



อัตราการปนเปื้อนและแผนที่จุดการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตติดต่อผ่านน้ำ
ในแหล่งน้ำใช้ของชาวเขาในอำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่
CONTAMINATION RATE AND CONTAMINANT SPOT MAP OF
WATERBORNE PARASITES IN WATER SUPPLY SOURCES
OF THE HILL TRIBE IN OMKOI DISTRICT,
CHIANG MAI PROVINCE

กุลชนา วงศ์ทองเหลือ

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาการวิเคราะห์ทางสุขภาพและชีวการแพทย์

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2568

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

อัตราการปนเปื้อนและแผนที่จุดการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตติดผ่านน้ำ
ในแหล่งน้ำใช้ของชาวเขาในอำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่
CONTAMINATION RATE AND CONTAMINANT SPOT MAP OF
WATERBORNE PARASITES IN WATER SUPPLY SOURCES
OF THE HILL TRIBE IN OMKOI DISTRICT,
CHIANG MAI PROVINCE

กุลชนา วงศ์ทองเหลือ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการวิเคราะห์ทางสุขภาพและชีวการแพทย์

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2568

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง



หน้าอนุมัติวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการวิเคราะห์ทางสุขภาพและชีวการแพทย์

วิทยานิพนธ์เรื่อง อัตราการปนเปื้อนและแผนที่จุดการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตติดต่อน้ำ

ในแหล่งน้ำใช้ของชาวเขาในอำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่

Contamination Rate and Contaminant Spot Map of Waterborne

Parasites in Water Supply Sources of the Hill Tribe in

Omkoï District, Chiang Mai Province

ผู้ประพันธ์ กุลชนา วงศ์ทองเหลือ

คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สงบ สนิท

ประธานกรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย นาชัยเวียง

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินตนา ยาโนละ

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาพ สุทชนะ

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิเวศน์ กุลวงศ์

กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย นาชัยเวียง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินตนา ยาโนละ)

คณบดี

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาพ สุทชนะ)

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เพราะได้รับความร่วมมือและความช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณหลายฝ่าย หลายท่านที่ได้ให้ความกรุณากับผู้วิจัย ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอแสดงกิตติกรรมประกาศไว้ ณ ที่นี้ และกราบขอขอบพระคุณท่านผู้มีพระคุณ ดังต่อไปนี้

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย นาชัยเวียง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินตนา ยาโนละ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สงบ สนิท ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุสดี ละออ อาจารย์ ดร.ประภาพรพรณ เหล็กงาม อาจารย์ภาณพงศ์ อุปละ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ แก้วดวงเล็ก เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาใช้เวลาอันมีค่ามาเป็น ที่ปรึกษาพร้อมทั้งให้คำแนะนำ ให้กำลังใจตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจน อาจารย์สำนักวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงและอาจารย์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ทุกท่านที่ให้ความรู้ สนับสนุน และช่วยเหลือตลอดระยะเวลาจนบรรลุผลในที่สุด

กราบขอบพระคุณ นายบุญเย็น ใจตา นางวรรณุช ใจตา นายเดช เสริมมติวงศ์ นายพลากร บุญเป็ง และนายณัด กันทะ ผู้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่อยู่ อำเภอมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ในการเก็บตัวอย่างน้ำ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่สำเร็จได้หากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากผู้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ในพื้นที่ทุกท่าน

ขอบคุณนางสาวศศิภา ศรีจันทร์ม่วง ผู้สละเวลาสอนใช้โปรแกรมต่าง ๆ นางสาวณัฐริณีย์ กองตะ ผู้สละเวลาสอนและช่วยเหลือการตรวจหาเชื้อปรีสติดด้วยเทคนิค PCR และการการตรวจวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ และเพื่อน ๆ รุ่นพี่ รุ่นน้องทุกคนที่คอยให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยฉบับนี้เป็นอย่างดี

ขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงที่ให้เงินทุนสนับสนุนเพื่อทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้ และสำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้น ผู้ศึกษาขอน้อมรับผิดแต่เพียงผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่าน เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาการศึกษาวิจัยต่อไป

กุลชนา วงศ์ทองเหลือ

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	อัตราการปนเปื้อนและแผนที่จุดการปนเปื้อนของเชื้อปรสิต ติดต่อผ่านน้ำในแหล่งน้ำใช้ของชาวเขาในอำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่
ผู้ประพันธ์	กุลชนา วงศ์ทองเหลือ
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาการวิเคราะห์ทางสุขภาพและชีวการแพทย์)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย นาชัยเวียง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินตนา ยาโนละ

บทคัดย่อ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาวิจัย: อำเภออมก๋อยเป็นอำเภอที่อยู่ทางใต้สุดของจังหวัดเชียงใหม่ มีลักษณะเป็นภูเขาสลับซับซ้อน ประชากรส่วนใหญ่เป็นชนชาติพันธุ์เผ่ากะเหรี่ยง และจัดเป็นพื้นที่ถิ่นทุรกันดาร การคมนาคมขนส่งลำบาก ระบบสาธารณสุขภาคพื้นฐานไม่ทั่วถึง ส่งผลให้ประชากรในพื้นที่จำต้องนำน้ำธรรมชาติมาใช้อุปโภคบริโภคในรูปแบบของประปาภูเขา ซึ่งหากนำน้ำมาใช้และไม่ผ่านการบำบัดอย่างถูกวิธีจะส่งผลให้เกิดการติดเชื้อปรสิต โดยเฉพาะปรสิตติดต่อผ่านน้ำ ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพและความเป็นอยู่ของคนในชุมชน ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาอัตราการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำใช้พร้อมทั้งพยากรณ์ลักษณะของแหล่งน้ำที่มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อปรสิตและสร้างแผนที่แสดงตำแหน่งปนเปื้อนของเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำใช้อุปโภคบริโภคของชนชาติพันธุ์อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อคืนข้อมูลกลับให้ชุมชนนำไปใช้ประโยชน์ เพื่อการควบคุมป้องกันโรคปรสิตที่ติดต่อทางน้ำ

วิธีดำเนินการวิจัย: เก็บตัวอย่างน้ำทั้งหมด 58 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูแล้ง (เดือนพฤษภาคม 2566) 30 ตัวอย่าง และช่วงฤดูฝน (เดือนกันยายน 2566) 28 ตัวอย่าง ในตำแหน่งเดียวกัน ตัวอย่างละ 20 ลิตร ในพื้นที่ 6 ตำบลของอำเภออมก๋อย โดยแบ่งตามความหนาแน่นของครัวเรือน และตรวจลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำแต่ละตัวอย่าง จากนั้นทำการกรองน้ำผ่านแผ่นเมมเบรนขนาด 1.2 ไมโครเมตร เพื่อแยกเอาตะกอน จากนั้นแยกเชื้อปรสิตจากตะกอนด้วยเทคนิคการลอยตัวและการตกตะกอน หลังจากนั้นตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยเทคนิคการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เทคนิคการตรวจดีเอ็นเอ และการตรวจวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ เพื่อยืนยันชนิด

ของเชื้อ แล้วจึงนำข้อมูลมาจัดทำแผนที่แสดงจุดการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำ พร้อมกับวิเคราะห์ลักษณะของน้ำที่มีโอกาสปนเปื้อนกับเชื้อปรสิต

ผลการวิจัย: จากการตรวจการปนเปื้อนในแหล่งน้ำด้วยเทคนิคการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบปรสิตที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาหลากหลายคล้ายคลึงกับเชื้อ *Cryptosporidium spp.*, *E. coli* และ *E. histolytica* จึงตรวจยืนยันด้วยการตรวจดีเอ็นเอ และพบว่าแหล่งน้ำมีการปนเปื้อน *E. coli* (1 จุดในฤดูแล้ง 1 จุดในฤดูฝน) และ *E. histolytica* (2 จุดในฤดูแล้ง 2 จุดในฤดูฝน) และไม่พบการปนเปื้อนของ *G. lamblia* และ *Cryptosporidium spp.* หลังจากการตรวจวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลักษณะของน้ำต่อการปนเปื้อนของปรสิต พบว่าแหล่งน้ำที่มีปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำสูง (≥ 200 มิลลิกรัม/ลิตร) มีโอกาสพบการปนเปื้อนของปรสิตมากกว่าแหล่งน้ำที่มีปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำต่ำ (1 – 99 มิลลิกรัม/ลิตร) 29.33 เท่า แหล่งน้ำที่มีปริมาณแอมโมเนียสูง (≥ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร) มีโอกาสพบการปนเปื้อนของปรสิตมากกว่าแหล่งน้ำที่มีแอมโมเนียต่ำ (0.0 – 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร) 25.50 เท่า และแหล่งน้ำที่มีปริมาณของไนโตรเจนสูง (≥ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร) มีโอกาสพบการปนเปื้อนของปรสิตมากกว่าแหล่งน้ำที่มีไนโตรเจนต่ำ (0 – 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร) 51.00 เท่า

สรุป: แหล่งน้ำในอำเภอมกอยมีการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตหลายชนิด ได้แก่ *E. coli* และ *E. histolytica* และอาจมีเชื้อปรสิตชนิดอื่น ๆ ที่ยังไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งน้ำที่มีปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำ ปริมาณแอมโมเนียและไนโตรเจนที่สูง มีความเสี่ยงในการพบเชื้อปรสิต จึงจำเป็นต้องบำบัดน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติทุกครั้งก่อนนำมาใช้อุปโภคและบริโภค เช่น การต้ม การกรอง การใช้สารเคมี และควรมีการจัดการระบบสุขาภิบาลที่ดี หากไม่สามารถบำบัดควรหลีกเลี่ยงแหล่งน้ำที่มีสาหร่ายสีเขียวเจริญเติบโตได้ดีเนื่องจากสาหร่ายสีเขียวมักจะเจริญได้ดีในแหล่งน้ำที่มีระดับแอมโมเนียและไนโตรเจนสูง

คำสำคัญ: เชื้อปรสิตก่อโรคผ่านน้ำ, ขาวกะเหยิง, อำเภอมกอย, แผนที่จุด, Nested PCR

Thesis Title	Contamination Rate and Contaminant Spot Map of Waterborne Parasites in Water Supply Sources of the Hill Tribe in Omkoi District, Chiang Mai Province
Author	Kulchana Wongthonglua
Degree	Master of Science (Health and Biomedical Analytics)
Advisor	Assistant Professor Woottichai Nachaiwieng, Ph. D.
Co-Advisor	Assistant Professor Jintana Yanola, Ph. D.

ABSTRACT

Background: Omkoi District is a district in the south of Chiang Mai Province. It is a mountainous area. Most of the population in Omkoi District is Karen hill tribe people and is considered a remote area and Transportation is difficult. This is one of the factors that makes it difficult for villagers to access public health services. As a result, the local population uses water for consumption in the form of mountain tap water. If the water is used and is not treated properly, it will result in parasitic infections, especially by waterborne parasites, posing potential risks to the health and well-being of these communities. The researchers therefore studied to determine the contamination rate of parasites in water sources used by ethnic groups, predict the characteristics of water sources that are likely to be contaminated with parasites, and create a spot map showing the location of parasite contamination in the water sources used for consumption by ethnic groups in Omkoi District, Chiang Mai Province, in order to return the information to the community.

Methods: A total of water 58 samples, 30 samples in dry season and 28 samples in wet season, at the same location, each sample 20 liters, in 6 sub-districts of Omkoi district, divided by household density were collected. The physical and chemical characteristics of each water sample were examined. The samples were then concentrated using 1.2 μm membrane filtration and flotation techniques. The parasites were then examined using microscopic examination techniques and DNA

examination techniques using Nested PCR and DNA sequencing analysis to confirm the species of parasite. Then create a spot map to show parasitic contamination spot in water sources, along with analyse the characteristics of water that are likely to be contaminated with parasites.

Results: From the examination of water source contamination by microscopic examination technique, it was found that parasites with various morphological characteristics similar to *Cryptosporidium spp.*, *E. coli*, and *E. histolytica* were found. Therefore, Nested PCR technique and DNA sequencing were used to determine and it was found that water sources were contaminated with *E. coli* (1 source in dry season, 1 source in wet season) and *E. histolytica* (2 source in dry season, 2 sources in wet season), and no contamination of *G. lamblia* and *Cryptosporidium spp.* were found. When analyzing the characteristics of water for parasite contamination, it was found that high total dissolved solids levels (≥ 200 mg/L) are 29.33 times more likely to be contaminated with parasites than water sources with low total dissolved solids levels (1 – 99 mg/L), high ammonia levels (≥ 0.5 mg/L) are 25.50 times more likely to be contaminated with parasites than water sources with low ammonia levels (0.0 – 0.5 mg/L), and high nitrite levels are 51.00 times more likely to be contaminated with parasites than water sources with low nitrite levels (0 – 0.1 mg/L).

Conclusion: Water sources in Omkoi District are contaminated with parasites such as *E. coli*, and *E. histolytica*, and may be other parasites that have not yet been analyzed. In addition, it was found that the characteristics of high total dissolved solids high ammonia and high nitrite in water are at risk of finding parasites presence. Therefore, it is necessary to treat water from natural water sources before consumption by boiling, natural filtration, using chemicals, and there should be good sanitation management. If the water cannot be treated, the water sources that should be avoided are water sources where green algae blooming from high ammonia and high nitrite levels.

Keywords: Waterborne Parasite, Karen Hill Tribe, Omkoi District, Spot Map, Nested PCR

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 กรอบแนวคิด	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยเมื่อเสร็จการวิจัย	3
2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 ข้อมูลพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดเชียงใหม่	4
2.2 ข้อมูลแหล่งน้ำต่าง ๆ ในพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดเชียงใหม่	5
2.3 ประวัติโรคผ่านน้ำ	5
2.4 การติดเชื้อปรสิตในลำไส้ของชาวเขาในอำเภอมวกเหล็ก	16
2.5 ประปาภูเขา	19
2.6 น้ำผิวดิน	20
2.7 คุณลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำ	20
2.8 การตรวจการปนเปื้อนของปรสิตก่อโรคในแหล่งน้ำโดยวิธีการลอยตัวและการตกตะกอน	21
2.9 การตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์	22
2.10 การตรวจยืนยันดีเอ็นเอเชื้อปรสิตด้วยเทคนิค PCR	23
2.11 โปรแกรม Quantum GIS (QGIS)	25
2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจเชื้อปรสิตก่อโรคในแหล่งน้ำ	26
3 วิธีดำเนินการวิจัย	28
3.1 พื้นที่ดำเนินการวิจัย	28
3.2 การสำรวจแหล่งน้ำในเขตอำเภอมวกเหล็ก	28
3.3 การเก็บตัวอย่างน้ำ	32
3.4 การตรวจวัดพารามิเตอร์ทางด้านกายภาพและด้านเคมีของน้ำ	33
3.5 การตรวจหาการปนเปื้อนของปรสิตในแหล่งน้ำ	33

สารบัญ

บทที่	หน้า
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล	56
3.7 การจัดทำแผนที่จุดการปนเปื้อนของปรสิตในแหล่งน้ำ	56
4 ผลการวิจัย	60
4.1 ตัวอย่างน้ำ	60
4.2 การตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์	66
4.3 การตรวจหาเชื้อปรสิตเป้าหมายด้วยวิธีการตรวจดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Nested PCR	69
4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำและแหล่งน้ำที่พบปรสิต	76
4.5 แผนที่จุดการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำ	81
5 อภิปรายผล สรุปผล และข้อเสนอแนะ	87
5.1 อภิปรายผลการศึกษา	87
5.2 สรุปผลการศึกษา	90
5.3 ข้อเสนอแนะ	90
5.4 ข้อจำกัดในการวิจัย	92
รายการอ้างอิง	93
ภาคผนวก	100
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	100
ภาคผนวก ข รูปภาพจุดเก็บตัวอย่างน้ำของฤดูแล้งและฤดูฝน	103
ภาคผนวก ค การสร้างแผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำ	161
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำและแหล่งน้ำที่พบปรสิตโดยใช้โปรแกรม SPSS	205
ประวัติผู้ประพันธ์	216

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยเมื่อเสร็จการวิจัย	3
2.1 สายพันธุ์และโฮสต์ของ <i>Giardia</i>	8
2.2 ชนิด ขนาด และโฮสต์หลักของ <i>Cryptosporidium</i>	11
2.3 ความชุกการติดพยาธิในลำไส้ของนักเรียนชาวเขาเผ่ากะเหรี่ยง ในพื้นที่อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่	18
3.1 การสำรวจแหล่งน้ำเพื่อกำหนดจุดเก็บตัวอย่างน้ำในอำเภออมก๋อย	29
3.2 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนของ <i>Cryptosporidium spp.</i>	44
3.3 ส่วนประกอบการศึกษา PCR และ Nested PCR ของ <i>Cryptosporidium spp.</i>	45
3.4 ปฏิกริยา PCR และ Nested PCR ของ <i>Cryptosporidium spp.</i>	46
3.5 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนของ <i>G. lamblia</i>	47
3.6 ส่วนประกอบการศึกษา PCR และ Nested PCR ของ <i>G. lamblia</i>	48
3.7 ปฏิกริยา PCR และ Nested PCR ของ <i>G. lamblia</i>	49
3.8 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนของ <i>E. coli</i>	50
3.9 ส่วนประกอบการศึกษา PCR และ Nested PCR ของ <i>E. coli</i>	51
3.10 ปฏิกริยา PCR และ Nested PCR ของ <i>E. coli</i>	52
3.11 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนของ <i>E. histolytica</i>	53
3.12 ส่วนประกอบการศึกษา PCR และ Nested PCR ของ <i>E. histolytica</i>	54
3.13 ปฏิกริยา PCR และ Nested PCR ของ <i>E. histolytica</i>	55

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
4.1 ข้อมูลทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูแล้ง	62
4.2 ข้อมูลทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูฝน	64
4.3 ผลการตรวจปรสิตเป้าหมาย <i>G. lamblia</i> และ <i>Cryptosporidium spp.</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของตัวอย่างน้ำทั้ง ฤดูแล้งและฤดูฝนในอำเภอมวกอย จังหวัดเชียงใหม่	66
4.4 ผลการตรวจดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Nested PCR	73
4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างฤดูกาลและคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำ	76
4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างการพบเชื้อปรสิตลักษณะทางด้านกายภาพและด้านเคมี ของน้ำ	78
4.7 ความสัมพันธ์ของปัจจัยทางลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำ ต่อการพบเชื้อปรสิต	80

สารบัญภาพ

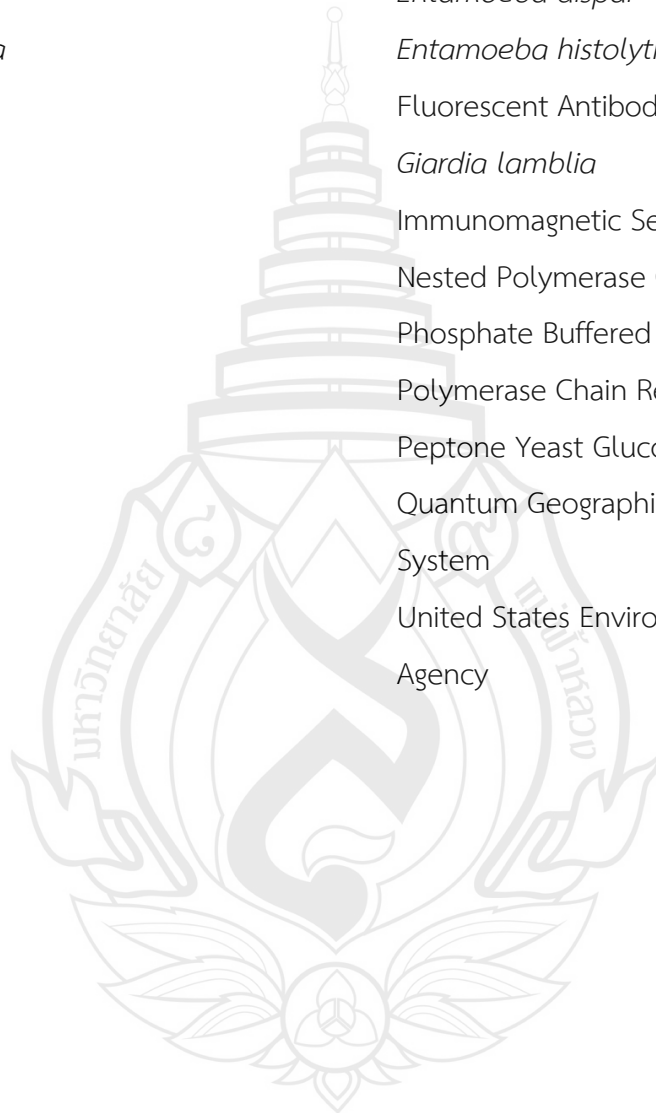
ภาพ	หน้า
1.1 กรอบแนวคิด	3
2.1 วงจรชีวิต <i>Giardia lamblia</i>	6
2.2 <i>Giardia lamblia</i> ระยะโทรโฟซอยต์	7
2.3 <i>Giardia lamblia</i> ระยะซิสต์	7
2.4 วงจรชีวิต <i>Cryptosporidium</i> spp.	10
2.5 โอโอซิสต์ของ <i>Cryptosporidium</i> spp.	10
2.6 วงจรชีวิต <i>Entamoeba coli</i>	13
2.7 <i>Entamoeba coli</i> ระยะโทรโฟซอยต์	13
2.8 <i>Entamoeba coli</i> ระยะซิสต์	14
2.9 วงจรชีวิต <i>Entamoeba histolytica</i>	15
2.10 <i>Entamoeba histolytica</i> ระยะโทรโฟซอยต์	15
2.11 <i>Entamoeba histolytica</i> ระยะซิสต์	16
3.1 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำอำเภอมวกอย จังหวัดเชียงใหม่	28
3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำเพื่อการกรองน้ำ	34
3.3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำเพื่อการทำให้เข้มข้น	34
3.4 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง Formalin Ether Cocentrations	36
3.5 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Double-Slide Simple	37
3.6 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Trichrome Staining	38
3.7 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Modified Acid Fast Staining	39
3.8 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อสกัดดีเอ็นเอ	40
3.9 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างซิสต์และการสกัดดีเอ็นเอ	42
3.10 วิธีการทำ PCR และ Nested PCR	56
3.11 แผนที่แสดงพิกัดจุดเก็บตัวอย่างน้ำอำเภอมวกอย	57

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
3.12 แผนที่แสดงพิกัดจุดเก็บตัวอย่างน้ำอำเภอมกอย	57
3.13 ภาพตัวอย่างการกระจายตัวของจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละตำบล	58
3.14 ภาพตัวอย่างการกระจายตัวของจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละตำบล	58
3.15 ภาพตัวอย่างการกระจายตัวของจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละตำบล	58
3.16 ภาพตัวอย่างการกระจายตัวของจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละตำบล	59
4.1 ซีสต์ที่มีลักษณะคล้ายกับซีสต์ของ <i>Entamoeba spp.</i>	68
4.2 ภาพแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ <i>Cryptosporidium spp.</i> เทียบกับเชื้อควบคุม	69
4.3 ภาพแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ <i>G. lamblia</i> เทียบกับเชื้อควบคุม	70
4.4 ภาพแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ <i>E. coli</i> เทียบกับเชื้อควบคุม	71
4.5 ภาพแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ <i>E. histolytica</i> เทียบกับเชื้อควบคุม	72
4.6 หมุดพิกัดจุดเก็บตัวอย่างน้ำในอำเภอมกอย	82
4.7 สีหมุดที่แสดงชุดข้อมูลของฤดูแล้งและฤดูฝนในตำแหน่งเดียวกัน	82
4.8 ตัวอย่างหมุดจุดเก็บตัวอย่างน้ำ	83
4.9 ตัวอย่างชุดผลข้อมูลของตำแหน่งเก็บตัวอย่างน้ำในฤดูฝน	83
4.10 หมุดแสดงเชื้อปรสิตที่ปนเปื้อนตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 2	84
4.11 หมุดแสดงเชื้อปรสิตที่ปนเปื้อนตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 3	84
4.12 หมุดแสดงเชื้อปรสิตที่ปนเปื้อนตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 13	85
4.13 หมุดแสดงเชื้อปรสิตที่ปนเปื้อนตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 15	85
4.14 QR Code แผนที่แสดงพิกัดจุดเก็บตัวอย่างน้ำและข้อมูลที่แสดงจุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำพร้อมทั้งคำพารามิเตอร์ทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำ และผลการตรวจพบเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำอำเภอมกอย จังหวัดเชียงใหม่	86

อักษรย่อและสัญลักษณ์

CA	Cellulose Acetate
<i>E. coli</i>	<i>Entamoeba coli</i>
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
FA	Fluorescent Antibody
<i>G. lamblia</i>	<i>Giardia lamblia</i>
IMS	Immunomagnetic Separation
Nested-PCR	Nested Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PYG	Peptone Yeast Glucose
QGIS	Quantum Geographic Information System
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาวิจัย

อำเภออมก๋อยเป็นอำเภอที่อยู่ทางใต้สุดของจังหวัดเชียงใหม่ พิกัดเส้นรุ้งที่ 17 องศาเหนือ และเส้นแวงที่ 98 องศาตะวันออกอยู่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,000 เมตร ลักษณะเป็นภูเขา สลับซับซ้อน มีพื้นที่ทั้งหมด 2,099.831 ตารางกิโลเมตรหรือ 1,365,177.812 ไร่ แหล่งน้ำสำคัญ 2 แหล่ง ได้แก่ ลำน้ำต๋อมจากเทือกเขาดอยพุงและลำน้ำต๋นจากเทือกเขาขุนต๋น (สำนักงานพัฒนาชุมชน อำเภออมก๋อย, 2559) อำเภออมก๋อยมีประชากรส่วนใหญ่เป็นชาวเขาเผ่ากะเหรี่ยง และจัดเป็นพื้นที่ ถิ่นทุรกันดาร มีลักษณะภูมิประเทศเป็นภูเขาสลับซับซ้อน และการคมนาคมขนส่งลำบากโดยเฉพาะ ในช่วงฤดูฝน จึงเป็นเหตุปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ชาวบ้านเข้าถึงระบบการบริการด้านสาธารณสุขได้ยากและไม่ทั่วถึง ทำให้ประชากรในพื้นที่มีการนำน้ำมาใช้อุปโภคบริโภคในรูปแบบของประปาภูเขา ซึ่งหากนำน้ำมาใช้และไม่ผ่านการบำบัดที่ถูกต้องจะส่งผลให้เกิดการติดเชื้อปรสิตติดต่อผ่านน้ำ ได้แก่ *Giardia lamblia* (*G. lamblia*) *Cryptosporidium* spp. *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) และ *Entamoeba coli* (*E. coli*) ซึ่งการติดเชื้อปรสิต *G. lamblia* สามารถติดต่อปรสิตชนิดนี้ได้จากทางอาหารและน้ำที่ปนเปื้อนอุจจาระของสัตว์หรือคนที่ติดเชื้อทำให้เกิดโรค Giardiasis (นิมิต มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560) ส่วนเชื้อปรสิต *Cryptosporidium* spp. สามารถติดต่อจากอุจจาระของสัตว์ที่ปนเปื้อนมาในอาหารและน้ำดื่มทำให้เกิดโรค Cryptosporidiosis (นิมิต มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560) ซึ่งหากมีการติดเชื้อ *G. lamblia* ในลำไส้เล็กจะมีอาการท้องเสียขั้นรุนแรง ปวดท้อง ท้องอืด ท้องเฟ้อ ผายลม เนื่องจากมีปริมาณแก๊สในกระเพาะมากเกินไป วิงเวียนศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน รู้สึกอ่อนเพลีย ปวดเกร็งบริเวณหน้าท้อง และมีน้ำหนักที่ลดลง หากติดเชื้อปรสิตชนิดนี้ในเด็กที่กำลังอยู่ในวัยเจริญเติบโตจะทำให้มีการเจริญเติบโตไม่เต็มที่ (นิมิต มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560) ส่วนการติดเชื้อปรสิตจาก *Cryptosporidium* spp. จะมีอาการท้องเสียถ่ายเป็นน้ำ มีอาการขาดน้ำ น้ำหนักตัวลด คลื่นไส้ อาเจียน ปวดเกร็งบริเวณหน้าท้อง มีไข้ สำหรับผู้ที่มิระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องจะมีอาการที่ร้ายแรงกว่าคนปกติอาจถึงขั้นเสียชีวิต เชื้อปรสิตชนิดนี้สามารถอยู่รอดได้เป็นเวลานานในน้ำคลอรีนและในสระว่ายน้ำ (นิมิต มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560) เชื้อปรสิต *E. histolytica* สามารถติดเชื้อโดยการรับประทานอาหารหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนของอุจจาระซึ่งมีชีสต์เป็นระยะติดต่อ ทำให้เกิดโรคบิดอะมีบา โดยเฉพาะฝีบิดอะมีบาที่ตับ ซึ่งพบได้บ่อยที่สุด เชลล์ตับ

จะเน่าตายเกิดดับอีกเสบ สำหรับอวัยวะอื่น ๆ อาจเกิดที่ปอดและเยื่อหุ้มปอด เยื่อหุ้มหัวใจ สมอง ผิวหนัง และอวัยวะเพศ เป็นต้น (ทัศนีย์ สุโกศล, 2545) และเชื้อปรสิต *E. coli* ติดต่อสู่คนโดยการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีเชื้อระยะชีสต์เข้าไป เชื้อ *E. coli* อาศัยอยู่ในลำไส้แต่ไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพใด ๆ ในร่างกาย (ทัศนีย์ สุโกศล, 2545) แต่เป็นตัวบ่งชี้ว่าน้ำมีการปนเปื้อนอุจจาระของคน

ดังนั้นการระบุอัตราการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตที่ถูกต้องและแม่นยำด้วยวิธีการตรวจดีเอ็นเอสามารถส่งเสริมและป้องกันปัญหาสุขภาพของชนชาติพันธุ์ในพื้นที่อ้อมก้อยได้อย่างตรงจุด แล้วจะนำข้อมูลมานำเสนอในรูปแบบแผนที่จุดการปนเปื้อน เพื่อนำฐานข้อมูลชุดนี้เพื่อออกแบบนโยบายส่งเสริมและป้องกันสุขภาพให้กับชนชาติพันธุ์ หรือนำข้อมูลไปคิดออกแบบระบบบำบัดน้ำประปาภูเขา หรือออกแบบนโยบายการควบคุมปศุสัตว์ต่อไปอีกด้วย

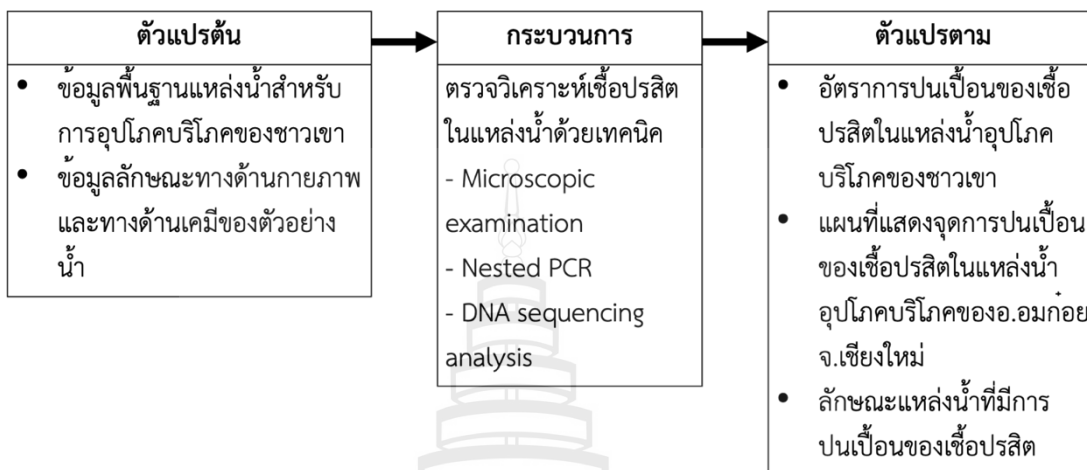
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาอัตราการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำใช้ของชนชาติพันธุ์อำเภอมก้อย จังหวัดเชียงใหม่
- 1.2.2 เพื่อสร้างแผนที่แสดงตำแหน่งปนเปื้อนของเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำใช้อุปโภคบริโภคของชนชาติพันธุ์อำเภอมก้อย จังหวัดเชียงใหม่
- 1.2.3 เพื่อศึกษาลักษณะของแหล่งน้ำที่มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อปรสิต

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการสำรวจอัตราการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตติดต่อกับน้ำในแหล่งน้ำใช้ผลิตประปาภูเขาของชนชาติพันธุ์ในอำเภอมก้อย จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 30 จุด ในฤดูแล้งและฤดูฝนอย่างละ 28 ตัวอย่าง รวมเป็น 58 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 20 ลิตร ทำให้เข้มข้นและตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นจึงยืนยันผลด้วยวิธีการตรวจดีเอ็นเอด้วยวิธี Nested PCR และวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ จากนั้นจัดทำแผนที่จุดการปนเปื้อน ด้วยโปรแกรม QGIS และ Google Earth Pro รวมไปถึงการวิเคราะห์ลักษณะของน้ำที่อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อปรสิต

1.4 กรอบแนวคิด



ภาพที่ 1.1 กรอบแนวคิด

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยเมื่อเสร็จการวิจัย

ตารางที่ 1.1 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยเมื่อเสร็จการวิจัย

ผลลัพธ์	ผลกระทบ
อัตราการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำ	แสดงให้เห็นว่าน้ำประปาภูเขาที่ชาวเขาใช้อุปโภคบริโภคนั้นไม่ปลอดภัย ควรบำบัดก่อนใช้
แผนที่แสดงจุดการปนเปื้อนของปรสิตในแหล่งน้ำ	แสดงตำแหน่งการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตในบริเวณแหล่งน้ำที่พบเชื้อปรสิต

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ข้อมูลพื้นที่อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่

อมก๋อย มาจากคำว่า อ่ากอย เป็นภาษาลัวะ (ละว้า) แปลว่า ชุนน้ำหรือต้นน้ำ สันนิษฐานว่า หมายถึง ต้นน้ำแม่ตื่นที่ไหลผ่านชุมชนเมืองโบราณจากตำนานเมืองต๋นนั้นทบุริได้จารึกไว้ว่าพระยาช้างเผือกและพระยาเล็ก สองพี่น้องได้พาราษฎรที่อพยพมาจากเมืองเชียงใหม่มาทำการสร้างเมืองต๋นบุริ ในปี พ.ศ. 1985 (ปัจจุบันตั้งอยู่ที่ตำบลแม่ตื่น) มีอาณาเขตถึงบ้านพ่อนฟ้า นาหง สะหร่ง บ้านป๊อก บ้านหมาก แม่ระมาด หินลวด นาไฮ หนองแสง ดินแดง ผาสาด และวังคำต่อมมาพระอิตตตราได้สร้างพระบรมธาตุเจดีย์วัดจอมแจ้งขึ้น ที่ดอยนางนอนในปี พ.ศ. 2148 และพระยอนันตราช เจ้าเมืองต๋นได้บรรจุพระบรมธาตุเจดีย์ในปี พ.ศ. 2299 และได้มีประเพณีไหว้พระธาตุในเดือน 9 เหนือ ขึ้น 15 ค่ำ ที่สืบเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน

