporidium* pig genotype II (Kvác *et al.*, 2013) และ *Cryptosporidium* mouse genotype I (Yui *et al.*, 2014)

การติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรเกิดทาง oral-fecal route ถึงแม้ว่าสุกรที่ติดเชื้อบางตัวจะไม่แสดงอาการก็ตาม แต่สุกรที่มีภูมิคุ้มกันต่ำและสุกรแรกเกิดจะมีอาการอุจจาระร่วงรุนแรง น้ำหนักลด และตาย (Bouزيد *et al.*, 2013; Omidian *et al.*, 2014) มีรายงานความชุกของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรจากประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยพบความชุกในประเทศจีน 3.3-56.8% (Qiu *et al.*, 2008; Zhao, 2003; Wang *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2015) ออสเตรเลีย 6.0-22.1% (Ryan *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2008) สเปน 22.5% (Suarez-Luengas *et al.*, 2007) เยอรมันนี 1.4% (Wieler *et al.*, 2001) เดนมาร์ก 31.9-40.9% (Maddox-Hyttel *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2015) แคนาดา 26% (Budu-Amoako *et al.*, 2012) สาธารณรัฐเช็ก 16.5%-26.4% (Kvác *et al.*, 2009b; Kvác *et al.*, 2009c; Nemejc *et al.*, 2012; Nemejc *et al.*, 2013) สวิตเซอร์แลนด์ 14.4% (Schubnell *et al.*, 2016) เวียดนามกลาง (central Vietnam) 14.5% (Nguyen *et al.*, 2012) ผลการศึกษานี้พบความชุกของ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรที่เลี้ยงในจังหวัดชลบุรี 20.8% สาเหตุที่แต่ละการศึกษาพบความชุกของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากแหล่งของตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษา และวิธีการตรวจหาเชื้อ มีผลต่อความชุกของเชื้อที่ตรวจพบ

ผลของ RFLP analysis ของการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกร เป็น *Cryptosporidium* pig genotype II (82.4%) และ *C. suis* (17.6%) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งตรวจพบเชื้อในสุกร (Lin *et al.*, 2015; Nemejc *et al.*, 2012; Budu-Amoako *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2015; Schubnell *et al.*, 2016) และเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยมากในสุกร (Xiao, 2010) ถึงแม้ว่าสปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรค cryptosporidiosis ในคนคือ *C. parvum* และ *C. hominis* (Hunter & Thompson, 2005) ซึ่ง *C. hominis* พบเฉพาะในคน ส่วน *C. parvum* พบในสัตว์เลี้ยงหลายชนิด และเป็นสปีชีส์หลักที่ทำให้เกิดการติดต่อจากสัตว์มาสู่คน (zoonosis) และผลการศึกษานี้ตรวจไม่พบ *C. parvum* ในสุกรที่ทำการศึกษา แต่ทั้ง *C. suis* และ *Cryptosporidium* pig genotype II เป็นเชื้อโรคที่สำคัญที่ทำให้เกิดการติดต่อจากสัตว์ไปสู่คน การศึกษานี้เป็นรายงานแรกของความชุกของการติดเชื้อและสปีชีส์/จีโนไทป์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรในประเทศไทย

ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในประชากรไทยไม่มากนัก รายงานความชุกของการติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV เท่ากับ 8.8-94.4% (Uga *et al.*, 1998; Gatei *et al.*, 2002; Saksirisampant *et al.*, 2002; Moolasart *et al.*, 1995; Srisuphanunt *et al.*, 2011) โดยสปีชีส์ที่พบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ได้แก่ *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis* และ *C. parvum* (Gatei *et al.*, 2002; Tiangtip & Jongwutiwes, 2002; Nuchjangreed *et al.*, 2008; Srisuphanunt *et al.*, 2011) ถึงแม้ *C. suis* จะตรวจไม่พบในประชากรไทย แต่สปีชีส์นี้พบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ในประเทศเปรู (Cama *et al.*, 2007) และประเทศจีน (Wang *et al.*, 2013) ส่วน *Cryptosporidium* pig genotype II พบในคนที่เป็ยโรคอุจจาระร่วงคนในสาธารณรัฐเช็ก (Kvác *et al.*, 2009a)

รายงานความชุกของการติดเชื้อและสปีชีส์/จีโนไทป์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสัตว์หลายชนิดในประเทศไทย มีดังนี้ ความชุกในวัวที่เลี้ยงในจังหวัดสระบุรี กาญจนบุรีและนครปฐม 1.3% ซึ่งเป็น *C. parvum* bovine genotype (Inprankaew *et al.*, 2009) วัวที่เลี้ยงในจังหวัดชลบุรี 9.6% (Nuchjangreed *et al.*, 2008) ซึ่งเป็น *C. parvum* วัวที่เลี้ยงที่ภาคตะวันตก 15.5% ซึ่งเป็น *C. parvum* bovine genotype (Inprankaew *et al.*, 2010) ลิงแสมในจังหวัดลพบุรี 1% ซึ่งเป็น monkey genotype และงูเลี้ยง (pet snake) 24.2% ซึ่งเป็น *C. parvum* mouse genotype, *C. serpentis* และ *C. muris* (Yimming *et al.*, 2016)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้เชื้อ *Cryptosporidium* spp. ที่พบในสุกรมีหลายสปีชีส์/จีโนไทป์ แต่จากการสำรวจในมูลสัตว์ชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อ *Cryptosporidium* spp. บางสปีชีส์มีความจำเพาะต่อโฮสต์เพียงชนิดเดียว เช่น *Cryptosporidium canis* พบเฉพาะในสุนัข (Satoh *et al.*, 2006; Huber *et al.*, 2007) *Cryptosporidium felis* พบเฉพาะในแมว (Xiao, 2010)

