

การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคคริปโตสปอริดิโอซิส ในลูกโคและกระบือโดยเทคนิค Nested Polymerase Chain Reaction

Development of a Diagnostic Method to Identify Parasitic Causative Agent of Bovine Cryptosporidiosis Using Nested Polymerase Chain Reaction

จันทรา วัฒนเมธานนท์* ศศิวิมล อยู่เอม มัญชรี ทัตติยพงศ์ สุภาวรรณ งามจิตต์เอื้อ
กิ่งดาว หมอแก้ว กิตติชัย อุ้นจิต และ มณฑกานต์ จิระธันธ์

Juntra Wattanamethanont*, Sasiwimon Yoo-eam, Muncharee Tattiyapong, Supawan Ngamjiteu,
Kingdao Mohkaew, Kittichai Unjit and Montakan Jiratanh

Abstract

Backgrounds : *Cryptosporidium* spp. are protozoan parasites that cause a diarrheal disease in humans and animals, especially *Cryptosporidium parvum* that is the most frequently reported zoonotic species. *Cryptosporidium* oocysts are shed in feces of infected cattles and can be transmitted to other hosts by fecal-oral route. Microscopic examination on Modified Ziehl Neelsen (MZN) stained fecal smear, the conventional diagnostic method, has many limitations as it is incapable of discriminating *Cryptosporidium* species and skilled personnel is required. Another limitation is that the sensitivity is potentially low. Additionally, discontinuous sucrose gradient technique has been implemented to harvest the oocysts, and therefore, increases the opportunity for microscopic oocyst detection. Recently, molecular technique such as nested polymerase chain reaction (nested PCR), which is highly sensitive and specific diagnostic method, was established. The objective of this study was to apply discontinuous sucrose gradient technique and nested PCR on *Cryptosporidium* spp. diagnosis in bovine fecal samples.

Methods : One-hundred and nine fecal samples of young calves and buffaloes less than 6 months of age or at any ages with diarrhea, were processed by microscopic examination using MZN stained fecal smears and discontinuous sucrose gradient techniques. Then, nested PCR targeting *Cryptosporidium* small subunit ribosomal RNA, was performed in all the fecal samples and microscopically positive samples by discontinuous sucrose gradient, after that the amplified fragments were subjected to DNA sequencing for species identification. Sensitivity and specificity of nested PCR were also determined.

Results : The positive microscopic results were found in MZN stained fecal smears examination and discontinuous sucrose gradient technique at 1 and 9 samples, respectively. The nested PCR results were positive for all 9 purified *Cryptosporidium* oocyst samples and 8 fecal samples, which showed a significant difference in proportion of positive results compared with conventional staining method ($p < 0.05$). The nucleotide sequences were 98-100% identical with *C. parvum* (N=1), *C. bovis* (N=6) and *C. ryanae* (N=4). For the sensitivity test, the lower detection limit of nested PCR was 50 oocysts/ml. Furthermore, Specificity tests revealed that no amplified products were observed when testing with other protozoan parasites DNA.

Conclusions : Nested PCR is considered as an accurate, sensitive and specific tool for detection of *Cryptosporidium* spp. which appears to be a suitable alternative diagnostic method.

Keywords: Cryptosporidiosis, bovine, discontinuous sucrose gradient, nested PCR

*สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900 โทรศัพท์ 0-2579-8908-14 E-mail: juntra_mai@hotmail.com

*National Institute of Animal Health, Ladyoa, Chatuchak, Bangkok 10900 Tel. 0-2579-8908-14 E-mail: juntra_mai@hotmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: เชื้อ *Cryptosporidium* spp. เป็นเชื้อโปรโตซัวที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในคนและสัตว์ โดยเฉพาะ *Cryptosporidium parvum* ซึ่งเป็น species ที่ติดต่อระหว่างสัตว์และคน โดย oocysts ของเชื้อจะถูกปล่อยออกมาจากอุจจาระของโคและกระบือที่ติดเชื้อ และติดต่อไปยังคนหรือสัตว์อื่นผ่านการกิน การตรวจวินิจฉัยวิธีดั้งเดิมโดยการตรวจอุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสี modified Ziehl-Neelsen (MZN) มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถจำแนก species ของเชื้อ ต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจ และมีความไวในการตรวจต่ำ นอกจากนี้วิธี discontinuous sucrose gradient เป็นเทคนิคที่มีการพัฒนาเพื่อใช้ในการเก็บแยก oocysts ของเชื้อออกจากตัวอย่างอุจจาระ ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มโอกาสการตรวจพบ oocysts ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในปัจจุบันเทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น nested polymerase chain reaction (nested PCR) เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะมากกว่าวิธีดั้งเดิม อีกทั้งสามารถจำแนก species ของเชื้อได้ เมื่อใช้ร่วมกับเทคนิค DNA sequencing การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในตัวอย่างอุจจาระโคและกระบือโดยใช้เทคนิค discontinuous sucrose gradient ร่วมกับ nested PCR

วิธีการ: ตัวอย่างอุจจาระลูกโคและกระบือ อายุไม่เกิน 6 เดือน หรืออายุเกิน 6 เดือนที่มีประวัติท้องร่วง จำนวน 109 ตัวอย่าง นำมาตรวจวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยวิธีย้อมสีอุจจาระป้ายสไลด์ด้วยสี MZN และวิธี discontinuous sucrose gradient จากนั้นนำ oocysts ที่แยกได้จากวิธี discontinuous sucrose gradient และตัวอย่างอุจจาระทั้งหมดมาสกัด DNA แล้วนำมาทำปฏิกิริยา nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ small subunit ribosomal RNA และจำแนก species ของเชื้อด้วยเทคนิค DNA sequencing ทำการเปรียบเทียบวิธี ทดสอบความไว และความจำเพาะของเทคนิค nested PCR