อำเภออมก๋อยเป็นอำเภอที่อยู่ทางใต้สุดของจังหวัดเชียงใหม่ พิกัดเส้นรุ้งที่ 17 องศาเหนือ และเส้นแวงที่ 98 องศาตะวันออก อยู่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,000 เมตร มีพื้นที่ทั้งหมด 2,099.831 ตารางกิโลเมตรหรือ 1,365,177.812 ไร่ ลักษณะพื้นที่เป็นภูเขาสลับ แบ่งเป็นเขตภูเขาสูง ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดแม่น้ำลำธาร อยู่ในพื้นที่ตำบลอมก๋อย ตำบลยางเปียง ตำบลสบโขง ตำบลนาเกียน ตำบลม่อนจอง ตำบลแม่ตื่น คิดเป็นพื้นที่ประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่อำเภอ และเขตภูเขาเตี้ย คิดเป็นพื้นที่ประมาณร้อยละ 20 ของพื้นที่อำเภอ มีอาณาเขตติดต่อกับอำเภอและจังหวัดใกล้เคียง ดังนี้

ทิศเหนือ ติดต่อกับอำเภอสบเมย (จังหวัดแม่ฮ่องสอน) และอำเภอฮอด

ทิศตะวันออก ติดต่อกับอำเภอดอยเต่า และอำเภอสามเงา (จังหวัดตาก)

ทิศใต้ ติดต่อกับอำเภอแม่ระมาด (จังหวัดตาก)

ทิศตะวันตก ติดต่อกับอำเภอท่าสองยาง (จังหวัดตาก) และอำเภอสบเมย (จังหวัดแม่ฮ่องสอน)

สภาพภูมิอากาศของพื้นที่อมก๋อยมีอากาศค่อนข้างเย็นตลอดทั้งปี ในฤดูร้อนมีอุณหภูมิเฉลี่ย 25 องศาเซลเซียส ส่วนในฤดูหนาวมีอุณหภูมิเฉลี่ย 15 – 20 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 2 – 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 1,000 มิลลิเมตรต่อปี อำเภออมก๋อยมีสภาพอากาศแบ่งเป็น 3 ฤดูดังนี้

ฤดูร้อน เริ่มตั้งแต่เดือนเมษายน – เดือนพฤษภาคม

ฤดูฝน เริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม – เดือนตุลาคม

ฤดูหนาว เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม – เดือนมีนาคม (สำนักงานพัฒนาชุมชนอำเภออมก๋อย, 2559)

2.2 ข้อมูลแหล่งน้ำต่าง ๆ ในพื้นที่อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่

อำเภออมก๋อยมีแหล่งน้ำที่สำคัญ ได้แก่

ลำน้ำแม่ต๋อม มีต้นกำเนิดจากเทือกเขาตอยพุย ทางทิศตะวันออกของอำเภอ ไหลผ่านหมู่บ้านต่าง ๆ และลงสู่ลำน้ำแม่ต๋อนมีความยาวประมาณ 30 กิโลเมตร เป็นแหล่งน้ำสำคัญสำหรับใช้ในการเกษตร

ลำน้ำแม่ต๋อน มีต้นกำเนิดจากเทือกเขาขุนตั้น ในตำบลสลบโขง ไหลผ่านตำบลอมก๋อย ตำบลยางเปียง ซึ่งมีแม่น้ำต๋อม น้ำแม่หาด และอีกมากมาย ไหลมารวมกันเป็นน้ำแม่ต๋อน ไหลสู่ตำบลม่อนจอง และตำบลแม่ต๋อน แล้วไหลลงรวมกับแม่น้ำปิงที่จังหวัดตาก มีความยาวประมาณ 200 กิโลเมตร เป็นแหล่งน้ำที่สำคัญของอำเภอ

ลำน้ำอื่น ๆ เช่น ลำน้ำแม่หาด ลำน้ำเทย ลำน้ำขุนแม่ต๋อนน้อย (สำนักงานพัฒนาชุมชนอำเภออมก๋อย, 2559)

2.3 ประสิทธิภาพผ่านน้ำ

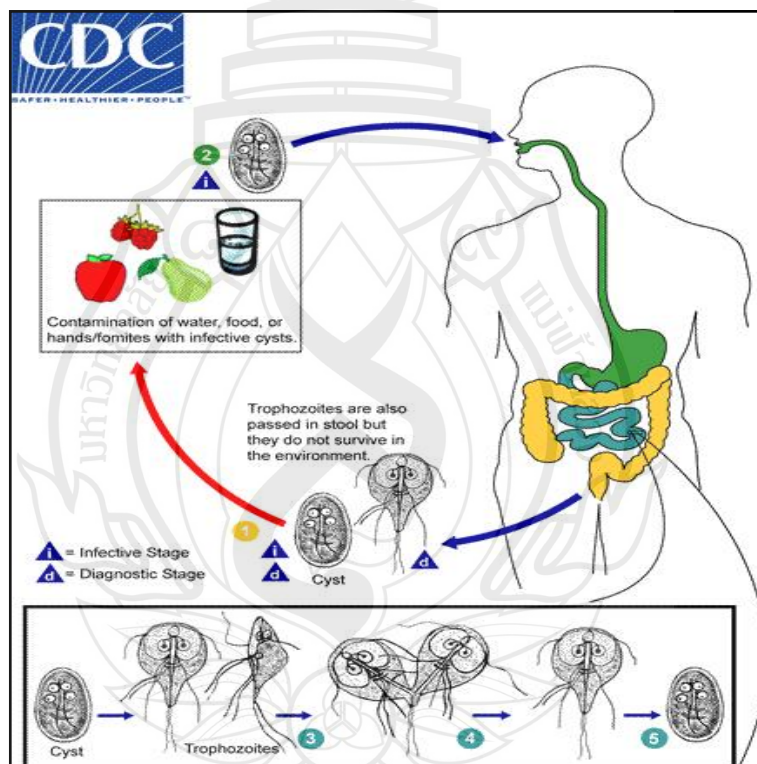
2.3.1 *Giardiasis lamblia/Giardia duodenalis*

G. lamblia เป็น flagellated protozoa คือ ใช้แฟลเจลลาในการเคลื่อนที่ สามารถพบปรสิตชนิดนี้ได้ทั้งในเขตร้อนมากกว่าเขตหนาว นอกจากนี้ยังพบในลำไส้ของเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ (นิมิต มรกต และคม สุคนธรรพ์, 2560) โดยติดต่อได้จากทางน้ำและอาหาร จัดเป็นอันตรายทางอาหาร (Food Hazard) ประเภทร้ายทางชีวภาพ (Biological Hazard) ทำให้เกิดโรค Giardiasis หรือ Lamblisis

G. lamblia มี 2 ระยะ คือ ระยะโทรโฟซอइटและระยะซีสต์ ระยะโทรโฟซอइटมูมมองจากด้านบนมีลักษณะคล้ายรูปาวโค้งด้านหน้ากลมและเรียวแหลมลงมาด้านท้ายของเซลล์ มูมมองด้านข้างส่วนด้านหน้าของเซลล์จะแบนส่วนด้านหลังจะโค้งนูน มีขนาดกว้าง 5 – 15 ไมโครเมตร และยาว 9.5 – 21 ไมโครเมตร มีแฟลเจลลาทั้งหมด 4 คู่ (8 เส้น) เนื่องจากนิวเคลียสที่อยู่เป็นคู่กัน

ประกอบกับการมีแผ่นดูดทำให้ปรสิตชนิดนี้เมื่อถูกย้อมสีแล้วศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์จะดูคล้ายคนใส่แว่นตาจึงตอบมา ระยะซิสต์มีลักษณะเป็นรูปไข่ ขนาดกว้าง 7 – 10 ไมโครเมตร และยาว 8 – 12 ไมโครเมตร ไม่มีแฟลกเจลลัมอิสระ ซิสต์อ่อนมี 2 นิวเคลียส ส่วนซิสต์แก่ซึ่งเป็นระยะติดต่อมี 4 นิวเคลียส

วงจรชีวิตของ *G. lamblia* เมื่อรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนซิสต์ซึ่งเป็นระยะติดเชื้อเข้าไป ซิสต์จะแตกตัวที่ลำไส้เล็กและปล่อยโทรโฟซอยต์ออกมา (แต่ละซิสต์จะผลิตโทรโฟซอยต์ออกมาสองตัว) ขยายพันธุ์แบบ Binary Fission ส่วนการเข้าซิสต์เกิดในขณะที่โทรโฟซอยต์เคลื่อนที่ไปยังลำไส้ใหญ่ จากนั้นจะถูกขับออกผ่านทางอุจจาระ สามารถตรวจพบซิสต์ได้จากอุจจาระแข็ง ส่วนโทรโฟซอยต์ตรวจพบซิสต์ได้จากอุจจาระเหลว (Centers for Disease Control and Prevention, 2024d) ดังภาพที่ 2.1



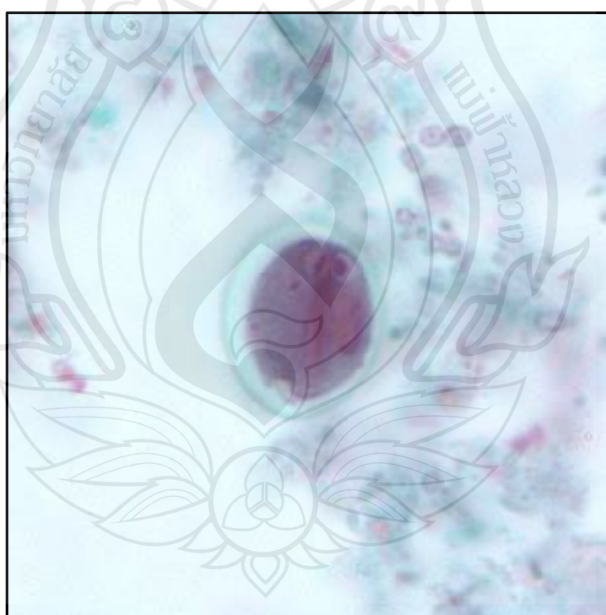
ที่มา Centers for Disease Control and Prevention (2024d)

ภาพที่ 2.1 วงจรชีวิต *Giardia lamblia*



ที่มา Centers for Disease Control and Prevention (2024d)

ภาพที่ 2.2 *Giardia lamblia* ระยะโทรโฟซอยต์



ที่มา Centers for Disease Control and Prevention (2024d)

ภาพที่ 2.3 *Giardia lamblia* ระยะซีสต์

โรค Giardiasis หรือ Lambliasis ผู้ติดเชื้อหลายรายไม่แสดงอาการ เนื่องจากมีภูมิคุ้มกันที่ดี แต่ในผู้ติดเชื้อบางรายที่มีความไวต่อเชื้อมากกว่าผู้อื่น อาจเกิดอาการท้องเสียทำให้เกิดอาการขาดน้ำ และลำไส้มีการผลิตเมือกออกมามาก มีอาการปวดท้อง ผายลมบ่อย และน้ำหนักลด อุจจาระมี

ไขมันมากแต่ไม่มีเลือด เนื่องจากปรสิตจะไปรบกวนการดูดซึมไขมันและสารอาหารของลำไส้ ซึ่งเป็นการเริ่มต้นของโรค ถ้าถุงน้ำดีมีการติดเชื้อจะทำให้เกิดอาการตัวเหลือง ตาเหลือง และปวดท้อง มีรายงานว่า *G. lamblia* ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ โรคนี้ไม่ทำให้ผู้ติดเชื้อเสียชีวิต แต่จะรบกวนไม่ให้ผู้ติดเชื้ออยู่ได้อย่างปกติสุข นอกจากนี้ *G. lamblia* ยังรบกวนการเจริญเติบโตของเด็กที่อยู่ในวัยเจริญเติบโต โดยเด็กที่ติดเชื้อจะมีการเจริญเติบโตไม่เต็มที่

การป้องกันทำได้ด้วยการล้างมือก่อนรับประทานอาหาร รับประทานอาหารปรุงสุก ดื่มน้ำที่ผ่านการต้มจนเดือดหรือกรองแล้ว (นิมิต มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560)

การวินิจฉัยโรคสามารถตรวจได้ 3 วิธี ได้แก่ (1) ตรวจหาซีสต์และโทรโซพอยต์จากอุจจาระของผู้ป่วยโดยตรง มักมีมูกและไขมันแต่ไม่มีเลือดปนอยู่ในอุจจาระของผู้ป่วย (2) ตรวจของเหลวในคูโอติ้นัม การดูดโดยใช้หลอดสอดดูดเข้าในลำไส้หรือการใช้แคปซูลเป็นด้ายในลอนยาว 1 เมตร ส่วนปลายติดด้วยลูกตุ้ม เก็บม้วนไว้ในแคปซูลเจลาตินมีปลายสายโผล่ออกมา เมื่อสาวด้ายขึ้นมาก็นำของเหลวที่ติดมากับเส้นด้ายไปตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์ (3) ตรวจภูมิคุ้มกันวิทยา โดยการใช้ชุดน้ำยาทางเซรัมตรวจหาแอนติเจนของเชื้อปรสิตในอุจจาระ (นิมิต มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560)

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์และโฮสต์ของ *Giardia*

ชื่อสายพันธุ์	โฮสต์	ลักษณะวิทยา		ข้อมูลโมเลกุล
		กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	
<i>G. agilis</i>	สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ	รูปร่างเรียวยาว		NA ^a
<i>G. muris</i>	สัตว์ฟันแทะ	รูปร่างกลมสั้นและโค้งมน		ห่างไกลจาก <i>G. lamblia</i>
<i>G. lamblia</i>	สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดรวมทั้งมนุษย์	รูปร่างคล้ายลูกแพร์		กลุ่มที่มีจีโนไทป์หลายแบบ
<i>G. ardeae</i>	วงศ์นกยาง	รูปร่างคล้ายลูกแพร์	Ventral disk และ แฟลเจลลัมหาง คล้ายกับ <i>G. muris</i>	ใกล้เคียงกับ <i>G. lamblia</i> มากกว่า <i>G. muris</i>

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชื่อสายพันธุ์	โฮสต์	สัณฐานวิทยา		ข้อมูลโมเลกุล
		กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสง	กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน	
<i>G. psittaci</i>	สัตว์ปีก เช่น	รูปร่างคล้าย	Ventrolateral	NA ^α
	นกแก้ว นก	ลูกแพร์	flange ไม่	
	หงส์หยก และ		สมบูรณ์ และไม่มี	
	นกกระตั้ว		marginal groove	
<i>G. microti</i>	หนูนาและหนูน้ำ	รูปร่างคล้าย	ซิสต์ประกอบด้วย	คล้ายกับจีโนไทป์ <i>G. lambia</i>
		ลูกแพร์	2 โทโรฟซอยต์กับ	
			mature ventral disks	

หมายเหตุ ^α NA = ไม่มี

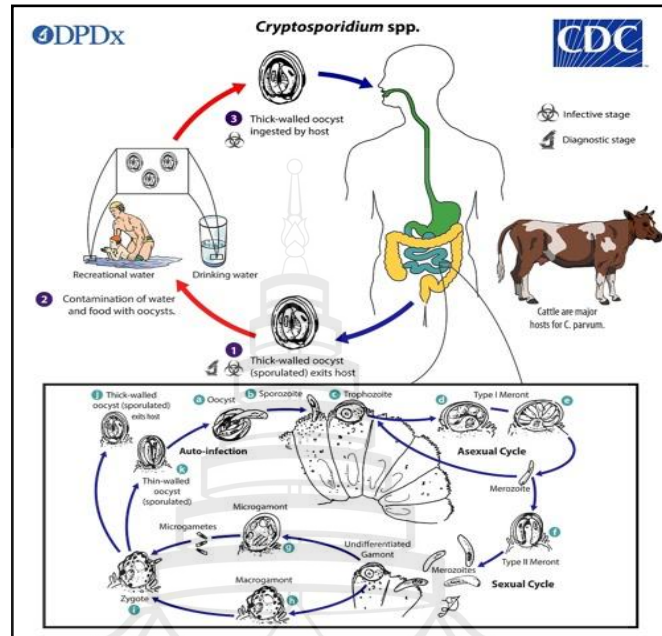
ที่มา Adam (2001)

2.3.2 *Cryptosporidium*

Cryptosporidium คือ เชื้อปรสิตที่สามารถติดต่อได้จากสัตว์สู่คน ซึ่งจะฝังตัวอยู่ในเซลล์บุผนังลำไส้เล็กของคนและสัตว์ แต่ชนิดที่ก่อโรคในคน คือ *Cryptosporidium hominis* และ *Cryptosporidium parvum* สามารถพบปรสิตชนิดนี้ได้ในเขตร้อน นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นหนึ่งในเชื้อปรสิตฉวยโอกาสที่ก่อโรคในผู้ป่วยเอดส์อีกด้วย (นิमित มรกต และคม สุนทรสรรพ, 2560)

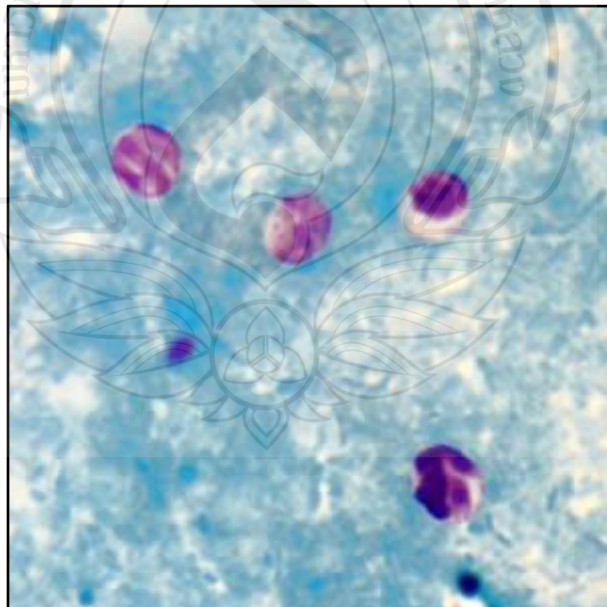
วงจรชีวิตของ *Cryptosporidium* เมื่อถูกปล่อยออกมาทางอุจจาระของโฮสต์ในรูปของโอโอซิสต์ผนังหนาเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.7 – 9.9 ไมโครเมตร (เฉลี่ย 8.6 ไมโครเมตร) ผนังสองชั้นหนาประมาณ 113 นาโนเมตร ผนังชั้นนอกหนา 63 นาโนเมตร และขรุขระ ผนังชั้นในหนา 50 นาโนเมตร และเรียบ ซึ่งเป็นระยะติดเชื้อประกอบด้วยสปอโรซอยต์ 4 ตัว ขนาดกว้างคูณยาว 0.7 – 0.8 × 12 – 15 ไมโครเมตร การติดเชื้อมาจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนโอโอซิสต์เข้าไป เมื่อโอโอซิสต์โดนกรดในกระเพาะของโฮสต์ สปอโรซอยต์ 4 ตัวถูกปล่อยออกมาแล้วมีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ หลังจากนั้นจึงมีการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดเป็นไซโกต ไซโกตพัฒนาเป็นโอโอซิสต์สองแบบได้แก่ โอโอซิสต์ผนังหนาและโอโอซิสต์ผนังบาง โอโอซิสต์ผนังหนาถูกขับออกจากโฮสต์สู่สิ่งแวดล้อม ส่วนโอโอซิสต์ผนังบางทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำในตัวเอง (Autoinfection) ไม่ได้ถูกขับออก

จากโฮสต์ (นิमित มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560; Centers for Disease Control and Prevention, 2024c) ดังภาพที่ 2.4



ที่มา Centers for Disease Control and Prevention (2024c)

ภาพที่ 2.4 วงจรชีวิต *Cryptosporidium* spp.



ที่มา Centers for Disease Control and Prevention (2024c)

ภาพที่ 2.5 โอโอซิสต์ของ *Cryptosporidium* spp.

การติดเชื้อ *Cryptosporidium* spp. เรียกว่า Cryptosporidiosis ก่อโรคได้ทั้งในคนปกติ และคนที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติโรคสามารถหายเอง อาการของผู้ป่วยทั่วไปมักมี อาการท้องเสียมีมูกแต่ไม่มีเลือดปน ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ต่ำ ส่วนผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกัน บกพร่องทำให้เกิดท้องเสียถ่ายเป็นน้ำรุนแรงเรื้อรัง น้ำหนักลด มีภาวะขาดสารอาหาร อันตรายต่อ ชีวิต (นิมิต มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560)

เนื่องจากโอโอซิสต์ไม่สามารถกำจัดได้ด้วยคลอรีน จึงไม่ควรกลืนน้ำขณะว่ายน้ำ ห้ามว่ายน้ำ ในขณะท้องเสียอย่างน้อยสองสัปดาห์ ดังนั้นการบำบัดน้ำจะต้องใช้โอโซนในระดับที่สูงกว่าคำแนะนำ ของหน่วยงานรัฐที่ 1 ppm ต่อ 5 นาที จึงจะสามารถฆ่าเชื้อได้ ส่วนการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตต้อง ใช้เวลาอย่างน้อย 150 นาที แม้มีโอโอซิสต์เพียงหนึ่งฟองก็สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้อีกทั้งยังทน ต่อน้ำยาฆ่า แต่ Formal Saline ร้อยละ 10, แอมโมเนีย ร้อยละ 3 และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือ อุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส แช่เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาทีช่วยให้โอโอซิสต์ไม่ติดต่อกันได้อีกวิธีที่ดี ที่สุดคือการต้มน้ำให้เดือด และยังสามารถต้มนมดิบหรืออาหารได้ นอกจากนี้ยังต้องล้างมือด้วยสบู่ ด้วยน้ำสะอาดก่อนประกอบอาหารหรือการสัมผัสกับสัตว์ และหลีกเลี่ยงการดื่มน้ำที่ไม่ได้รับการบำบัด (นิมิต มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560)

ตารางที่ 2.2 ชนิด ขนาด และโฮสต์หลักของ *Cryptosporidium*

สายพันธุ์ <i>Cryptosporidim</i>	ขนาด (ไมโครเมตร)	โฮสต์	ตำแหน่ง
<i>C. andersoni</i>	5.5 × 7.4	วงศ์วัวและควาย	กระเพาะแท้
<i>C. baileyi</i>	4.6 × 6.2	นก	ทวารร่วมหรือช่อง เปิดทวารรวม, อุ้งน้ำในข้อ, ทางเดินหายใจ
<i>C. canis</i>	5.0 × 4.7	วงศ์สุนัข, มนุษย์	ลำไส้เล็ก
<i>C. felis</i>	4.5 × 5.0	วงศ์เสือและแมว, มนุษย์	ลำไส้เล็ก
<i>C. galli</i>	8.0-8.5 × 6.2-6.4	นก	กระเพาะอาหาร ส่วนต่อมของนก
<i>C. hominis</i>	4.5 × 5.5	มนุษย์	ลำไส้เล็ก
<i>C. meleagridis</i>	4.5-5.0 × 4.6-5.2	นก, มนุษย์	ลำไส้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

สายพันธุ์ <i>Cryptosporidium</i>	ขนาด (ไมโครเมตร)	โฮสต์	ตำแหน่ง
<i>C. molnaris</i>	4.7 × 4.5	ปลา	ท้อง
<i>C. muris</i>	5.6 × 7.4	สัตว์ฟันแทะ, มนุษย์	ท้อง
<i>C. parvum</i>	4.5 × 5.5	สัตว์เคี้ยวเอื้อง, มนุษย์	ลำไส้
<i>C. varanii</i>	4.2-5.2 × 4.4-5.6	สัตว์เลื้อยคลาน, งู	ลำไส้และเยื่อ โพรงมดลูก
<i>C. serpentis</i>	4.8-5.6 × 5.6-6.6	สัตว์เลื้อยคลาน, งู	ลำไส้และเยื่อ โพรงมดลูก
<i>C. suis</i>	5.1 × 4.4	หมู, มนุษย์	ท้อง
<i>C. wrairi</i>	4.0-5.0 × 4.8-5.6	หนูตะเภา	ลำไส้เล็ก
<i>C. bovis</i>	4.2-4.8 × 4.8-5.4	สัตว์เคี้ยวเอื้อง	ลำไส้เล็ก
<i>C. scophithlmi</i>	3.0-4.7 × 3.7-5.0	ปลา	ลำไส้

ที่มา Snelling et al. (2007)

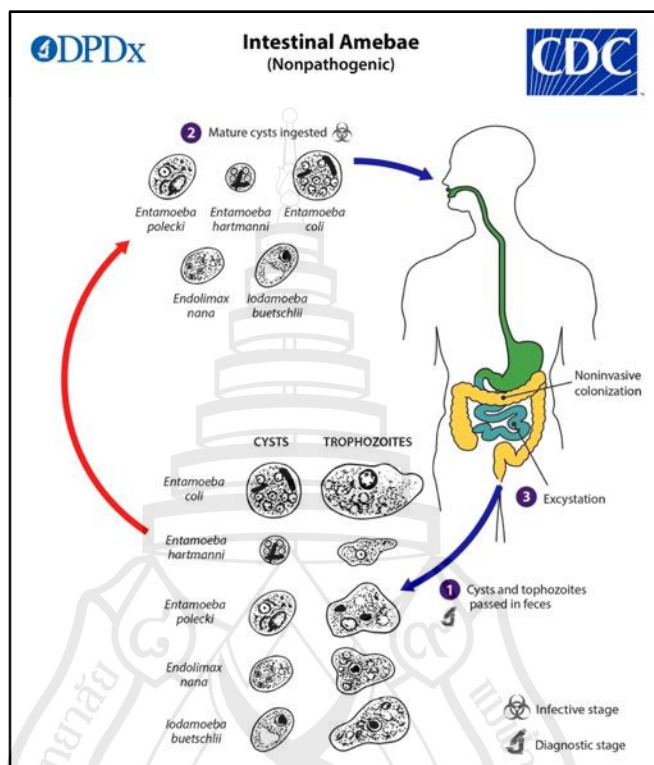
การวินิจฉัยเพื่อตรวจหาโอโอซิสต์ของ *Cryptosporidium* นิยมใช้วิธีการย้อมสี Acid Fast โอโอซิสต์ติดสีแดง พื้นสีฟ้าหรือใช้วิธีแยกเชื้อออกมาโดยใช้วิธีลอยตัวในน้ำเชื่อมและอีกวิธีคือการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) มักใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม แต่ไม่เหมาะนำมาตรวจหา *Cryptosporidium* ในอุจจาระ (นิมิต มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560)

2.3.3 *Entamoeba coli*

E. coli เป็นอะมีบาที่โทรโฟซอยต์มีขนาด 15 – 50 ไมโครเมตร มี 1 นิวเคลียส ซีสต์มีขนาด 10 – 35 ไมโครเมตร รูปร่างกลมมี 1 – 8 นิวเคลียส ติดต่อกันโดยการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่มีระยะซีสต์ที่มี 8 นิวเคลียสซึ่งเป็นระยะติดต่อเข้าไป อะมีบาจะออกจากผนังหุ้มซีสต์บริเวณลำไส้เล็ก แบ่งตัวเป็นโทรโฟซอยต์แล้วไปอาศัยอยู่บริเวณลำไส้ใหญ่ เชื้อบางส่วนเปลี่ยนเป็นระยะซีสต์ปนออกมากับอุจจาระ *E. coli* อาศัยอยู่ในช่องกลางของลำไส้ใหญ่แต่ไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพใด ๆ ในร่างกาย และไม่แพร่กระจายไปยังส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถอาศัยอยู่ในร่างกายได้หลายสัปดาห์ หลายเดือน หรือหลายปี (ทัศนีย์ สุโกศล, 2545)

วงจรชีวิต *E. coli* ซีสต์และโทรโฟซอยต์ถูกขับออกมาทางอุจจาระจากโฮสต์สู่สิ่งแวดล้อม เมื่อรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อนซีสต์เข้าไป เมื่ออยู่ในลำไส้เล็กซีสต์เปลี่ยนเป็นโทรโฟซอยต์

จากนั้นโทรโฟซอยต์เคลื่อนที่ไปยังลำไส้ใหญ่ โทรโฟซอยต์มีการแบ่งตัวแบบ Binary Fission แล้วเข้าสู่สภาวะซีสต์อีกครั้งและถูกขับออกมาทางอุจจาระ (Centers for Disease Control and Prevention, 2019a) ดังภาพที่ 2.6



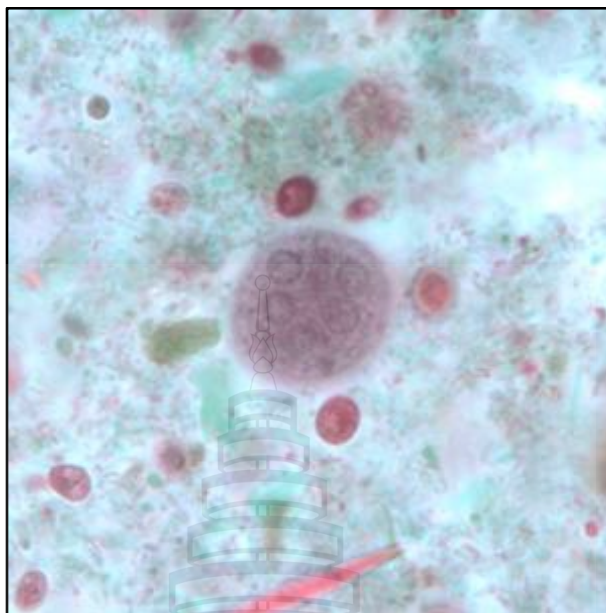
ที่มา Centers for Disease Control and Prevention (2019a)

ภาพที่ 2.6 วงจรชีวิต *Entamoeba coli*



ที่มา Centers for Disease Control and Prevention (2019a)

ภาพที่ 2.7 *Entamoeba coli* ระยะโทรโฟซอยต์



ที่มา Centers for Disease Control and Prevention (2019a)

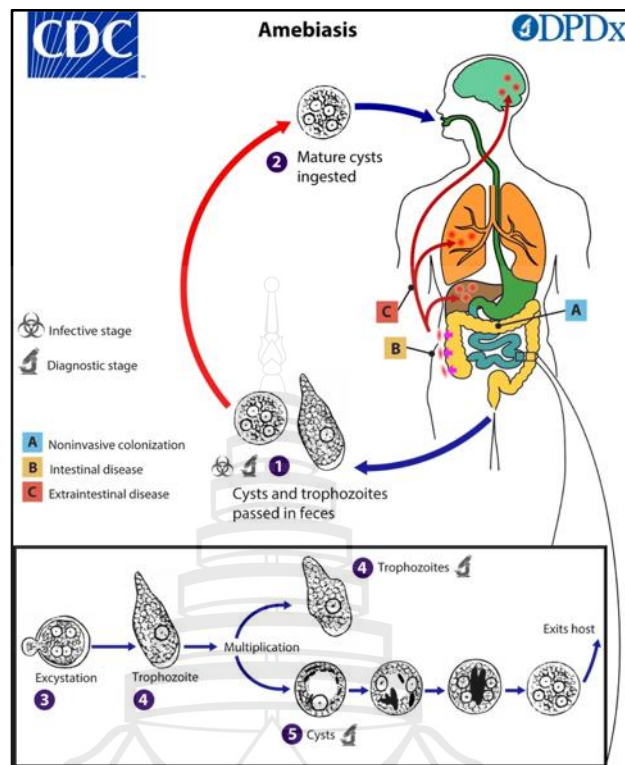
ภาพที่ 2.8 *Entamoeba coli* ระยะซิสต์

การป้องกันการติดเชื้อทำได้โดยถ่ายอุจจาระลงส้วมที่ถูกสุขลักษณะ รักษาอนามัยส่วนบุคคล และรับประทานอาหารและน้ำดื่มที่สุกและสะอาดเสมอ (ทัศนีย์ สุโกศล, 2545)

2.3.4 *Entamoeba histolytica*

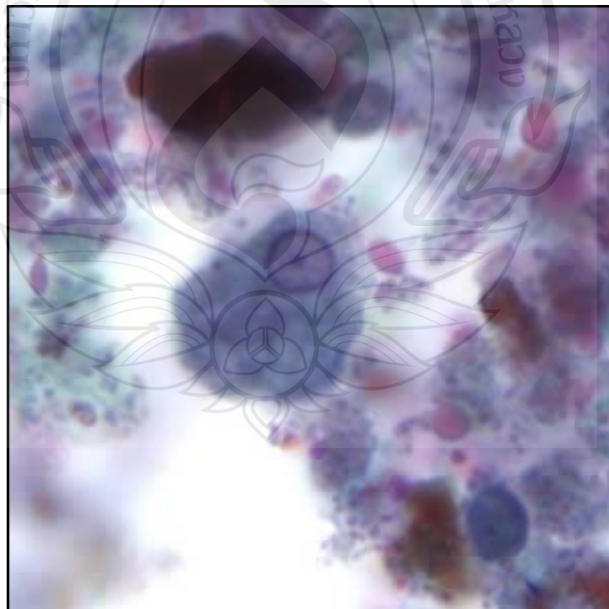
E. histolytica เป็นโปรโตซัวกลุ่มอะมีบา ระยะโทรโฟซอยต์มีรูปร่างไม่แน่นอนมีขนาด 10 – 60 ไมโครเมตร มี 1 นิวเคลียส เคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วด้วยชูโดพอดเทียม ส่วนระยะซิสต์มีขนาด 12 – 15 ไมโครเมตร รูปร่างกลมมี 1 – 4 นิวเคลียส (ทัศนีย์ สุโกศล, 2545)

วงจรชีวิตของ *E. histolytica* เกิดจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนซิสต์เข้าไป เมื่ออยู่ในลำไส้เล็กซิสต์เปลี่ยนเป็นโทรโฟซอยต์ จากนั้นโทรโฟซอยต์เคลื่อนที่ไปยังลำไส้ใหญ่ สามารถบุกรุกเยื่อบุลำไส้หรือบริเวณนอกลำไส้ได้ เช่น ตับ ปอด และสมอง โทรโฟซอยต์มีการแบ่งตัวแบบ Binary Fission แล้วเข้าสู่สภาวะซิสต์อีกครั้งและถูกขับออกมาทางอุจจาระ (ทัศนีย์ สุโกศล, 2545; Centers for Disease Control and Prevention, 2019b) ดังภาพที่ 2.9