E. bienersi เป็นเชื้อโปรโตซัวปรสิตที่อยู่ในกลุ่มที่เรียกกันทั่วๆ ไปว่า Microsporidium เชื้อในกลุ่มนี้ต้องอาศัยอยู่ในเซลล์โฮสต์ (obligate intracellular protozoa) พบได้ทั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง โรคที่เกิดจากการติดเชื้อกลุ่มนี้เรียกว่าโรค microsporidiosis ซึ่งผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่จะมีอาการท้องร่วงเรื้อรัง โดยมีเชื้อ *E. bienersi* เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ โรคติดเชื้อนี้สามารถพบได้ทั่วโลก ความชุกของโรคพบได้ตั้งแต่ 2-50% ในผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการท้องร่วงเรื้อรัง (Bryan, 1992) จากการศึกษาในประเทศไทย พบว่า microsporidia เป็นสาเหตุของท้องเสียเรื้อรังในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ถึง 33% (Wanachiwanawin *et al.*, 1998)

ปัจจุบันรายงานความชุกของการติดเชื้อ *E. bienersi* ในคนและสัตว์ในประเทศไทยมีไม่มากนัก โดยพบความชุกในเด็กกำพร้าที่สถานสงเคราะห์ 4.1% (Leelayoova *et al.*, 2005) ซึ่งเป็นจีโนไทป์ A แมวจรจัดที่อาศัยอยู่ในวัดในเขตภาคกลาง 31.3% (Mori *et al.*, 2013) ซึ่งเป็นจีโนไทป์ D, ETMK2, ETMK3 และ ETMK4 คนเลี้ยงสุกรในจังหวัดนครปฐม 1.4% และสุกรที่เลี้ยงในจังหวัดนครปฐม 15.7% ซึ่งเป็นจีโนไทป์ O E และ H (Leelayoova *et al.*, 2009) ผลการศึกษานี้พบความชุกของการติดเชื้อ *E. bienersi* ในสุกรที่เลี้ยงในจังหวัดชลบุรี 15.1% ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานในสุกรที่ผ่านมา แต่ความชุกของศึกษานี้ต่ำกว่าการศึกษาในสุกรในประเทศอื่นๆ ได้แก่ สุกรในประเทศบราซิล 59.3% (Fiuza *et al.*, 2015) สหรัฐอเมริกา 32% (Buckholt *et al.*, 2002) จีน 16.4-45.1% (Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2011) สาธารณรัฐเช็ก 94% (Sak *et al.*, 2008) สวิตเซอร์แลนด์ 34.9%

(Breitenmoser *et al.*, 1999) ญี่ปุ่น 33.3% (Abe & Kimata, 2010) และเยอรมันนี 32.3-66.7% (Reetz *et al.*, 2009; Rinder *et al.*, 2000) แต่ผลการศึกษาที่พบความชุกของการติดเชื้อ *E. bieneusi* ในสุกรสูงกว่าการศึกษาในสาธารณรัฐเกาหลีใต้ ซึ่งพบความชุกในสุกร 14% (Jeong *et al.*, 2007) เยอรมันนี 10% (Dengjel *et al.*, 2001) สาเหตุที่แต่ละการศึกษาพบความชุกของเชื้อ *E. bieneusi* ในสุกรแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากแหล่งของตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษา และวิธีการตรวจหาเชื้อ มีผลต่อความชุกของเชื้อที่ตรวจพบ

ผลการศึกษาที่พบความชุกของการติดเชื้อทั้ง *Cryptosporidium* spp. และ *E. bieneusi* สูงที่สุดในสุกรช่วงอายุ >2-4 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Leelayoova *et al.* (2009) ซึ่งรายงานความชุกของ *E. bieneusi*. สูงที่สุดในสุกรอายุ 2-4 เดือน (33.8%) และ Petersen *et al.* (2015) พบความชุกของ *Cryptosporidium* spp. สูงที่สุดในสุกรอายุ 9-14 สัปดาห์ (72.2%) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าสุกรที่เลี้ยงในเมืองต่างๆ ทางภาคเหนือของประเทศไทย อายุ <1 เดือน มีอัตราการติดเชื้อ *E. bieneusi* (63.6%) สูงกว่าสุกรอายุ 1-2 เดือน (41.0%) และ สุกรอายุ >2 เดือน (26.3%) (Li *et al.*, 2014) และมีการศึกษาในสาธารณรัฐเช็กพบว่าอัตราการติดเชื้อ *E. bieneusi* ในสุกรแต่ละช่วงอายุไม่มีความแตกต่างกัน (Sak *et al.*, 2008) ความแตกต่างของความชุกของ *E. bieneusi* ในสุกรแต่ละช่วงอายุของแต่ละการศึกษาอาจเนื่องมาจากความหนาแน่นของสุกรในฟาร์ม สภาพแวดล้อมและระบบสุขาภิบาลของฟาร์ม ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มโอกาสในการติดต่อกับการติดเชื้อ *E. bieneusi* ระหว่างสุกรแต่ละตัว (Zhao *et al.*, 2014)