ผล: ตรวจพบ oocysts ของเชื้อจากอุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสี MZN และวิธี discontinuous sucrose gradient ที่ 1 และ 9 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดย purified oocysts ที่แยกได้ทั้ง 9 ตัวอย่าง ให้ผลบวกในการทำปฏิกิริยา nested PCR และสามารถแยก species ได้ทั้งหมด

ในขณะที่ DNA ที่สกัดจากอุจจาระโดยตรงพบว่า ให้ผลบวกจำนวน 8 ตัวอย่าง และสามารถแยก species ของเชื้อได้เช่นเดียวกัน โดยพบสัดส่วนของการตรวจพบผลบวกของวิธี nested PCR แตกต่างจากวิธีตรวจอุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสี MZN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่ได้พบมีความคล้ายคลึง (98-100%) กับเชื้อ *C. parvum* (N=1), *C. bovis* (N=6) และ *C. ryanae* (N=4) โดยพบความไวของเทคนิค nested PCR ที่ 50 oocysts/ml และมีความจำเพาะของเทคนิคโดยไม่ให้ผลบวกกับเชื้อโปรโตซัวอื่น

สรุป: Nested PCR เป็นเทคนิคที่มีความถูกต้องแม่นยำ มีความไว และความจำเพาะ เหมาะสมสำหรับที่จะนำมาใช้เป็นทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: คริปโตสปอริดิโอซิส, โคและกระบือ, discontinuous sucrose gradient, nested PCR

บทนำ

Cryptosporidiosis เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่สำคัญ และก่อให้เกิดปัญหาทั่วโลก สาเหตุเกิดจากเชื้อโปรโตซัว *Cryptosporidium* spp. ซึ่งจัดอยู่ในไฟลัม Apicomplexa ก่อให้เกิดอาการท้องร่วงในคนและสัตว์ และเป็นหนึ่งในเชื้อปรสิตวยโอกาสที่สำคัญในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเอดส์ (นิมิตร และคม, 2554) การติดต่อโรคนี้ในสัตว์และคน เกิดจากการกินอาหารและน้ำที่มีการปนเปื้อน oocysts ของเชื้อ (Ramirez et al., 2004) oocysts ของเชื้อมีขนาดประมาณ 4 - 6 μm มีผนังหนา ภายในมี sporozoite จำนวน 4 เซลล์ เมื่อถูกปล่อยออกมาจากอุจจาระจะมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นาน (นิมิตร และคม, 2554) เชื้อ *Cryptosporidium* spp. ที่พบในโค กระบือมีทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* และ *C. andersoni* โดย *C. parvum* เป็น species ที่ติดต่อระหว่างสัตว์และคน และมักก่อให้เกิดอาการท้องร่วงในลูกโค กระบืออายุน้อยกว่า 6 สัปดาห์ แต่หากเกิดการติดเชื้อในโคอายุมากกว่า 6 สัปดาห์ สัตว์จะปล่อย oocysts ออกมาตามอุจจาระได้โดยไม่พบอาการทางคลินิก (Thomson et al., 2017) ส่วนในผู้ป่วยโรคเอดส์ species

ที่มักมีรายงานตรวจพบ คือ *C. hominis* และ *C. parvum* ในประเทศไทยมีรายงานความชุกของโรคนี้ในผู้ป่วยโรคเอดส์อยู่ในช่วงระหว่าง 8.8 - 34.4% (Iqbal *et al.*, 2012) โดยมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ตรวจพบ *C. parvum* จากอุจจาระโค และอุจจาระผู้ป่วยโรคเอดส์ โดยใช้วิธี nested PCR ร่วมกับ DNA sequencing (Nuchjangreed *et al.*, 2008) นอกจากนี้มีการศึกษาในโคนมในเขตภาคเหนือพบความชุกของโรคที่ 7.6% โดยตรวจพบ *C. parvum* และ *C. bovis* จากอุจจาระโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) (Inpankaew, 2017) ในปัจจุบันยังไม่มียาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาเชื้อนี้ทั้งในสัตว์และคน การควบคุมและป้องกันโรคอาศัยการจัดการและสุขาภิบาลที่ดี (Thomson *et al.*, 2017)

การตรวจวินิจฉัยโรค Cryptosporidiosis มีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจหาเชื้อโดยตรง การตรวจทางอิมมูโนวินิจฉัย และการตรวจด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (OIE, 2016) การตรวจหาเชื้อโดยตรง ทำโดยการตรวจหา oocysts ของเชื้อภายในอุจจาระด้วยกล้องจุลทรรศน์ เช่น การตรวจอุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสีพิเศษ เช่น modified Ziehl-Neelsen (MZN) และการตรวจอุจจาระแบบเข้มข้น เช่น วิธีลอยตัว เป็นต้น วิธีการตรวจวินิจฉัยแบบดั้งเดิมโดยการตรวจอุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสี MZN นั้นมีข้อจำกัดคือ มีความไวในการตรวจต่ำ ต้องอาศัยความชำนาญในการส่องตรวจ และไม่สามารถจำแนก species ของเชื้อที่ตรวจพบได้ เนื่องจาก oocysts มีรูปร่าง และขนาดที่ใกล้เคียงกันในแต่ละ species (OIE, 2016) ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อมาใช้ในการวินิจฉัย และใช้การตรวจหาชิ้นเป้าหมายที่แตกต่างกันในการตรวจวินิจฉัยเชื้อในอุจจาระโคมีรายงานว่าเทคนิค nested polymerase chain reaction (nested PCR) โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน Small subunit ribosomal RNA (SSUrRNA) เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความไว และความจำเพาะมากกว่าวิธีการตรวจหา oocysts ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Bhat *et al.*, 2014) อีกทั้งยีนในตำแหน่งนี้มีบริเวณที่มีลำดับสารพันธุกรรมที่แตกต่างกันในแต่ละ species จึงสามารถใช้จำแนก species ของเชื้อด้วยเทคนิค DNA sequencing ได้ (Xiao *et al.*, 1999) นอกจากนี้มีรายงานถึงวิธีการ discontinuous sucrose gradient ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการพัฒนาเพื่อใช้ในการแยก