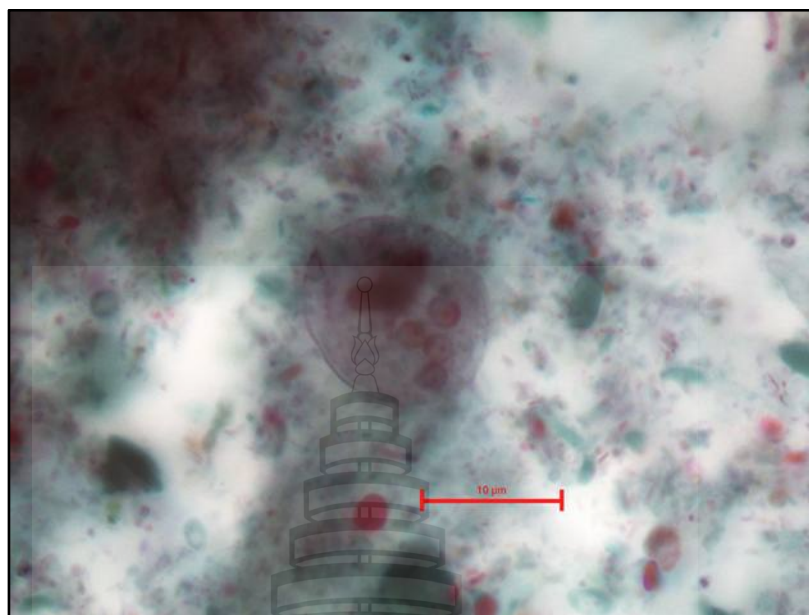
ที่มา Centers for Disease Control and Prevention (2019b)

ภาพที่ 2.9 วงจรชีวิต *Entamoeba histolytica*



ที่มา Centers for Disease Control and Prevention (2019b)

ภาพที่ 2.10 *Entamoeba histolytica* ระยะโทรโฟซอยต์



ที่มา Walkowski (2012)

ภาพที่ 2.11 *Entamoeba histolytica* ระยะชีสต์

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อปรสิตชนิดนี้เรียกว่า โรคบิดอะมีบาชนิดมีตัว (Amoebiasis) โดยเฉพาะฝีดิบอะมีบาที่ตับ ซึ่งพบได้บ่อยที่สุด เซลล์ตับจะเน่าตายเกิดตับอักเสบ สำหรับอวัยวะอื่น ๆ อาจเกิดที่ปอดและเยื่อหุ้มปอด เยื่อหุ้มปอด เยื่อหุ้มหัวใจ สมอง ผิวหนัง และอวัยวะเพศ เป็นต้น (ทัศนีย์ สุโกศล, 2545)

การป้องกัน คือ การไม่รับประทานอาหารดิบ รับประทานอาหารสุก ดื่มน้ำสะอาดที่ผ่านการต้มให้เดือด วิธีเหล่านี้สามารถช่วยป้องกันการลดความเสี่ยงในการติดเชื้อได้ (ทัศนีย์ สุโกศล, 2545)

การวินิจฉัยสามารถตรวจหาเชื้อปรสิตได้หลายวิธี เช่น (1) ตรวจหาเชื้อปรสิตสามารถตรวจได้จากอุจจาระที่เป็นมูกเลือดโดยการทำสเมียร์แล้วตรวจดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ (2) การใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) สามารถแยกแยะ *E. histolytica* จาก *E. dispar* ได้ (3) การย้อมสี Trichrome เพื่อเพิ่มความชัดเจนในการมองเห็น แต่ไม่สามารถแยกแยะ *E. histolytica* จาก *E. dispar* ได้ (นิมิต มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560)

2.4 การติดเชื้อปรสิตในลำไส้ของชาวเขาในอำเภออมก๋อย*

มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการติดพยาธิในลำไส้ในเด็กวัยเรียนช่วง 10 ปีที่ผ่านมา มีรายงานความชุกอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 9.7 – 61.1 (Saksirisampant et al., 2004, 2006;

Maneeboonyang et al., 2008; Ngrenngamlert et al., 2007; Apidechkul, 2015) อย่างไรก็ตามในกลุ่มเด็กด้อยโอกาส เช่น เด็กชาวเขาเผ่าต่าง ๆ พบความชุกของการติดเชื้อปรสิตในลำไส้ร้อยละ 48.9 โดยเชื้อที่พบมากที่สุด คือ *Entamoeba coli* มีความชุกร้อยละ 40.9 เชื้อชนิดนี้เป็นโปรโตซัวที่พบได้ในอุจจาระ และติดทางการกินอาหารหรือน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อน ถึงแม้ว่าจะไม่ก่อโรคแต่สามารถบ่งบอกถึงสุขลักษณะที่ไม่ดีของบุคคลนั้น ความชุกของการติดเชื้อปรสิตที่พบรองลงมาได้แก่ *G. lamblia* พบร้อยละ 14.9 และเชื้อปรสิตอื่น ๆ ได้แก่ hookworm, *Ascaris lumbricoides* และ *Trichuris trichiura* พบความชุกของการติดเชื้อร้อยละ 13.4 ร้อยละ 8.0 และร้อยละ 6.9 ตามลำดับ (Piangjai et al., 2003)

นอกจากนี้ผลงานวิจัยล่าสุด ได้รายงานความชุกของการติดพยาธิในลำไส้ของเด็กวัยเรียนชาวเขาเผ่ากะเหรี่ยงในอำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ที่ยังคงมีค่าความชุกสูงถึงร้อยละ 47.7 (Yanola et al., 2018) และมีค่าไม่แตกต่างจากช่วงค่าความชุกที่เคยมีรายงานไว้ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา รูปแบบการติดพยาธิที่พบมีทั้งแบบการติดเชื้อเดี่ยว (ร้อยละ 29.3) และการติดเชื้อร่วม (ร้อยละ 18.4) ส่วนใหญ่พยาธิในลำไส้ที่ตรวจพบเป็นกลุ่มโปรโตซัว (ร้อยละ 24.2) โดยในกลุ่มโปรโตซัวก่อโรค ตรวจพบความชุกสูงของ *G. lamblia* (ร้อยละ 3.5) ส่วนกลุ่มโปรโตซัวที่ไม่ก่อโรค ตรวจพบความชุกสูงของ *Entamoeba coli* (ร้อยละ 31.2) อย่างไรก็ตามในกลุ่มหนอนพยาธิที่ตรวจพบส่วนใหญ่เป็นกลุ่มหนอนพยาธิที่ติดต่อผ่านดิน (Soil Transmitted Helminths) ซึ่งได้แก่ พยาธิแส้ม้า *T. trichiura* (ร้อยละ 16.3) พยาธิไส้เดือน *A. lumbricoides* (ร้อยละ 13.3) และพยาธิปากขอ (ร้อยละ 0.5) ประเทศไทยแม้จะมีนโยบายการกำจัดพยาธิโดยอาศัยโรงเรียนเป็นฐาน (School Based Deworming Program) แต่อาจมีเด็กวัยเรียนที่ด้อยโอกาสจำนวนหนึ่งที่เข้าไม่ถึงโครงการกำจัดพยาธิดังกล่าว เช่น เด็กชาวเขา ดังนั้นการติดพยาธิในลำไส้ของเด็กกลุ่มดังกล่าวจึงอาจยังมีความชุกสูง

การติดพยาธิในลำไส้ยังคงเป็นปัญหาสำคัญในเด็กวัยเรียนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ชนบท เนื่องจากพฤติกรรมการบริโภค และการใช้ชีวิตประจำวัน การติดเชื้อปรสิตในลำไส้เป็นการติดเชื้อในกลุ่มโปรโตซัว (Protozoa) รวมถึงหนอนพยาธิ (Helminthes) โดยหนอนพยานั้น ยังสามารถแบ่งตามลักษณะออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ๆ ได้แก่ พยาธิตัวกลม (Nematodes) โดยคนเราสามารถติดพยาธิได้หลายทาง ขึ้นกับวงจรชีวิตของพยาธิแต่ละชนิด โดยส่วนใหญ่มักติดต่อทาง Fecal Oral Route การติดเชื้อปรสิตในลำไส้นำไปสู่การเจ็บป่วยและโรคต่าง ๆ อาทิ อาการท้องเสีย ภาวะโลหิตจาง และภาวะขาดสารอาหาร เป็นต้น การติดเชื้อปรสิตในลำไส้ หากมีอาการรุนแรง อาจนำไปสู่การเสียชีวิตได้ หากไม่ได้รับการรักษา

ตารางที่ 2.3 ความชุกการติดพยาธิในลำไส้ของนักเรียนชาวเขาเผ่ากะเหรี่ยง ในพื้นที่อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่

พยาธิในลำไส้	ความชุกการติดพยาธิ	
	N (%)	95%CI
การติดพยาธิในลำไส้ทั้งหมด	179 (47.7)	42.8-52.8
การติดเชื้อเดี่ยว:	110 (29.3)	24.8-34.2
โปรโตซัวในลำไส้	77 (20.5)	16.3-24.7
<i>Entamoeba coli</i>	63 (16.8)	12.9-20.7
<i>Endolimax nana</i>	5 (1.3)	0.4-3.1
<i>Giardia lamblia</i>	7 (1.9)	0.8-3.8
<i>Sarcocystis spp.</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>Blastocystis hominis</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
หนอนพยาธิในลำไส้	33 (8.9)	6.1-12.1
<i>Ascaris lumbricoides</i>	8 (2.2)	0.9-4.2
<i>Trichuris trichiura</i>	23 (6.2)	3.9-9.1
<i>Enterobius vermicularis</i>	2 (0.5)	0.1-1.9
การติดเชื้อร่วม:	69 (18.4)	14.6-22.7
โปรโตซัวในลำไส้	14 (3.8)	2.1-6.2
<i>E. coli</i> + <i>E. nana</i>	8 (2.2)	0.9-4.2
<i>E. coli</i> + <i>G. lamblia</i>	3 (0.8)	0.2-2.3
<i>E. coli</i> + <i>Sarcocystis spp.</i>	2 (0.5)	0.1-1.9
<i>E. coli</i> + <i>E. dispar/E. histolytica</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
หนอนพยาธิในลำไส้	11 (2.9)	1.5-5.2
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>	11 (2.9)	1.5-5.2
โปรโตซัวในลำไส้และหนอนพยาธิในลำไส้	44 (11.7)	8.7-15.4
<i>E. coli</i> + <i>A. lumbricoides</i>	13 (3.5)	1.9-5.9
<i>E. coli</i> + <i>T. trichiura</i>	7 (1.9)	0.8-3.8
<i>E. coli</i> + Hookworm	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>E. coli</i> + <i>E. vermicularis</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>G. lamblia</i> + <i>T. trichiura</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>Sarcocystis spp.</i> + <i>T. trichiura</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>E. coli</i> + <i>E. nana</i> + <i>A. lumbricoides</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>E. coli</i> + <i>E. nana</i> + <i>T. trichiura</i>	2 (0.5)	0.1-1.9

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

พยาธิในลำไส้	ความชุกการติดพยาธิ	
	N (%)	95%CI
<i>E. coli</i> + <i>G. lamblia</i> + <i>A. lumbricoides</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>E. coli</i> + <i>B. hominis</i> + <i>T. trichiura</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>E. coli</i> + <i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>	7 (1.9)	0.8-3.8
<i>E. coli</i> + <i>Chilomastix mesnili</i> + <i>A. lumbricoides</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>E. coli</i> + <i>E. nana</i> + <i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>	3 (0.8)	0.2-2.3
<i>E. nana</i> + <i>G. lamblia</i> + <i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>E. coli</i> + <i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + Hookworm	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>E. coli</i> + <i>E. nana</i> + <i>G. lamblia</i> + <i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>	1 (0.3)	0.0-1.5
<i>E. coli</i> + <i>E. nana</i> + <i>Sarcocystis</i> spp. + <i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>	1/375 (0.3)	0.0-1.5

ที่มา Yanola et al. (2018)

2.5 ประปาภูเขา

ประปาภูเขา คือ ภูมิปัญญาพื้นเมืองของชาวเขาโดยใช้หลักการแรงโน้มถ่วงให้น้ำที่สูงไหลลงสู่ที่ต่ำ

ส่วนประกอบของระบบประปาภูเขามีดังนี้

1. แหล่งต้นน้ำ ใช้น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ
2. อ่างรวบรวมน้ำบนภูเขา เป็นแหล่งกักเก็บน้ำบนภูเขาและต่อท่อลำเลียงน้ำมาจากแหล่งต้นน้ำและมีกรองเศษวัสดุ เช่น ใบไม้ ดิน หวาย ฝุ่น หรือสิ่งอื่น ๆ ด้วยตะแกรงหรือตาข่ายที่จะไหลเข้าไปในท่อส่งน้ำเพื่อป้องกันท่ออุดตัน

3. ท่อส่งน้ำสายหลัก ใช้ท่อน้ำพีวีซีเป็นท่อลำเลียงน้ำสายหลักจากอ่างรวบรวมน้ำบนภูเขาไปยังถังเก็บพักน้ำที่อยู่ด้านล่าง

4. ถังเก็บพักน้ำที่อยู่ด้านล่าง ใช้สำหรับพักน้ำ สำรองน้ำ ลดแรงดันน้ำเพื่อเตรียมจ่ายน้ำไปยังบ้านเรือน

5. ท่อส่งน้ำสายรองที่ต่อน้ำจากแท่งพักน้ำที่อยู่ด้านล่าง เป็นท่อที่ต่อแยกออกจากถังพักน้ำเพื่อต่อเข้าไปกระจายในเขตพื้นที่ที่ใช้ประโยชน์ของแต่ละครัวเรือนอย่างทั่วถึง

6. ท่อส่งน้ำใช้ประโยชน์ในระดับครัวเรือนหรือแปลงเพาะปลูก เมื่อผู้ใช้น้ำต้องการใช้น้ำจากท่อสายรอง ผู้ใช้น้ำใช้วิธีการต่อท่อโดยสายยางหรือท่อพีวีซีเข้าสู่บ้านเรือนหรือแปลงเพาะปลูก

7. ถังเก็บน้ำส่วนตัว ผู้ใช้น้ำแต่ละรายจัดหาไว้รองรับน้ำไว้ใช้ประโยชน์ ส่วนใหญ่เป็นถังคอนกรีตตั้งบนพื้นดินและมีก๊อกน้ำ ปิด – เปิด น้ำด้านล่าง (ประสิทธิ์ ประครองศรี และมานะ เก่งชูวงศ์, 2559)

2.6 น้ำผิวดิน

น้ำผิวดิน หมายถึง น้ำฝนที่ตกลงสู่พื้นดิน โดยน้ำฝนจะถูกกักเก็บทำให้ในบริเวณนั้นมีพื้นที่เป็นแอ่ง เป็นหลุม หรือเป็นบ่อจากขนาดเล็กน้อยมีขนาดใหญ่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น แม่น้ำ ลำคลอง ทะเลสาบ และเกิดจากที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น อ่างเก็บน้ำ เขื่อน (พัฒนา มูลพฤกษ์, 2546)

2.7 คุณลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำ

2.7.1 การตรวจวัดพารามิเตอร์ทางด้านกายภาพของน้ำ

2.7.1.1 ออกซิเจนละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen)

หมายถึง ออกซิเจนที่มีอยู่ในน้ำ (พัฒนา มูลพฤกษ์, 2546)

2.7.1.2 ปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำ (Total Dissolved Solids)

หมายถึง ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด ประกอบด้วยเกลืออนินทรีย์ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม และโซเดียม ซึ่งเป็นเกลือไอออนบวกทั้งหมด และ คาร์บอเนต ไนเตรต ไบคาร์บอเนต คลอไรด์ และซัลเฟต ซึ่งเป็นเกลือไอออนลบทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีสารอินทรีย์จากธรรมชาติ จากมนุษย์ ได้แก่ น้ำเสียจากอุตสาหกรรม น้ำเสียจากชุมชน น้ำเสียจากการเกษตร (พัฒนา มูลพฤกษ์, 2546)

2.7.1.3 ความขุ่น (Turbidity)

หมายถึง สารแขวนลอย เช่น ตะกอนดินที่ละเอียด จุลินทรีย์ แพลงตอน อยู่ในน้ำแล้วดบังแสงทำให้ไม่สามารถมองรอดผ่านไปยังน้ำที่ระดับลึกได้ (พัฒนา มูลพฤกษ์, 2546)

2.7.1.4 ความเป็นกรดและด่าง (pH)

pH ย่อมาจาก positive potential of the hydrogen ions เป็นค่าที่แสดงระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนที่อยู่ในน้ำ มีค่าตั้งแต่ 0 – 14 ค่าตรงกลาง คือ 7 ค่าที่ต่ำกว่า 7 เป็นกรด ค่าที่สูงกว่า 7 เป็นด่าง (กลุ่มงานเคมี ส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์ และสำนักวิจัยและพัฒนา กรมชลประทาน, 2550)

2.7.1.5 ความเค็ม (Salinity)

หมายถึง เกลือที่ละลายอยู่ในน้ำ (กลุ่มงานเคมี ส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์ และสำนักวิจัยและพัฒนา กรมชลประทาน, 2550)

2.7.2 การตรวจวัดพารามิเตอร์ทางด้านเคมีของน้ำ

2.7.2.1 แอมโมเนีย

เป็นสารประกอบไนโตรเจน เกิดจากแบคทีเรียย่อยสลายของเสียสัตว์น้ำที่ถูกขับถ่ายออกมาแล้วกลายเป็นแอมโมเนีย (ส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์ และสำนักวิจัยและพัฒนา กรมชลประทาน, 2550)

2.7.2.2 ไนเตรต

ไนเตรตเกิดจากการออกซิเดชันของแอมโมเนียและได้ออกมาเป็นไนไตรท์ จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นไนเตรตโดยจุลินทรีย์ (พัฒนา มูลพฤกษ์, 2546)

2.7.2.3 ไนไตรท์

ไนไตรท์เกิดจากการออกซิเดชันของแอมโมเนีย และการรีดักชันของไนเตรตของจุลินทรีย์เป็นตัวบ่งชี้ความสกปรกของน้ำ (ส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์ และสำนักวิจัยและพัฒนา กรมชลประทาน, 2550)

2.8 การตรวจการปนเปื้อนของปรสิตกก่อโรคในแหล่งน้ำโดยวิธีการลอยตัว และการตกตะกอน

การลอยตัวในน้ำเชื่อม (Sugar Flotation) และการตกตะกอนโดยใช้หลักการชีสต์หรือโอโอชีสต์ที่มีความถ่วงจำเพาะแตกต่างกับความหนาแน่นของน้ำเชื่อมที่ใช้ซึ่งมีความถ่วงจำเพาะ 1.25 – 1.27 เพื่อแยกชีสต์หรือโอโอชีสต์ลอยขึ้นมาอยู่บนผิวน้ำเชื่อมกับตะกอนอื่นขณะตกลงสู่ข้างล่าง แล้ว

นำฝืนน้ำเชื่อมส่วนบนไปตรวจ (ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ม.ป.ป.)

2.9 การตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.9.1 Simple Smear/Direct Smear

เป็นเทคนิคพื้นฐานทางปรสิตวิทยาในการตรวจหาซิสต์ของโปรโตซัว โอโอซิสต์ของโปรโตซัว ไข่พยาธิ หรือตัวอ่อนของพยาธิโดยไม่ต้องย้อมสี ข้อดีของวิธีนี้คือรวดเร็ว ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และต้นทุนต่ำ แต่ข้อเสียคือ บ่งชี้ชนิดของซิสต์ โอโอซิสต์ หรือโทรโฟซอยต์ของโปรโตซัวได้ยาก (ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ม.ป.ป.)

2.9.2 Trichrome Staining

เป็นเทคนิคที่ใช้ย้อมหลายชนิดเพื่อช่วยให้เห็นโครงสร้างรายละเอียดของโปรโตซัวได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น มีขั้นตอนดังนี้ (1) การตรึงสภาพ (Fixation) การดิงจะช่วยให้โครงสร้างของปรสิตไม่เสียรูปร่าง โดยใช้ยาตรึงสภาพ Schaudinn's fixative (2) การย้อมสี (Staining) และการปรับสี (Destaining) การย้อมสีนี้ใช้หลักการสีที่มีความแตกต่างกันในการจับกับสารเคมีกับองค์ประกอบของเซลล์อย่างจำเพาะ และการปรับสีช่วยให้โปรโตซัวติดสีได้แบบพอดี (3) การขจัดน้ำ (Dehydration) ทำให้ใส (Clearing) การขจัดน้ำออกทำให้โปรโตซัวใสมองเห็นโครงสร้างชัดเจน (ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ม.ป.ป.)

2.9.3 Modified Acid-Fast Staining

เป็นการย้อมสีทนกรดเพื่อตรวจหาโอโอซิสต์ของ *Cryptosporidium* โอโอซิสต์จะติดสีแดงของคาร์บอลฟุคซิน (Carbol Fuchsin) ส่วนสีพื้นจะเป็นสีฟ้าของเมทิลีนบลู (Methylene Blue) (นิमित มรกต และคม สุคนธสรณ์, 2560) ซึ่งวิธีการย้อมสีทนกรดแบบ Modified Kinyoun Acid-Fast Stain แตกต่างจากวิธีย้อมแบบ Ziehl-Neelsen Modified Acid-Fast คือ ไม่ต้องใช้ความร้อนทำให้สะดวกและมีความปลอดภัยในขณะการย้อมสี

2.10 การตรวจยืนยันดีเอ็นเอเชื้อปรสิตด้วยเทคนิค PCR

2.10.1 การสกัดดีเอ็นเอ

1. การทำให้เซลล์แตก การทำให้ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกออก เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาด้วยวิธีการ เช่น การบด หรือการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์ เช่น Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

2. การกำจัดโปรตีนและสิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการ เป็นการทำให้โปรตีนเสียสภาพตามธรรมชาติ โดยการใช้เอนไซม์โปรตีเอสหรือการใช้สารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มเพื่อแยกโปรตีนและไขมันออกจากดีเอ็นเอ

3. การตกตะกอนดีเอ็นเอ การเติมเอทานอลเพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน ซึ่งดีเอ็นเอจะอยู่ในรูปแบบของเส้นใย (คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 2560)

2.10.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการได้ในระยะเวลาอันสั้นในหลอดทดลองซึ่งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนเหมือนเป็นเครื่องถ่ายเอกสารดีเอ็นเอ (อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และฉันทชัย สุระ, 2534; McPherson & MØller, 2000)

2.10.3 Nested PCR

Nested PCR เป็นเทคนิคเพิ่มความจำเพาะและความไวในการขยายดีเอ็นเอ ในขั้นตอนแรกใช้ไพรเมอร์ด้านนอกสำหรับทำ PCR ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเป้าหมายแต่มีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ภายในลำดับเบสของผลผลิตดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำผลผลิตของ PCR ขั้นตอนแรกไปทำ PCR ขั้นตอนที่สอง โดยใช้ไพรเมอร์ด้านในซึ่งออกแบบมาสำหรับเพิ่มขยายเฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมาย (อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และฉันทชัย สุระ, 2534; McPherson & MØller, 2000)

2.10.4 ส่วนประกอบของ PCR

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ

คือ ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษา

2. ไพรเมอร์

คือ ดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ สังเคราะห์ได้ง่าย รวดเร็ว และราคาถูกด้วยเครื่อง DNA Oligonucleotide Synthesizer โดยมีไพรเมอร์ด้าน Forward Primer และ Reverse Primer

3. Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs)

คือ นิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วย 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dGTP, dCTP สำหรับสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมา และ dNTPs ทั้ง 4 ชนิดต้องมีความเข้มข้นเท่ากัน ถ้าไม่ความเข้มข้นไม่เท่ากันจะส่งผลต่อความแม่นยำของ PCR

4. เอนไซม์ DNA Polymerase

เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ในการเชื่อมต่อไพรเมอร์ให้เข้ากับวคลีโอไทด์ซึ่งในปฏิกิริยา PCR ขั้นตอนนี้มีการใช้อุณหภูมิที่สูงทำให้ต้องใช้เอนไซม์ที่ทนต่อความร้อนได้สูงโดยไม่มีการเสียสภาพ แต่เอนไซม์จะต้องเก็บในที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา เนื่องจากเสื่อมคุณภาพง่าย

5. Magnesium ion (Mg^{2+})

เป็นส่วนประกอบสำคัญสำหรับปฏิกิริยา PCR ทำหน้าที่เป็น Co-Factor ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ DNA Polymerase ในการสร้างสายดีเอ็นเอ และช่วยในการจับกันของดีเอ็นเอต้นแบบและดีเอ็นเอที่สร้างใหม่ ความเข้มข้นของ Mg^{2+} เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการปฏิกิริยา PCR หากมีความเข้มข้นมากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะ หรือถ้าน้อยเกินไปจะทำให้ปริมาณผลผลิต PCR น้อย

6. Buffer

เป็นสารละลายที่ช่วยในการรักษาค่า pH

7. เครื่อง Thermo Cycler

เครื่องมือสำหรับการทำ PCR โดยมีโปรแกรมที่สามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้ตามที่ต้องการ (อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และฉันทชัย สุระ, 2534; McPherson & Møller, 2000)

2.10.5 ขั้นตอนการทำ PCR

1. Denaturation

เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงประมาณ 94 องศาเซลเซียส ในการทำลายพันธะไฮโดรเจน

2. Annealing

เป็นขั้นตอนการคืนสภาพ มีการลดอุณหภูมิลงให้อยู่ในช่วง 40 – 72 องศาเซลเซียส แต่โดยทั่วไปจะลดอุณหภูมิลงให้อยู่ที่ประมาณ 55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วยเบสที่เป็นคู่สมกันได้อย่างจำเพาะ

3. Extension

เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ที่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบจะทำงานได้ในอุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส โดยไพรเมอร์จะถูกสร้างในทิศทางจาก 5' → 3' เมื่อทำครบทั้ง 3 ขั้นตอน ถือเป็นการทำปฏิกิริยา PCR 1 รอบ ซึ่งโดยทั่วไปจะทำปฏิกิริยาประมาณ 25 – 40 รอบ ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้น 2^n (n = จำนวนรอบที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR) และปล่อยให้ปฏิกิริยา PCR มีอุณหภูมิเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส (อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และฉันทชัย สุระ, 2534; McPherson & Møller, 2000)

2.10.6 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR

Gel Electrophoresis

หลังจากที่ปฏิกิริยา PCR เสร็จสิ้นแล้วให้นำ Amplicon มาตรวจสอบเพื่อดูว่าเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการจะศึกษาหรือไม่ โดยการทำ Gel Electrophoresis ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 – 3 จากการใช้ Agarose gel ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไป (อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และฉันทชัย สุระ, 2534; McPherson & Møller, 2000)

2.10.7 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

Sanger Sequencing เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำในการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ใช้ Oligonucleotide Primers เพื่อจับเฉพาะบริเวณของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และใช้ Dideoxynucleotide Triphosphates (ddNTPs) ทำหน้าที่หยุดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ ซึ่ง ddNTPs มีการติดสารเรืองแสงที่สีแตกต่างกัน ได้แก่ ddATP สีเขียว, ddTTP สีแดง, ddCTP สีฟ้า หรือสีน้ำเงิน และ ddGTP สีเหลืองหรือสีดำ โดยมีเลเซอร์ของเครื่องคอยจับความเข้มแสงของแต่ละสี ข้อมูลจะถูกแปลงให้แสดงออกมาเป็นค่าพีคที่ปรากฏบนกราฟของเครื่องอ่านลำดับดีเอ็นเอซึ่งแสดงถึงตำแหน่งของเบสแต่ละตัว (Robin & Farmer, 2018)

2.11 โปรแกรม Quantum GIS (QGIS)

Quantum GIS หรือ QGIS คือ โปรแกรมประเภทจัดการข้อมูล GIS (Geographic Information System) โปรแกรมหนึ่ง ซึ่งใช้เป็นแบบกราฟิก (Graphic User Interface: GUI) ที่เข้าใจและใช้งานง่ายสำหรับใช้ในการนำเสนอข้อมูลในรูปแบบตาราง กราฟ และแผนที่ที่สามารถเรียกใช้ข้อมูลในรูปแบบ Shapefile ซึ่งเป็นรูปแบบมาตรฐานที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย (สถานภูมิภาคเทคโนโลยีอวกาศและภูมิสารสนเทศ ภาคเหนือตอนล่าง มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2560)

2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจเชื้อปรสิตก่อโรคในแหล่งน้ำ

การปนเปื้อนของปรสิตก่อโรคในแหล่งน้ำ ถือเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก ซึ่งในแต่ละประเทศก็มีรายงานการตรวจเชื้อปรสิตปนเปื้อนในแหล่งน้ำ เช่น ในประเทศโปแลนด์ มีการตรวจชีสต์ของ *Giardia* และ *Cryptosporidium* ในน้ำทั้งจำนวน 13 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการย้อมเชื้อด้วยฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งได้ตรวจพบเชื้อมีจำนวนที่ค่อนข้างมากหากเทียบกับในแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยพบเชื้อ *Giardia* จำนวน 0.7 – 660 ชีสต์ต่อลิตร และ *Cryptosporidium* จำนวน 0.4 – 154.1 โอโอชีสต์ต่อลิตร (Sroka et al., 2013) ส่วนในภูมิภาคตะวันออกเฉียงใต้ก็พบว่าการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำเช่นกันโดย Kumar และคณะ ได้ทำการตรวจการปนเปื้อนของ *Giardia* และ *Cryptosporidium* ในบริเวณประเทศแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ มาเลเซีย ไทย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม ด้วยวิธีการย้อมเชื้อด้วยฟลูออเรสเซนซ์ ทั้งแหล่งน้ำที่ทำการบำบัดและไม่ได้บำบัด จำนวน 221 ตัวอย่าง ซึ่งในประเทศไทยมีการเก็บตัวอย่างน้ำที่ไม่ได้ทำการบำบัดทั้งสิ้น 93 ตัวอย่าง พบว่าในตัวอย่างน้ำทั้งหมดพบการปนเปื้อนจาก *Cryptosporidium* 25 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 26.9) ซึ่งมีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 0.22 โอโอชีสต์ต่อลิตร และพบการปนเปื้อน *Giardia* 20 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 21.5) ซึ่งมีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 0.12 ชีสต์ต่อลิตร (Kumar et al., 2016) อีกทั้งคณะวิจัยยังได้ทำการศึกษาปรสิตในแหล่งน้ำใช้ในเขตภาคใต้ของประเทศไทยและประเทศมาเลเซีย เช่น *Giardia* และ *Cryptosporidium* ด้วยวิธีการย้อมเชื้อด้วยฟลูออเรสเซนซ์ และการตรวจเชื้อปรสิตอื่น ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบโบรท์ฟิลด์ ซึ่งพบว่าเชื้อปรสิตที่พบได้แก่ *Giardia* (0.04 – 4 ชีสต์ต่อลิตร), *Cryptosporidium* (0.06 – 2.33 โอโอชีสต์ต่อลิตร), Hookworm (6.67 – 350 ไข่ต่อลิตร), *Ascaris* (0.33 – 33.33 ไข่ต่อลิตร), and *Schistosoma* (9.25 – 13.33 ไข่ต่อลิตร) (Kumar et al., 2014) ยิ่งไปกว่านั้นยังมีการตรวจการปนเปื้อนของ *Giardia* และ *Cryptosporidium* ในบริเวณเขื่อนแม่กวง จังหวัดเชียงใหม่ และแม่น้ำใกล้เคียงทั้งในฤดูแล้ง และฤดูฝน ด้วยวิธีการย้อมเชื้อด้วยฟลูออเรสเซนซ์ จำนวน 120 ตัวอย่าง จากจุดเก็บ 60 จุด รวมถึงการตรวจเชื้อปรสิตจากอุจจาระของวัวที่เลี้ยงบริเวณดังกล่าว พบว่าในฤดูแล้งตัวอย่างน้ำร้อยละ 13 ตรวจพบเชื้อ *Cryptosporidium* (0.25 – 6.50 โอโอชีสต์ต่อ 10 ลิตร) ในขณะเดียวกันร้อยละ 18 ของตัวอย่างน้ำ ตรวจพบเชื้อ *Giardia* (0.25 – 2.94 ชีสต์ ต่อ 10 ลิตร) ส่วนฤดูฝนพบว่า ร้อยละ 15 ของตัวอย่างน้ำพบเชื้อ *Cryptosporidium* (0.37 – 4.00 โอโอชีสต์ต่อ 10 ลิตร) และร้อยละ 38 ของตัวอย่างน้ำ ตรวจพบเชื้อ *Giardia* (0.28 – 13.89 ชีสต์ต่อ 10 ลิตร) เมื่อตรวจอุจจาระของวัวที่เลี้ยงบริเวณดังกล่าวพบว่า ร้อยละ 97 ของตัวอย่างอุจจาระ มีการติดเชื้อปรสิต ซึ่งคาดการณ์ว่าการติดเชื้อในแหล่งน้ำอาจจะเกิดจากการจัดการของเสียจากการปศุสัตว์ที่ไม่ดีพอ (Chuah et al., 2016) จะเห็นได้ว่า จากงานวิจัย

ทั้งหมดสามารถตรวจวัดการปนเปื้อนปรสิตก่โรคในแหล่งน้ำด้วยวิธีที่เหมือนกันคือการใช้เทคนิค Direct Immunofluorescence Assay (DFA) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและมีประสิทธิภาพที่ค่อนข้างสูง



บทที่ 3

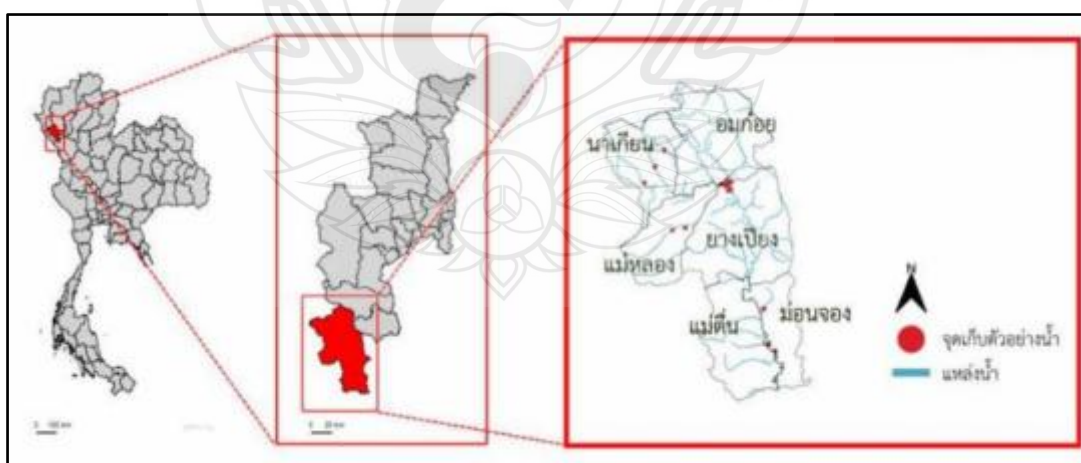
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พื้นที่ดำเนินการวิจัย

แม่น้ำ ลำธาร อ่างเก็บน้ำ บ่อน้ำ และแหล่งน้ำใช้ของชาวบ้านในเขตอำเภอมวกก่อ จังหวัด
เชียงใหม่