ปกติแล้วสุกรที่ติดเชื้อ *E. bieneusi* จะไม่มีอาการ ดังนั้นโรค microsporidiosis ในสุกรที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้จึงไม่ได้รับความสนใจมากนัก แต่สุกรเป็นโฮสต์กักตุนที่สำคัญของ *E. bieneusi* เนื่องจากสุกรติดเชื้อนี้ได้ตั้งแต่อายุยังน้อยและสามารถปล่อยสปอร์ออกมากับมูลได้ตลอดชีวิต (Sak *et al.*, 2008) นอกจากนี้การนำมูลสุกรมาใช้เป็นปุ๋ยในการเพาะปลูกพืชผัก ทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อสู่สิ่งแวดล้อม รวมทั้งลงสู่แหล่งน้ำ ความรู้เกี่ยวกับบ่อนุระบาดวิทยาของเชื้อ *E. bieneusi* ในโฮสต์แต่ละชนิดเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการควบคุมการติดเชื้อ *E. bieneusi* ในคน เพราะยังไม่มีวัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อและยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค microsporidiosis

ผลการศึกษาที่เป็นรายงานแรกของความชุกและจีโนไทป์/สปีชีส์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในสุกรในประเทศไทย ซึ่งมีความชุกเท่ากับ 20.8% และเป็นเชื้อ *Cryptosporidium* spp. pig genotype II และ *C. suis* และพบความชุกของ *E. bieneusi* เท่ากับ 15.1% แสดงให้เห็นว่าสุกรโฮสต์กักตุนที่สำคัญของเชื้อทั้งสองชนิด การศึกษาในอนาคตควรจะทำการจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อ *E. bieneusi* เพื่อให้ทราบจำนวนของจีโนไทป์หลักของเชื้อที่พบในมูลสุกร ซึ่งสามารถนำมาอธิบายแหล่งของการติดเชื้อในคนว่ามาจากสัตว์หรือไม่ ทำให้สามารถนำมาหาทางป้องกัน ควบคุมการติดเชื้อ และแพร่กระจายของเชื้อ *E. bieneusi* และ *Cryptosporidium* spp. จากสัตว์เลี้ยงสู่สิ่งแวดล้อมต่อไป

บรรณานุกรม

- Abe, N. & Kimata, I. 2010. Molecular survey of *Enterocytozoon bieneusi* in a Japanese porcine population. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10: 425-427.
- Bouzid, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M. & Tyler, K.M. 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 26: 115-134.
- Breitenmoser, A.C., Mathis, A., Bürgi, E., Weber, R. & Deplazes, P. 1999. High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. *Parasitol.* 118: 447-453.
- Bryan, R.T. 1992. Microsporidiosis as an AIDS-related opportunistic infection. *Clin. Infect. Dis.* 21(suppl. 1): S62-5.
- Buckholt, M.A., Lee, J.H. & Tzipori, S. 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2595-2599.
- Budu-Amoako, E., Greenwood, S.J., Dixon, B.R., Barkema, H.W., Hurnik, D., Estey, C. & McClure, J.T. 2012. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in pigs on Prince Edward Island, Canada. *Vet. Parasitol.* 184(1): 18-24.
- Cama, V.A., Ross, J.M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Navincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, R.H., Bern, C. & Xiao, L. 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J. Infect. Dis.* 196: 684-691.
- Dengjel, B., Zahler, M., Hermanns, W., Heinritz, K., Spillmann, T., Thomschke, A., Loscher, T., Gothe, R. & Rinder, H. 2001. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4495-4499.
- Fayer, R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124: 90-97.
- Fiuza, V.R., Oliveira, F.C., Fayer, R. & Santin, M. 2015. First report of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs in Brazil. *Parasitol. Int.* 64(4): 18-23.
- Gatei, W., Suputtamongkol, Y., Waywa, D., Ashford, R.W., Bailey, J.W., Greensill, J., Beeching, N.J., & Hart, C.A. 2002. Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96: 797-802.
- Huber, F., da Silva, S., Bomm, T.C., Teixeira, K.R. & Bello, A.R. 2007. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Vet. Parasitol.* 150: 65-74.
- Hunter, P.R. & Thompson, R.C.A. 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and

- Cryptosporidium*. Int. J. Parasitol. 35: 1181-1190.
- Inpankaew, T., Traub, T., Thompson, R.C.A. & Sukthana, Y. 2007. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 38: 247-255.
- Inprankaew, T., Arunvipas, P., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W. & Jittapalapong, S. 2009. Prevalence, risk factors and genotyping of *Cryptosporidium* spp. from feces of dairy cows in Saraburi, Kanchanaburi and Nakhon pathom provinces. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 43: 58-62.
- Inprankaew, T., Jiyipong, T., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Thompson, R.C.A. & Jittapalapong, S. 2010. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* spp. from dairy cow fecal samples in western Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 41(4): 770-775.
- Jeong, D.K., Won, G.Y., Park, B.K., Hur, J., You, J.Y., Kang, S.J., Oh, I.G., Lee, Y.S., Stein, B.D. & Lee, J.H. 2007. Occurrence and genotypic characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs with diarrhea. Parasitol. Res. 102:123-128
- Jex, A.R., Pangasa, A., Campbell, B.E., Whipp, M., Hogg, G., Sinclair, M.I., Stevens, M., & Gasser, R.B. 2008. Classification of *Cryptosporidium* species from patients with sporadic cryptosporidiosis by use of sequencebased multilocus analysis following mutation scanning. J. Clin. Microbiol. 46: 2252-2262.
- Jittapalapong, S., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Siripanth, C. & Stich, R.W. 2006. Prevalence of *Cryptosporidium* among dairy cows in Thailand. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1081: 328-335.
- Johnson, J., Buddle, R., Reid, S., Armson, A. & Ryan, U.M. 2008. Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. Exp. Parasitol. 119(3): 418-21.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Heise, W., Loscher, T. & Rinde, R.H. 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimen. Trop. Med. Inter. Health 1: 373-378.
- Kvác, M., Hanzlíková, D., Sak, B. & Kvetonová, D. 2009b. Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. Vet. Parasitol. 160: 319-322
- Kvác, M., Kestřánová, M., Pinková, M., Květoňová, D., Kalinová, J., Wagnerová, P., Kotková, M., Vitovec, J., Ditrich, O., McEvoy, J., Stenger, B. & Sak, B. 2013. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). Vet. Parasitol. 191: 218-227
- Kvác, M., Kvetonova, B. S. & Ditrich, O. 2009a. *Cryptosporidium* pig genotype