oocysts ของเชื้อออกจากตัวอย่างอุจจาระ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำ oocysts ไปใช้ทดลองต่อ หรือนำไปเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Arrowood and Sterling, 1987) ซึ่ง oocysts ที่แยกได้จะมีความบริสุทธิ์ มีความเข้มข้นที่สูงขึ้น ซึ่งช่วยเพิ่มโอกาสการตรวจพบด้วยกล้องจุลทรรศน์แม้ในกรณีที่มี oocysts จำนวนน้อยในอุจจาระ และทำให้ได้ purified oocysts ที่เหมาะสมในการนำมาสกัดสารพันธุกรรม เนื่องจากลดสิ่งปนเปื้อนอื่นๆในอุจจาระที่อาจจะยับยั้งกระบวนการ PCR ได้ (Schrader *et al.*, 2012) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในตัวอย่างอุจจาระโค และกระบือ โดยใช้เทคนิค discontinuous sucrose gradient เพื่อแยก oocysts ร่วมกับ nested PCR เพื่อให้ได้วิธีการที่มีความถูกต้องแม่นยำ มีความไว และความจำเพาะ ตลอดจนนำไปสู่การแยก species ของเชื้อได้ด้วยเทคนิค DNA sequencing

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างอุจจาระ

อุจจาระลูกโค และกระบือ อายุไม่เกิน 6 เดือน หรืออายุเกิน 6 เดือนแต่มีประวัติท้องร่วงร่วมด้วยจากจังหวัดสระบุรี อุทัยธานี ขอนแก่น และนครราชสีมาที่ส่งมาชันสูตรโรคที่กลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และเก็บตัวอย่างจากในพื้นที่ในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2558 - 2559 จำนวน 109 ตัวอย่าง เก็บรักษาตัวอย่างอุจจาระใน 2.5% $K_2Cr_2O_7$ ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิ 4 °C (Chen *et al.*, 2007)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

วิธีตรวจอุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสี modified Ziehl-Neelsen (MZN) โดยการป้ายอุจจาระบนสไลด์ตรึงและย้อมสี MZN ตามวิธีการของ Ash and Orihel (1987) จากนั้นตรวจหา oocysts ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างที่กำลังขยาย 400 - 1,000 เท่า

วิธี discontinuous sucrose gradient โดยการเตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น (sucrose stock solution) ที่ความถ่วงจำเพาะ 1.18 (น้ำตาลซูโครส 500 g ในน้ำกลั่น 650 ml) จากนั้นเตรียมสารละลายซูโครส A และสารละลายซูโครส B โดยใช้ stock solution ผสมกับ

น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้สารละลายซูโครส A ที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.09 และ 1:3 ให้ได้สารละลายซูโครส B ที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.045 ตามลำดับ เติมสารละลายซูโครส B (ความถ่วงจำเพาะ 1.045) 15 ml ลงใน centrifuge tube จากนั้น เติมสารละลายซูโครส A 15 ml โดยปล่อยสารที่ก้นหลอด สารละลาย B จะแยกชั้นขึ้นมายู่ด้านบนของสารละลาย A เติมอุจจาระที่ผ่านการกรองและปั่นล้างใน 0.2% Tween 20 ปริมาตร 5 ml แล้ว ลงไปชั้นบนสุด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $1,000 \times g$ เวลา 30 นาที โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Arrowood and Sterling (1987) จากนั้นดูด oocyst suspension ที่เป็นชั้นสีขาวตรงกลางระหว่างสารละลายซูโครส A และ B มาปั่นล้างใน distilled water (DW) 3 รอบ จากนั้นนำมาตรวจหา oocysts ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างที่กัลังขยาย 400 - 1,000 เท่า

การตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยเทคนิค nested PCR

การสกัด DNA นำ *Cryptosporidium* spp. oocysts ที่แยกได้จากวิธี discontinuous sucrose gradient และอุจจาระทั้งหมด 109 ตัวอย่างมาแช่แข็ง (freeze) ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C นาน 2 นาที และทำให้ละลาย (thaw) ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 2 นาที รวม 3 รอบ เพื่อให้ผนัง oocysts แตก จากนั้นสกัด DNA จาก oocysts ด้วย Dneasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen) และสกัด DNA จากอุจจาระด้วย QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) โดยดัดแปลงขั้นตอนจากบริษัทผู้ผลิตโดยใช้การบ่มตัวอย่างใน lysis buffer ที่อุณหภูมิ 56°C ข้ามคืน (Adamska *et al.*, 2011) เก็บ DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