3.2 การสำรวจแหล่งน้ำในเขตอำเภอมวกก่อ

สำรวจแหล่งน้ำบริเวณที่ถูกใช้เป็นแหล่งทำประปาภูเขาเพื่อใช้ในครัวเรือนและแหล่งน้ำ
บริเวณที่ใกล้กับการปศุสัตว์หรือเขตชุมชนโดยประสานงานขอข้อมูลกับกรมทรัพยากรน้ำในพื้นที่และ
ชาวบ้านในหมู่บ้านเพื่อกำหนดจุดการเก็บตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำ ลำธาร อ่างเก็บน้ำ บ่อน้ำ และแหล่ง
น้ำใช้ของชาวบ้าน อ.มวกก่อ ในแต่ละตำบล ทั้งหมด 6 ตำบล ได้แก่ อมก้อย ยางเปียง นาเกียน แม่
หลอง แม่ต๋ืน และม่อนจอง ซึ่งจำนวนจุดเก็บตัวอย่างในแต่ละตำบลคำนวณโดยเทียบอัตราส่วนจาก
จำนวนครัวเรือนของประชากรในแต่ละตำบล รวมทั้งสิ้น 60 จุด ครอบคลุมตำแหน่งแหล่งน้ำทั้งหมด
ในเขตอำเภอมวกก่อ



ภาพที่ 3.1 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำอำเภอมวกก่อ จังหวัดเชียงใหม่

ตารางที่ 3.1 การสำรวจแหล่งน้ำเพื่อกำหนดจุดเก็บตัวอย่างน้ำในอำเภออมก๋อย

ตำบล	ตำแหน่งที่เก็บ ตัวอย่างน้ำ	จำนวน (จุด)	จุดพิกัด	แหล่งน้ำ
อมก๋อย	1 – 9	9	ตำแหน่งที่ 1 17.79648° N, 98.34962° E	แม่น้ำต้น
			ตำแหน่งที่ 2 17.79843° N, 98.35752° E	ธารน้ำบริเวณ ใกล้บ้านเรือน
			ตำแหน่งที่ 3 17.79875° N, 98.36089° E	บ่อน้ำ
			ตำแหน่งที่ 4 17.80154° N, 98.36160° E	อ่างเก็บน้ำ
			ตำแหน่งที่ 5 17.80177° N, 98.37408° E	อ่างเก็บน้ำ
			ตำแหน่งที่ 6 17.79912° N, 98.36326° E	แม่น้ำตอม
			ตำแหน่งที่ 7 17.79858° N, 98.36238° E	แม่น้ำตอม
			ตำแหน่งที่ 8 17.79553° N, 98.35770° E	แม่น้ำต้น
			ตำแหน่งที่ 9 17.80810° N, 98.36548° E	แม่น้ำตอม

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ตำบล	ตำแหน่งที่เก็บ ตัวอย่างน้ำ	จำนวน (จุด)	จุดพิกัด	แหล่งน้ำ
ยางเปียง	10 – 14	5	ตำแหน่งที่ 10 17.79337° N, 98.35920° E	ลำธารสายเล็ก
			ตำแหน่งที่ 11 17.78680° N, 98.37014° E	แม่น้ำตื้น
			ตำแหน่งที่ 12 17.78072° N, 98.36694° E	คลองสักกะหลัก
			ตำแหน่งที่ 13 17.78563° N, 98.37233° E	แม่น้ำตื้น
นาเกียน	15 – 19	5	ตำแหน่งที่ 14 17.78250° N, 98.37290° E	สระน้ำบ้านหลวง
			ตำแหน่งที่ 15 17.88524° N, 98.20390° E	แม่น้ำอุทุม
			ตำแหน่งที่ 16 17.88557° N, 98.20407° E	แม่น้ำอุทุม
			ตำแหน่งที่ 17 17.84213° N, 98.18005° E	แม่น้ำลอบ
			ตำแหน่งที่ 18 17.84255° N, 98.17995° E	แม่น้ำลอบ

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ตำบล	ตำแหน่งที่เก็บ ตัวอย่างน้ำ	จำนวน (จุด)	จุดพิกัด	แหล่งน้ำ
นาเกียน	15 – 19	5	ตำแหน่งที่ 19 17.81962° N, 98.14667° E	ธารน้ำบริเวณ หมู่บ้าน
แม่ฮ่อง (สบโขง)	20 – 23	4	ตำแหน่งที่ 20 17.68138° N, 98.22518° E	แม่น้ำหลง
			ตำแหน่งที่ 21 17.68037° N, 98.22488° E	แม่น้ำหลง
			ตำแหน่งที่ 22 17.68694° N, 98.25359° E	แม่น้ำหลงน้อย
			ตำแหน่งที่ 23 17.68900° N, 98.24439° E	แม่น้ำหลง
แม่ตื่น	24 – 28	5	ตำแหน่งที่ 24 17.37010° N, 98.48718° E	แม่น้ำตื่น
			ตำแหน่งที่ 25 17.36994° N, 98.48747° E	แม่น้ำตื่น
			ตำแหน่งที่ 26 17.37046° N, 98.48763° E	แม่น้ำตื่น
			ตำแหน่งที่ 27 17.38750° N, 98.46819° E	แม่น้ำตื่น

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ตำบล	ตำแหน่งที่เก็บ ตัวอย่างน้ำ	จำนวน (จุด)	จุดพิกัด	แหล่งน้ำ
แม่ตื่น	24 – 28	5	ตำแหน่งที่ 28 17.38790° N, 98.46806° E	แม่น้ำตื่น
ม่อนจอง	29 – 30	2	ตำแหน่งที่ 29 17.47860° N, 98.45853° E	แม่น้ำตื่น
			ตำแหน่งที่ 30 17.47412° N, 98.45596° E	แม่น้ำตื่น

3.3 การเก็บตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำที่เก็บเป็นการเก็บแบบจ้วงหรือ Grab Sampling โดยเก็บจากน้ำผิวดิน และเก็บลึกจากผิวน้ำประมาณ 20 – 30 เซนติเมตร ปริมาตรจุดละ 20 ลิตร ทั้งฤดูแล้งและฤดูฝน โดยฤดูแล้งคือช่วงที่มีอากาศแห้งและมีปริมาณน้ำฝนน้อย และฤดูฝน คือ ช่วงที่มีปริมาณน้ำฝนมาก (Chuah et al., 2016) ช่วงฤดูแล้งเก็บตัวอย่างน้ำในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2566 และช่วงฤดูฝนเก็บตัวอย่างน้ำในเดือนกันยายน พ.ศ. 2566 พร้อมวัดอัตราการไหลของกระแสน้ำและค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ทั้งด้านกายภาพและด้านเคมี โดยการเลือกจากตำแหน่งบริเวณที่ถูกนำไปใช้ผลิตน้ำประปาภูเขาหรือเป็นบริเวณแหล่งที่ชาวบ้านนิยมนำไปใช้อุปโภคบริโภค และเวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำรวมทั้งระยะเวลาในการเดินทางเริ่มตั้งแต่ 08:00 – 18:00 นาฬิกา โดยจุดเก็บตัวอย่างน้ำแต่ละจุดไม่สามารถระบุเวลาที่ชัดเจนได้ เนื่องจากการเดินทางที่ค่อนข้างลำบากจึงมีปัญหาเรื่องระยะเวลาในการเดินทางไปยังจุดเก็บตัวอย่างน้ำแต่ละจุด โดยตัวอย่างน้ำถูกบรรจุอยู่ในแกลลอนพลาสติกขนาด 20 ลิตร และดำเนินการในขั้นตอนการกรองน้ำด้วยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีรูขนาดเล็กภายในเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 การตรวจวัดพารามิเตอร์ทางด้านกายภาพและด้านเคมีของน้ำ

ตรวจวัดพารามิเตอร์ทางด้านกายภาพของน้ำ จำนวน 6 พารามิเตอร์ ได้แก่ (1) ออกซิเจนละลายในน้ำวัดด้วยเครื่องมือเครื่องวัดแบบพกพาพร้อมด้วยเซนเซอร์ตรวจจับออกซิเจนละลายน้ำด้วยแสง Hach HQ40D (HQ40D, HACH, สหราชอาณาจักร) (2) ปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำวัดด้วยเครื่องวัดมวลสารรวมละลายในน้ำ TDS Testr11 (Eutech™ TDS Testr11 Dual Range, Thermo Scientific™, สหรัฐอเมริกา) (3) ความขุ่นวัดด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบพกพา Turb® 430 IR - WTW (Portable turbidity meter Turb® 430 IR – WTW, Instrument Asia, สหรัฐอเมริกา) (4) ความเค็มวัดด้วยเครื่องวัดความเค็มแบบพกพา รุ่น SaltTestr11 ยี่ห้อ Thermo Scientific (Eutech™ SALTTEST11 Salinity Meter, Thermo Scientific™, สหรัฐอเมริกา) (5) กรดต่างวัดด้วยเครื่องวัดพีเอชแบบพกพา รุ่น ProfiLine pH 3310 (WTW – pH meter ProfiLine pH 3310, Instrument Asia, สหรัฐอเมริกา) (6) อัตราการไหลของกระแสน้ำ โดยใช้วิธีการติดตั้งท่อที่ปลายสายวัดออกจากตลับเมตรให้ตั้งและตรงยาว 1 เมตร วางขนานกับผิวน้ำ จากนั้นใช้ตะขอเกี่ยวกับลูกตุ้มและผูกเส้นเอ็นตักปลา แล้วปล่อยลูกตุ้มให้ลอยตามกระแสน้ำโดยเริ่มจากสายปลายตลับเมตรไปจบที่ตะขอตลับเมตรพร้อมกับจับเวลาเป็นวินาทีแล้วจดบันทึกเวลาที่ได้ โดยทั้ง 6 พารามิเตอร์นี้วัดในสถานที่จุดเก็บตัวอย่างน้ำทุกจุด

ตรวจวัดพารามิเตอร์ทางด้านเคมีของน้ำ จำนวน 4 พารามิเตอร์ ได้แก่ (1) แอมโมเนียใช้ชุดทดสอบทางเคมีตรวจหาแอมโมเนีย (Ammonium tests 0.2 – 10.0mg/l #9750, B Smart Science, ไทย) (2) คลอรีนใช้ชุดทดสอบทางเคมีตรวจหาคลอรีน (Free Chlorine 0.1 – 8mg/l #9725, B Smart Science, ไทย) (3) ไนเตรตใช้ชุดทดสอบทางเคมีตรวจหาไนเตรต (HI3874 CTK Nitrate, Hanna Instruments, สหรัฐอเมริกา) (4) ไนไตรท์ใช้ชุดทดสอบทางเคมีตรวจหาไนไตรท์ (Nitrite test 0.02 – 1.00mg/l #9730, B Smart Science, ไทย) โดยตรวจวัดพารามิเตอร์ทั้ง 4 นี้หลังจากที่ไปเก็บตัวอย่างน้ำกลับมาไว้ยังพื้นที่สำรวจ

3.5 การตรวจหาการปนเปื้อนของปรสิตในแหล่งน้ำ

3.5.1 การกรองตัวอย่างน้ำ

นำตัวอย่างน้ำปริมาตร 20 ลิตร กรองด้วยวิธี Membrane Filtration (EMD Millipore Corp., Billerica, MA) ซึ่งโอโอซิส ซีเอส และหรือไซ์พายาจีจะติดอยู่บนแผ่นเมมเบรน Cellulose Acetate (CA) (ขนาดรูพรุน 1.2 ไมโครเมตร, เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร, บริษัท EMD

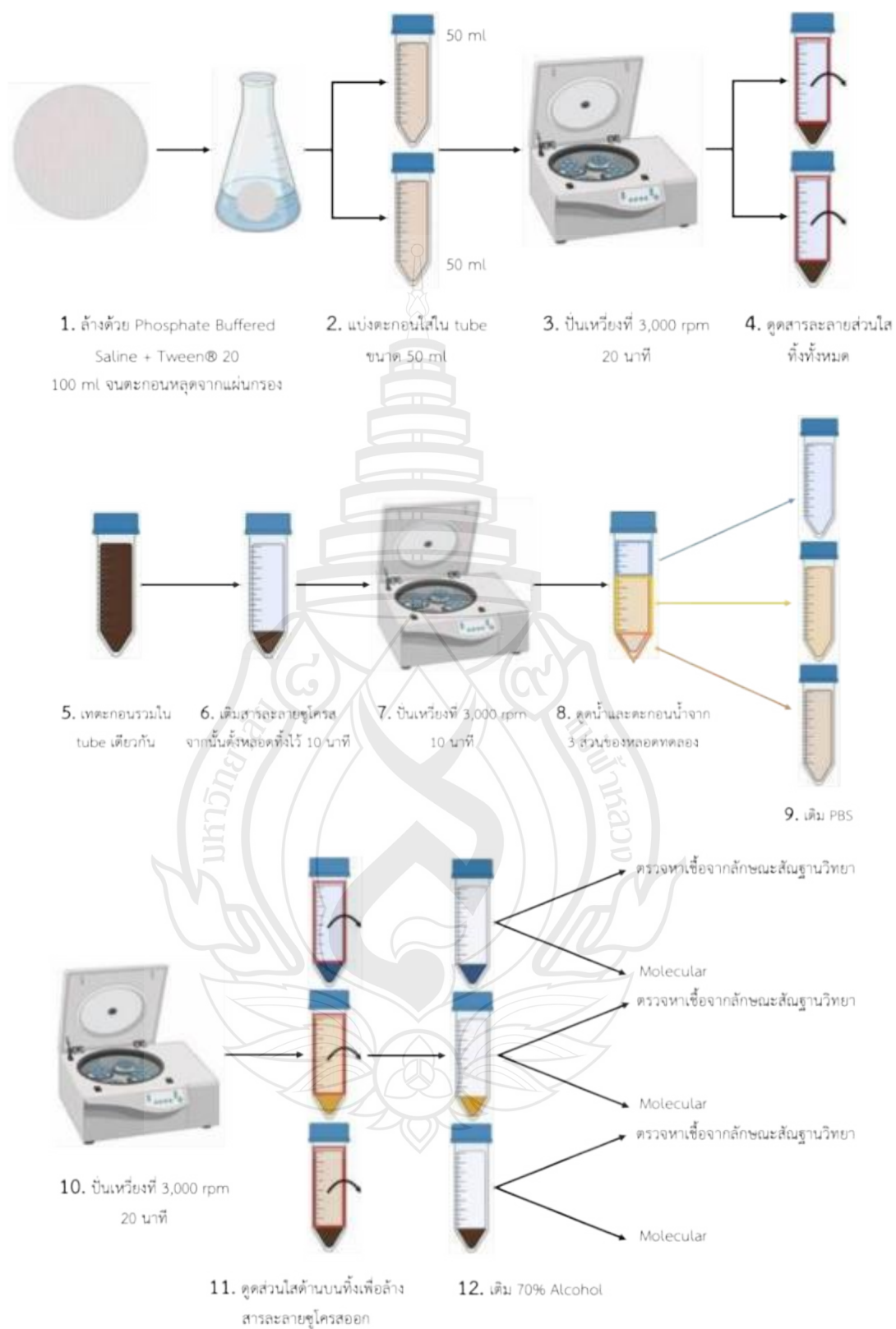
Millipore Corp.) ทำการกรองน้ำจนครบ 20 ลิตร แล้วนำแผ่นกรองแช่ในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างตะกอนน้ำของจุลชีพตัวอย่างนั้น ๆ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฝาแล้วพันด้วยพาราฟิล์ม เอ็ม (Amcor plc, สวิตเซอร์แลนด์) นำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสในพื้นที่สำรวจ จากนั้นนำส่งไปที่ห้องปฏิบัติการ ดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำเพื่อการกรองตัวอย่างน้ำ

3.5.2 การทำให้เข้มข้น

ล้างตะกอนบนแผ่นเมมเบรน Cellulose Acetate (CA) ด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS) (10 mM) กับ Tween® 20 ร้อยละ 0.01 (PBST) จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ทำการแยกน้ำยา PBS และ Tween® 20 โดยแบ่งตะกอนใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 1,000 g (3,000 rpm) เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงดูดสารละลายส่วนใสทิ้งทั้งหมดโดยใช้พาสเจอร์ปิเปต ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายซูโครสที่มีค่าความถ่วงจำเพาะ (ถ.พ.) เท่ากับ 1.3 ในหลอดทดลองที่มีตะกอนอยู่ และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 35 มิลลิลิตร ตั้งหลอดทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ น้ำยาและตะกอนเข้ากันดี แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 1,000 g (3,000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการดูดน้ำและตะกอนน้ำจาก 3 ส่วนของหลอดทดลอง เพื่อเก็บเชื้อปรสิตที่ต้องการศึกษาออกจากตะกอนน้ำ จากนั้นเติม PBS เพื่อปรับปริมาตรให้เท่ากับ 35 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 1,000 g (3,000 rpm) เป็นเวลา 20 นาที (Koompaong et al., 2012) จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนทิ้งเพื่อล้างน้ำตาลออก และเติมแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรลงในตะกอน เพื่อเตรียมนำไปตรวจหาเชื้อปรสิตในขั้นตอนต่อไป ดังภาพที่ 3.3



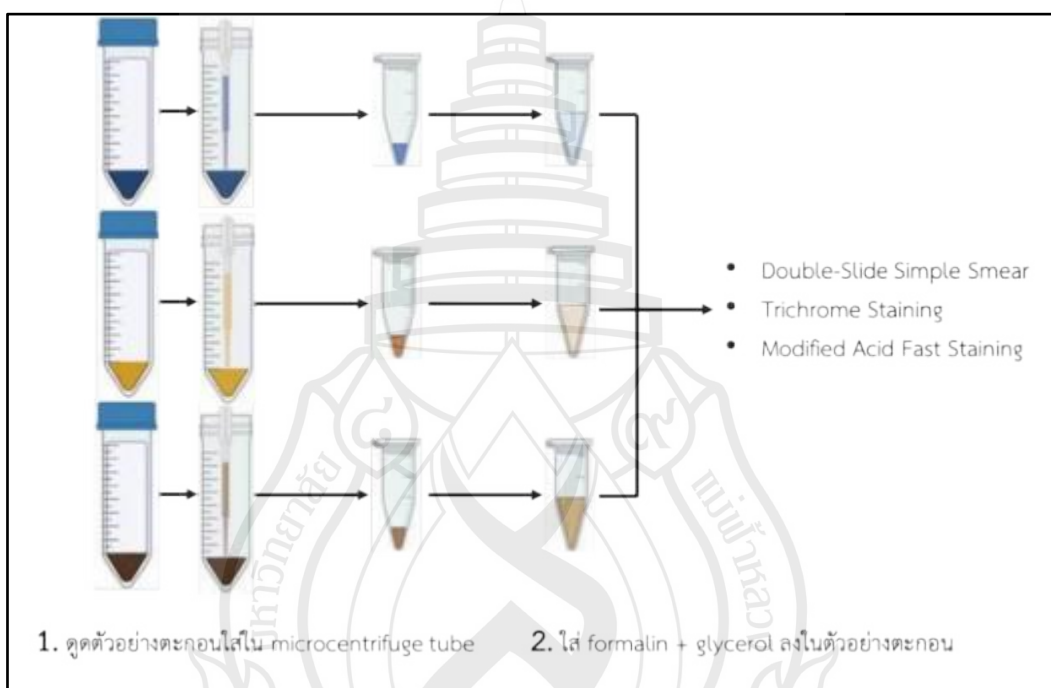
ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำเพื่อการทำให้เข้มข้น

3.5.3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง Formalin Ether Concentration และการตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.3.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง Formalin Ether Concentration

1. นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.5.2 การทำให้เข้มข้น ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวกซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. ใส่ฟอร์มาลีนร้อยละ 10 ที่ผสมกับกลีเซอรอลร้อยละ 10 ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน ดังภาพที่ 3.4 มาทำการตรวจหาเชื้อปรสิตด้วย 3 วิธี ดังนี้



ภาพที่ 3.4 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง Formalin Ether Concentration

3.5.3.2 วิธี Double-Slide Simple Smear เพื่อตรวจหาชีสต์หรือโทรโฟซอยต์ของโปรโตซัว มีขั้นตอนดังนี้

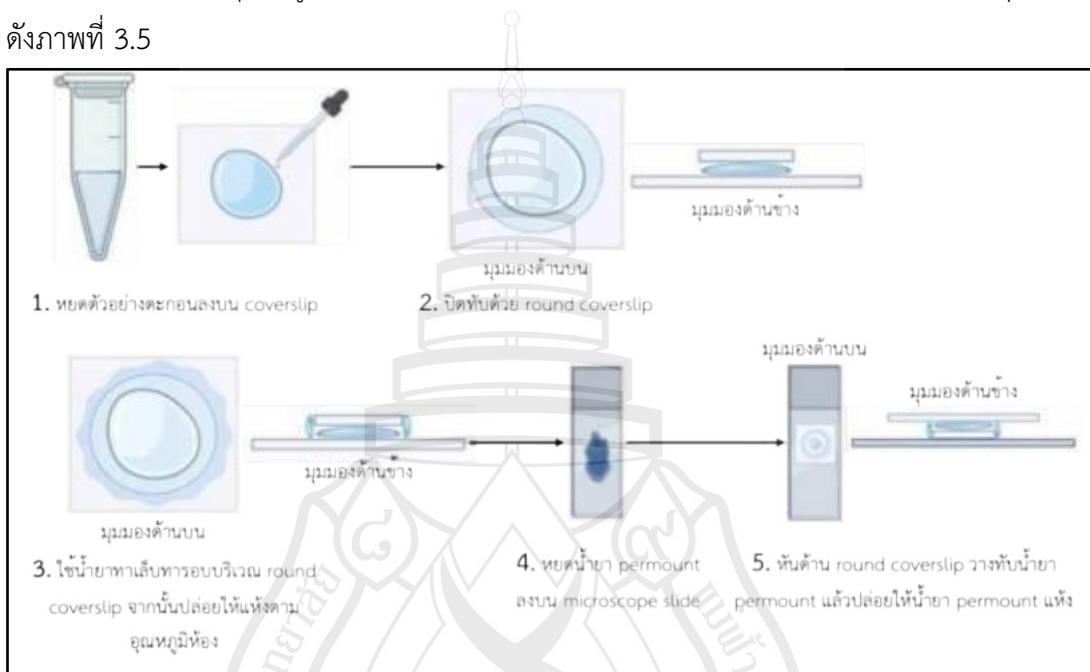
1. หยดตัวอย่างตะกอนจำนวน 1 หยดลงบนกระจกปิดสไลด์ขนาด 22 x 22 มิลลิเมตร

2. ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์แบบกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร

3. ใช้น้ำยาทาเล็บทารอบบริเวณกระจกปิดสไลด์แบบกลมเพื่อทำให้กระจกปิดสไลด์ทั้งสองแผ่นยึดติดกันเป็นการกักเก็บตัวอย่างตะกอนแบบชั่วคราวไม่ให้ตัวอย่างตะกอนระเหยออกไป แล้วปล่อยให้แห้งตามอุณหภูมิห้อง

4. หยดน้ำยาเปอร์มาต์จำนวน 1 หยดลงบนกระจกสไลด์ขนาด 25.4 x 72.6 มิลลิเมตร

5. นำกระจกสไลด์ที่ทำด้วยน้ำยาทาเล็บจากขั้นตอนที่ 3. นำมาวางลงบนหยดน้ำยาเปอร์มาต์โดยหันด้านที่เป็นกระจกปิดสไลด์แบบกลมวางทับบนน้ำยาเปอร์มาต์แล้วปล่อยให้ น้ำยาเปอร์มาต์แห้งตามอุณหภูมิห้อง แล้วนำกระจกสไลด์ไปตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังภาพที่ 3.5



ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Double-Slide Simple Smear

3.5.3.3 วิธีการย้อมสี Trichrome เพื่อตรวจหาซิสต์หรือโทรโฟซอइटของโปรโตซัว มีขั้นตอนดังนี้

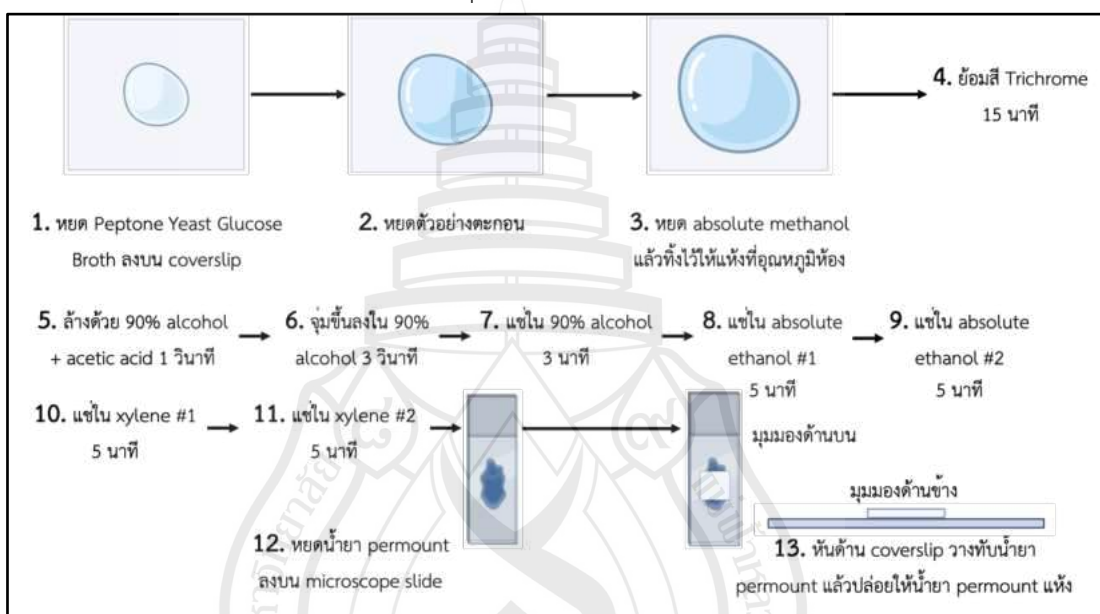
1. ขั้นตอน Pre-Fixation หยดตัวอย่างตะกอนจำนวน 1 หยด ผสมกับ Peptone Yeast Glucose (PYG) Broth จำนวน 1 หยดบนกระจกสไลด์เพื่อให้ตัวอย่างยึดติดกับกระจกปิดสไลด์

2. ขั้นตอน Post-Fixation หยดเมทานอลร้อยละ 100 จำนวน 1 หยดลงบนกระจกปิดสไลด์ขนาด 22 x 22 มิลลิเมตรแล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3. นำตะกอนที่แห้งแล้วไปย้อมสี Trichrome เป็นเวลา 15 นาที

4. ล้างด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 90 ที่ผสมกับกรดอะซิติก ร้อยละ 0.06 เป็นเวลา 1 วินาที จากนั้นนำไปจุ่มขึ้นลงในแอลกอฮอล์ร้อยละ 90 เป็นเวลา 3 วินาที

5. แช่ในแอลกอฮอล์ร้อยละ 90 เป็นเวลา 3 นาที
6. แช่ในแอลกอฮอล์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง
7. แช่ไซลีนเป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง
8. หยดน้ำยา Permount Mounting Medium จำนวน 1 หยดลงบนกระจกสไลด์ขนาด 25.4 x 72.6 มิลลิเมตร แล้วนำกระจกสไลด์ที่ถูกย้อมสีไปปิดทับบนกระจกสไลด์ด้วยน้ำยา Permount Mounting Medium จากนั้นปล่อยให้ น้ำยาแห้งตามอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำสไลด์ตัวอย่างไปตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังภาพที่ 3.6



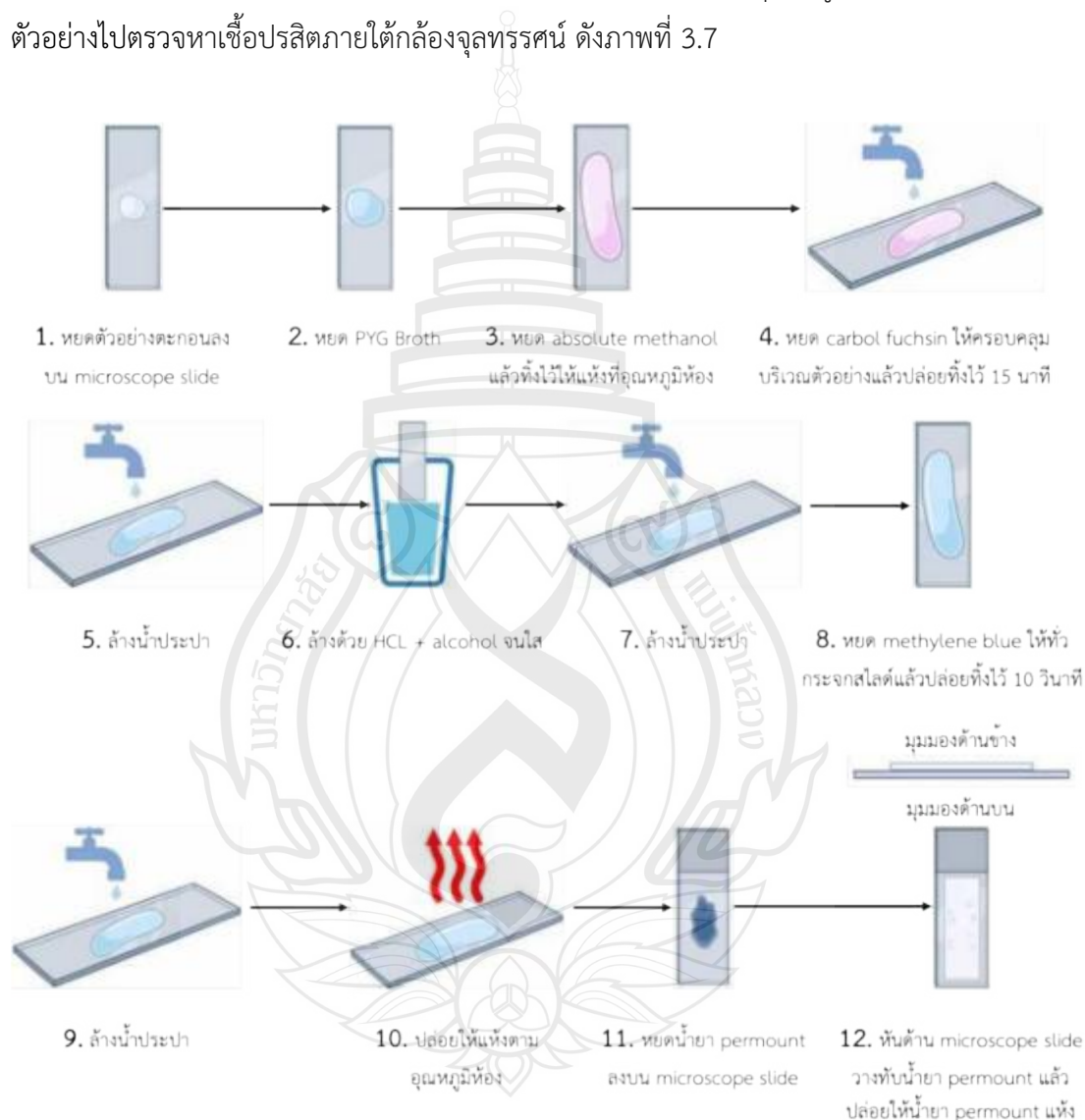
ภาพที่ 3.6 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Trichrome Staining

3.5.3.4 วิธีการย้อมสี Modified Acid Fast เพื่อตรวจหาโอโอซิสต์ของโปรโตซัว *Cryptosporidium spp.* มีขั้นตอนดังนี้

1. ขั้นตอน Pre-Fixation หยดตัวอย่างตะกอนจำนวน 1 หยด ผสมกับ Peptone Yeast Glucose (PYG) Broth จำนวน 1 หยดเพื่อให้ตัวอย่างยึดติดกับกระจกสไลด์
2. ขั้นตอน Post-Fixation หยดเมทานอลร้อยละ 100 จำนวน 1 หยดลงบนกระจกปิดสไลด์ขนาด 22 x 50 มิลลิเมตรแล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
3. หยดสีคาร์บอิลฟุคซินให้ครอบคลุมบริเวณตัวอย่างแล้วปล่อยให้แห้งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปล้างน้ำประปาแล้วล้างด้วยกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 1 ที่ผสมกับแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 จนใสแล้วล้างด้วยน้ำประปาอีกครั้ง

4. หยดเมทิลีนบลูให้ทั่วกระจกสไลด์แล้วปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำประปาแล้วปล่อยให้กระจกสไลด์แห้งตามอุณหภูมิห้อง

5. หยดน้ำยา Permout Mounting Medium จำนวน 1 หยดลงบนกระจกสไลด์ขนาด 25.4 x 72.6 มิลลิเมตร แล้วนำกระจกสไลด์ที่ถูกย้อมสีไปปิดทับบนกระจกสไลด์ด้วยน้ำยา Permout Mounting Medium จากนั้นปล่อยให้น้ำยาแห้งตามอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำสไลด์ตัวอย่างไปตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.7 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Modified Acid Fast Staining

3.5.4.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างชีสต์และการสกัดดีเอ็นเอ

1. การเตรียมตัวอย่างชีสต์ให้พร้อมก่อนการสกัดดีเอ็นเอนั้นทำให้เปลือกชีสต์แตก โดยทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที
2. ดูดแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 ออกให้ได้มากที่สุดโดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติ
3. ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่มีความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
4. ดูดน้ำกลั่นออกให้เหลือปริมาตรรวมอยู่ที่ 200 ไมโครลิตร เพื่อให้ตัวอย่างตะกอนเท่ากันทุกหลอด
5. เติมผงทรายแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 – 0.52 มิลลิเมตร (Babaei et al., 2011) ปริมาณ 0.200 กรัม หรือในอัตราส่วน 1:1 ลงไปในหลอดตัวอย่าง จากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร
6. นำตะกอนตัวอย่างไปผ่านกระบวนการแช่แข็ง – ละลาย โดยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 5 นาที
7. นำตะกอนตัวอย่างไปละลายทันทีที่อุณหภูมิ 95 – 100 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องอุ่นหลอดทดลองและละลายทิ้งไว้เป็นเวลา 7 นาที
8. ระหว่างนี้ให้เขย่าตัวอย่างตะกอนโดยใช้เครื่องเขย่าสารเป็นระยะ ๆ ทำซ้ำกระบวนการแช่แข็ง – ละลายตัวอย่างตะกอนทั้งหมด 7 รอบ เพื่อให้เปลือกของโอโอชีสต์และชีสต์แตก
9. การสกัดดีเอ็นเอใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit ตามขั้นตอนของชุดสกัด โดยเติม InhibitEX Buffer จำนวน 400 ไมโครลิตร
10. ตีผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องมือ บีตบีตเตอร์ 16 (Mini-Beadbeater-16, BioSpec Products, Inc., สหรัฐอเมริกา) เป็นเวลา 10 นาที
11. นำตะกอนตัวอย่างไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
12. นำตัวอย่างตะกอนไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
13. ดูดส่วนที่เป็นของเหลวเหนือตะกอน จำนวน 200 ไมโครลิตร ระวังก่อนให้ตะกอนฟุ้ง มาใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุ Proteinase K อยู่แล้ว 15 ไมโครลิตร
15. เติม Buffer AL จำนวน 200 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร
16. นำตัวอย่างไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
17. เติมแอลกอฮอล์ร้อยละ 100 ลงไป จำนวน 200 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร

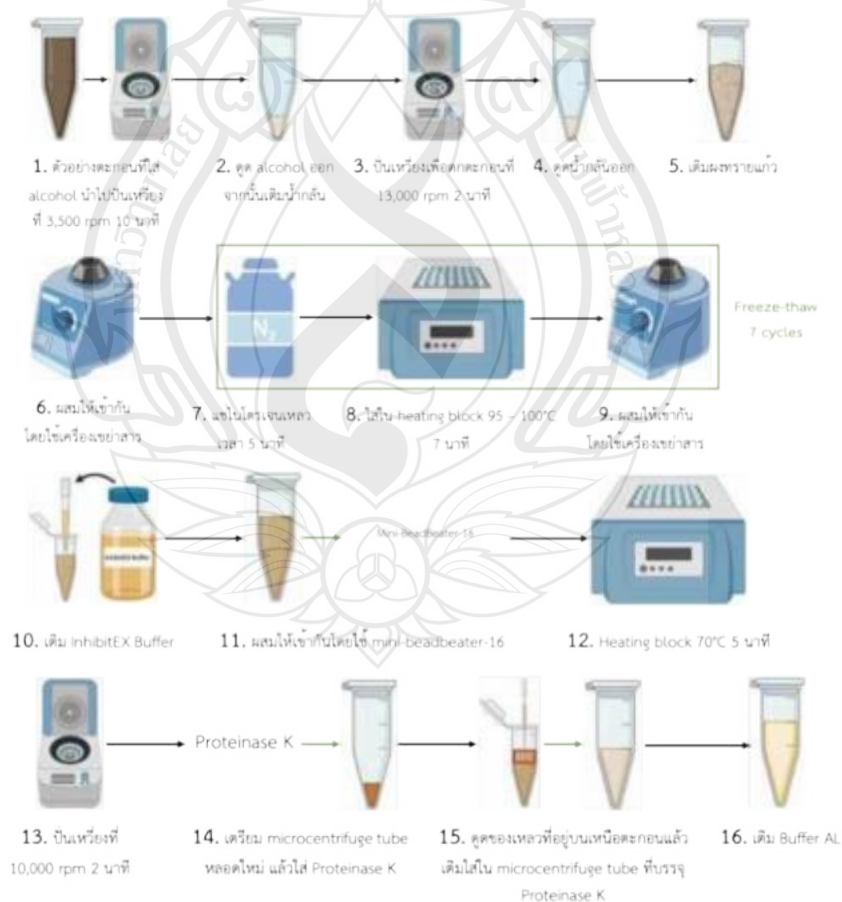
18. ดูดสารละลายทั้งหมด มาใส่ในชุด QIAamp spin column พร้อมกับใส่ collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

19. เท buffer ที่ผสมแอลกอฮอล์ทิ้ง แล้วปั่นล้างครั้งที่ 1 ด้วย Buffer AW1 จำนวน 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

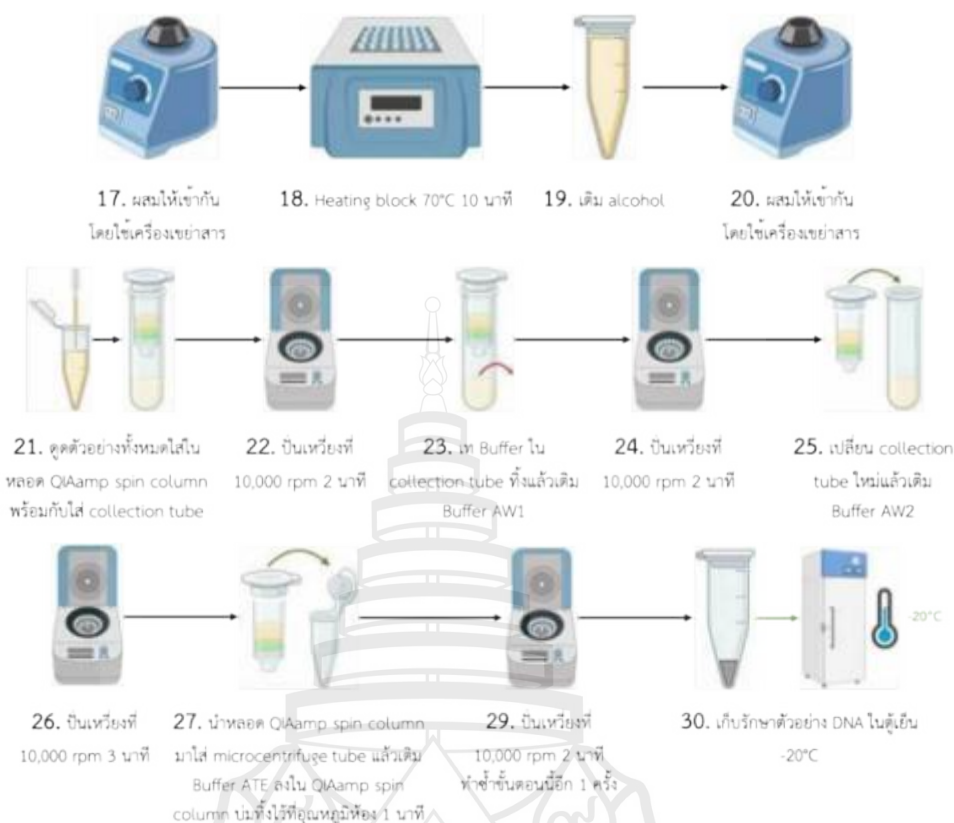
20. เปลี่ยน collection tube ใหม่แล้วปั่นล้างครั้งที่ 2 ด้วย Buffer AW2 จำนวน 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที

21. ปั่นแห้งเพื่อกำจัด Buffer AW2 ที่อาจจะหลงเหลืออยู่ใน QIAamp spin column หลังจากนั้นย้ายหลอด QIAamp spin column มาเสียบบนหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สำหรับเก็บ DNA เติม Buffer ATE จำนวน 60 ไมโครลิตร ลงใน QIAamp spin column บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที

22. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 1 ครั้ง และเก็บ DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยวิธีการตรวจดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป



ภาพที่ 3.9 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างซีสต์และการสกัดดีเอ็นเอ



ภาพที่ 3.9 (ต่อ)

3.5.4.3 การตรวจหา *Cryptosporidium* spp. ด้วยวิธี Nested-PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบส

นำตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ มาตรวจหาสารพันธุกรรมของ *Cryptosporidium* spp. ด้วยหลักการ Nested-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายของ *Cryptosporidium* spp. และสร้างผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ในการเตรียมปฏิกิริยา Nested PCR (Nested-PCR reactions) นั้น สามารถเตรียมส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของ *Cryptosporidium* spp. ดังแสดงในตาราง 3.3 (ส่วนประกอบ) และทำปฏิกิริยา Nested-PCR ตามขั้นตอนที่แสดงในตารางที่ 3.4 โดยใช้เครื่อง PCR (Biometra Tone, analytik jena, เยอรมัน) หลังจากทำ Nested-PCR เสร็จแล้ว นำผลิตภัณฑ์ PCR ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจลโดยใช้อะกาโรสเจล 1.7% ใน บัฟเฟอร์ PBS ใช้กำลังไฟฟ้าที่ 120 โวลต์เป็นเวลา 25 นาที หรือ 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที (เติมผลิตภัณฑ์ 5 ไมโครลิตร/หลุม) ดังภาพที่ 3.10 ในรายที่ให้ผลเชิงบวกนำส่งการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอเพื่อยืนยันเชื้อปรสิตชนิดนั้น ๆ

ตารางที่ 3.2 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนของ *Cryptosporidium* spp.

โปรโตซัว	ยีนของโปรโตซัว	PCR	ลำดับไพรเมอร์	ขนาดของ ผลิตภัณฑ์ (Base Pairs)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	18S rRNA	1 st PCR	Forward primer 18SiCF2 5'-GAC ATA TCA TTC AAG TTT CTG ACC-3' Reverse primer 18SiCR2 5'-CTG AAG GAG TAA GGA ACA ACC-3'	763
<i>Cryptosporidium</i> spp.	18S rRNA	Nested PCR	Forward primer 18SiCF1 5'-CCT ATC AGC TTT AGA CGG TAG G-3' Reverse primer 18SiCR1 5'-TCT AAG AAT TTC ACC TCT GAC TG-3'	587

ที่มา Ryan et al. (2003)

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการเกิดปฏิกิริยา PCR และ Nested PCR ของ *Cryptosporidium* spp.

ส่วนประกอบของ PCR	1X ในปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer-MgCl ₂	1	1X
10 mM dNTP mixture	0.2	0.2 มิลลิโมลาร์
50 mM MgCl ₂	0.3	1.5 มิลลิโมลาร์
10 uM 18SciCF2 (<i>Cryptosporidium</i> spp.)	0.5	0.5 มิลลิโมลาร์
10 uM 18SciCR2 (<i>Cryptosporidium</i> spp.)		
DNA template	7.4	–
Platinum Taq DNA pol	0.1	4 Unit
ddH ₂ O	–	
ส่วนประกอบของ Nested PCR	1X ในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer-MgCl ₂	2	1X
10 mM dNTP mixture	0.4	0.2 มิลลิโมลาร์
50 mM MgCl ₂	0.6	1.5 มิลลิโมลาร์
10 uM 18SciCF1 (<i>Cryptosporidium</i> spp.)	1	0.5 มิลลิโมลาร์
10 uM 18SciCR1 (<i>Cryptosporidium</i> spp.)		
1 st PCR product	2	–
Platinum Taq DNA pol	0.2	4 Unit
ddH ₂ O	12.8	

ตารางที่ 3.4 ปฏิบัติ PCR และ Nested PCR ของ *Cryptosporidium* spp.

PCR			
	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	35 รอบ
Annealing	58 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
<i>Cryptosporidium</i> <i>spp.</i>			
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
Hold	4 องศาเซลเซียส	–	
Nested PCR			
	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	35 รอบ
Annealing	58 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
<i>Cryptosporidium</i> <i>spp.</i>			
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
พัก	4 องศาเซลเซียส	–	
ร้อยละ 1.7 Agarose Gel Electrophoresis 120 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที หรือ 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที (ใส่ผลิตภัณฑ์ 5 ไมโครลิตร/หลุม)			

3.5.4.4 การตรวจหา *G. lamblia* ด้วยวิธี Nested-PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบส

นำตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ มาตรวจหาสารพันธุกรรมของ *G. lamblia* ด้วยหลักการ Nested-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายของ *G. lamblia* และสร้างผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.5 ในการเตรียมปฏิบัติการ Nested PCR (Nested-PCR reactions) นั้น สามารถเตรียมส่วนประกอบปฏิบัติการ PCR สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของ

G. lamblia ดังแสดงในตาราง 3.6 และทำปฏิกิริยา Nested-PCR ตามขั้นตอนที่แสดงในตารางที่ 3.7 โดยใช้เครื่อง PCR (Biometra Tone, analytik jena, เยอรมัน) หลังจากทำ Nested-PCR เสร็จแล้ว นำผลิตภัณฑ์ PCR ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจลโดยใช้อะกาโรสเจล 1.7% ใน บัฟเฟอร์ PBS ใช้กำลังไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที หรือ 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที (เติมผลิตภัณฑ์ 5 ไมโครลิตร/หลุม) ดังภาพที่ 3.10 ในรายที่ให้ผลเชิงบวกนำส่งการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอเพื่อยืนยันเชื้อปรสิตชนิดนั้น ๆ

ตารางที่ 3.5 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนของ *G. lamblia*

โปรโตซัว	ยีนของโปรโตซัว	PCR	ลำดับไพรเมอร์	ขนาดของ ผลิตภัณฑ์ (Base Pairs)
<i>G. lamblia</i>	β -giardin	1 st PCR	Forward primer G7 5'-AAG CCC GAC GAC CTC ACC CGC AGT GC-3' Reverse primer G7595'- GAG GCC GCC CTG GAT CTT CGA GAC GAC-3'	753
<i>G. lamblia</i>	β -giardin	Nested PCR	Forward primer 5'- GAACGAGATCGAGGTCCG- 3' Reverse primer 5'- CTCGACGAGCTTCGTGTT-3'	511

ที่มา Cacciò et al. (2002) and Lalle et al. (2005)

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบในการเกิดปฏิกิริยา PCR และ Nested PCR ของ *G. lamblia*

ส่วนประกอบของ PCR	1X ในปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer-MgCl ₂	1	1X
10 mM dNTP mixture	0.2	0.2 มิลลิโมลาร์
50 mM MgCl ₂	0.3	1.5 มิลลิโมลาร์
10 uM GD1F (<i>G. lamblia</i>)	0.5	0.5 มิลลิโมลาร์
10 uM GD1R (<i>G. lamblia</i>)		
DNA template	7.4	-
Platinum Taq DNA pol	0.1	4 Unit
ddH ₂ O	-	
ส่วนประกอบของ Nested PCR	1X ในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer-MgCl ₂	2	1X
10 mM dNTP mixture	0.4	0.2 มิลลิโมลาร์
50 mM MgCl ₂	0.6	1.5 มิลลิโมลาร์
10 uM GD2F (<i>G. lamblia</i>)	1	0.5 มิลลิโมลาร์
10 uM GD2R (<i>G. lamblia</i>)		
1 st PCR product	2	-
Platinum Taq DNA pol	0.2	4 Unit
ddH ₂ O	12.8	

ตารางที่ 3.7 ปฏิบัติการ PCR และ Nested PCR ของ *G. lamblia*

PCR			
	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	35 รอบ
Annealing	65 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
<i>G. lamblia</i>			
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
Hold	4 องศาเซลเซียส	–	
Nested PCR			
	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	35 รอบ
Annealing	65 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
<i>G. lamblia</i>			
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
พัก	4 องศาเซลเซียส	–	
ร้อยละ 1.7 Agarose Gel Electrophoresis 120 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที หรือ 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที (ใส่ผลิตภัณฑ์ 5 ไมโครลิตร/หลุม)			

3.5.4.5 การตรวจหา *E. coli* ด้วยวิธี Nested-PCR

นำตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ มาตรวจหาสารพันธุกรรมของ *E. coli* ด้วยหลักการ Nested-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายของ *E. coli* และสร้างผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.8 ในการเตรียมปฏิบัติการ Nested PCR (Nested-PCR reactions) นั้น สามารถเตรียมส่วนประกอบปฏิบัติการ PCR สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของ *E. coli* ดังแสดงในตาราง 3.9 และทำปฏิบัติการ Nested-PCR ตามขั้นตอนที่แสดงในตารางที่ 3.10 โดยใช้เครื่อง PCR (Biometra Tone, analytik jena, เยอรมัน) หลังจากทำ Nested-PCR เสร็จแล้ว

นำผลิตภัณฑ์ PCR ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจลโดยใช้อะกาโรสเจล 1.7% ใน บัฟเฟอร์ PBS ใช้กำลังไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที หรือ 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที (เติมผลิตภัณฑ์ 5 ไมโครลิตร/หลุม) ดังภาพที่ 3.10 ในรายที่ให้ผลเชิงบวกนำส่งการวิเคราะห์หาลำดับ ดีเอ็นเอเพื่อยืนยันเชื้อปรสิตชนิดนั้น ๆ

ตารางที่ 3.8 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนของ *E. coli*

โปรโตซัว	ยีนของโปรโตซัว	PCR	ลำดับไพรเมอร์	ขนาดของ ผลิตภัณฑ์ (Base Pairs)
<i>E. coli</i>	CDC 16S-like small subunit ribosomal RNA gene	1 st PCR	Forward primer Entam1 5'-GTT GAT CCT GCC AGT ATT ATA TG-3' Reverse primer Entam2 5'-CAC TAT TGG AGC TGG AAT TAC-3'	550
<i>E. coli</i>	CDC 16S-like small subunit ribosomal RNA gene	Nested PCR	Forward primer EcoliF 5'-CTA AGC ACA AAG TCC TAG TAT GAT G- 3' Reverse primer EcoliR 5'-CCT CAT CGA TTA CAC TCC CAG AG-3'	166

ที่มา Verweij et al. (2001) and Rattaprasert et al. (2021)

ตารางที่ 3.9 ส่วนประกอบในการเกิดปฏิกิริยา PCR และ Nested PCR ของ *E. coli*

ส่วนประกอบของ PCR	1X ในปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer-MgCl ₂	1	1X
10 mM dNTP mixture	0.2	0.2 มิลลิโมลาร์
50 mM MgCl ₂	0.3	1.5 มิลลิโมลาร์
10 uM Entam1 (<i>E. coli</i>)	0.5	0.5 มิลลิโมลาร์
10 uM Entam2 (<i>E. coli</i>)		
DNA template	7.4	–
Platinum Taq DNA pol	0.1	4 Unit
ddH ₂ O	–	
ส่วนประกอบของ Nested PCR	1X ในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer-MgCl ₂	2	1X
10 mM dNTP mixture	0.4	0.2 มิลลิโมลาร์
50 mM MgCl ₂	0.6	1.5 มิลลิโมลาร์
10 uM EcoliF (<i>E. coli</i>)	1	0.5 มิลลิโมลาร์
10 uM EcoliR (<i>E. coli</i>)		
1 st PCR product	2	–
Platinum Taq DNA pol	0.2	4 Unit
ddH ₂ O	12.8	

ตารางที่ 3.10 ปฏิบัติ PCR และ Nested PCR ของ *E. coli*

PCR			
	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
Annealing <i>E. coli</i>	55 องศาเซลเซียส	45 วินาที	35 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
Hold	4 องศาเซลเซียส	–	
Nested PCR			
	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
Annealing <i>E. coli</i>	55 องศาเซลเซียส	45 วินาที	35 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
พัก	4 องศาเซลเซียส	–	
ร้อยละ 1.7 Agarose Gel Electrophoresis 120 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที หรือ 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที (ใส่ผลิตภัณฑ์ 5 ไมโครลิตร/หลุม)			

3.5.4.6 การตรวจหา *E. histolytica* ด้วยวิธี Nested-PCR

นำตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ มาตรวจหาสารพันธุกรรมของ *E. histolytica* ด้วยหลักการ Nested-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายของ *E. histolytica* และสร้างผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.11 ในการเตรียมปฏิกิริยา Nested PCR (Nested-PCR reactions) นั้น สามารถเตรียมส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของ *E. histolytica* ดังแสดงในตาราง 3.12 และทำปฏิกิริยา Nested-PCR ตามขั้นตอนที่แสดงในตารางที่ 3.13 โดยใช้เครื่อง PCR (Biometra Tone, analytik jena, เยอรมัน) หลังจากทำ Nested-PCR เสร็จแล้ว นำผลิตภัณฑ์ PCR ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจลโดยใช้อะกาโรสเจล 1.7% ใน บัฟเฟอร์ PBS ใช้กำลังไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที หรือ 120 โวลต์ เป็นเวลา

30 นาที (เติมผลิตภัณฑ์ 5 ไมโครลิตร/หลุม) ดังภาพที่ 3.10 ในรายที่ให้ผลเชิงบวกนำส่งการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอเพื่อยืนยันเชื้อปรสิตชนิดนั้น ๆ

ตารางที่ 3.11 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนของ *E. histolytica*

โปรโตซัว	ยีนของโปรโตซัว	PCR	ลำดับไพรเมอร์	ขนาดของ ผลิตภัณฑ์ (Base Pairs)
<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i> gene for small subunit ribosomal RNA (16S-like)	1 st PCR	Forward primer E-1 5' TAAGATGCACGAGAGCG AAA 3' Reverse primer E-2 5'GTACAAAGGGCAGGGA CGTA 3'	898
<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i> gene for small subunit ribosomal RNA (16S-like)	Nested PCR	Forward primer EH-1 5' AAGCATTGTTTCTAGATC TGAG 3' Reverse primer EH-2 5' AAGAGGTCTAACCGAAAT TAG 3'	439

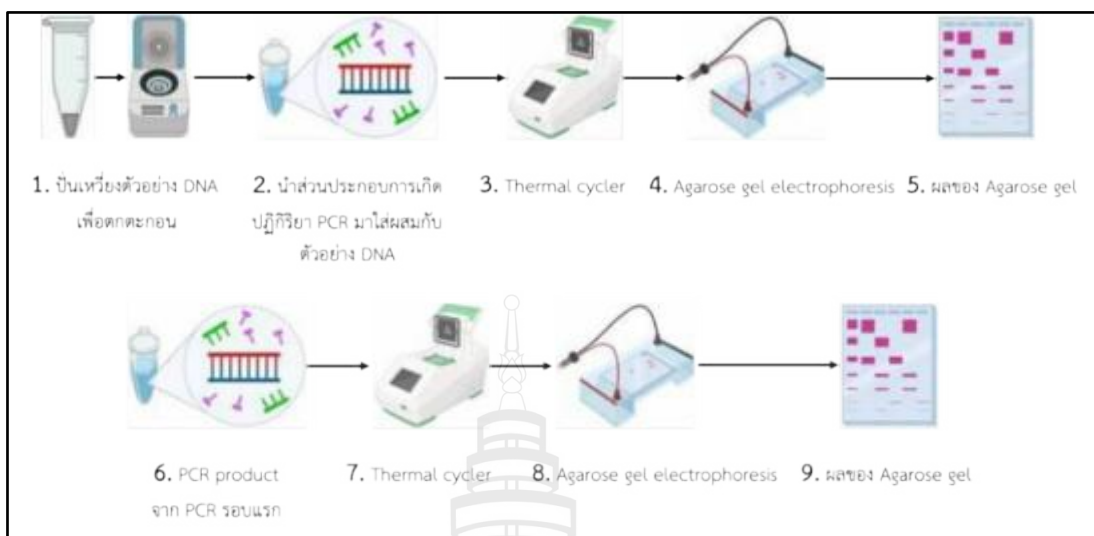
ที่มา Khairnar et al. (2007)

ตารางที่ 3.12 ส่วนประกอบในการเกิดปฏิกิริยา PCR และ Nested PCR ของ *E. histolytica*

ส่วนประกอบของ PCR	1X ในปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer-MgCl ₂	1	1X
10 mM dNTP mixture	0.2	0.2 มิลลิโมลาร์
50 mM MgCl ₂	0.3	1.5 มิลลิโมลาร์
10 uM E1 (<i>E. histolytica</i>)	0.5	0.5 มิลลิโมลาร์
10 uM E2 (<i>E. histolytica</i>)		
DNA template	7.4	–
Platinum Taq DNA pol	0.1	4 Unit
ddH ₂ O	–	
ส่วนประกอบของ Nested PCR	1X ในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer-MgCl ₂	2	1X
10 mM dNTP mixture	0.4	0.2 มิลลิโมลาร์
50 mM MgCl ₂	0.6	1.5 มิลลิโมลาร์
10 uM EH1 (<i>E. histolytica</i>)	1	0.5 มิลลิโมลาร์
10 uM EH2 (<i>E. histolytica</i>)		
1 st PCR product	2	–
Platinum Taq DNA pol	0.2	4 Unit
ddH ₂ O	12.8	

ตารางที่ 3.13 ปฏิบัติการ PCR และ Nested PCR ของ *E. histolytica*

PCR			
	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	35 รอบ
Annealing	56 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
<i>E. histolytica</i>			
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
Hold	4 องศาเซลเซียส	–	
Nested PCR			
	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	35 รอบ
Annealing	48 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
<i>E. histolytica</i>			
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
พัก	4 องศาเซลเซียส	–	
ร้อยละ 1.7 Agarose Gel Electrophoresis 120 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที หรือ 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที (ใส่ผลิตภัณฑ์ 5 ไมโครลิตร/หลุม)			



ภาพที่ 3.10 วิธีการทำ PCR และ Nested PCR

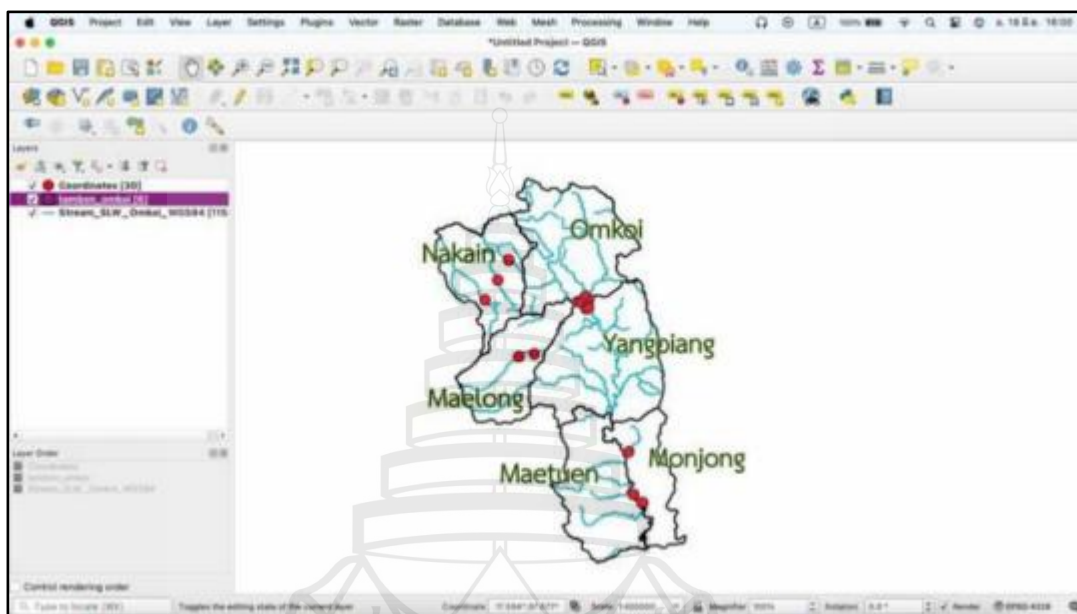
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS รุ่น 29.0.1.0 โดยใช้สถิติ t-test เพื่อศึกษาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำในกลุ่มช่วงฤดูกาลและกลุ่มช่วงอัตราการไหลของน้ำ สถิติ Fisher exact เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำกับการพบเชื้อปรสิตเพื่อใช้บอกลักษณะแหล่งน้ำที่มีโอกาสพบเชื้อปรสิตที่ระดับนัยสำคัญ $P\text{-value} < 0.05$ และ สถิติ Logistic regression เพื่อหาปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการพบเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำใช้ของชาวเขาอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดเชียงใหม่

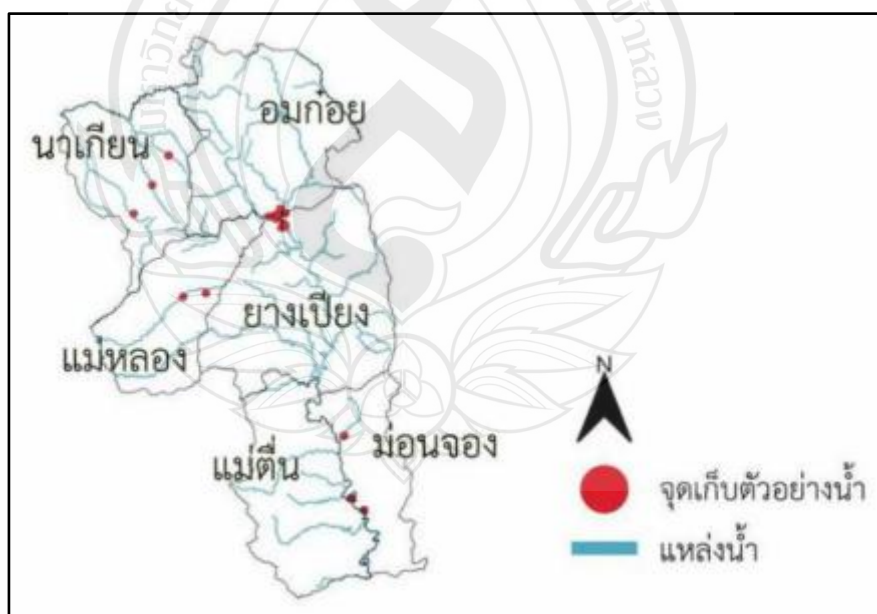
3.7 การจัดทำแผนที่จุดการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำ

จับพิกัดของตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างน้ำด้วยเครื่องรับสัญญาณดาวเทียมแบบพกพา ระบบสัมผัส Garmin Oregon® 750 และโทรศัพท์มือถือหรือตัวรับสัญญาณจากดาวเทียม (GPS Receiver Module) รวมถึงรูปถ่ายบริเวณที่เก็บตัวอย่างและทำการกำหนดตำแหน่งพิกัด พร้อมระบุรายละเอียดชนิดของเชื้อปรสิตที่ตรวจพบและพารามิเตอร์แวดล้อมต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม QGIS รุ่น 3.32.3-Lima และ Google Earth Pro รุ่น 7.3.6.9796 จากนั้นสร้างแผนที่ออนไลน์และคืนข้อมูลให้แก่หน่วยงานที่รับผิดชอบในพื้นที่เพื่อดำเนินการวางแผนจัดการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตในน้ำต่อไป

ในแผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำจะประกอบไปด้วย จุดพิกัดตำแหน่งเก็บตัวอย่างน้ำทั้งหมด 30 จุด ในอำเภอมวกน้อย ชื่ออำเภอมวกน้อย และเส้นทางน้ำ ดังภาพที่ 3.11 – 3.12 และภาพตัวอย่างการกระจายตัวของจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละตำบล ดังภาพที่ 3.13 – 3.16



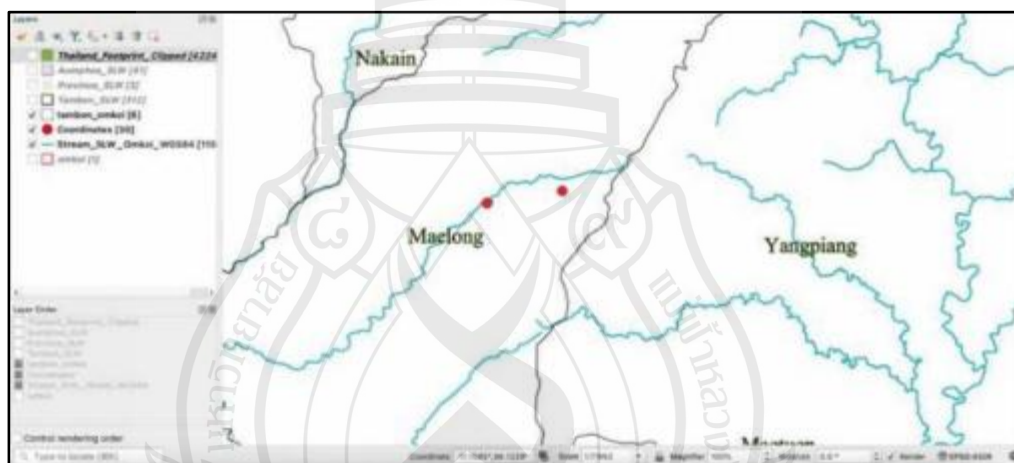
ภาพที่ 3.11 แผนที่แสดงพิกัดจุดเก็บตัวอย่างน้ำอำเภอมวกน้อย



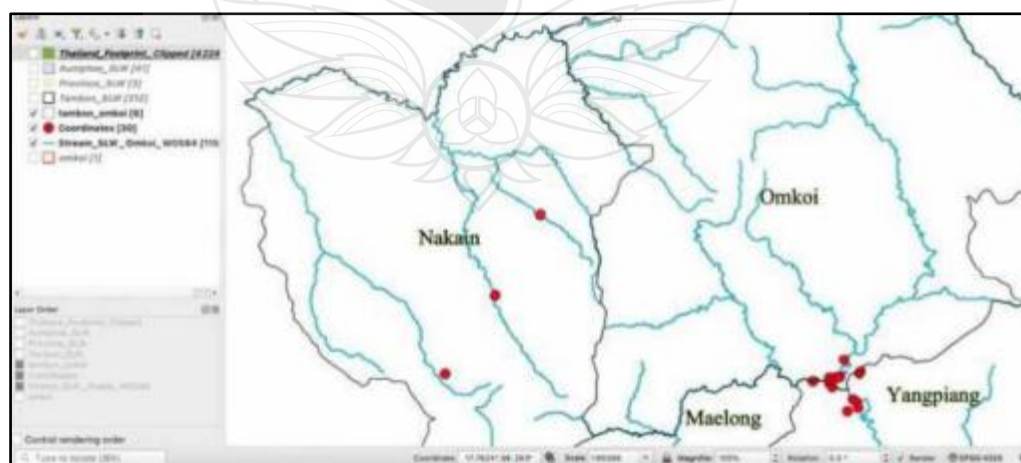
ภาพที่ 3.12 แผนที่แสดงพิกัดจุดเก็บตัวอย่างน้ำอำเภอมวกน้อย



ภาพที่ 3.13 ภาพตัวอย่างการกระจายตัวของจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละตำบล



ภาพที่ 3.14 ภาพตัวอย่างการกระจายตัวของจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละตำบล



ภาพที่ 3.15 ภาพตัวอย่างการกระจายตัวของจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละตำบล



ภาพที่ 3.16 ภาพตัวอย่างการกระจายตัวของจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละตำบล



บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ตัวอย่างน้ำ

จากการเก็บข้อมูลทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำทั้งฤดูแล้งและฤดูฝนในตำแหน่งเดียวกัน ฤดูกาลละ 30 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้นเป็น 60 ตัวอย่าง แต่ในฤดูฝนไม่สามารถเก็บตัวอย่างน้ำได้ 2 ตำแหน่ง ในตำแหน่งที่ 21 และ 23 ดังนั้นจึงรวมเป็น 58 ตัวอย่าง พบว่าแหล่งน้ำในช่วงฤดูแล้งมีลักษณะที่ตื้น กระแสน้ำไหลช้าสามารถเดินข้ามแม่น้ำได้บางแหล่ง ส่วนแหล่งน้ำในช่วงฤดูฝนนั้นเนื่องจากมีฝนตกทุกวันทำให้ปริมาณน้ำในแม่น้ำเพิ่มสูง กระแสน้ำไหลแรง และน้ำขุ่นมากกว่าช่วงฤดูแล้ง ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ทั้งกายภาพและเคมีที่ตรวจในตัวอย่างน้ำในช่วงฤดูแล้งมีค่าออกซิเจนละลายในน้ำอยู่ในช่วงระหว่าง 2.68 – 14.9 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วงระหว่าง 20 – 310 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าความขุ่นอยู่ในช่วงระหว่าง 4.15 – 710 มิลลิกรัม ค่ากรดต่างอยู่ในช่วงระหว่าง 4.72 – 7.28 ค่าความเค็มอยู่ในช่วงระหว่าง 0 – 0.2 ส่วนต่อพัน ค่าอัตราการไหลอยู่ในช่วงระหว่าง 0 – 0.69 เมตร/วินาที ค่าแอมโมเนียอยู่ในช่วงระหว่าง 0.2 – 2 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าคลอรีน 0 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าไนเตรตอยู่ในช่วงระหว่าง 10 – 20 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าไนโตรทอยู่ในช่วงระหว่าง 0.02 – 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