- II in immunocompetent man. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 982–983.
- Kvác, M., Sak, B., Hanzlíková, D., Kotilová, J. & Kvetonová, D. 2009c. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. *Parasitol. Res.* 104(2): 425-8.
- Leelayoova, S., Piyaraj, P., Subrungruang, I., Pagornrat, W., Naaglor, T., Phumklan, S., Taamasri, P., Suwanasri, J. & Mungthin, M. 2009. Genotypic characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in specimens from pigs and humans in a pig farm community in Central Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 47: 1572-1574.
- Leelayoova, S., Subrungruang, I., Rangsin, R., Chavalitshewinkoon-Petmitr, P., Worapong, J., Naaglor, T. & Mungthin, M. 2005. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* genotypae A in a Thai orphanage. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73: 104-107.
- Leelayoova, S., Subrungruang, I., Suputtamongkol, Y., Worapong, J., Chavalitshewinkoon-Petmitr, P. & Mungthin, M. 2006. Identification of genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* from stool samples from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3001-3004.
- Leoni, F., Amar, C., Nichols, G., Pedraza-Díaz, S. & McLauchlin, J. 2006. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.* 55: 703-707
- Li, W., Diao, R., Yang, J., Xiao, L., Lu, Y., Li, Y. & Song, M. 2014. High diversity of human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in swine in northeast China. *Parasitol. Res.* 113: 1147–1153.
- Lin, Q., Wang, X.-Y., Chen, J.-W., Ding, L. & Zhao, G.-H. 2015. *Cryptosporidium suis* infection in post-weaned and adult pigs in Shaanxi Province, Northwestern China. *Korean J. Parasitol.* 53(1): 113-117.
- Maddox-Hyttel, C., Langkjaer, R.B., Enemark, H.L. & Vigre, H. 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs-occurrence and management associated risk factors. *Vet. Parasitol.* 141: 48-59
- Moolasart, P., Eampokalap, B., Ratanasrithong, M., Kanthasing, P., Tansupaswaskul, S., & Tanchanpong, C. 1995. Cryptosporidiosis in HIV infected patients in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 26(2), 335-338.
- Mori, H., Mahittikorn, A., Thammasonthijarern, N., Chaisiri, K., Rojekittikhun, W. & Sukthana, Y. 2013. Presence of zoonotic *Enterocytozoon bieneusi* in cats in a temple in central Thailand. *Vet. Parasitol.* 197(3-4): 696-701.
- Němejc, K., Sak, B., Květoňová, D., Hanzal, V., Jeníková, M. & Kvác, M. 2012.

- The first report on *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) (Czech Republic). *Vet. Parasitol.* 184(2-4): 122-5.
- Němejc, K., Sak, B., Květoňová, D., Kernerová, N., Rost, M., Cama, V.A. & Kváč, M. 2013. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitol. Res.* 112(3): 1143-54.
- Nguyen, S.T., Honma, H., Geurden, T., Ikarash, M., Fukuda, Y., Huynh, V.V., Nguyen, D.T., & Nakai, Y. 2012. Prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* oocyst shedding in pigs in Central Vietnam. *Res. Vet. Sci.* 93: 848-852.
- Nuchjangreed, C., Boonrod, K., Ongerth, J. & Karanis, P. 2008. Prevalence and molecular characterization of human and bovine *Cryptosporidium* isolates in Thailand. *Parasitol. Res.* 103: 1347-1353.
- Omidian, Z., Ebrahimzadeh, E., Shahbazi, P., Asghari, Z. & Shayan, P. 2014. Application of recombinant *Cryptosporidium parvum* P23 for isolation and prevention. *Parasitol. Res.* 113: 229-237.
- Petersen, H.H., Jianmin, W., Katakam, K.K., Mejer, H., Thamsborg, S.M., Dalsgaard, A., Olsen, A. & Enemark, H.L. 2015. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Danish organic pig farms: Seasonal and age-related variation in prevalence, infection intensity and species/genotypes. *Vet. Parasitol.* 214(1-2): 29-39.
- Qiu, S.X., Lu, Q.B., Qi, M., Zhang, X.H., Duan, Z.X., Nin, C.S., Jian, F.C. & Zhang, L.X. 2008. The prevalence of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Henan province. *Chin. J. Zoonosis.* 24: 481-482.
- Reetz, J., Nöckler, K., Reckinger, S., Vargas, M.M., Weiske, W. & Broglia, A. 2009. Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitol. Int.* 58: 285-292.
- Rinder, H., Thomschke, A., Dengjel, B., Gothe, R., Löscher, T. & Zahler, M. 2000. Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. *J. Parasitol.* 86: 185-188.
- Ryan, U.M., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, J.R., Robertson, I.D. & Thompson, R.C. 2003. Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3970-3974.
- Sak, B., Kváč, M., Hanzlíková, D. & Cama, V. 2008. First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 153: 220-224.