เทคนิค nested PCR ใช้ primer ที่จำเพาะกับ ยีน small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) ของเชื้อโดยดัดแปลงส่วนผสม และอุณหภูมิจากวิธีการของ Xiao *et al.* (1999) โดยในรอบแรกส่วนผสม 25 μl ประกอบด้วย 10x PCR buffer, 3 mM MgCl_2 , 200 μM ของ each dNTP, 5 pmol ของ Forward primer (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') และ Reverse primer (5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'), 2.5U HotStarTaq® DNA Polymerase (Qiagen) และ DNA 2 μl โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 1,325 bp ในรอบที่สองส่วนผสม 25 μl จะเหมือนในรอบแรก ยกเว้นไม่ใส่ 3 mM MgCl_2

และใช้ 5 pmol ของ Forward primer (5'-GGAAGG-GTTGTATTTATTAGATAAAAG-3') และ Reverse primer (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3') และใช้ผลิตภัณฑ์ PCR จากรอบแรก 1 μl เป็น DNA template ในการเพิ่มปริมาณ DNA ทั้งสองรอบ ใช้สภาวะอุณหภูมิ ดังนี้ 95°C 15 นาที และ 94°C 45 วินาที, 58°C 45 วินาที, 72°C 1 นาที รวม 40 รอบ และ 72°C 10 นาที นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ใน 1.5% agarose โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 830 bp

การจำแนก species ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. โดยใช้เทคนิค DNA sequencing

ตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ออกจาก gel นำมาผ่านกระบวนการทำให้ DNA มีความบริสุทธิ์ด้วย GenepHlow™ Gel/PCR Cleanup Kit (Geneaid) จากนั้นศึกษาลำดับสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค BigDye Terminator DNA Cycle Sequencing นำข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่ได้มาศึกษาโดยใช้โปรแกรม ClustalW multiple alignment of BioEdit (Thompson *et al.*, 1994) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank เพื่อบ่งชี้ species ของเชื้อโดยใช้ Basic local alignment search tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990)

การทดสอบความไว และความจำเพาะของเทคนิค nested PCR

ทดสอบความไวของเทคนิค nested PCR โดยใช้ *C. parvum* oocysts ที่แยกได้จากวิธี discontinuous sucrose gradient นำมานับจำนวน oocysts ด้วย Haemocytometer ตามวิธีการของ Smith *et al.* (2003) เพื่อหาความเข้มข้นของ oocysts/ml แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^4 oocysts/ml จากนั้นนำมา dilute เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ oocyst suspension ในระดับต่างๆ ได้แก่ 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 , 500, 100, 50, 10, 5 และ 1 oocyst/ml จากนั้นนำมาสกัดสารพันธุกรรม และทดสอบด้วยปฏิกิริยา nested PCR สำหรับการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค nested PCR โดยการทดสอบการทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง DNA ของเชื้อโปรโตซัวในทางเดินอาหารอื่น ๆ ได้แก่ *Giardia* spp. รวมทั้งโปรโตซัวใน

ไฟลัม Apicomplexa ได้แก่ *Babesia bigemina*, *Theileria* spp., *Plasmodium gallinaceum*, *Toxoplasma gondii* และ *Neospora* spp. และใช้ distilled water เป็น negative control

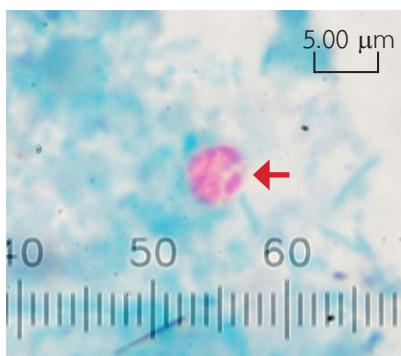
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธีการวินิจฉัย โดยใช้ McNemar's Chi-square test ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.)

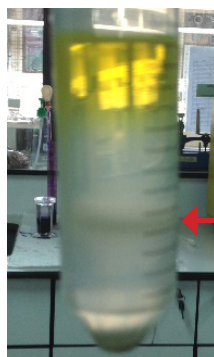
ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจหา *Cryptosporidium* spp. oocysts ด้วยกล้องจุลทรรศน์จากอุจจาระลูกโคและกระบือ จำนวนทั้งสิ้น 109 ตัวอย่างนั้น ตรวจพบ oocysts ของเชื้อจากอุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสี MZN 1 ตัวอย่าง (1/109, 0.92%) (ภาพที่ 1) ในขณะที่วิธี discontinuous sucrose gradient

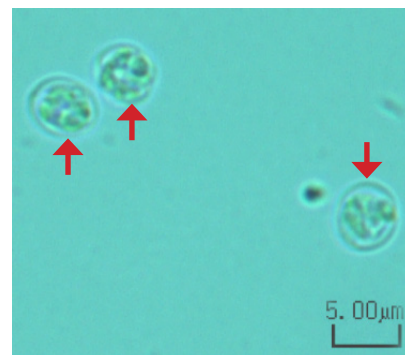
ตรวจพบ 9 ตัวอย่าง (9/109, 8.26%) (ภาพที่ 2 และ 3) โดย purified oocysts ที่แยกได้ทั้ง 9 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อการทำปฏิกิริยา nested PCR และสามารถแยก species ของเชื้อโดยใช้เทคนิค DNA sequencing ได้ทั้ง 9 ตัวอย่าง (9/109, 8.26%) ในขณะที่ DNA ที่สกัดจากอุจจาระโดยตรงพบว่ามีผลบวกจำนวน 8 ตัวอย่าง (8/109, 7.34%) และสามารถแยก species ของเชื้อได้เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 1) ผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. มีขนาดประมาณ 830 bp (ภาพที่ 4) โดยผลการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี nested PCR ทั้งการใช้ DNA ที่สกัดจาก purified oocysts (N=9) และการใช้ DNA ที่สกัดจากอุจจาระโดยตรง (N=8) นั้น พบว่าให้ผลการตรวจที่แตกต่างกันกับวิธี MZN (N=1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ McNemar's $\chi^2 = 8.00$; $p = 0.0078$ และ McNemar's $\chi^2 = 7.00$; $p = 0.0156$ ตามลำดับ แต่ผลการตรวจด้วยวิธี nested PCR ระหว่างการใช้ DNA ที่สกัดโดย 2 วิธีดังกล่าว พบว่าไม่แตกต่างกันที่ McNemar's $\chi^2 = 0.20$; $p = 1.00$