ในขณะที่ช่วงฤดูฝนมีค่าออกซิเจนละลายในน้ำอยู่ในช่วงระหว่าง 1.5 – 4.5 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วงระหว่าง 16 – 214 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าความขุ่นอยู่ในช่วงระหว่าง 1.37 – > 1100 มิลลิกรัม ค่ากรดต่างอยู่ในช่วงระหว่าง 6.65 – 7.81 ค่าความเค็ม 0 ส่วนต่อพัน ค่าอัตราการไหลอยู่ในช่วงระหว่าง 0 – 1.27 เมตร/วินาที ค่าแอมโมเนียอยู่ในช่วงระหว่าง 0 – 0.6 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าคลอรีน 0 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าไนเตรตอยู่ในช่วงระหว่าง 0 – 5 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าไนโตรทอยู่ในช่วงระหว่าง 0.02 – 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร โดยตัวอย่างน้ำแต่ละแหล่งมีค่าพารามิเตอร์ที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่เป็นที่น่าสังเกตว่ามีบางตัวอย่างที่มีค่าพารามิเตอร์ค่อนข้างต่างไปจากตัวอย่างที่เหลือ เช่น ตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 2 ที่เก็บในฤดูแล้งและมีลักษณะเป็นธารน้ำบริเวณใกล้บ้านเรือน มีค่าออกซิเจนละลายในน้ำต่ำที่สุด คือ 2.68 มิลลิกรัม/ลิตร มีค่าปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำที่สูงคือ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าแอมโมเนียสูงที่สุด คือ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าไนเตรตสูงที่สุด คือ 20 มิลลิกรัม/ลิตร และจุดที่ 3 ที่เก็บตัวอย่างในฤดูแล้ง ซึ่งมีลักษณะเป็นบ่อกักเก็บน้ำใช้ของชาวบ้าน มีค่าออกซิเจนละลายในน้ำสูงที่สุด คือ 14.90 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าปริมาณรวม

ทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำสูงที่สุดคือ 310 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนในช่วงฤดูฝนตัวอย่างน้ำที่เก็บในตำแหน่งที่ 2 และ 3 ค่าปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำสูงกว่าจุดอื่นอยู่ที่ 176 และ 214 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1 และ 4.2

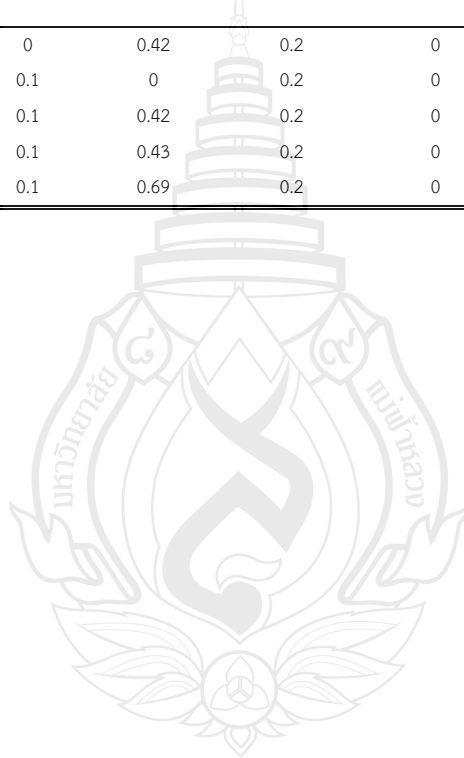


ตารางที่ 4.1 ข้อมูลทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูแล้ง

จุดเก็บ ตัวอย่างน้ำ	ออกซิเจน ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณรวมทั้งหมด ของสารที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความขุ่น (มิลลิกรัม)	กรดต่าง	ความเค็ม (ส่วนต่อพัน)	อัตราการไหล (เมตร/วินาที)	แอมโมเนีย (มิลลิกรัม/ลิตร)	คลอรีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	ไนเตรต (มิลลิกรัม/ลิตร)	ไนไตรท์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	จุดพิกัด
1	6.68	50	78.5	5.75	0	0.54	0.2	0	10	0.02	17.79648° N, 98.34962° E
2	2.68	300	4.15	5.91	0.2	0.14	2	0	20	0.5	17.79843° N, 98.35752° E
3	14.9	310	14.2	6.79	0.2	0	0.6	0	10	0.2	17.79875° N, 98.36089° E
4	7.98	50	8.09	6.35	0	0	0.2	0	10	0.02	17°48'03.0"N 98°22'24.7"E
5	9.73	50	11.4	7.20	0	0	0.2	0	10	0.02	17.80177° N, 98.37408° E
6	6.46	90	234	6.24	0.1	0.49	0.2	0	10	0.02	17.79912° N, 98.36326° E
7	6.5	90	229	7.28	0.1	0.45	0.2	0	10	0.02	17.79858° N, 98.36238° E
8	6.47	100	222	6.10	0.1	0.65	0.2	0	10	0.02	17.79553° N, 98.35770° E
9	6.07	70	142	5.29	0.1	0.58	0.2	0	10	0.02	17.80810° N, 98.36548° E
10	7.45	80	27.1	5.45	0.1	0.26	0.2	0	10	0.02	17.79337° N, 98.35920° E
11	6.01	70	113	5.32	0.1	0.26	0.2	0	10	0.02	17.78680° N, 98.37014° E
12	6.65	80	10.1	6.57	0.1	0.44	0.2	0	10	0.02	17.78072° N, 98.36694° E
13	6.45	70	169	5.36	0.1	0.45	0.2	0	10	0.02	17.78563° N, 98.37233° E
14	6.07	40	96.5	5.27	0	0	0.2	0	10	0.02	17.78250° N, 98.37290° E
15	6.88	40	41.6	5.44	0	0.38	0.2	0	10	0.02	17.88524° N, 98.20390° E
16	7.17	30	36.5	5.60	0	0.42	0.2	0	10	0.02	17.88557° N, 98.20407° E
17	6.57	30	23.5	5.91	0	0.30	0.2	0	10	0.02	17.84213° N, 98.18005° E
18	6.85	40	20.6	5.87	0	0	0.2	0	10	0.02	17.84255° N, 98.17995° E
19	5.64	20	44.3	4.72	0	0	0.2	0	10	0.02	17.81962° N, 98.14667° E
20	6.82	170	7.89	6.34	0.1	0.41	0.2	0	10	0.02	17.68138° N, 98.22518° E
21	6.55	170	11.6	6.75	0.1	0.22	0.2	0	10	0.02	17.68037° N, 98.22488° E
22	5.68	180	6.61	6.50	0.1	0.23	0.2	0	10	0.02	17°41'21.1"N 98°14'41.0"E
23	6.66	180	10.2	6.27	0.1	0	0.2	0	10	0.02	17.68900° N, 98.24439° E
24	6.57	100	642	5.91	0.1	0.50	0.2	0	10	0.02	17.37010° N, 98.48718° E
25	6.21	90	710	5.77	0.1	0.24	0.2	0	10	0.02	17.36994° N, 98.48747° E

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

จุดเก็บ ตัวอย่างน้ำ	ออกซิเจน ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณรวมทั้งหมด ของสารที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความขุ่น (มิลลิกรัม)	กรดต่าง	ความเค็ม (ส่วนต่อพัน)	อัตราการไหล (เมตร/วินาที)	แอมโมเนีย (มิลลิกรัม/ลิตร)	คลอรีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	ไนเตรต (มิลลิกรัม/ลิตร)	ไนไตรท์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	จุดพิกัด
26	6.64	80	47.2	5.55	0	0.42	0.2	0	10	0.02	17.37046° N, 98.48763° E
27	5.63	100	541	5.86	0.1	0	0.2	0	10	0.02	17.38750° N, 98.46819° E
28	5.65	100	519	5.53	0.1	0.42	0.2	0	10	0.02	17.38790° N, 98.46806° E
29	6.36	110	147	5.71	0.1	0.43	0.2	0	10	0.02	17°28'43.0"N 98°27'30.7"E
30	6.69	120	161	5.54	0.1	0.69	0.2	0	10	0.02	17°28'26.8"N 98°27'21.5"E



ตารางที่ 4.2 ข้อมูลทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูฝน

จุดเก็บ ตัวอย่างน้ำ	ออกซิเจน ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณรวมทั้งหมด ของสารที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความขุ่น (มิลลิกรัม)	กรดต่าง	ความเค็ม (ส่วนต่อพัน)	อัตราการไหล (เมตร/วินาที)	แอมโมเนีย (มิลลิกรัม/ลิตร)	คลอรีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	ไนเตรต (มิลลิกรัม/ลิตร)	ไนไตรท์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	จุดพิกัด
1	4.0	16	15.1	6.90	0	0.67	0.3	0	0	0.02	17.79659° N, 98.34903° E
2	4.0	176	2.10	6.65	0	0.30	0.4	0	5	0.2	17.79847° N, 98.35749° E
3	2.0	214	10.2	6.88	0	0	0.6	0	3	0.05	17.79874° N, 98.36091° E
4	3.5	22	51.5	6.76	0	0	0.2	0	3	0.02	17.80084° N, 98.37348° E
5	2.5	23	56.7	6.70	0	0	0.2	0	3	0.02	17.80182° N, 98.37402° E
6	3.0	52	59.2	7.36	0	0.50	0.2	0	3	0.02	17.79903° N, 98.36330° E
7	3.0	53	93.5	7.68	0	0.50	0.4	0	5	0.02	17.79844° N, 98.36218° E
8	2.5	80	64.1	7.28	0	0.46	0.2	0	5	0.2	17.79620° N, 98.35801° E
9	4.0	22	>1100	6.97	0	0.62	0	0	0	0.02	17.80805° N, 98.36551° E
10	3.0	23	84.1	7.07	0	1.05	0.2	0	3	0.02	17.79334° N, 98.35914° E
11	2.5	19	675	6.70	0	0.68	0.2	0	5	0.02	17.78693° N, 98.37020° E
12	2.5	32	423	7.05	0	1	0.2	0	5	0.02	17.78078° N, 98.36720° E
13	2.0	17	509	7.00	0	0.78	0	0	3	0.02	17.78567° N, 98.37220° E
14	1.5	22	6.08	7.01	0	0	0.2	0	0	0.02	17.78259° N, 98.37296° E
15	3.5	23	9.94	7.81	0	0.61	0	0	0	0.02	17.88519° N, 98.20392° E
16	3.0	16	130	7.56	0	0.38	0	0	0	0.02	17.88555° N, 98.20420° E
17	4.5	16	6.61	7.51	0	1.04	0	0	0	0.02	17.84229° N, 98.17989° E
18	4.0	17	5.31	7.30	0	1.04	0	0	0	0.02	17.84250° N, 98.18004° E
19	4.5	10	5.31	7.27	0	0.43	0	0	0	0.02	17.80069° N, 98.15340° E
20,21 (รวมเป็นจุด เดียวกัน)	3.5	80	4.42	7.64	0	0.71	0	0	0	0.02	17.68922° N, 98.24442° E

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

จุดเก็บ ตัวอย่างน้ำ	ออกซิเจน ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณรวมทั้งหมด ของสารที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความขุ่น (มิลลิกรัม)	กรดต่าง	ความเค็ม (ส่วนต่อพัน)	อัตราการไหล (เมตร/วินาที)	แอมโมเนีย (มิลลิกรัม/ลิตร)	คลอรีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	ไนเตรต (มิลลิกรัม/ลิตร)	ไนไตรท์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	จุดพิกัด
22,23 (รวมเป็นจุด เดียวกัน)	4.5	104	1.37	7.66	0	0.90	0	0	0	0.02	17.68589° N, 98.25787° E
24	2.0	31	369	7.23	0	1.01	0	0	0	0.02	17.37016° N, 98.48698° E
25	3.0	28	521	7.20	0	1.01	0	0	0	0.02	17.37007° N, 98.48701° E
26	2.5	38	81.2	7.15	0	0	0	0	0	0.02	17.37070° N, 98.48739° E
27	3.0	32	529	7.23	0	0.25	0	0	0	0.02	17.38753° N, 98.46846° E
28	1.5	28	630	7.21	0	0.58	0	0	0	0.02	17.38754° N, 98.46754° E
29	1.5	55	166	7.44	0	1.27	0	0	0	0.02	17.47816° N, 98.45776° E
30	1.5	51	183	7.40	0	1.27	0	0	0	0.02	17.47815° N, 98.45764° E

4.2 การตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่สามารถตรวจยืนยันเชื้อปรสิตเป้าหมาย ได้แก่ *G. lamblia* และ *Cryptosporidium spp.* ทั้ง 3 วิธี ได้แก่ วิธี Double-Slide Simple Smear วิธี Trichrome Staining และ วิธี Modified Acid Fast Staining แต่พบซีสต์ที่สงสัยว่าเป็นของปรสิตชนิดอื่นแทน เช่น ตัวอ่อนของ *Strongyloides spp.*, ซีสต์ของ *E. histolytica/E. dispar* และ *E. coli* จากตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่ 2,5 ในฤดูแล้ง และตำแหน่งที่ 3 ในฤดูฝน ซึ่งทั้งสามตำแหน่งถูกพบด้วยวิธี Double-Slide Simple Smear จากการตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการตรวจปรสิตเป้าหมาย *G. lamblia* และ *Cryptosporidium spp.* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของตัวอย่างน้ำทั้ง ฤดูแล้งและฤดูฝนในอำเภอมวกก่อ จังหวัดเชียงใหม่

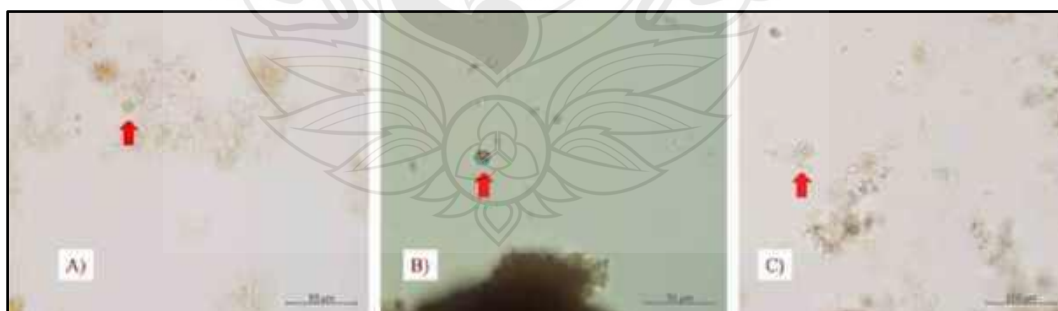
จุดเก็บ ตัวอย่างน้ำ	Double-Slide Simple Smear	Trichrome Staining	Modified Acid Fast Staining
ฤดูแล้ง			
1	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
2	พบลักษณะคล้ายซีสต์	ไม่พบ	ไม่พบ
3	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
4	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
5	พบลักษณะคล้ายซีสต์	ไม่พบ	ไม่พบ
6	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
7	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
8	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
9	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
12	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
13	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
14	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
15	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
16	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
17	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

จุดเก็บ ตัวอย่างน้ำ	Double-Slide Simple Smear	Trichrome Staining	Modified Acid Fast Staining
ฤดูแล้ง			
18	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
19	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
20	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
21	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
22	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
23	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
24	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
25	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
26	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
27	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
28	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
29	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
30	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ฤดูฝน			
1	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
2	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
3	พบลักษณะคล้ายซีสต์	ไม่พบ	ไม่พบ
4	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
5	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
6	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
7	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
8	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
9	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
12	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
13	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

จุดเก็บ ตัวอย่างน้ำ	Double-Slide Simple Smear	Trichrome Staining	Modified Acid Fast Staining
ฤดูแล้ง			
14	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
15	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
16	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
17	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
18	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
19	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
20	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
21	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
22	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
23	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
24	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
25	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
26	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
27	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
28	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ



หมายเหตุ ตัวอย่างน้ำจุดที่ 2 ฤดูแล้ง (A), ตัวอย่างน้ำจุดที่ 3 ฤดูฝน (B), ตัวอย่างน้ำจุดที่ 5 ฤดูแล้ง (C)

ภาพที่ 4.1 ซีสต์ที่มีลักษณะคล้ายกับซีสต์ของ *Entamoeba spp.*

4.3 การตรวจหาเชื้อปรสิตเป้าหมายด้วยวิธีการตรวจดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Nested PCR

เนื่องจากการตรวจตัวอย่างน้ำเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์พบวัตถุคล้ายซิสต์จากตัวอย่างน้ำ ซึ่งคาดหมายว่าอาจจะเป็นซิสต์ของปรสิตที่ก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ *E. histolytica*/*E. dispar* และปรสิตที่ไม่ก่อโรคแต่บ่งชี้ถึงสุขอนามัยที่ไม่ดีของผู้ที่ติดเชื้อ ได้แก่ *E. coli* จึงได้ทำการรวมเชื้อปรสิต *E. histolytica*/*E. dispar* และ *E. coli* เป็นปรสิตเป้าหมายด้วย ซึ่งจากการตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยวิธีการตรวจดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Nested PCR ของตัวอย่างทั้งฤดูแล้งและฤดูฝนรวมทั้งหมด 58 จุด มีผลดังนี้

4.3.1 ผลของการใช้อะกาโรสเจลตรวจหา *Cryptosporidium spp.* ด้วยเทคนิค Nested PCR

ไม่ได้เจอ แคไข่ไพรเมอร์ *Cryptosporidium spp.* แล้วพบแถบดีเอ็นเอปรากฏ เมื่อตรวจยืนยันด้วยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอแล้วไม่ใช่ *Cryptosporidium spp.* โดย Positive Control ได้มาจากตัวอย่างอุจจาระคนไข้ของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดังภาพที่ 4.2

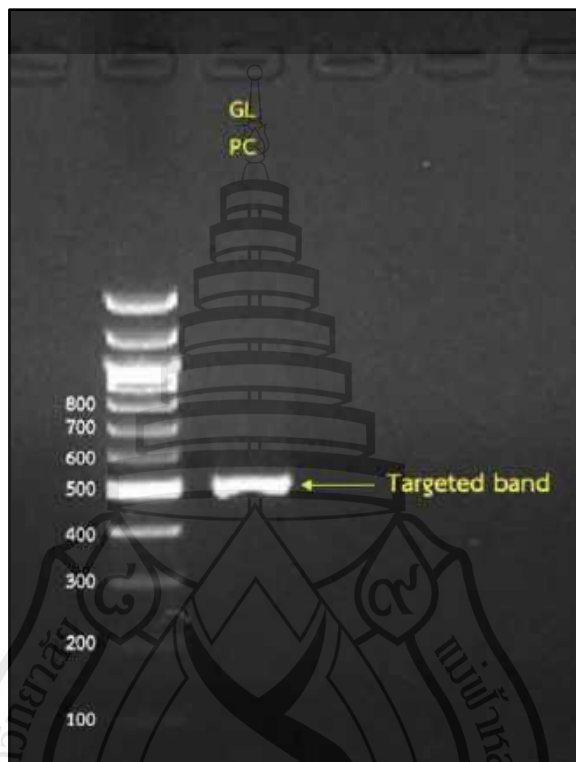


หมายเหตุ CT PC = *Cryptosporidium spp.* positive control, Targeted band = แถบดีเอ็นเอของเชื้อปรสิต, Non-specific band = แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอย่างไม่จำเพาะ, ตัวเลขD/S = ตำแหน่งตัวอย่างน้ำ ฤดูแล้ง/Supernatant, ตัวเลขD/P = ตำแหน่งตัวอย่างน้ำ ฤดูแล้ง/Pellet, ตัวเลขW/P = ตำแหน่งตัวอย่างน้ำ ฤดูฝน/Pellet

ภาพที่ 4.2 ภาพแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ *Cryptosporidium spp.* เทียบกับเชื้อควบคุม

4.3.2 ผลของการใช้กาโรสเจลตรวจหา *G. lamblia* ด้วยเทคนิค Nested PCR

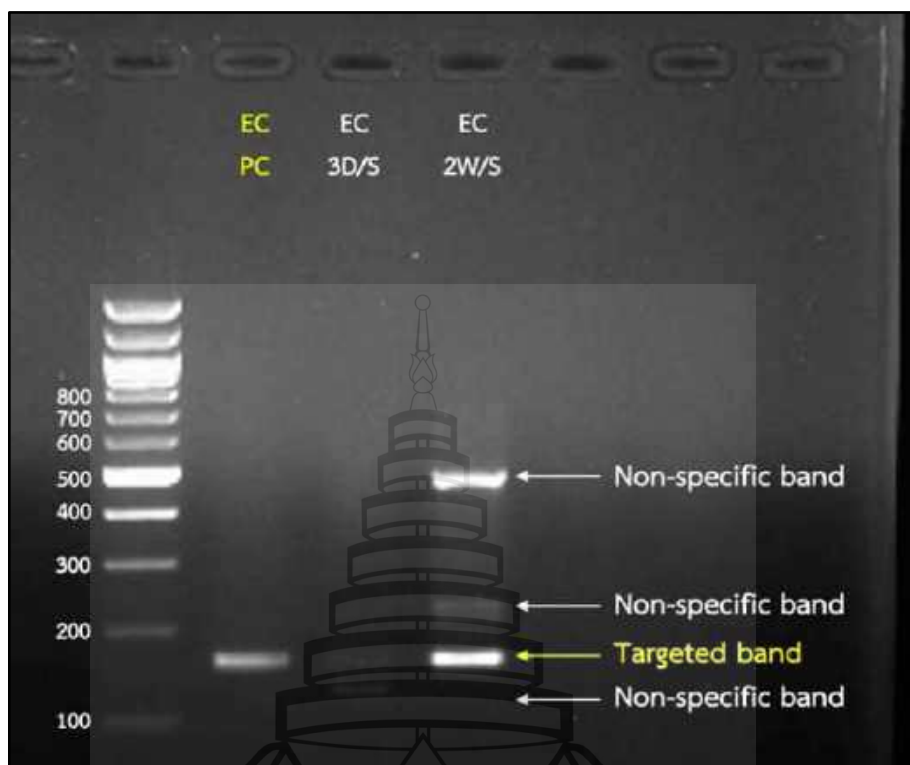
จากการตรวจหาเชื้อ *G. lamblia* ในน้ำทั้ง 58 แหล่ง ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 511 bp เมื่อเทียบกับ Positive Control ได้มาจากตัวอย่างอุจจาระคนไข้ของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดังภาพที่ 4.3



หมายเหตุ GL PC = *G. lamblia* positive control, Targeted band = แถบดีเอ็นเอของเชื้อปรสิต
ภาพที่ 4.3 ภาพแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ *G. lamblia* เทียบกับเชื้อควบคุม

4.3.3 ผลของการใช้กาโรสเจลตรวจหา *E. coli* ด้วยเทคนิค Nested PCR

พบว่าในฤดูแล้งตรวจพบเชื้อปรสิต *E. coli* ในตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 3 ในฤดูฝนพบในตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 2 โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 166 bp เมื่อเทียบกับ Positive Control ได้มาจากตัวอย่างอุจจาระคนไข้ของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดังภาพที่ 4.4

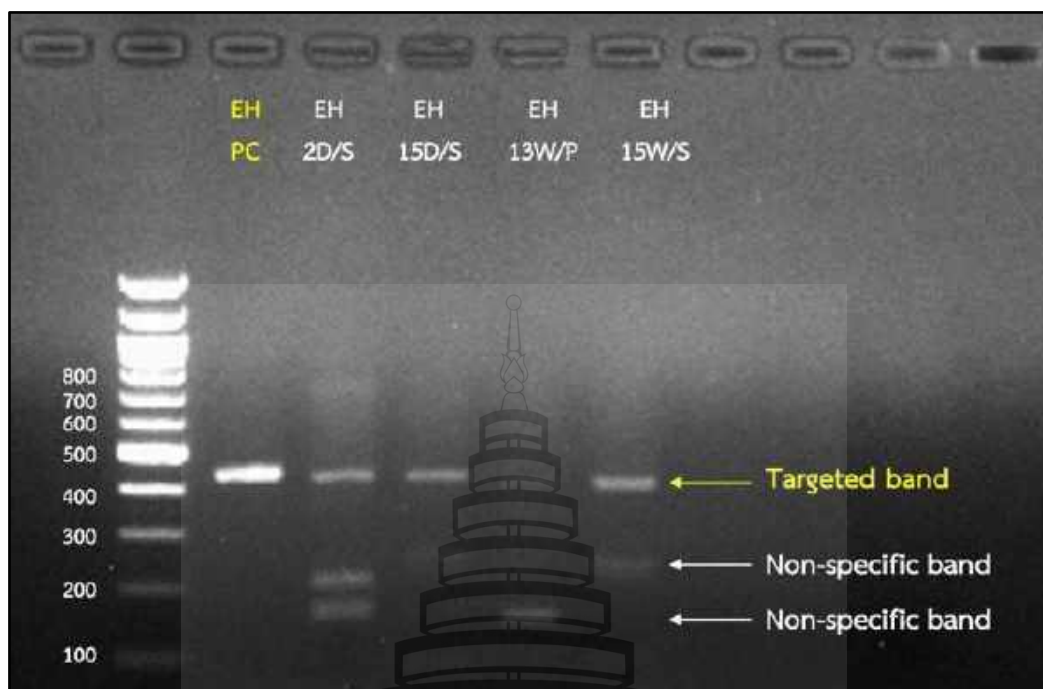


หมายเหตุ EC PC = *E. coli* positive control, Targeted band = แถบดีเอ็นเอของเชื้อปรสิต, Non-specific band = แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอย่างไม่จำเพาะ, ตัวเลขD/S = ตำแหน่งตัวอย่างน้ำ ฤดูแล้ง/Supernatant, ตัวเลขW/S = ตำแหน่งตัวอย่างน้ำ ฤดูฝน/Supernatant

ภาพที่ 4.4 ภาพแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ *E. coli* เทียบกับเชื้อควบคุม

4.3.4 ผลของการใช้สารโอสเจลตรวจหา *E. histolytica* ด้วยเทคนิค Nested PCR

พบว่าในฤดูแล้งตรวจพบเชื้อปรสิต *E. histolytica*. ในตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 2,15 ในฤดูฝนพบในตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 13,15 โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 439 bp เมื่อเทียบกับ Positive Control ได้มาจากตัวอย่างอุจจาระคนไข้ของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดังภาพที่ 4.5



หมายเหตุ EH PC = *E. histolytica* positive control, Targeted band = แถบดีเอ็นเอของเชื้อปรสิต, Non-specific band = แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอย่างไม่จำเพาะ, ตัวเลขD/S = ตำแหน่งตัวอย่างน้ำ ฤดูแล้ง/Supernatant, ตัวเลขW/P = ตำแหน่งตัวอย่างน้ำ ฤดูฝน/Pellet, ตัวเลขW/S = ตำแหน่งตัวอย่างน้ำ ฤดูฝน/Supernatant

ภาพที่ 4.5 ภาพแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ *E. histolytica* เทียบกับเชื้อควบคุม

เมื่อตรวจวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของปรสิตเป้าหมาย *Cryptosporidium* spp. ด้วยวิธี Sanger Sequencing และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์หาคอนเซนซัส ซีควเन्ซ์ของยีนเป้าหมายนั้น ๆ โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime และนำไปเปรียบเทียบความเหมือนของสิ่งมีชีวิตเป้าหมายบนฐานข้อมูล GenBank เว็บไซต์ NCBI โดยการใช้ Blast Nucleotide พบว่า แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *E. histolytica* และ *E. coli* ไม่สามารถระบุลำดับดีเอ็นเอได้ แต่ก็สามารถยืนยันว่าเป็นเชื้อปรสิตทั้งสองชนิดได้จากผลของการทำ Nested PCR ซึ่งได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับชิ้นส่วนควบคุมเชิงบวกของเชื้อปรสิตทั้ง 2 ชนิดเป็น Primer Specific Gene ส่วนเชื้อ *Cryptosporidium* spp. พบว่า ร้อยละของ Query Cover ไม่เป็นร้อยละ 100 และไปตรงกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการตรวจดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Nested PCR

ชื่อตัวอย่าง	เชื้อปรสิตเป้าหมาย	ผลการหาลำดับเบส	รหัสประจำดีเอ็นเอ	ชื่อวิทยาศาสตร์	เปอร์เซ็นต์อัตลักษณ์	ความครอบคลุม
CT14D/P	<i>Cryptosporidium</i> spp.	ดี	FJ410742.1	Uncultured alveolate	97.31	90
			MN410725.1	<i>Cryptosporidium galli</i>	94.34	55
CT14W/P	<i>Cryptosporidium</i> spp.	ปานกลาง	EF196722.1	Eukaryotic picoplankton environmental sample	99.06	100
			MN410725.1	<i>Cryptosporidium galli</i>	94.84	58
CT20D/S	<i>Cryptosporidium</i> spp.	ล้มเหลว				
CT21D/P	<i>Cryptosporidium</i> spp.	ดี	HQ191345.1	Uncultured eukaryote	92.61	100
			KX513543.1	<i>Cryptosporidium</i> sp. avian genotype VIII	92.48	54
			MW090797.1	<i>Cryptosporidium testudinis</i>	92.48	54
CT21D/S	<i>Cryptosporidium</i> spp.	ดี	HQ191345.1	Uncultured eukaryote	99	92.59
			KX513543.1	<i>Cryptosporidium</i> sp. avian genotype VIII	92.59	53
			MW090797.1	<i>Cryptosporidium testudinis</i>	92.59	53

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ชื่อตัวอย่าง	เชื้อปรสิตเป้าหมาย	ผลการหาลำดับเบส	รหัสประจำตีเอ็นเอ	ชื่อวิทยาศาสตร์	เปอร์เซ็นต์อัตลักษณ์	ความครอบคลุม
CT3D/S	<i>Cryptosporidium spp.</i>	ดี	EF196787.1	Eukaryotic picoplankton environmental sample	99	95.49
			EU825745.1	<i>Cryptosporidium</i> environmental	95.48	54
			AB222185.1	<i>Cryptosporidium sp.</i> Kn732	95.48	54
CT4D/P	<i>Cryptosporidium spp.</i>	ดี	FJ410723.1	Uncultured alveolate	97.45	89
			MN410725.1	<i>Cryptosporidium galli</i>	94.34	55
CT5D/P	<i>Cryptosporidium spp.</i>	ดี	JN547327.1	Uncultured eukaryote	97.57	100
			MN410725.1	<i>Cryptosporidium galli</i>	94.36	55
CT5W/P	<i>Cryptosporidium spp.</i>	ดี	JQ639762.1	<i>Peridinium bipes</i>	95.55	100
			KX513543.1	<i>Cryptosporidium sp.</i> avian genotype VIII	93.10	51
EC (positive control)	<i>E. coli</i>	ดี	AF149915.1	<i>Entamoeba coli</i>	100	100
EC2D/S	<i>E. coli</i>	ดี	AF149915.1	<i>Entamoeba coli</i>	96.55	100
EC3D/S	<i>E. coli</i>	ล้มเหลว				

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ชื่อตัวอย่าง	เชื้อปรสิตเป้าหมาย	ผลการหาลำดับเบส	รหัสประจำตีเอ็นเอ	ชื่อวิทยาศาสตร์	เปอร์เซ็นต์อัตลักษณ์	ความครอบคลุม
EH13D/P	<i>E. histolytica</i>	ล้มเหลว				
EH15/DS	<i>E. histolytica</i>	ล้มเหลว				
EH15W/S	<i>E. histolytica</i>	ล้มเหลว				
EH2D/S	<i>E. histolytica</i>	ล้มเหลว				
GL (positive control)	<i>G. lamblia</i>	ดี	LC436575.1	<i>Giardia intestinalis</i>	99.8	100

4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางด้านกายภาพและทางเคมีของน้ำและแหล่งน้ำที่พบประสิทธิ์

ฤดูกาลส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำอย่างชัดเจนเนื่องจากในฤดูฝนระดับน้ำสูงขึ้น น้ำไหลเร็วและแรง มีความขุ่นมากกว่าฤดูแล้ง พารามิเตอร์ของน้ำ ได้แก่ ออกซิเจนที่ละลายน้ำ ปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำ กรดต่าง ความเค็ม แอมโมเนีย และไนเตรต แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่พบคลอรีนในตัวอย่างน้ำเนื่องจากเป็นแหล่งน้ำจากธรรมชาติ ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างฤดูกาลและคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำ

ฤดู	การไหล ของน้ำ	จำนวน ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยและ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำ								
				กายภาพ					เคมี			
				ออกซิเจน ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณรวมทั้งหมด ของสารที่ละลายใน น้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความขุ่น (มิลลิกรัม)	กรดต่าง	ความเค็ม (ส่วนต่อพัน)	แอมโมเนีย (มิลลิกรัม/ ลิตร)	คลอรีน (มิลลิกรัม/ ลิตร)	ไนเตรต (มิลลิกรัม/ ลิตร)	ไนไตรท์ (มิลลิกรัม/ ลิตร)
แล้ง	น้ำนิ่ง	8	ค่าเฉลี่ย	7.93	98.75	93.29	6.04	0.05	0.25	0.00	10.00	0.04
			ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	3.13	99.35	183.33	0.80	0.07	0.14	0.00	0.00	0.06
	น้ำไหล	22	ค่าเฉลี่ย	6.33	100.91	162.85	5.90	0.08	0.28	0.00	10.45	0.42
			ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.92	60.47	204.80	0.52	0.05	0.38	0.00	2.13	0.10
T (การไหลของน้ำ)				1.428	-0.72	-0.844	0.567	-1.339	-0.227	-	-0.596	0.018
P (การไหลของน้ำ)				0.194	0.943	0.406	0.575	0.191	0.822	-	0.556	0.986
ฝน	น้ำนิ่ง	5	ค่าเฉลี่ย	2.40	63.80	41.14	6.90	0.00	0.24	0.00	1.80	0.03
			ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.74	84.24	32.17	0.18	0.00	0.22	0.00	1.64	0.01
	น้ำไหล	23	ค่าเฉลี่ย	3.07	42.65	242.87	7.27	0.00	0.09	0.00	1.48	0.04
			ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.97	38.03	296.43	0.31	0.00	0.14	0.00	2.15	0.05
T (การไหลของน้ำ)				-1.438	0.549	-3.179	-2.557	0	1.967	-	0.313	-0.339
P (การไหลของน้ำ)				0.162	0.610	0.004	0.017	0	0.060	-	0.756	0.687

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

	คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำ								
	กายภาพ					เคมี			
	ออกซิเจน ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณรวมทั้งหมด ของสารที่ละลายใน น้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความขุ่น (มิลลิกรัม)	กรดต่าง	ความเค็ม (ส่วนต่อพัน)	แอมโมเนีย (มิลลิกรัม/ ลิตร)	คลอรีน (มิลลิกรัม/ ลิตร)	ไนเตรต (มิลลิกรัม/ ลิตร)	ไนโตรท์ (มิลลิกรัม/ ลิตร)
T (ความแปรผันของการเก็บตัวอย่างตามฤดูกาล)	9.666	3.367	-0.977	-10.144	6.886	2.231	-	17.236	0.414
P (ความแปรผันของการเก็บตัวอย่างตามฤดูกาล)	<0.001*	0.001*	0.333	<0.001*	<0.001*	0.030*	-	<0.001*	0.681