- Saksirisampant, W., Eampokalap, B., Rattanasrithong, M., Likanonsakul, S., Wiwanitkit, V., Nasingkarn, A. & Denmasae, N. 2002. A prevalence of *Cryptosporidium* infections among Thai HIV-infected patients. *J. Med. Assoc. Thai.* 85 (suppl 1), S424-8.
- Satoh, M., Matsubara-Nihei, Y., Sasaki, T. & Nakai, Y. 2006. Characterization of *Cryptosporidium canis* isolated in Japan. *Parasitol. Res.* 99: 746-748.
- Schubnell, F., von Ah, S., Graage, R., Sydler, T., Sidler, X., Hadorn, D. & Basso, W. 2016. Occurrence, clinical involvement and zoonotic potential of endoparasites infecting swiss pigs. *Parasitol. Int.* 65(6 Pt A): 618-624.
- Smith, H. V., Caccio, S. M., Tait, A., McLauchlin, J. & Thompson, R. C. A. 2006. Tools for investigating the abiotic transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol.* 22: 160-166.
- Srisuphanunt, M., Saksirisampant, W., & Karanis, P. 2011. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* isolated from HIV/AIDS patients in urban areas of Thailand. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 105: 463-468.
- Suárez-Luengas, L., Clavel, A., Quílez, J., Goñi-Cepero, M.P., Torres, E., Sánchez-Acedo, C. & del Cacho, E. 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 148: 231-235.
- Tiangtip, R. & Jongwutiwes, S. 2002. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health* 7: 357-364.
- Tomazic, M.L., Maidana, J., Dominguez, M., Uriarte, E.L., Galarza, R., Garro, C., Florin-Christensen, M. & Schnittger, L. 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. *Vet. Parasitol.* 198: 382-386
- Traversa, D. 2010. Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Paras. Vect.* 3: 21.
- Uga, S., Kunaruk, N., Rai, S.K. & Watanabe, M. 1998. *Cryptosporidium* infection in HIV-seropositive and seronegative populations in southern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 29: 100-104.
- Wanachiwanawin, D., Manatsathi, S., Lertlaituan, P., Thakerngpol, K. & Suwanagool, P. 1998. Intestinal microsporidiosis in HIV infected patients with chronic diarrhea in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 29: 767-771.
- Wang, L., Zhang, H., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, G., Guo, M., Liu, L., Feng, Y., & Xiao, L. 2013. Zoonotic *Cryptosporidium* species and *Enterocytozoon bienersi* genotypes in HIV-positive patients on antiretroviral therapy. *J. Clin. Microbiol.* 51(2): 557-563.

- Wang, R., Qiu, S., Jian, F., Zhang, S., Shen, Y., Zhang, L., Ning, C., Cao, J., Qi, M. & Xiao, L. 2010. Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Henan, China. *Parasitol. Res.* 107: 1489-1494.
- Wieler, L.H., Ilieff, A., Herbst, W., Bauer, C., Vieler, E., Bauerfeind, R., Failing, K., Klös, H., Wengert, D., Baljer, G. & Zahner, H. 2001. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 48: 151-159
- Xiao, L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp. Parasitol.* 124(1): 80-89.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montani, R.J., Fayer, R. & Lal A.A. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1578-1583.
- Yimming, B., Pattanatanang, K., Sanyathitiseree, P., Inpankaew, T., Kamyngkird, K., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W. & Phasuk, J. 2016. Molecular identification of *Cryptosporidium* species from pet snakes in Thailand. *Korean J. Parasitol.* 54(4): 423-429.
- Yui, T., Nakajima, T., Yamamoto, N., Kon, M., Abe, N., Matsubayashi, M. & Shibahara, T. 2014. Age-related detection and molecular characterization of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* in pre- and post-weaned piglets and adult pigs in Japan. *Parasitol. Res.* 113: 359-365
- Zhang, X., Wang, Z., Su, Y., Liang, X., Sun, X., Peng, S., Lu, H., Jiang, N., Yin, J., Xiang, M. & Chen Q. 2011. Identification and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in China. *J. Clin. Microbiol.* 49: 2006-2008.
- Zhao, C. & Li, P. 2003. Epidemiologic survey of pig cryptosporidiosis in Fengtai county in Anhui province. *Chin. J. Vet. Parasitol.* 11: 42-44.
- Zhao, W., Zhang, W., Yang, F., Cao, J., Liu, H., Yang, D., Shen, Y. & Liua, A. 2014. High Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in asymptomatic pigs and assessment of zoonotic risk at the genotype level. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(12): 3699-3707.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ข้อมูลของตัวอย่างสุกรที่ทำการศึกษา

จากการเก็บตัวอย่างมูลสุกรที่สุกรถ่ายออกมาแล้ว (เพิ่งถ่าย) จำนวน 245 ตัวอย่าง จากสุกร 245 ตัว จากฟาร์มจำนวน 11 ฟาร์ม โดยได้ทำการบันทึกเพศ อายุ และสายพันธุ์ของสุกรแต่ละตัวดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เพศ อายุ และสายพันธุ์ของสุกรที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	เพศ	อายุ	สายพันธุ์
1	1	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	2	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	3	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	4	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	5	เมีย	6 เดือน	หมู 3 สาย
	6	ผู้	6 เดือน	หมู 3 สาย
	7	ผู้	6 เดือน	หมู 3 สาย
	8	ผู้	6 เดือน	หมู 3 สาย
	9	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
	10	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
	11	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	12	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	13	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
	14	ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย
	15	ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย
	16	เมีย	4 เดือน	หมู 3 สาย
	17	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	18	ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
	19	ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
	20	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
	21	ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
2	22	ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย
	23	ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย
	24	ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย
	25	ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย
	26	ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย
	27	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	28	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	29	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	เพศ	อายุ	สายพันธุ์
2	30	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	31	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	32	เมีย	7 เดือน	หมู 3 สาย
	33	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	34	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	35	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
	36	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	37	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	38	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
	3	39	เมีย	5 เดือน
40		เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
41		เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
42		เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
43		เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
44		ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
45		ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
46		ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
47		ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
48		ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
49		ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
50		ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
51		ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
52		ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
53		เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
54		เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
55		ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
56		เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
57		เมีย	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
58		เมีย	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
59	ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย	
60	ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย	
4	61	เมีย	5 ปี 10 เดือน	หมู 3 สาย
	62	เมีย	2 ปี 10 เดือน	หมู 3 สาย
	63	เมีย	1 ปี 5 เดือน	หมู 3 สาย
	64	เมีย	5 ปี 6 เดือน	หมู 3 สาย
	65	เมีย	2 ปี 6 เดือน	หมู 3 สาย