ภาพที่ 1 แสดง *C. parvum* oocyst ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เมื่อย้อมด้วยสี MZN รูปร่าง oocyst มีลักษณะกลม หรือรีเล็กน้อย ขนาด 4 - 6 μm ภายในมี sporozoites 4 เซลล์ ติดสีชมพูเข้ม ในขณะที่พื้นหลังติดสีเขียว (ลูกศร)



ภาพที่ 2 แสดงการแยก *C. parvum* oocysts โดยใช้วิธี discontinuous sucrose gradient พบ purified oocysts ที่แยกเป็นชั้นสีขาวขุ่นตรงกลางระหว่างสารละลายน้ำตาลซูโครสความถ่วงจำเพาะ 1.09 (ด้านล่าง) และ 1.045 (ด้านบน) (ลูกศร)

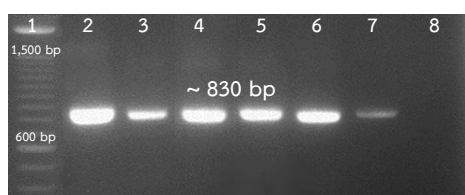


ภาพที่ 3 แสดง *C. parvum* oocysts ที่แยกได้จากวิธี discontinuous sucrose gradient ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างที่กำลังขยาย 1,000 เท่า รูปร่าง oocysts มีลักษณะกลม หรือรีเล็กน้อย ขนาด 4 - 6 μm ภายในมี sporozoites 4 เซลล์ (ลูกศร)

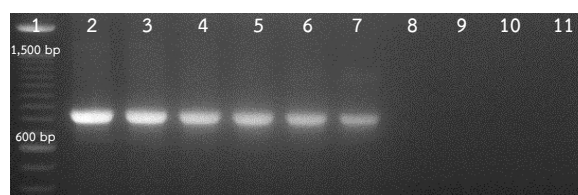
ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างอุจจาระที่ตรวจพบ *Cryptosporidium* spp. โดยวิธีตรวจอุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสี MZN, discontinuous sucrose gradient และ nested PCR โดยการสกัดสารพันธุกรรมจาก purified oocysts และสกัดจากอุจจาระ

ลำดับที่	อายุ	ประวัติท้องร่วง	คะแนนอุจจาระ*	การตรวจวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์		การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Nested PCR		การวิเคราะห์ด้วย BLAST	
				อุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสี MZN	วิธี Discontinuous sucrose gradient	Purified oocysts	อุจจาระ	ผล DNA Sequencing	% Identity
1	< 1 เดือน	มี	2	+	+	+	+	<i>C. parvum</i>	100
2	1-5 เดือน	ไม่มี	0	-	+	+	+	<i>C. bovis</i>	99
3	1-5 เดือน	ไม่มี	0	-	+	+	+	<i>C. ryanae</i>	100
4	4 เดือน	ไม่มี	0	-	+	+	+	<i>C. ryanae</i>	99
5	2 เดือน	ไม่มี	0	-	+	+	+	<i>C. ryanae</i>	99
6	4-6 เดือน	ไม่มี	0	-	+	+	+	<i>C. ryanae</i>	99
7	2 เดือน	ไม่มี	0	-	+	+	-	<i>C. bovis</i>	99
8	1 ปี	มี	1	-	+	+	-	<i>C. bovis</i>	98
9	4-6 เดือน	มี	2	-	+	+	-	<i>C. bovis</i>	99
10	1-5 เดือน	ไม่มี	0	-	-	-	+	<i>C. bovis</i>	100
11	3-5 เดือน	ไม่มี	0	-	-	-	+	<i>C. bovis</i>	99

หมายเหตุ *: 0 = อุจจาระปกติ มีลักษณะนิ่ม เป็นก้อน, 1 = อุจจาระกึ่งเหลว, 2 = อุจจาระค่อนข้างเหลว, 3 = อุจจาระเหลวเป็นน้ำ



ภาพที่ 4 ผลลัพธ์ PCR ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. มีขนาดประมาณ 830 bp; lane 1: 100 bp Marker; lane 2 - 7: Positive sample (2: *C. parvum*; 3 - 4: *C. bovis*; 5 - 7: *C. ryanae*); lane 8: Negative control (DW)



ภาพที่ 5 ผลลัพธ์ PCR ของเชื้อ *C. parvum* ในการทดสอบ sensitivity test; lane 1: 100 bp Marker; lane 2: *C. parvum* 1×10^4 ; lane 3: 5×10^3 ; lane 4: 1×10^3 ; lane 5: 5×10^2 ; lane 6: 100; lane 7: 50; lane 8: 10; lane 9: 5 และ lane 10: 1 oocyst/ml; lane 11: Negative control (DW)

จากผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าวิธี discontinuous sucrose gradient ตรวจพบ oocysts (N=9) ได้มากกว่าวิธีตรวจจากอุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสี MZN (N=1) แม้ว่าวิธีการย้อมสี MZN จะเป็นวิธีย้อมสีพิเศษที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว เหมาะแก่การตรวจคัดกรองในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก แต่ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ตรวจ เนื่องจาก oocysts ของเชือนี้มีขนาดเล็ก และอาจสับสนกับเชื้อรา และยีสต์ ซึ่งติดสีชมพูเช่นเดียวกัน (Vohra et al., 2012) ในขณะที่วิธี discontinuous sucrose gradient ได้นำมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มโอกาสการตรวจพบ

oocysts ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ในการเก็บแยกให้ได้เฉพาะ oocysts ของเชื้อ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ในขั้นตอนการเตรียมชิ้นของสารละลายซูโครส ได้ปรับเปลี่ยนความถ่วงจำเพาะของสารละลายซูโครสจาก 1.103 ที่ก้นหลอด และ 1.064 ที่ด้านบน ตามวิธีการดั้งเดิมของ Arrowood and Sterling (1987) มาเป็นความถ่วงจำเพาะของสารละลายซูโครส 1.09 ที่ก้นหลอด และ 1.045 ที่ด้านบน ตามคำแนะนำของ Prof. Dr. Edward Robert Atwill (University of California-Davis) ซึ่งการใช้ความถ่วงจำเพาะของสารละลายชั้นบนที่ 1.045 นั้นมีค่าใกล้เคียงกับความถ่วงจำเพาะของ *Cryptosporidium*

oocysts ซึ่งมีค่าประมาณ 1.045 - 1.05 (Stott, 2003; Searcy *et al.*, 2006) จึงช่วยเพิ่มโอกาสให้ oocysts แยกออกมาได้มากยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับหลักการของวิธีนี้ คือ โมเลกุลเมื่อถูกปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสม จะเกิดการเคลื่อนที่ลงมาอยู่ในบริเวณตัวกลางที่มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับโมเลกุลนั้นๆ จนเกิดเป็นแถบขึ้น (Brakke, 1961) แต่ข้อจำกัดของการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ คือ ต้องอาศัยความชำนาญในการส่องตรวจ และไม่สามารถจำแนก species ของเชื้อจากรูปร่างลักษณะของ oocysts เพียงอย่างเดียว จึงต้องอาศัยเทคนิค nested PCR มาใช้ในการจำแนก species โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่า purified oocysts ที่แยกได้ทั้ง 9 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยา nested PCR ทุกตัวอย่าง ดังนั้น ตัวอย่าง purified oocysts ที่แยกได้จากวิธี discontinuous sucrose gradient จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้สกัดสารพันธุกรรมได้

จากตารางที่ 1 ในจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค nested PCR นั้น เป็นตัวอย่าง DNA ที่สกัดจาก purified oocysts 9 ตัวอย่าง ในขณะที่ DNA ที่สกัดจากอุจจาระให้ผลบวก 8 ตัวอย่าง โดยพบว่ามี 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลข 7, 8 และ 9) ที่ให้ผลบวกจาก DNA ที่สกัดจาก purified oocysts ที่แยกได้เท่านั้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจจะเกิดจากการกระจายตัวของ oocysts ภายในตัวอย่างอุจจาระไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้พบว่ามี 2 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลข 10 และ 11) ที่ให้ผลบวกในตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากอุจจาระ แต่ไม่สามารถแยก oocysts โดยวิธี discontinuous sucrose gradient ได้ อาจเนื่องมาจากเทคนิคดังกล่าวมีหลายขั้นตอน จึงมีโอกาที่จะสูญเสีย oocysts ในระหว่างกระบวนการได้ ในกรณีที่ตัวอย่างอุจจาระนั้นมี oocysts จำนวนน้อย (Vohra *et al.*, 2012) หรืออาจเกิดจากการที่ oocysts แตกออกแต่ยังมี DNA หลงเหลืออยู่ภายในตัวอย่างอุจจาระ หรืออาจเกิดจากตัวอย่างอุจจาระไม่ได้เก็บรักษาใน 2.5% $K_2Cr_2O_7$ โดยทันที ซึ่งการเก็บรักษาอุจจาระในสารที่ช่วยคงสภาพ oocysts เช่น 2.5% $K_2Cr_2O_7$ ก็มีส่วนสำคัญในการป้องกันไม่ให้ oocysts แตก และรักษาความมีชีวิตของ oocysts ไว้ (Chen *et al.*, 2007) และยังนำไปตรวจด้านโมเลกุลวินิจฉัยต่อไปได้ (da Silva and Pieniazek, 2003)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า วิธี nested PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัย เนื่องจากพบสัดส่วนของการตรวจพบผลบวกทั้งการใช้ DNA ที่สกัดจาก purified oocysts (N=9) และการใช้ DNA ที่สกัดจากอุจจาระโดยตรง (N=8) แตกต่างจากวิธีตรวจอุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสี MZN (N=1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) Primer ที่จำเพาะกับยีน SSUrRNA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นยีนที่มีจำนวน copy number สูง และประกอบด้วยตำแหน่งที่มีทั้งบริเวณอนุรักษ์ที่เหมือนกันในแต่ละ species และบริเวณที่แปรผันซึ่งแตกต่างกันในแต่ละ species (Xiao and Ryan, 2008) จึงสามารถนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค DNA sequencing เพื่อจำแนก species ของเชื้อได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของ oocysts น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบผลบวกได้โดยวิธีนี้ คือ 50 oocysts/ml (รูปที่ 5) ทั้งนี้มีการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Adamska *et al.* (2011) ได้ทดสอบความไวของเทคนิค nested PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน SSUrRNA ทดสอบในตัวอย่าง purified oocysts ที่ความเข้มข้น 1,000, 500, 100, 50 และ 10 oocysts/200 μ l โดยผลการศึกษาดูพบความไวที่ 50 oocysts/200 μ l ซึ่งล้วนพบว่ามีค่าความไวมากกว่าวิธีตรวจจากอุจจาระป้ายสไลด์ย้อมสี MZN ซึ่งมีการรายงานไว้ที่ $3 \times 10^5 - 10^6$ oocysts/ml ของอุจจาระ (Khurana *et al.*, 2012) และจากผลการศึกษาพบว่าเทคนิค nested PCR นี้มีความจำเพาะ โดยให้ผลลบต่อเชื้อ *Giardia* spp. ซึ่งเป็นโปรโตซัวในทางเดินอาหารที่สำคัญ รวมทั้งโปรโตซัวในไฟลัม Apicomplexa ตัวอื่น ๆ ได้แก่ *Babesia bigemina*, *Theileria* spp., *Plasmodium gallinaceum*, *Toxoplasma gondii* และ *Neospora* spp. ดังนั้นเทคนิค nested PCR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าให้ผลการตรวจถูกต้อง แม่นยำ มีความไว และความจำเพาะ เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวินิจฉัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการศึกษาครั้งนี้ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากเทคนิค nested PCR เมื่อนำมาศึกษาหาข้อมูลลำดับ สารพันธุกรรมที่ได้ด้วยเทคนิค DNA sequencing และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึง (98-100%) กับเชื้อ *C. parvum*, *C. bovis* และ *C. ryanae* จำนวน 1, 6 และ 4 ตัวอย่างตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดย

C. parvum 1 ตัวอย่างนั้น ตรวจพบจากตัวอย่างอุจจาระ หมายเลข 1 ที่ได้จากลูกโคอายุน้อยกว่า 1 เดือน ที่มีอาการท้องร่วง อุจจาระมีลักษณะเหลว นอกนั้นพบเป็น *C. bovis* และ *C. ryanae* ที่ตรวจพบในโคที่มีอายุมากกว่า 1 เดือน ขึ้นไปจนถึง 1 ปี ซึ่งโคเหล่านี้ส่วนใหญ่ไม่มีประวัติท้องร่วง และอุจจาระมีลักษณะปกติ พบเพียงตัวอย่างอุจจาระ หมายเลข 8 และ 9 ซึ่งตรวจพบ *C. bovis* ที่มีลักษณะอุจจาระกึ่งเหลวจนถึงเหลว และมีประวัติท้องร่วงร่วมด้วย ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า *C. parvum* เป็น species ที่หลักที่มักก่อให้เกิดอาการท้องร่วง โดยเฉพาะในลูกโคและกระบือที่อายุน้อยกว่า 6 สัปดาห์ซึ่งพบว่าเป็นช่วงอายุที่ไวต่อการติด *C. parvum* (Thomson *et al.*, 2017) ในขณะที่ *C. bovis* สามารถพบได้ในโคทุกช่วงอายุ และก่อให้เกิดอาการท้องร่วงได้เช่นเดียวกัน แต่ลูกโคที่ติด *C. parvum* พบว่ามีโอกาสการเกิดภาวะท้องร่วงได้มากกว่าลูกโคที่ติด *C. bovis* (Silverlås, 2010) ส่วน *C. ryanae* และ *C. andersoni* นั้นไม่ก่อให้เกิดอาการทางคลินิก และมักพบในโคอายุมากกว่า 6 สัปดาห์ไปแล้ว (Thomson *et al.*, 2017) การศึกษาในครั้งนี้พบผลสอดคล้องระหว่างปัจจัยด้านอายุและอาการท้องร่วงกับ species ของเชื้อที่พบ อีกทั้งหากโคมีอาการท้องร่วง หรืออุจจาระเหลว แม้ในโคมีอายุมากกว่า 6 สัปดาห์ไปแล้ว ก็ไม่ควรละเลยที่จะตรวจวินิจฉัยเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้ด้วย นอกจากนี้การวินิจฉัยแยกแยะระหว่างทั้ง 4 species ที่ตรวจพบในโค กระบือได้จึงมีประโยชน์ในการแยกแยะระหว่าง *C. parvum* ซึ่งเป็น species ที่ก่อโรค และติดต่อระหว่างสัตว์และคนออกจาก species ที่ไม่ก่อโรคได้การตรวจพบเชื้อ *Cryptosporidium* spp. รวมทั้ง *C. parvum* ในตัวอย่างอุจจาระโคในการศึกษานี้ อาจก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ รวมทั้งอาจเกิดการถ่ายทอดเชื้อระหว่างสัตว์และคน ดังนั้นการคำนึงถึงการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อในสัตว์และคน และการจัดการสุขาภิบาลฟาร์มที่ดีจึงเป็นสิ่งสำคัญ

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

เทคนิค nested PCR ที่พัฒนาขึ้นจากการศึกษาในครั้งนี้ ร่วมกับการใช้วิธี discontinuous sucrose gradient ในการแยกให้ได้ purified oocysts ที่มีความ

บริสุทธิ์ และเหมาะสมที่จะนำมาสกัด DNA สามารถนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ที่พบในโค กระบือได้ถึงในระดับ genus อีกทั้งสามารถแยก species เมื่อใช้ร่วมกับเทคนิค DNA sequencing โดยให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำ มีความไว และความจำเพาะเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีการทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยโรค Cryptosporidiosis ได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือใช้ยืนยันผลจากการตรวจด้วยวิธีดั้งเดิม