หมายเหตุ *ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), T = t-test

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการพบเชื้อปรสิตและลักษณะทางด้านกายภาพและด้านเคมีของน้ำพบว่า ปัจจัยปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำ แอมโมเนีย และไนโตรเจน มีความสัมพันธ์ต่อการพบเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า $p = 0.019$ $p = 0.026$ และ $p = 0.002$ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างการพบเชื้อปรสิตลักษณะทางด้านกายภาพและด้านเคมีของน้ำ

เชื้อปรสิต	ทั้งหมด จำนวน (ร้อยละ)	ไม่พบเชื้อ จำนวน (ร้อยละ)	พบเชื้อ จำนวน (ร้อยละ)	Fisher exact	P-value
อัตราการใช้					
น้ำนิ่ง	13 (22.40)	12 (92.30)	1 (7.70)	0.000	1.000
น้ำไหล	45 (77.60)	42 (89.40)	5 (10.60)		
ฤดูกาล					
ฤดูแล้ง	30 (51.70)	27 (90.00)	3 (10.00)	0.000	1.000
ฤดูฝน	28 (48.30)	25 (89.30)	3 (10.70)		
กรดต่าง					
< 7	36 (62.10)	31 (86.10)	5 (13.90)	0.000	0.392
≥ 7	22 (37.90)	23 (95.80)	1 (4.20)		
ความขุ่น					
ขุ่นน้อย (< 25)	21 (36.20)	19 (82.60)	4 (17.40)	2.411	0.313
ขุ่นปานกลาง (25 – 100)	14 (24.10)	13 (92.90)	1 (7.10)		
ขุ่นมาก (≥ 100)	23 (39.70)	22 (95.70)	1 (4.30)		
ปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำ					
1 – 99	47 (81.00)	45 (93.80)	3 (6.30)	7.401	0.019*
100 – 199	8 (13.80)	8 (88.90)	1 (11.10)		
≥ 200	3 (5.20)	1 (33.30)	2 (66.70)		

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

เชื้อปรสิต	ทั้งหมด จำนวน (ร้อยละ)	ไม่พบเชื้อ จำนวน (ร้อยละ)	พบเชื้อ จำนวน (ร้อยละ)	Fisher exact	P-value
ออกซิเจนละลายในน้ำ					
< 4	22 (37.90)	20 (87.00)	3 (13.00)	0.000	0.664
≥ 4	36 (62.10)	34 (91.90)	3 (8.10)		
ความเค็ม					
0.0	38 (65.50)	36 (90.00)	4 (10.00)	0.000	1.000
0.1 – 0.2	20 (34.50)	18 (90.00)	2 (10.00)		
แอมโมเนีย					
0.0 – 0.5	55 (94.80)	53 (93.00)	4 (7.00)	0.000	0.026*
0.6 – 2	3 (5.20)	1 (33.30)	2 (66.70)		
ไนเตรต					
0 – 9	28 (48.30)	27 (90.00)	3 (10.00)	0.000	1.000
10 – 20	30 (51.70)	27 (90.00)	3 (10.00)		
ไนไตรท์					
0.00 – 0.1	54 (93.10)	53 (94.60)	3 (5.40)	20.119	0.002*
0.2 – 0.5	4 (6.90)	1 (25.00)	3 (75.00)		

หมายเหตุ *ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หลังจากนั้นจึงศึกษาหาปัจจัยเสี่ยงของการพบเชื้อปรสิตและลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำพบว่า ปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 200 มีความเสี่ยงต่อการพบเชื้อปรสิตมากกว่าช่วงค่า 1 – 99 ถึง 29.33 เท่า ($p = 0.013$) แอมโมเนียช่วงค่า 0.6 – 2 มีความเสี่ยงต่อการพบเชื้อปรสิตมากกว่าช่วงค่า 0.0 – 0.5 ถึง 25.50 เท่า ($p = 0.015$) และไนไตรท์ช่วงค่า 0.2 – 0.5 มีความเสี่ยงต่อการพบเชื้อปรสิตมากกว่าช่วงค่า 0.00 – 0.1 ถึง 51.00 เท่า ($p = 0.002$) ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ความสัมพันธ์ของปัจจัยทางลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำต่อการพบเชื้อปรสิต

เชื้อปรสิต	ไม่พบเชื้อ จำนวน (ร้อยละ)	พบเชื้อ จำนวน (ร้อยละ)	OR	P-value	95%CI
อัตราการใช้					
น้ำดื่ม	12 (92.30)	1 (7.70)	0.67	0.723	0.71 – 6.274
น้ำใช้	42 (89.40)	5 (10.60)	1.00		
ฤดูกาล					
ฤดูแล้ง	27 (90.00)	3 (10.00)	0.93	0.929	0.17 – 5.01
ฤดูฝน	25 (89.30)	3 (10.70)	1.00		
กรดต่าง					
ต่ำกว่า 7	31 (86.10)	5 (13.90)	3.39	0.281	0.37 – 31.10
สูงกว่า 7	23 (95.80)	1 (4.20)	1.00		
ความขุ่น					
ขุ่นน้อย (< 25)	19 (82.60)	4 (17.40)	5.18	0.158	0.53 – 50.65
ขุ่นปานกลาง ($25 - 100$)	13 (92.90)	1 (7.10)	1.69	0.718	0.10 – 29.41
ขุ่นมาก (≥ 100)	22 (95.70)	1 (4.30)	1.00		
ปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำ					
1 – 99	45 (93.80)	3 (6.30)	1.00		
100 – 199	8 (88.90)	1 (11.10)	2.10	0.546	0.19 – 23.09
≥ 200	1 (33.30)	2 (66.70)	29.33	0.013*	2.08 – 423.66
ออกซิเจนละลายในน้ำ					
< 4	20 (87.00)	3 (13.00)	1.74	0.524	0.32 – 9.48
≥ 4	34 (91.90)	3 (8.10)	1.00		
ความเค็ม					
0.0	36 (90.00)	4 (10.00)	1.06	0.950	0.18 – 6.35
0.1 – 0.2	18 (90.00)	2 (10.00)	1.00		

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

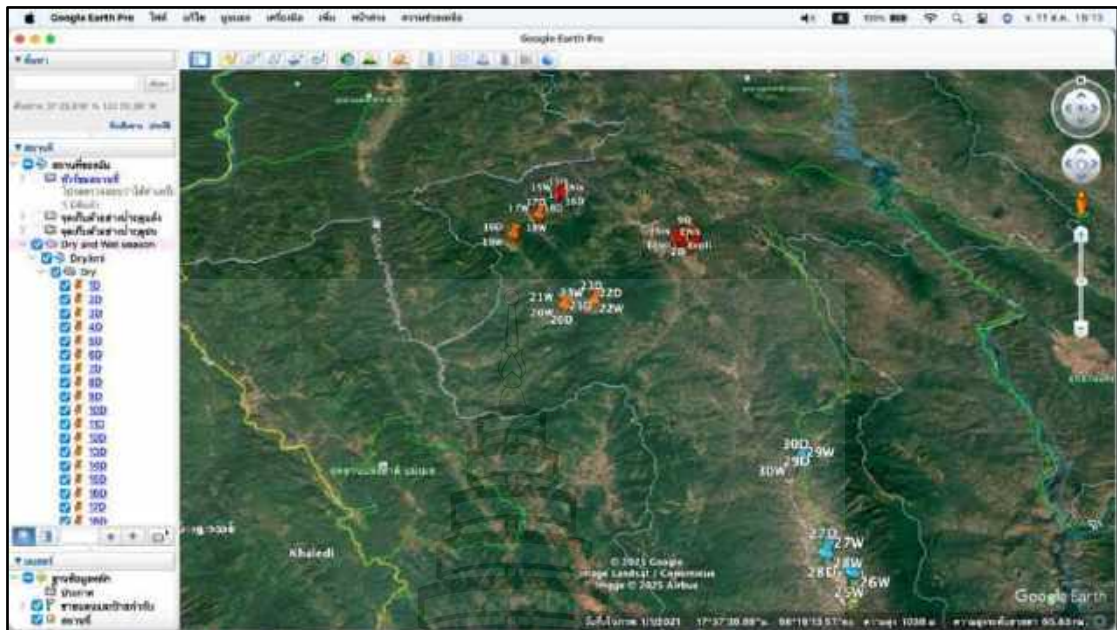
เชื้อปรสิต์	ไม่พบเชื้อ จำนวน (ร้อยละ)	พบเชื้อ จำนวน (ร้อยละ)	OR	P-value	95%CI
แอมโมเนีย					
0.0 – 0.5	53 (93.00)	4 (7.00)	1.00		
0.6 – 2	1 (33.30)	2 (66.70)	25.50	0.015*	1.88 – 345.83
ไนเตรต					
0 – 9	27 (90.00)	3 (10.00)	1.00		
10 – 20	27 (90.00)	3 (10.00)	0.929	0.926	0.17 – 5.02
ไนไตรท์					
0.00 – 0.1	53 (94.60)	3 (5.40)	1.00		
0.2 – 0.5	1 (25.00)	3 (75.00)	51.00	0.002*	4.00 – 649.10

หมายเหตุ OR = Odds ratio, 95%CI = 95% Confidence Interval

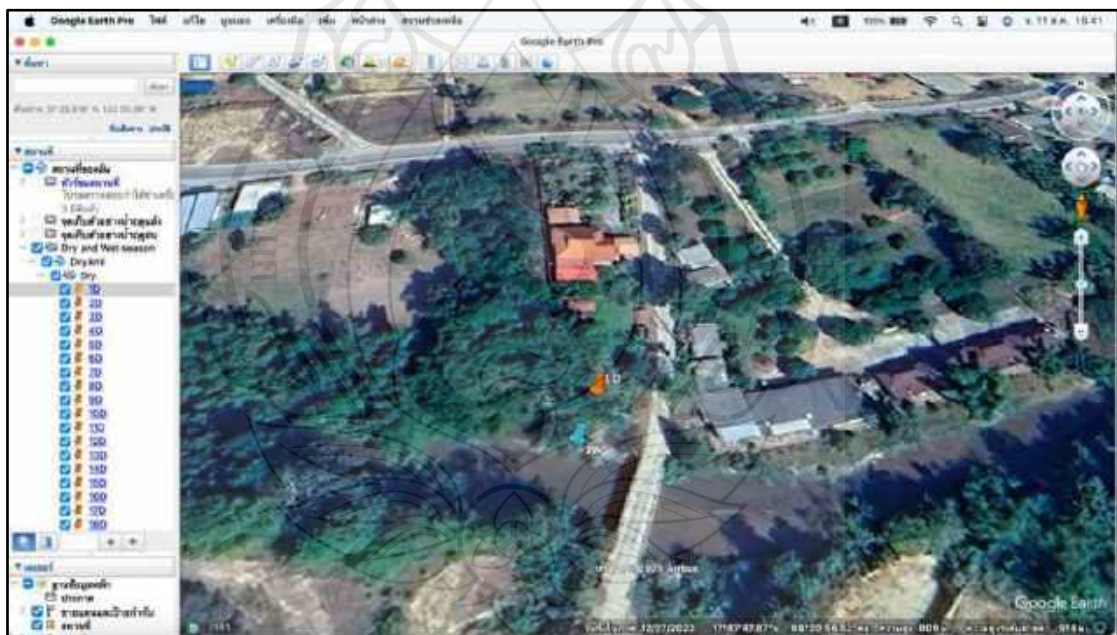
*ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.5 แผนที่จุดการปนเปื้อนของเชื้อปรสิต์ในแหล่งน้ำ

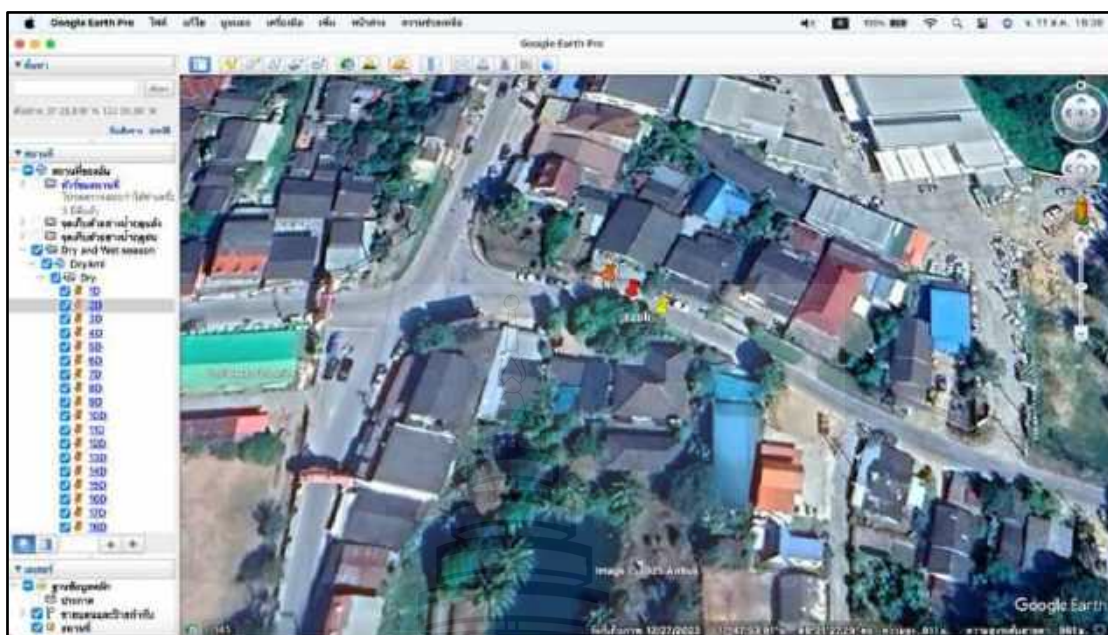
ผลข้อมูลที่แสดงจุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำพร้อมทั้งค่าพารามิเตอร์ทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำ และผลการตรวจพบเชื้อปรสิต์ในแหล่งน้ำใส่ลงใน Google Earth Pro เมื่อเข้าสู่หน้าหลักของโปรแกรม Google Earth Pro สามารถดูข้อมูลต่าง ๆ ได้ในแต่ละจุด โดยหนึ่งจุดจะมีชุดข้อมูลของทั้งฤดูแล้งและฤดูฝน โดยแสดงสีหมุดที่แตกต่างกัน ได้แก่ หมุดสีส้ม = ผลข้อมูลของฤดูแล้ง, หมุดสีฟ้า = ผลข้อมูลของฤดูฝน, หมุดสีเหลือง = แสดงผลการปนเปื้อนของเชื้อปรสิต์ *E. coli* ในจุดเก็บตัวอย่างน้ำ, หมุดสีแดง = แสดงผลการปนเปื้อนของเชื้อปรสิต์ *E. histolytica* ในจุดเก็บตัวอย่างน้ำ ดังภาพที่ 4.6 – 4.9 และในแผนที่มีการปักหมุดแสดงเชื้อปรสิต์ที่ปนเปื้อนบริเวณเก็บตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 2,3,13,15 ดังภาพที่ 4.10 – 4.13 หากต้องการดูข้อมูลเพิ่มเติม สามารถสแกน QR Code ดังภาพที่ 4.14 แต่จะต้องทำการติดตั้งโปรแกรม Google Earth Pro ก่อน จึงจะใช้งานได้



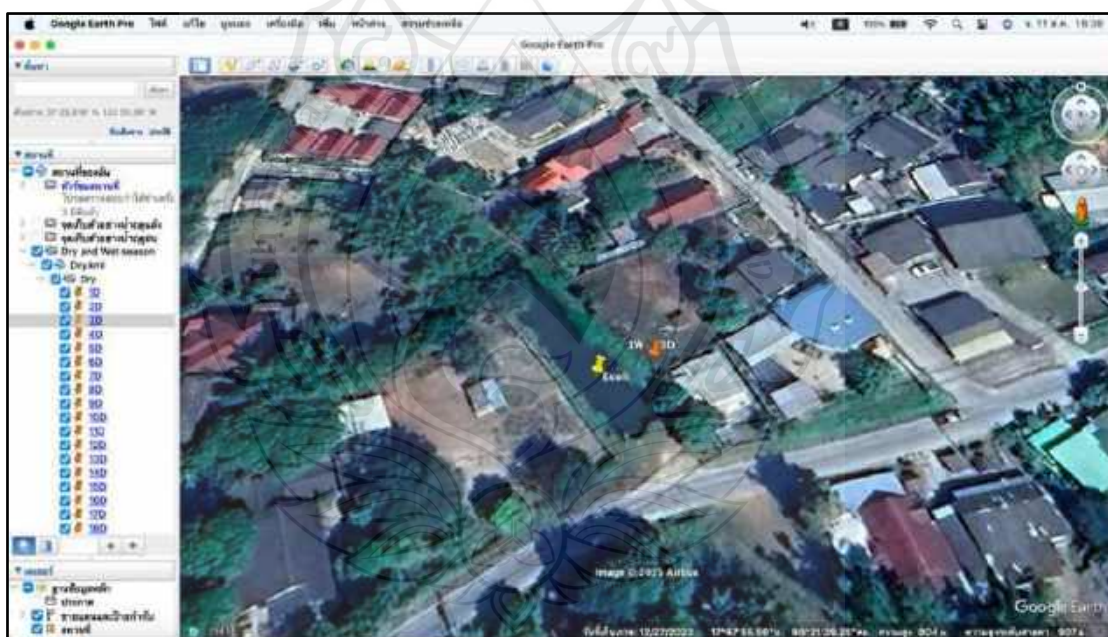
ภาพที่ 4.6 หมุดพิกัดจุดเก็บตัวอย่างน้ำในอำเภออมก๋อย



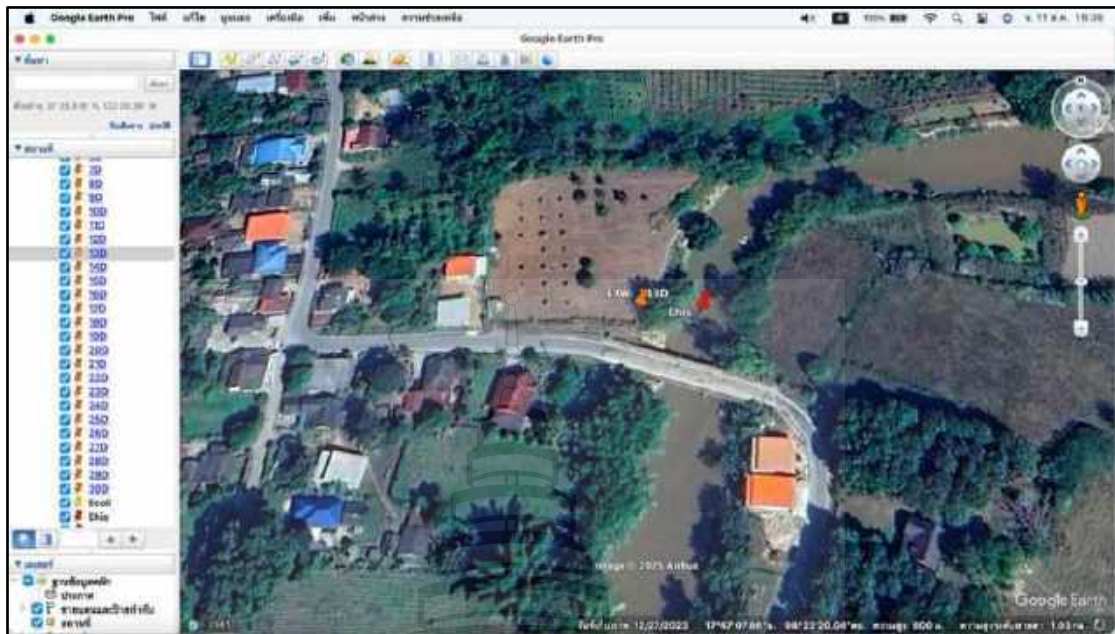
ภาพที่ 4.7 สีหมุดที่แสดงชุดข้อมูลของฤดูแล้งและฤดูฝนในตำแหน่งเดียวกัน



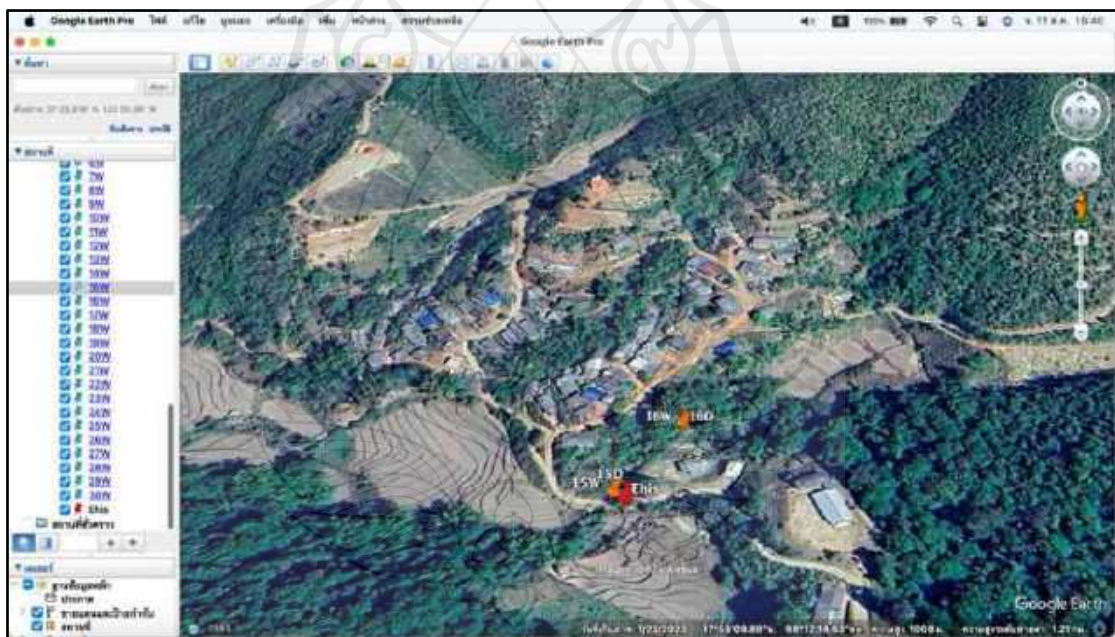
ภาพที่ 4.10 หมุดแสดงเชื้อปรสิตที่ปนเปื้อนตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 2



ภาพที่ 4.11 หมุดแสดงเชื้อปรสิตที่ปนเปื้อนตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 3



ภาพที่ 4.12 หมุดแสดงเชื้อปรสิตที่ปนเปื้อนตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 13



ภาพที่ 4.13 หมุดแสดงเชื้อปรสิตที่ปนเปื้อนตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่ 15



ภาพที่ 4.14 QR Code แผนที่แสดงพิกัดจุดเก็บตัวอย่างน้ำและข้อมูลที่แสดงจุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำ พร้อมทั้งค่าพารามิเตอร์ทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำและผลการตรวจพบเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำอำเภอมวกอ้อย จังหวัดเชียงใหม่

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการศึกษา

5.1.1 ตัวอย่างน้ำ

การศึกษานี้ทำการเก็บข้อมูลทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำฤดูแล้ง 30 ตัวอย่าง และฤดูฝน 28 ตัวอย่าง ในตำแหน่งเดียวกัน รวมทั้งสิ้นเป็น 58 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 20 ลิตร ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้สามารถตรวจพบเชื้อปรสิตในน้ำโดยใช้ปริมาตรน้ำอย่างน้อย 20 ลิตร (Chuah et al., 2016) อีกทั้งการเก็บตัวอย่างน้ำที่ฤดูกาลต่างกันมีผลต่อการพบเชื้อปรสิตที่ต่างกัน (Chuah et al., 2016) ซึ่งพบว่าฤดูกาลและลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีบางค่าของตัวอย่างน้ำมีผลต่อการพบเชื้อปรสิต โดยการพบเชื้อปรสิตจะพบในแหล่งน้ำที่มีลักษณะเป็นน้ำนิ่ง ซึ่งในฤดูแล้งน้ำจะนิ่งกว่าฤดูฝน เพราะการไหลของกระแสน้ำในฤดูฝนแรงกว่าฤดูแล้งทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของซิสต์ที่ลอยอยู่บนผิวน้ำตลอดเวลา การไหลของกระแสน้ำมีผลต่อความขุ่นของน้ำ เนื่องจากในแหล่งน้ำธรรมชาติมีดิน หิน โคลน หวาย หากน้ำไหลแรงจะส่งผลให้ตะกอนเหล่านี้ลอยตัวขึ้นมาปนกับผิวน้ำทำให้น้ำขุ่นมากขึ้นอีกทั้งยังมีฝนที่ตกหนักเกือบทุกวัน บางวันตกมากกว่าหนึ่งครั้ง ในช่วงระหว่างที่อยู่อำเภอมวกเกย จังหวัดเชียงใหม่ น้ำฤดูแล้งจึงขุ่นน้อยกว่าน้ำฤดูฝน ทำให้มีโอกาสพบเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำในช่วงฤดูแล้งที่มีลักษณะนิ่งและขุ่นน้อย ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Chuah et al. (2016) ที่พบเชื้อปรสิตในฤดูฝนมากกว่าฤดูแล้ง จำนวนและตำแหน่งการเก็บตัวอย่างน้ำนั้นคำนวณจากความหนาแน่นของประชากรทั้งหมดของแต่ละตำบลในปี พ.ศ. 2566 และบริเวณตำแหน่งการใช้น้ำของชุมชน ตามลำดับ

5.1.2 การตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้นเป็นวิธีการตรวจหาเชื้อปรสิตเบื้องต้น เป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนต่ำ แต่มีข้อจำกัด คือ มีความไวที่ค่อนข้างน้อย (D'Almeida et al., 2023) ซึ่งโดยทั่วไปจะมีการตรวจโดยใช้วิธีการที่แตกต่างกัน 3 วิธี เพื่อวัตถุประสงค์ในการตรวจเชื้อที่แตกต่างกัน ได้แก่ วิธี Double-slide simple smear ซึ่งเป็นวิธีที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อนและต้นทุนต่ำ เป็นการตรวจหาเชื้อปรสิตเบื้องต้น สามารถตรวจพบเชื้อได้หลากหลาย เพียงแต่สัณฐานวิทยาอาจจะไม่ชัดเจนในเชื้อบางสายพันธุ์ เนื่องจากภาพที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเป็นภาพที่ใสไม่มีสี อาจจะทำให้วินิจฉัยผิดพลาดไม่เชี่ยวชาญเพียงพอ (Lab Pro, 2020) ส่วนวิธี Trichrome Staining เป็นการ

ย้อมสีโปรโตซัวอย่างถาวร ช่วยให้ผู้ตรวจสอบสามารถเห็นโครงสร้างของโปรโตซัวได้ละเอียดชัดเจนขึ้น และสามารถเก็บไว้เป็นหลักฐานได้เป็นเวลานานโดยไม่เสื่อมสภาพ โดยผลที่ได้จะมีดังนี้ นิวเคลียส โครมาติน คาร์โบไฮเดรต แอ็กโซสไตล์ แอ็กโซนิม ติดสีแดงหรือม่วงแดง ไฮโดพลาสซึมติดสีเขียวหรือม่วงเขียว ผนังซิสต์ไม่ติดสี ไข่และตัวอ่อนหนอนพยาธิสีแดงถึงม่วง พื้นเป็นสีเขียวอ่อน (CDC, 2016; Thermo Fisher Scientific, 2021) ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อปรสิตได้ง่ายขึ้น และวิธี Modified Acid Fast Staining เป็นวิธีการย้อมสีทึบเพื่อตรวจหาโอโอซิสต์ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. และอื่น ๆ ซึ่งสีย้อมหลัก Carbol Fuchsin ให้โอโอซิสต์จะติดสีแดง ส่วนสีย้อมพื้นหลัง Methylene Blue ไม่ติดสีย้อมหลักให้สีน้ำเงินหรือฟ้า (CDC, 2016; Thermo Fisher Scientific, 2021) ทำให้สามารถตรวจพบโอโอซิสต์ของเชื้อปรสิตได้ง่าย ซึ่งจากการตรวจหาเชื้อปรสิตเบื้องต้นด้วยวิธีการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ไม่พบซิสต์ของเชื้อปรสิตที่เป็นเป้าหมาย ได้แก่ *G. lamblia* และ *Cryptosporidium* spp. แต่กลับพบซิสต์ที่คล้ายคลึงกับปรสิตชนิดอื่น เช่น *Entamoeba coli* และ *Entamoeba histolytica* หรือ *Entamoeba dispar* ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าปริมาณของซิสต์และโอโอซิสต์ของเชื้อกลุ่มเป้าหมายมีค่อนข้างน้อย เนื่องจากการที่จะสามารถตรวจพบซิสต์และโอโอซิสต์ดังกล่าวจะต้องมีความเข้มข้นของซิสต์และโอโอซิสต์อย่างน้อย 9 และ 10 ซิสต์/โอโอซิสต์ ต่อ มิลลิลิตร (Chuah et al., 2016) อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการตรวจยืนยันด้วยการใช้ปริมาณตะกอนน้ำที่มากขึ้น และวิธีการตรวจที่มีความไวและความจำเพาะมากขึ้น

5.1.3 การตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยวิธีการตรวจดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Nested PCR และการยืนยันด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส

การตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยวิธีการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค Nested PCR ที่ช่วยเพิ่มความจำเพาะเจาะจงให้กับตรวจยืนยันเชื้อปรสิตเป้าหมายและนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยวิธีของแซงเกอร์ ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการตรวจยืนยันเชื้อปรสิต *G. lamblia* และ *Cryptosporidium* spp. (Chuah et al., 2016; Zhang et al., 2022; Barbosa et al., 2023) แต่วิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับในระดับสากลคือวิธี Immunomagnetic Separation (IMS)/Fluorescent Antibody (FA) โดยเป็นเทคนิคที่ใช้อนุภาคแม่เหล็กที่เคลือบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อปรสิตเป้าหมายในการแยกเชื้อออกจากตัวอย่างน้ำอย่างจำเพาะเจาะจงร่วมกับเทคนิคการตรวจจับเชื้อปรสิตด้วยสฟลูออเรสเซนต์ที่ติดอยู่กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อปรสิตเป้าหมาย ซึ่งถูกกำหนดไว้ใน USEPA 1623 ของสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อม ประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S. EPA, 2005) ซึ่งมีหลายการศึกษาที่ใช้เทคนิคนี้เพื่อตรวจยืนยันเชื้อปรสิต *G. lamblia* และ *Cryptosporidium* spp. การศึกษาของ Kumar et al. (2016) ใช้เทคนิค IMS เพื่อระบุ (โอโอ) ซิสต์ของเชื้อปรสิต *G. lamblia* และ *Cryptosporidium* spp. ในตัวอย่างน้ำที่ผ่านการ

บำบัดและไม่ผ่านการบำบัด ตัวอย่างแหล่งน้ำธรรมชาติและแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้นในการศึกษาของ Chuah et al. (2016) ได้ใช้เทคนิค IMS เพื่อระบุและนับจำนวนของ (โอโอ) ซีสต์ของเชื้อปรสิต *G. lamblia* และ *Cryptosporidium spp.* และการศึกษาของ Moreno-Mesonero et al. (2023) ตรวจสอบเชื้อปรสิตที่ปนเปื้อนอยู่ในผักและผลไม้โดยใช้เทคนิค IMS แต่เนื่องจากการศึกษาของผู้วิจัยมีงบประมาณจำกัด จึงไม่ได้ใช้เทคนิค IMS/FA เพราะเทคนิคนี้จำเป็นต้องใช้ต้นทุนที่สูง และต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะ

5.1.4 ความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตและลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำ

การหาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตและลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำสามารถใช้สำหรับวิเคราะห์ลักษณะของแหล่งน้ำที่มีความเสี่ยงของการปนเปื้อนปรสิตซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อประชาชนผู้ใช้น้ำสำหรับอุปโภคและบริโภคที่ไม่ผ่านการบำบัดน้ำก่อนใช้ เนื่องจากในบางพื้นที่ เช่น พื้นที่อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ เป็นพื้นที่ที่ขาดสาธารณูปโภคขั้นพื้นฐาน เช่น ระบบน้ำประปา ประชาชนส่วนใหญ่จึงจำเป็นต้องใช้น้ำประปาภูเขาที่ยังไม่ผ่านการบำบัด ทำให้มีความเสี่ยงในการได้รับเชื้อปรสิตเข้าสู่ร่างกาย โดยจากรายงานก่อนหน้านี้นี้พบว่าพื้นที่อมก๋อยมีผู้ที่ติดเชื้อปรสิตในลำไส้ค่อนข้างสูง (Yanola et al., 2018) ซึ่งเชื่อที่พบส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อมาน้ำ ดังนั้นการหาความสัมพันธ์นี้จะทำให้ประชาชนผู้ใช้น้ำสามารถหลีกเลี่ยงแหล่งน้ำที่เป็นจุดเสี่ยงที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อปรสิต

จากผลการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณแอมโมเนีย และปริมาณไนโตรเจนในน้ำที่สูง เป็นแหล่งน้ำที่มีความเสี่ยงต่อการพบเชื้อปรสิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ในการศึกษาของ Onichandran et al. (2014) ยังพบว่า แหล่งน้ำที่มีแอมโมเนียและไนโตรเจนสูงเป็นแหล่งน้ำที่มีความเสี่ยงสูงสำหรับการพบเชื้อปรสิต ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ แต่ในการศึกษาของ Onichandran et al. (2013) พบว่าแหล่งน้ำปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำมีความเสี่ยงต่อการพบเชื้อปรสิต *Schistosoma spp.* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$

จากปัจจัยที่พบดังกล่าวจึงสามารถให้ข้อเสนอแนะได้ว่าแหล่งน้ำในอมก๋อยมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อปรสิตได้แก่ *E. coli* และ *E. histolytica* และอาจจะมีเชื้อปรสิตอื่น ๆ อีกที่ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติทุกครั้งก่อนการอุปโภคบริโภคด้วยวิธีการต้ม การกรองแบบธรรมชาติ การใช้สารเคมี (Mitrwater., 2022) ทั้งนี้ หากไม่สามารถบำบัดน้ำได้ ควรหลีกเลี่ยงแหล่งน้ำที่มีสาหร่ายสีเขียวเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากมีรายงานว่า แหล่งน้ำที่มีปริมาณแอมโมเนียและไนโตรเจนสูง มักจะมีสาหร่ายสีเขียวเจริญเติบโตได้ดี (Chen et al., 2009)

5.1.5 การจัดทำแผนที่จุดการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำ

นอกจากการวิเคราะห์ถึงแหล่งน้ำที่มีความเสี่ยงสูงในการปนเปื้อนเชื้อปรสิตแล้ว การศึกษานี้ยังมีการจัดทำแผนที่จุดการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตที่มีการตรวจยืนยันทั้งหมดในครั้งนี้อย่างน้อย 30 จุด (ในฤดูแล้งและฤดูฝน) รวมถึงข้อมูลลักษณะทางกายภาพและเคมีของแหล่งน้ำแต่ละแห่ง โดยก่อนหน้านี้เคยมีรายงานว่าการสร้างแผนที่จุดการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตแบบนี้มีประโยชน์มากสำหรับการเฝ้าระวัง และการบำบัดแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ (Chuah et al., 2016) โดยหน่วยงานในพื้นที่ อ.อมก๋อยที่ได้รับผลประโยชน์จากข้อมูลการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตในแหล่งน้ำ ได้แก่ หน่วยจัดการต้นน้ำในอำเภออมก๋อย และสำนักงานสาธารณสุขอำเภออมก๋อย สำหรับการนำข้อมูลที่ได้รับไปจัดทำแผนการบำบัดแหล่งน้ำอุปโภคบริโภคและจัดทำโครงการป้องกันการติดเชื้อปรสิตจากแหล่งน้ำ ตามลำดับ หากได้รับผลการตอบรับจากหน่วยงานภาครัฐต่อโครงการวิจัยนี้ไปในทางที่ดี ทางคณะผู้วิจัยมีแผนการดำเนินงานแบบเดียวกันกับพื้นที่อื่น ๆ ในประเทศไทยที่ยังขาดสาธารณูปโภคขั้นพื้นฐานที่ดีอีกด้วย