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	เพศ	อายุ	สายพันธุ์
4	66	เมีย	1 ปี 9 เดือน	หมู 3 สาย
	67	เมีย	5 ปี 8 เดือน	หมู 3 สาย
	68	เมีย	1 ปี 9 เดือน	หมู 3 สาย
	69	เมีย	1 ปี 8 เดือน	หมู 3 สาย
	70	เมีย	1 ปี 4 เดือน	หมู 3 สาย
	71	เมีย	2ปี 10 เดือน	หมู 3 สาย
	72	เมีย	5 ปี 6 เดือน	หมู 3 สาย
	73	เมีย	2 ปี	หมู 3 สาย
	74	เมีย	5 ปี 1 เดือน	หมู 3 สาย
	75	เมีย	5 ปี 8 เดือน	หมู 3 สาย
	76	เมีย	4 ปี 7 เดือน	หมู 3 สาย
	77	เมีย	4 ปี	หมู 3 สาย
	78	ผู้	1 เดือน 3 สัปดาห์	หมู 3 สาย
	79	เมีย	1 เดือน 3 สัปดาห์	หมู 3 สาย
	80	เมีย	1 เดือน 3 สัปดาห์	หมู 3 สาย
	81	เมีย	3.5 เดือน	หมู 3 สาย
	82	เมีย	3.5 เดือน	หมู 3 สาย
	83	เมีย	3.5 เดือน	หมู 3 สาย
	84	เมีย	3.5 เดือน	หมู 3 สาย
	85	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
	86	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
	87	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
	88	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
	89	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	90	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	91	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	92	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	93	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	94	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	95	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	96	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	97	ผู้	5 เดือน 1 สัปดาห์	หมู 3 สาย
	98	ผู้	5 เดือน 1 สัปดาห์	หมู 3 สาย
	99	ผู้	5 เดือน 1 สัปดาห์	หมู 3 สาย
	100	ผู้	5 เดือน 1 สัปดาห์	หมู 3 สาย
	101	เมีย	5 เดือน 1 สัปดาห์	หมู 3 สาย

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	เพศ	อายุ	สายพันธุ์
5	102	เมีย	2 เดือน	หมู 3 สาย
	103	ผู้	2 เดือน	หมู 3 สาย
	104	ผู้	2 เดือน	หมู 3 สาย
	105	ผู้	2 เดือน	หมู 3 สาย
	106	ผู้	3 สัปดาห์	หมู 3 สาย
	107	ผู้	3 สัปดาห์	หมู 3 สาย
	108	ผู้	3 สัปดาห์	หมู 3 สาย
	6	109	เมีย	3 สัปดาห์
110		เมีย	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
111		ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
112		ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
113		เมีย	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
114		ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
115		ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย
7		116	ผู้	4 เดือน
	117	ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย
	118	ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย
	119	เมีย	3.5 เดือน	หมู 3 สาย
	120	เมีย	3.5 เดือน	หมู 3 สาย
	121	เมีย	1.5 เดือน	หมู 3 สาย
	122	เมีย	1.5 เดือน	หมู 3 สาย
	123	ผู้	1.5 เดือน	หมู 3 สาย
	124	ผู้	1.5 เดือน	หมู 3 สาย
	125	ผู้	1.5 เดือน	หมู 3 สาย
	126	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
8	127	ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
	128	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
	129	เมีย	7 ปี	หมู 3 สาย
	130	เมีย	7 ปี	หมู 3 สาย
	131	เมีย	7 ปี	หมู 3 สาย
9	132	เมีย	7 เดือน	หมู 3 สาย
	133	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	134	เมีย	6 เดือน	หมู 3 สาย
	135	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	136	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	137	ผู้	6 เดือน	หมู 3 สาย
	138	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	เพศ	อายุ	สายพันธุ์
9	139	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	140	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	141	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
	142	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
	143	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย
	144	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	145	เมีย	4 เดือน	หมู 3 สาย
	146	ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
	147	เมีย	4 เดือน	หมู 3 สาย
	148	เมีย	4 เดือน	หมู 3 สาย
	149	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	150	ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย
	151	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	152	ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
	153	เมีย	7 เดือน	หมู 3 สาย
	154	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	155	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	156	เมีย	4 เดือน	หมู 3 สาย
	157	เมีย	4 เดือน	หมู 3 สาย
	158	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	159	เมีย	6 เดือน	หมู 3 สาย
	160	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	161	เมีย	6 เดือน	หมู 3 สาย
	162	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
	163	เมีย	4 เดือน	หมู 3 สาย
	164	เมีย	4 เดือน	หมู 3 สาย
	165	ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
	166	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	167	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	168	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
	169	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย
	170	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	171	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	172	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
	173	ผู้	7 เดือน	หมู 3 สาย
	174	ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
	175	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	เพศ	อายุ	สายพันธุ์	
9	176	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย	
	177	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย	
	178	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย	
	179	เมีย	6 เดือน	หมู 3 สาย	
	180	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย	
	181	เมีย	5 ปี 1 เดือน	หมู 3 สาย	
	182	เมีย	2 ปี 5 เดือน	หมู 3 สาย	
	183	เมีย	4 ปี 7 เดือน	หมู 3 สาย	
	184	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย	
	185	เมีย	1 ปี 4 เดือน	หมู 3 สาย	
	186	เมีย	1 ปี 4 เดือน	หมู 3 สาย	
	187	เมีย	5 ปี 11 เดือน	หมู 3 สาย	
	188	เมีย	10 เดือน	หมู 3 สาย	
	189	เมีย	5 ปี 1 เดือน	หมู 3 สาย	
	190	เมีย	4 ปี 7 เดือน	หมู 3 สาย	
	191	ผู้	4 เดือน	หมู 3 สาย	
	10	192	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
		193	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
		194	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย
195		เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย	
196		เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย	
197		เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย	
198		เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย	
199		ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย	
200		ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย	
201		เมีย	2 เดือน	หมู 3 สาย	
202		เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย	
203		ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย	
204	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย		
205	ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย		
206	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย		
207	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย		
208	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย		
209	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย		
210	เมีย	2 เดือน	หมู 3 สาย		
211	เมีย	2.5 เดือน	หมู 3 สาย		