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Prof. Dr. Edward Robert Atwill และ Dr. Xunde Li จาก Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California-Davis ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณ ผศ.สพ.ญ.ดร.วรพร สุขุมวาสิ หน่วยงานปริสตีวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ DNA ขอขอบคุณ สพ.ญ.เพ็ญนรินทร์ ดวงมาลา สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดสกลนคร และน.สพ.อาจอง อ่อนหวาน ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือด้านการเก็บตัวอย่างอุจจาระ รวมทั้งเจ้าหน้าที่กลุ่มปริสตีวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ช่วยเหลือในการเตรียมและตรวจตัวอย่าง จนงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- นิมิตร มรกต และคม สุนธสรพร. 2554. *Cryptosporidium*. ปริสตีวิทยาทางการแพทย์ 1.โปรโตซัว. ภาควิชาปริสตีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. กลางเวียงการพิมพ์ เชียงใหม่. หน้า 156-162.
- Adamska, M., Leonska-Duniec, A., Maciejewska, A., Sawczuk, M. and Skotarczak, B. 2011. PCR and real time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum* oocyst DNA. *Folia Biol (Krakow)*. 59(3-4): 115-120.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215(3): 403-410.

- Arrowood, M.J. and Sterling, C.R. 1987. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J Parasitol.* 73(2): 314-319.
- Ash, L.R. and Orihel, T.C. 1987. Parasites, a Guide to Laboratory Procedures and Identification. American Society of Clinical Pathologists, Raven Press, UK. 328 pp.
- Bhat, S.A., Dixit, M., Juyal, P.D. and Singh, N.K. 2014. Comparison of nested PCR and microscopy for the detection of cryptosporidiosis in bovine calves. *J Parasit Dis.* 38(1): 101-105.
- Brakke, M.K. 1961. Density Gradient Centrifugation And its Application to Plant Viruses. In: Advances in Virus Research, Volumn 7. K.M. Smith and M. A. Lauffer, eds. Academic Press, USA. pp. 193-224.
- Chen, F., Huang, K., Qin, S., Zhao, Y. and Pan, C. 2007. Comparison of viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in potassium dichromate solution and chlorinated tap water. *Vet Parasitol.* 150(1): 13-17.
- da Silva A.J., Pieniazek N.J. 2003. Latest Advances and Trends in PCR-Based Diagnostic Methods. In: Textbook-Atlas of Intestinal Infections in AIDS. D. Dionisio, eds. Springer, Milano, Italy. pp. 397-412.
- Inpankaew, T., Jiyipong, T., Sunanta, C., Kengradomkij, C., Pinyopanuwat, N. and Jittapalapong, S. 2017. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* from dairy cows in Northern Thailand. *Acta Parasitol.* 62(4): 772-774.
- Iqbal, A., Lim, Y., Mahdy, M., Dixon, B.R. and Surin, J. 2012. Epidemiology of Cryptosporidiosis in HIV-Infected Individuals: A Global Perspective. 1: 431. [online]. Available: <http://dx.doi.org/10.4172/scientificreports.431>. Accessed Jan 1, 2018.
- Khurana, S., Sharma, P., Sharma, A. and Malla, N. 2012. Evaluation of Ziehl-Neelsen staining, auramine phenol staining, antigen detection enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction, for the diagnosis of intestinal cryptosporidiosis. *Trop Parasitol.* 2(1): 20-23.
- Nuchjangreed, C., Boonrod, K., Ongerth, J. and Karanis, P. 2008. Prevalence and molecular characterization of human and bovine *Cryptosporidium* isolates in Thailand. *Parasitol Res.* 103(6): 1347-1353.
- Ramirez, N.E., Ward, L.A. and Sreevatsan, S. 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect.* 6(8): 773-785.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. and Johne, R. 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 113(5): 1014-1026.
- Searcy, K.E., Packman, A.I., Atwill, E.R. and Harter, T. 2006. Deposition of *Cryptosporidium* oocysts in streambeds. *Appl Environ Microbiol.* 72(3): 1810-1816.
- Silverlås, C. 2010. *Cryptosporidium* infection in dairy cattle: prevalence, species distribution and associated management factors. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. 77 pp.
- Smith, H.V., Nichols, R.A.B. and Campbell, B.M. 2003. Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* oocysts isolated during regulatory monitoring (DWI0832). Foundation for Water Research, London, UK. 53 pp.
- Stott, R. 2003. Fate and behaviour of parasites in wastewater treatment systems. In: The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. D. Mara and N. Horan, eds. Academic Press, UK. pp. 491-524.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-4680.
- Thomson, S., Hamilton, C.A., Hope, J.C., Katzer, F., Mabbott, N.A., Morrison, L.J. and Innes, E.A. 2017. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res.* 48(1): 42.
- Vohra, P., Sharma, M. and Chaudhary, U. 2012. A comprehensive review of diagnostic techniques for detection of *Cryptosporidium parvum* in stool samples. *IOSR Journal of Pharmacy.* 2(5): 15-26.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2016. Chapter 2.9.4. Cryptosporidiosis. OIE Terrestrial Manual. [online]. Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.04_CRYPTO.pdf. Accessed Jan 1, 2018.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R. and Lal, A.A. 1999. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. *Appl Environ Microbiol.* 65(8): 3386-3391.
- Xiao, L. and Ryan, U. 2008. Molecular Epidemiology. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. R. Fayer and L. Xiao, eds. 2nd ed. Taylor & Francis, USA. pp. 119 - 172.