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	เพศ	อายุ	สายพันธุ์
10	212	ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
	213	ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
	214	ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
	215	ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
	216	ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
	217	เมีย	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
	218	ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
	219	ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
	220	ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
	221	ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
	11	222	เมีย	2.5 เดือน
223		ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
224		เมีย	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
225		ผู้	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
226		เมีย	2.5 เดือน	หมู 3 สาย
227		เมีย	2 เดือน	หมู 3 สาย
228		ผู้	2 เดือน	หมู 3 สาย
229		เมีย	2 เดือน	หมู 3 สาย
230		ผู้	2 เดือน	หมู 3 สาย
231		เมีย	2 เดือน	หมู 3 สาย
232		เมีย	2 เดือน	หมู 3 สาย
233		ผู้	2 เดือน	หมู 3 สาย
234		ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย
235		ผู้	2 เดือน	หมู 3 สาย
236	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย	
237	ผู้	5 เดือน	หมู 3 สาย	
238	ผู้	3 เดือน	หมู 3 สาย	
239	ผู้	2 เดือน	หมู 3 สาย	
240	ผู้	2 เดือน	หมู 3 สาย	
241	เมีย	6 เดือน	หมู 3 สาย	
242	เมีย	2 เดือน	หมู 3 สาย	
243	เมีย	6 เดือน	หมู 3 สาย	
244	เมีย	5 เดือน	หมู 3 สาย	
245	เมีย	3 เดือน	หมู 3 สาย	

ภาคผนวก ข
การเตรียมบัฟเฟอร์และ Reagent

1. 0.5x Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer, pH 8.3

สูตรของ 10x Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer, pH 8.3 มีส่วนประกอบดังนี้

Tris Base	890	mM
Boric Acid	890	mM
EDTA	20	mM

วิธีเตรียม

เติม 10x Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer สำเร็จรูป (Vivantis, Malasia) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 950 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 10 mM dNTPs

สูตรการเตรียม (ปริมาตร 400 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย

dATP (100 mM)	10	ไมโครลิตร
dTTP (100 mM)	10	ไมโครลิตร
dCTP (100 mM)	10	ไมโครลิตร
dGTP (100 mM)	10	ไมโครลิตร

วิธีเตรียม

ดูด dNTPs แต่ละชนิด (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 360 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3. 20 μM ไพรเมอร์

สูตรการเตรียม (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย

ไพรเมอร์ (100 μM)	20	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	80	ไมโครลิตร

วิธีเตรียม

ดูดไพรเมอร์ (100 μM) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 80 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

ภาคผนวก ค
ผลการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ
Enterocytozoon bieneusi
ในมูลสุกร

จากการนำ DNA ของเชื้อที่สกัดได้จากมูลสุกรจำนวน 245 ตัวอย่าง มาใช้เป็น DNA แม่แบบ ในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rRNA ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *E. bieneusi* ด้วยวิธี nested-PCR เพื่อตรวจหาเชื้อทั้งสองชนิด ให้ผลดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ผลการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และ *E. bieneusi* ในมูลสุกรแต่ละตัวอย่าง

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	ผล PCR ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล RFLP ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล PCR ของเชื้อ <i>E. bieneusi</i>
1	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-
	5	-	-	-
	6	-	-	+
	7	-	-	-
	8	-	-	-
	9	-	-	-
	10	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	11	-	-	-
	12	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	13	-	-	-
	14	-	-	-
	15	-	-	-
	16	-	-	-
	17	-	-	-
	18	+	<i>Cryptosporidium suis</i>	-
	19	-	-	-
	20	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	21	-	-	-
2	22	-	-	-
	23	-	-	+
	24	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	25	-	-	-
	26	-	-	-

ตารางที่ 19 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	ผล PCR ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล RFLP ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล PCR ของเชื้อ <i>E. bieneusi</i>
2	27	-	-	-
	28	-	-	-
	29	-	-	-
	30	-	-	-
	31	-	-	-
	32	-	-	-
	33	-	-	-
	34	-	-	-
	35	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	36	-	-	+
	37	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	38	-	-	+
3	39	-	-	-
	40	-	-	-
	41	-	-	-
	42	-	-	-
	43	-	-	-
	44	-	-	-
	45	-	-	-
	46	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	47	-	-	-
	48	-	-	+
	49	-	-	-
	50	-	-	-
	51	-	-	-
	52	-	-	-
	53	-	-	-
	54	-	-	-
	55	-	-	-
	56	-	-	-
	57	-	-	-
	58	-	-	-
	59	-	-	-
	60	-	-	+
4	61	-	-	-
	62	-	-	-

ตารางที่ 19 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	ผล PCR ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล RFLP ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล PCR ของเชื้อ <i>E. bienersi</i>
4	63	-	-	+
	64	-	-	-
	65	-	-	-
	66	-	-	-
	67	-	-	-
	68	-	-	-
	69	-	-	-
	70	-	-	-
	71	-	-	-
	72	-	-	-
	73	-	-	-
	74	-	-	-
	75	-	-	-
	76	-	-	-
	77	-	-	-
	78	+	<i>Cryptosporidium suis</i>	-
	79	+	<i>Cryptosporidium suis</i>	+
	80	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	81	+	<i>Cryptosporidium suis</i>	+
	82	-	-	+
	83	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	84	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	85	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	86	-	-	-
	87	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	88	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	89	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	90	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	91	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	92	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	93	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	94	-	-	+
	95	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	96	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	97	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	98	-	-	-

ตารางที่ 19 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	ผล PCR ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล RFLP ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล PCR ของเชื้อ <i>E. bieneusi</i>
	99	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	100	-	-	-
	101	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
5	102	-	-	-
	103	-	-	-
	104	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	105	-	-	-
	106	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	107	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	108	-	-	-
6	109	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	110	-	-	-
	111	-	-	-
	112	-	-	-
	113	-	-	-
	114	-	-	-
	115	-	-	-
7	116	-	-	-
	117	-	-	-
	118	-	-	-
	119	-	-	+
	120	-	-	-
	121	-	-	-
	122	-	-	-
	123	-	-	-
	124	-	-	-
	125	-	-	-
	126	-	-	-
	127	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	128	-	-	-
8	129	-	-	-
	130	-	-	-
	131	-	-	-
9	132	-	-	-
	133	-	-	-
	134	-	-	-

ตารางที่ 19 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	ผล PCR ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล RFLP ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล PCR ของเชื้อ <i>E. bieneusi</i>
9	135	-	-	-
	136	-	-	-
	137	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	138	-	-	-
	139	-	-	-
	140	-	-	-
	141	-	-	-
	142	-	-	-
	143	-	-	+
	144	-	-	-
	145	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	146	-	-	-
	147	-	-	-
	148	-	-	-
	149	-	-	-
	150	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+
	151	-	-	-
	152	-	-	-
	153	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	154	-	-	+
	155	-	-	-
	156	-	-	-
	157	-	-	-
	158	-	-	-
	159	-	-	-
	160	-	-	-
	161	-	-	-
	162	-	-	-
	163	-	-	-
	164	-	-	-
	165	-	-	-
	166	-	-	-
	167	-	-	-
	168	-	-	-
	169	-	-	-
	170	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	+

ตารางที่ 19 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	ผล PCR ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล RFLP ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล PCR ของเชื้อ <i>E. bieneusi</i>
9	171	-	-	-
	172	-	-	-
	173	-	-	-
	174	-	-	+
	175	-	-	-
	176	-	-	-
	177	+	<i>Cryptosporidium suis</i>	-
	178	-	-	-
	179	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	180	-	-	+
	181	-	-	-
	182	-	-	-
	183	-	-	-
	184	-	-	-
	185	-	-	-
	186	-	-	-
	187	-	-	-
	189	-	-	-
	190	-	-	-
	191	-	-	-
10	192	-	-	-
	193	-	-	-
	194	-	-	-
	195	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	196	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	197	-	-	-
	198	+	<i>Cryptosporidium suis</i>	-
	199	-	-	+
	200	-	-	+
	201	-	-	-
	202	-	-	-
	203	-	-	-
	204	-	-	-
	205	-	-	-
	206	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	207	-	-	-

ตารางที่ 19 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	ผล PCR ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล RFLP ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล PCR ของเชื้อ <i>E. bieneusi</i>
10	208	-	-	-
	209	-	-	-
	210	-	-	-
	211	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	212	-	-	-
	213	-	-	+
	214	-	-	-
	215	-	-	+
	216	-	-	-
	217	+	<i>Cryptosporidium suis</i>	-
	218	+	<i>Cryptosporidium suis</i>	-
	219	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	220	-	-	-
	221	-	-	-
11	222	-	-	-
	223	-	-	-
	224	-	-	-
	225	-	-	-
	226	-	-	-
	227	-	-	-
	228	-	-	-
	229	-	-	-
	230	-	-	-
	231	-	-	-
	232	-	-	-
	233	-	-	-
	234	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	235	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	236	-	-	-
	237	-	-	-
	238	+	<i>Cryptosporidium</i> spp. pig genotype II	-
	239	-	-	+
	240	-	-	-
	241	-	-	-
	242	+	<i>Cryptosporidium suis</i>	+
	243	-	-	+

ตารางที่ 19 (ต่อ)

ฟาร์มที่	ลำดับตัวอย่าง	ผล PCR ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล RFLP ของเชื้อ <i>Cryptosporidium</i> spp.	ผล PCR ของเชื้อ <i>E. bienersi</i>
11	244	-	-	-
	245	-	-	+