5.2 สรุปผลการศึกษา

ในการศึกษานี้พบว่า มีการปนเปื้อนของเชื้อปรสิต *E. coli* (1 แหล่งในฤดูแล้ง 1 แหล่งในฤดูฝน) *E. histolytica* (2 แหล่งในฤดูแล้ง 2 แหล่งในฤดูฝน) และไม่พบว่า มีการปนเปื้อนของเชื้อ *G. lamblia* และ *Cryptosporidium spp.* นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งน้ำที่มีปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำแอมโมเนียและไนโตรเจนสูง มีความเสี่ยงในการพบเชื้อปรสิต

สีหมุดในแผนที่ Google Earth Pro แสดงบริเวณแหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่างแตกต่างกันในแต่ละฤดูอย่างชัดเจน ทำให้แยกความแตกต่างของข้อมูลในฤดูแล้งและฝนออก เพื่อง่ายต่อการดูแผนที่ อีกทั้งยังเพิ่มการปกคลุมเชื้อปรสิตในบริเวณแหล่งน้ำที่มีการพบเชื้อปรสิต

โดยลักษณะของแหล่งน้ำที่มีโอกาสการปนเปื้อนของเชื้อปรสิตมักมีสาหร่ายสีเขียวเจริญเติบโตได้ดี อันเนื่องมาจากปริมาณรวมทั้งหมดของสารที่ละลายในน้ำแอมโมเนียและไนโตรเจนที่สูง

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ข้อเสนอแนะสำหรับชาวเขาและชาวบ้าน

สำหรับชาวเขาและชาวบ้านที่อาศัยอยู่ในอำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ หากจะนำน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาอุปโภคบริโภคควรหลีกเลี่ยงการใช้แหล่งน้ำที่มีลักษณะมีความขุ่นน้อย น้ำนิ่ง และบริเวณที่มีสาหร่ายสีเขียวทำให้มีความเสี่ยงต่อการพบเชื้อปรสิตและโซไฟยา ควรใช้แหล่งน้ำธรรมชาติที่มีลักษณะการไหลที่แรงและไม่มีสาหร่ายอยู่บริเวณนั้น หากต้องการถ่ายของเสียแต่อยู่ในพื้นที่ที่ห่างไกลจากห้องน้ำ ควรฝังของเสียลึกประมาณ 20 เซนติเมตร และห่างจากบริเวณแหล่งน้ำธรรมชาติอย่างน้อยประมาณ 60 เมตร (CDC, 2025) การรับประทานอาหารที่ปรุงสุกและสะอาด การล้างมือให้สะอาดก่อนการปรุงและรับประทานอาหาร การต้มน้ำที่ต้มเดือดหรือผ่านการกรองน้ำด้วยวิธีธรรมชาติ คือ วิธีการปล่อยให้ น้ำไหลผ่านชั้นกรอง วัสดุดิบได้แก่ ก้อนกรวด ใช้กรองสิ่งแปลกปลอมชิ้นใหญ่ ทราบ ใช้กรองสิ่งแปลกปลอมชิ้นเล็ก ถ่าน ใช้กรองสารพิษที่ปนมากับน้ำและเชื้อโรคต่าง ๆ และกำจัดกลิ่นจากน้ำ นุ่น สาลี ผ้า เป็นการกรองด้านสุดท้ายเพื่อกักเศษผงที่หลุดรอดออกมาจากชั้นต่าง ๆ แต่การกรองด้วยวิธีเป็นเพียงการกรองในขั้นต้นเท่านั้น อีกวิธีคือการใช้สารเคมี ได้แก่ คลอรีน โดยเติมลงในน้ำคนให้ละลาย ปิดฝาทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนนำน้ำไปใช้ควรเปิดฝาดังให้คลอรีนระเหยออก ดังทบทิม ใช้ 0.5 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ทิงเจอร์ไอโอดีน ใช้ 6 หยด ต่อน้ำ 1 ลิตร ทิ้งไว้ครึ่งชั่วโมง และสารส้ม แก้วสารส้มในน้ำจางตะกอนเริ่มจับตัว โดยทำการแกว่งที่ความลึกประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของความลึกน้ำจากผิวน้ำ แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีตะกอนจะตกลงสู่ก้น ถัง ได้น้ำใสนำไปใช้ รวมทั้งการถ่ายอุจจาระให้ถูกสุขลักษณะเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของอุจจาระในสิ่งแวดล้อมจะช่วยป้องกันการติดเชื้อได้

5.3.2 ข้อเสนอแนะสำหรับองค์กรภาครัฐ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

องค์กรภาครัฐ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรมีการพัฒนานโยบายเกี่ยวกับสุขภาพ การประปา ควรมีการเพิ่มการผลิตน้ำประปาที่มีคุณภาพในพื้นที่ที่ห่างไกลความเจริญ หรือมีการจัดการเกี่ยวกับการบำบัดน้ำ กรองน้ำเพื่อให้ น้ำที่จะนำมาอุปโภคบริโภคมีคุณภาพมากยิ่งขึ้น มีการเพิ่มการฆ่าเชื้อปรสิตที่มากขึ้นเพื่อลดความเสี่ยงในการติดเชื้อ มีการให้ความรู้เกี่ยวกับสุขอนามัยและสุขภาพ

5.4 ข้อจำกัดในการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้มีข้อจำกัดได้แก่ งบประมาณการวิจัยที่มีอย่างจำกัดทำให้ไม่สามารถใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์มาตรฐานที่แนะนำจากสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อม ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ (U.S. EPA, 2005) และเส้นทางการเดินทางไปเก็บตัวอย่างน้ำ เนื่องจากบางพื้นที่ไม่มีถนน ถนนชำรุด ไม่มีการซ่อมแซม ถนนขาด ในช่วงฤดูฝนดินบนถนนและเป็นโคลนทำให้รถยนต์หรือรถตู้ไม่สามารถเดินทางไปได้ อีกทั้งในบางพื้นที่ไม่มีสัญญาณอินเทอร์เน็ตและสัญญาณโทรศัพท์ หากไม่ชำนาญทาง อาจทำให้เกิดการหลงอยู่ในป่าเขาและเกิดอันตรายต่าง ๆ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องจ้างให้ชาวบ้านในพื้นที่ที่มีความชำนาญในเส้นทางรวมถึงการขับรถมาช่วยในการนำทางไปเก็บตัวอย่างน้ำในจุดต่าง ๆ



รายการอ้างอิง

กลุ่มงานเคมี ส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์ และสำนักวิจัยและพัฒนา กรมชลประทาน.

(2550). คู่มือการปฏิบัติงานการวิเคราะห์คุณภาพน้ำกลุ่มงานวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์.

http://kmcenter.rid.go.th/kcresearch/MANUAL/water_analysis.pdf

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยี กรมวิชาการเกษตร. การ

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.

(2563). การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอพืชอย่างรวดเร็ว.

<https://www.doa.go.th/biotech/wp-content/uploads/2020/09/KM.pdf>

คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. (2560). ปฏิบัติการ

ชีววิทยา 2 (Biology Laboratory 2). (พิมพ์ครั้งที่ 2). ตักสิลาการพิมพ์.

นิमित มรกต และ คมสุคนธ์สรรพ. (2560). ปรสิตวิทยาทางการแพทย์ I. โปรโตซัว. ภาควิชาปรสิต

วิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

https://w1.med.cmu.ac.th/parasite/wp-content/uploads/2024/10/Protozoa_.pdf

ประสิทธิ์ ประครองศรี และ มานะ เก่งชูวงศ์. (2559). การถอดบทเรียนการจัดการประปาภูเขาเพื่อ

ความพอเพียงต่อการอุปโภคและบริโภคในระดับชุมชน กรณีศึกษา: ระบบประปาภูเขาชุมชน

ห้วยน้ำใส บ้านจันทระเพ็ญ ตำบลจันทระเพ็ญ อำเภอเต่างอย จังหวัดสกลนคร.

https://www.ubu.ac.th/web/files_up/08f2016082509544248.pdf

พัฒนา มุลพฤกษ์. (2546). อนามัยสิ่งแวดล้อม ฉบับปรับปรุง (พิมพ์ครั้งที่ 3). บริษัท ชิกม่า ดีไซน์

กราฟฟิก จำกัด.

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. (ม.ป.ป.) วิธีตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ปรสิตวิทยาทางการแพทย์ Laboratory methods in medical parasitology. สืบค้นเมื่อ 9

มิถุนายน 2568, จาก [https://w1.med.cmu.ac.th/parasite/wp-](https://w1.med.cmu.ac.th/parasite/wp-content/uploads/2024/10/Parasitology-Laboratory-Manual.pdf)

[content/uploads/2024/10/Parasitology-Laboratory-Manual.pdf](https://w1.med.cmu.ac.th/parasite/wp-content/uploads/2024/10/Parasitology-Laboratory-Manual.pdf)

สถานภูมิภาคเทคโนโลยีอวกาศและภูมิสารสนเทศ ภาคเหนือตอนล่าง มหาวิทยาลัยนเรศวร. (2560).

คู่มือการใช้โปรแกรม Quantum GIS.

<https://water.rid.go.th/waterm/template/manager/mc/Doc/Gis/qGIS.pdf>

สำนักงานพัฒนาชุมชนอำเภออมก๋อย. (2559). *ประวัติความเป็นมา*.

[https://district.cdd.go.th/omkoi/about-](https://district.cdd.go.th/omkoi/about-us/%e0%b8%9b%e0%b8%a3%e0%b8%b0%e0%b8%a7%e0%b8%b1%e0%b8%95%e0%b8%b4%e0%b8%84%e0%b8%a7%e0%b8%b2%e0%b8%a1%e0%b9%80%e0%b8%9b%e0%b9%87%e0%b8%99%e0%b8%a1%e0%b8%b2/)

[us/%e0%b8%9b%e0%b8%a3%e0%b8%b0%e0%b8%a7%e0%b8%b1%e0%b8%95%e0%b8%b4%e0%b8%84%e0%b8%a7%e0%b8%b2%e0%b8%a1%e0%b9%80%e0%b8%9b%e0%b9%87%e0%b8%99%e0%b8%a1%e0%b8%b2/](https://district.cdd.go.th/omkoi/about-us/%e0%b8%9b%e0%b8%a3%e0%b8%b0%e0%b8%a7%e0%b8%b1%e0%b8%95%e0%b8%b4%e0%b8%84%e0%b8%a7%e0%b8%b2%e0%b8%a1%e0%b9%80%e0%b8%9b%e0%b9%87%e0%b8%99%e0%b8%a1%e0%b8%b2/)

อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และฉันทชัย สุระ. (2534). ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์ II.

Polymerase Chain Reaction. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต*, 1(4), 469-477.

Apidechkul, T., (2015). Prevalence and risk factors of intestinal parasitic infections among hill tribe schoolchildren, northern Thailand. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 5, 695–699.

Babaei, Z., Oormazdi, H., Rezaie, S., Rezaeian, M., & Razmjou, E. (2011). Giardia intestinalis: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Experimental Parasitology*, 128(2), 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.001>

Barbosa, A. D., Egan, S., Feng, Y., Xiao, L., & Ryan, U. (2023). *Cryptosporidium* and *giardia* in cats and dogs: What is the real zoonotic risk? *Current Research in Parasitology Vector-Borne Diseases*, 4, 100158. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2023.100158>

Cacciò, S. M., De Giacomo, M., & Pozio, E. (2002). Sequence analysis of the β -*Giardin* Gene and development of a polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assay to genotype *giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1023–1030. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00068-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00068-1)

Centers for Disease Control and Prevention. (2016). *CDC - DPDx - diagnostic procedures - stool specimens*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/stool/staining.html#:~:text=Tri chrome%20Staining%20Procedure&text=The%20permanent%20stained%20sme ar%20facilitates,seen%20on%20the%20stained%20smear>

Centers for Disease Control and Prevention. (2019a). *CDC - dpdx - intestinal (non-pathogenic) Amebae*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/intestinalamebae/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (2019b). *CDC - dpdx - amebiasis*. Centers for Disease Control and Prevention.

<https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (2021). *Parasites – Cryptosporidium (also known as “Crypto”)*. Centers for Disease Control and Prevention.

<https://www.cdc.gov/parasites/crypto/general-info.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (2024c). *CDC - dpdx - cryptosporidiosis*. Centers for Disease Control and Prevention.

<https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (2024d). *CDC - dpdx - giardiasis*. Centers for Disease Control and Prevention.

<https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (2025). *About water treatment options when hiking, camping, or traveling*. Centers for Disease Control and Prevention.

https://www.cdc.gov/drinking-water/prevention/water-treatment-hiking-camping-traveling.html?CDC_AAref_Val=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fhealthywater%2Fdrinking%2Ftravel%2Findex.html

Chen, W., Zhang, Q., & Dai, S. (2009). Effects of nitrate on intracellular nitrite and growth of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 21(6), 701–706. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9405-1>

Chuah, C. J. Mukhaidin, N. Choy, S. H. Smith, G. J. D. Mendenhall, I. H. Lim, Y. A. L. & Ziegler, A. D. (2016). Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the water resources of the Kuang River catchment, Northern Thailand. *Sci. Total Environ*, 562, 701–713.

D’Almeida, C. de. Sammarro Silva, K. J., Sabogal-Paz, L. P., & Pratavieira, S. (2023). Label-free detection and quantification of *giardia duodenalis* cysts using a lens-free microscope. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(5), 110932. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110932>

- Khairnar, K., & Parija, S. C. (2007). A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. Moshkovskii* and *E. Dispar* DNA in stool samples. *BMC Microbiology*, 7(1), 47.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-47>
- Koompapong K., & Sukthana Y. (2012). Seasonal variation and potential sources of *Cryptosporidium* contamination in surface waters of Chao Phraya River and Bang Pu Nature Reserve pier, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 43(4), 832-40.
- Kumar, T. Lim, Y. A. Sulaiman, W. Y. Sawangjaroen, N. Salibay, C. C. Dungca, J. Z., . . . Andiappan, H. (2014). Comparative study on waterborne parasites between Malaysia and Thailand: A new insight. *Am J Trop Med Hyg*, 90(4), 682–689.
- Kumar, T., Majid M. A., Onichandran, S., Jaturas, N., Andiappan, H., Salibay, C. C. A. L., . . . Nissapatorn, V. (2016). Presence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water samples from Southeast Asia: Towards an integrated water detection system. *Infect Dis Poverty*, 5(1).
- Kumar, T., Majid, M. A., Onichandran, S., Jaturas, N., Andiappan, H., Salibay, C. C., A. L., . . . Nissapatorn, V. (2016). Presence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water samples from Southeast Asia: Towards an integrated water detection system. *Infectious Diseases of Poverty*, 5(1).
<https://doi.org/10.1186/s40249-016-0095-z>
- Lab Pro. (2020). *The ultimate guide to choosing a compound light microscope: Pros, cons and limitations*. Lab Pro Inc. <https://labproinc.com/blogs/microscopes-lighting-and-optical-inspection/the-ultimate-guide-to-choosing-a-compound-light-microscope-pros-cons-and-limitations#:~:text=The%20magnifying%20power%20of%20a,t%20be%20viewed%20with%20it>
- Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., & Cacciò, S. M. (2005). Genetic heterogeneity at the β -*giardin* locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal for Parasitology*, 35(2), 207–213.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.022>

- Maneeboonyang, W., Prommongkol, S., Wongjindanon, N., Treerattanapiboon, L., Pasuralertsakul, S., Chaimungkun, W., & Puangsa-Art, S. (2008). Reexamination of parasitic infections in Karen children on the western border of Thailand: two-year follow-up. *J. Trop. Med. Parasitol*, 31(2), 77–84.
- McPherson, M. J., & MØller, S. G. (2000). *PCR*.
https://research.ebsco.com/c/faem6i/ebook-viewer/pdf/x5yeqqm2e5/page/pp_Cover?location=https%25253A%25252F%25252Fresearch.ebsco.com%25252Fc%25252Ffaem6i%25252Fsearch%25252Fdetails%25252Fx5yeqqm2e5
- Mitrwater. (2022). 7 เคล็ดลับวิธีการกรองน้ำบาดาลแบบธรรมชาติที่ปลอดภัยที่สุด. MITRWATER.
https://mitrwater.com/how-to-filter-groundwater-naturally/#5kha_cheux_rokh_doy_chi_sar_khemi
- Moreno-Mesonero, L., Soler, L., Amorós, I., Moreno, Y., Ferrús, M. A., & Alonso, J. L. (2023). Protozoan parasites and free-living amoebae contamination in organic leafy green vegetables and strawberries from Spain. *Food and Waterborne Parasitology*, 23(32). <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2023.e00200>
- Ngrenngamlert, W., Lamom, C., Pasuralertsakul, S., Yaicharoen, R., Wongjindanon, N., Sripochang, S., . . . Kiatfuengfoo, R. (2007). Intestinal parasitic infections among school children in Thailand. *Trop. Biomed*, 24(2), 83–88.
- Onichandran, S., Kumar, T., Salibay, C. C., Dungca, J. Z., Tabo, H. A., Tabo, N., . . . Nissapatorn, V. (2014). Waterborne parasites: A current status from the Philippines. *Parasites Vectors*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-244>
- Piangjai, S., Sukontason, K., Sukontason, K. L. (2003). Intestinal parasitic infections in hill-tribe Schoolchildren in Chiang Mai, northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 34(2), 90-3.
- Pretorius, M., & Avenant-Oldewage, A. (2021). Parasites as biological indicators: The impact of Environmental Quality on the infections of *Lamproglana clariae* (crustacea) on *Clarias gariepinus* along the Vaal River, South Africa. *Biological Trace Element Research*, 200(6), 2937–2947. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02899-5>

- Rattaprasert, P., Nitatsukprasert, C., Thima, K., & Chavalitsheewinkoon-Petmitr, P. (2021). *Development of Nested PCR for Identification of Entamoeba coli in Stool Samples*. Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-965132/v1>
- Robin, Nathaniel H. & Farmer, Meagan B. (2018). *Pediatric Cancer Genetics*. Elsevier Inc.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A., Pavlasek, I. (2003). Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol*, 69(7), 4302–4307.
- Saksirisampant, W., Prownebon, J., Kanmarnee, P., Thaisom, S., Yenthakam, S., Nuchprayoon, S. (2004). Prevalence of parasitism among students of the Karen hilltribe in Mae Chame district, Chiang Mai province, Thailand. *J. Med. Assoc. Thai*, 87(2), S278–S283.
- Saksirisampant, W., Prownebon, J., Kulkumthorn, M., Yenthakam, S., Janpla, S., Nuchprayoon, S. (2006). Prevalence of intestinal parasitic infections among school children in the central region of Thailand. *J. Med. Assoc. Thai*, 89(11), 1928–33.
- Snelling, W. J., Xiao, L., Ortega-Pierres, G., Lowery, C. J., Moore, J. E., Rao, J. R., . . . Dooley, J. S. G. (2007). Cryptosporidiosis in developing countries. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 1(03), 242–256. <https://doi.org/10.3855/jidc.360>
- Sroka, J., Stojcecki, K., Zdybel, J., Karamon, J., Cencek, T., & Dutkiewicz, J. (2013). Occurrence Of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Effluent from Sewage Treatment Plant from Eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*, 1, 57–62.
- Sulaiman, I. M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R. H., Trout, J. M., Schantz, P. M., . . . Xiao, L. (2003). Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases*, 9(11), 1444–1452. <https://doi.org/10.3201/eid0911.030084>
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). (2012). *Method 1623.1: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA*. <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/labcert/upload/epa816r12001.pdf>.

Verweij, J. J., Polderman, A. M., & Clark, C. G. (2001). Genetic Variation among Human Isolates of Uninucleated Cyst-Producing *Entamoeba* Species. *J Clin Microbiol. Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1644–1646.

<https://doi.org/10.1128/jcm.39.4.1644-1646.2001>

Walkowski, S. (n.d.). *Wikipedia, the free encyclopedia*. Retrieved April 12, 2025, from https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Entamoeba_histolytica_quadrinucleate_cyst.jpg

Yanola, J., Nachaiwieng, W., Duangmano, S., Prasannarong, M., Somboon, P., & Pornprasert, S. (2018). Current prevalence of intestinal parasitic infections and their impact on hematological and nutritional status among Karen hill tribe children in Omkoi District, Chiang Mai Province, Thailand. *Acta Tropica*, 30(180), 1-6.

Zhang, Y., Chen, J., Pan, H., Ma, X., Jiang, L., Zhu, Q., Wu, H., & Wang, Z. (2022). Development and preliminary application of a triplex real-time quantitative PCR assay for the simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *cryptosporidium parvum*. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.888529>

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1.1 การเตรียม Phosphate Buffered Saline ผสมกับ Tween® 20

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 6.8 กรัม
2. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 1.5 กรัม
3. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 0.43 กรัม
4. น้ำกลั่น (dH_2O) 1 ลิตร
5. Tween® 20 10 มิลลิลิตร

1.2 ขั้นตอนการเตรียม Phosphate Buffered Saline ผสมกับ Tween® 20

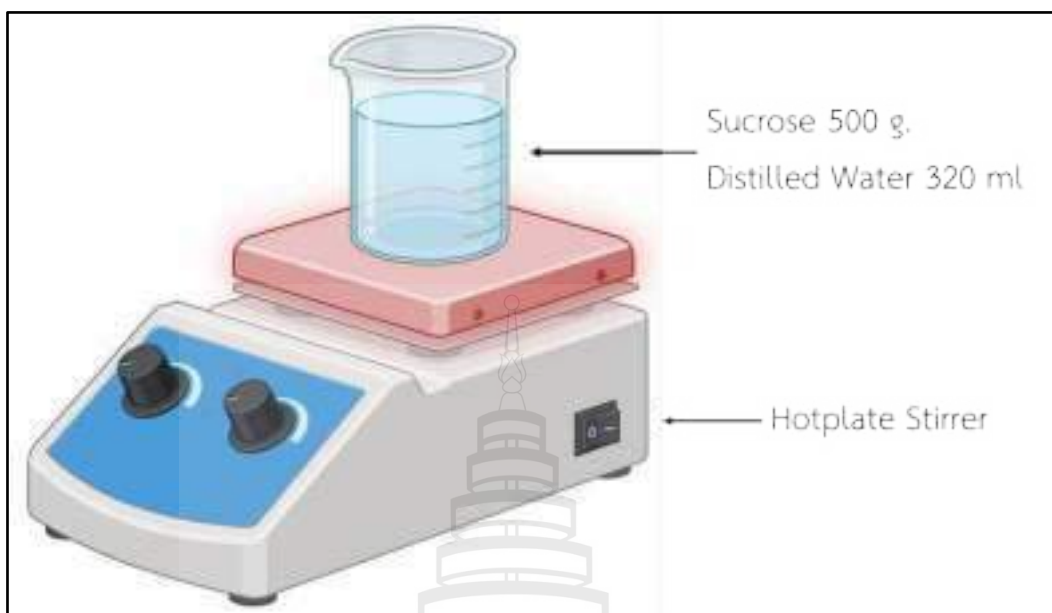
1. ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 6.8 กรัม
2. ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 1.5 กรัม
3. ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 0.43 กรัม
4. เทสารทั้งสามลงในบีกเกอร์
6. เติม Tween® 20 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มี PBS
5. เติมน้ำกลั่น (dH_2O) ประมาณ 70 มิลลิลิตร
6. ใช้แท่งแก้วคนจนเป็นเนื้อเดียวกัน
7. เติมน้ำกลั่น (dH_2O) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร

2.1 การเตรียมสารละลายซูโครส

1. ซูโครส 500 กรัม
2. น้ำกลั่น (dH_2O) 320 มิลลิลิตร

2.2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายซูโครส

1. ชั่งซูโครส 500 กรัม ใส่ในบีกเกอร์
2. เติมน้ำกลั่น (dH_2O) ประมาณ 200 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีซูโครส
3. ใช้เครื่อง Hotplate Stirrer กวนจนซูโครสละลายจนหมด
4. เติมน้ำกลั่น (dH_2O) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 320 มิลลิลิตร



3. การเตรียมฟอร์มาลีนร้อยละ 10 ที่ผสมกับกลีเซอรอลร้อยละ 10

3.1 การเตรียมฟอร์มาลีนร้อยละ 10

1. ฟอร์มาลีน 10 มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น (dH_2O) 90 มิลลิลิตร

3.2 ขั้นตอนการเตรียมฟอร์มาลีนร้อยละ 10

1. เติมฟอร์มาลีน 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น (dH_2O) ประมาณ 70 มิลลิลิตร ลงในปิកเกอร์
2. ใช้แท่งแก้วคนจนเป็นเนื้อเดียวกัน
3. เติมน้ำกลั่น (dH_2O) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 90 มิลลิลิตร

3.3 การเตรียมกลีเซอรอลร้อยละ 10

1. กลีเซอรอล 10 มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น (dH_2O) 90 มิลลิลิตร

3.4 ขั้นตอนการเตรียมกลีเซอรอลร้อยละ 10

1. เติมกลีเซอรอล 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น (dH_2O) ประมาณ 70 มิลลิลิตร ลงในปิกเกอร์
2. ใช้แท่งแก้วคนจนเป็นเนื้อเดียวกัน

3. เติมน้ำกลั่น (dH_2O) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 90 มิลลิลิตร

4.1 การเตรียมผสมสี Trichrome

1. Chromotrope 2R 6.00 กรัม
2. Light green SF 0.15 กรัม
3. Fast green FCF 0.15 กรัม
4. Phosphotungstic acid 0.70 กรัม
5. Glacial acetic acid 1.0 มิลลิลิตร
6. น้ำกลั่น (dH_2O) 100 มิลลิลิตร

4.2 ขั้นตอนการผสมสี Trichrome

1. ชั่ง Chromotrope 2R 6.00 กรัม
2. ชั่ง Light green SF 0.15 กรัม
3. ชั่ง Fast green FCF 0.15 กรัม
4. ชั่ง Phosphotungstic acid 0.70 กรัม
5. เทสารทั้งหมดลงในปิกเกอร์
6. เติม Glacial acetic acid 1.0 มิลลิลิตร ลงในปิกเกอร์ที่มีสาร
7. ใช้แท่งแก้วคนจนเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ 15 – 30 นาที
8. เติมน้ำกลั่น (dH_2O) 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

รูปภาพจุดเก็บตัวอย่างน้ำของฤดูแล้งและฤดูฝน

รูปภาพจุดเก็บตัวอย่างน้ำในฤดูแล้งทั้งหมด 30 จุด



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 1



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 2



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 3



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 4



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 5





จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 6



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 7



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 8



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 9



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 10



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 11



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 12





จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 13



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 14



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 15



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 16



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 17



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 18





จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 19



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 20



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 21



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 22



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 23



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 24



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 25



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 26



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 27



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 28



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 29



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 30

รูปภาพจุดเก็บตัวอย่างน้ำในฤดูฝนทั้งหมด 28 จุด



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 1



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 2



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 3



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 4



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 5



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 6



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 7



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 8



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 9



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 10



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 11



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 12



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 13



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 14



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 15



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 16



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 17



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 18



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 19



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 20,21

หมายเหตุ จุดเก็บตัวอย่างน้ำ 20,21 ใช้จุดเก็บตัวอย่างน้ำจุดเดียวกัน

จุดเก็บตัวอย่างน้ำ 22,23 ใช้จุดเก็บตัวอย่างน้ำจุดเดียวกัน

ดังนั้นตัวอย่างน้ำในฤดูฝนจึงเหลือ 28 ตัวอย่าง จาก 30 ตัวอย่าง



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 22,23



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 24



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 25



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 26



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 27



จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 28

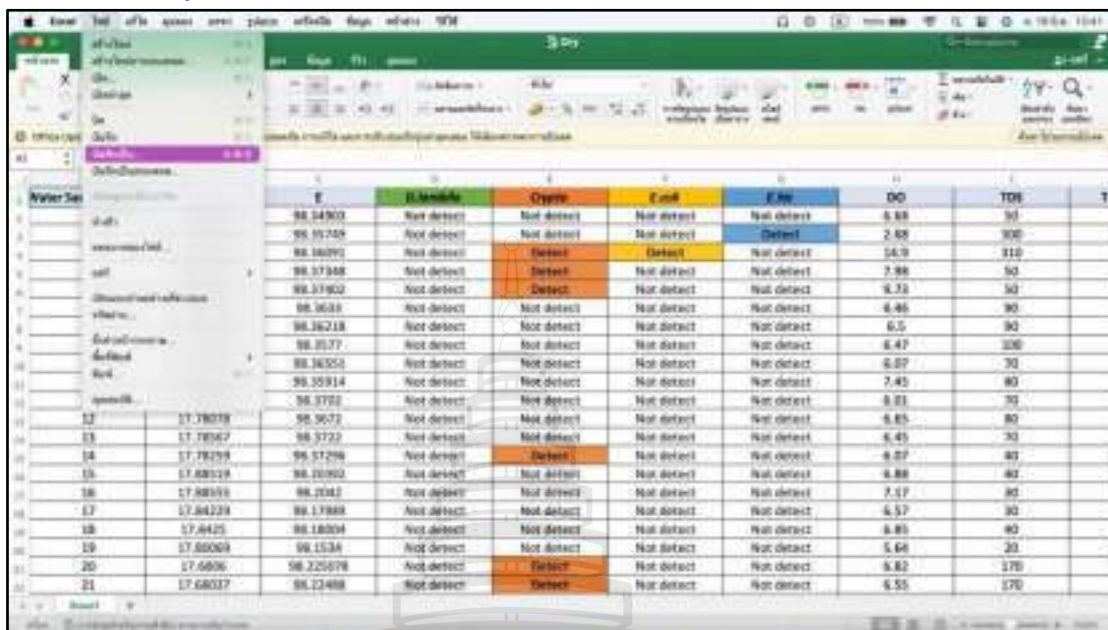


จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 29

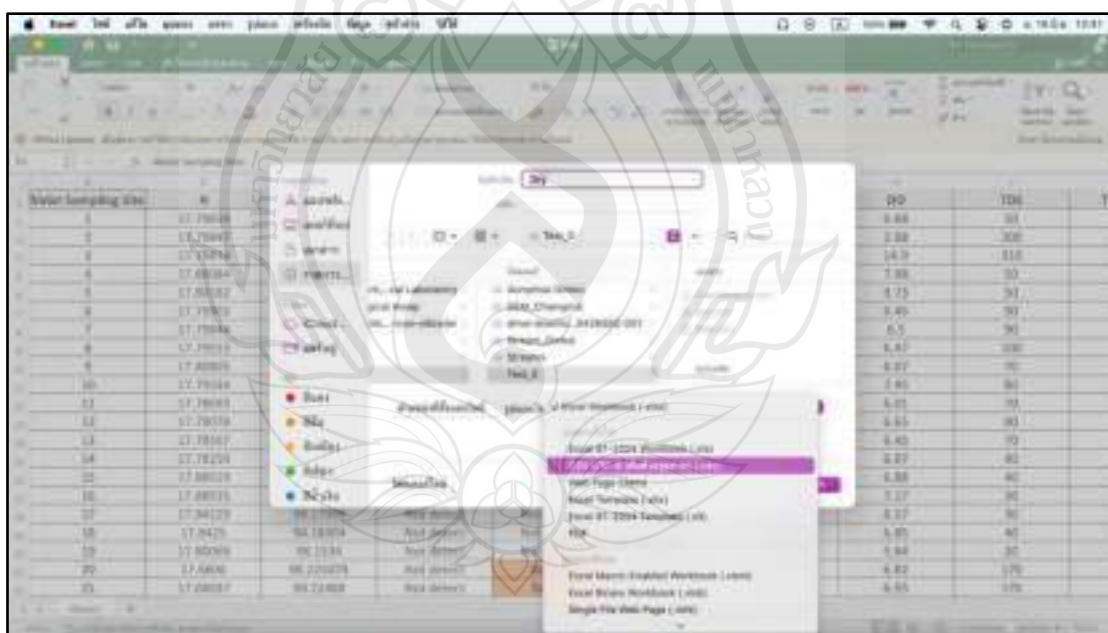


จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 30

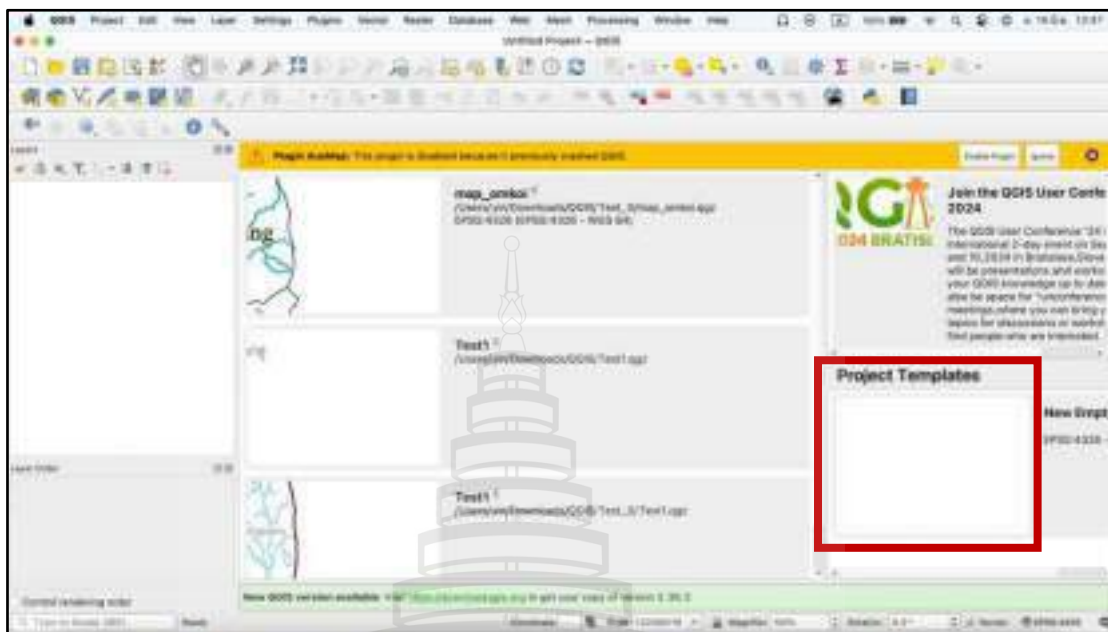
2. เมื่อกรอกข้อมูลครบเรียบร้อยแล้ว กด ไฟล์ จากนั้นกด บันทึกเป็น



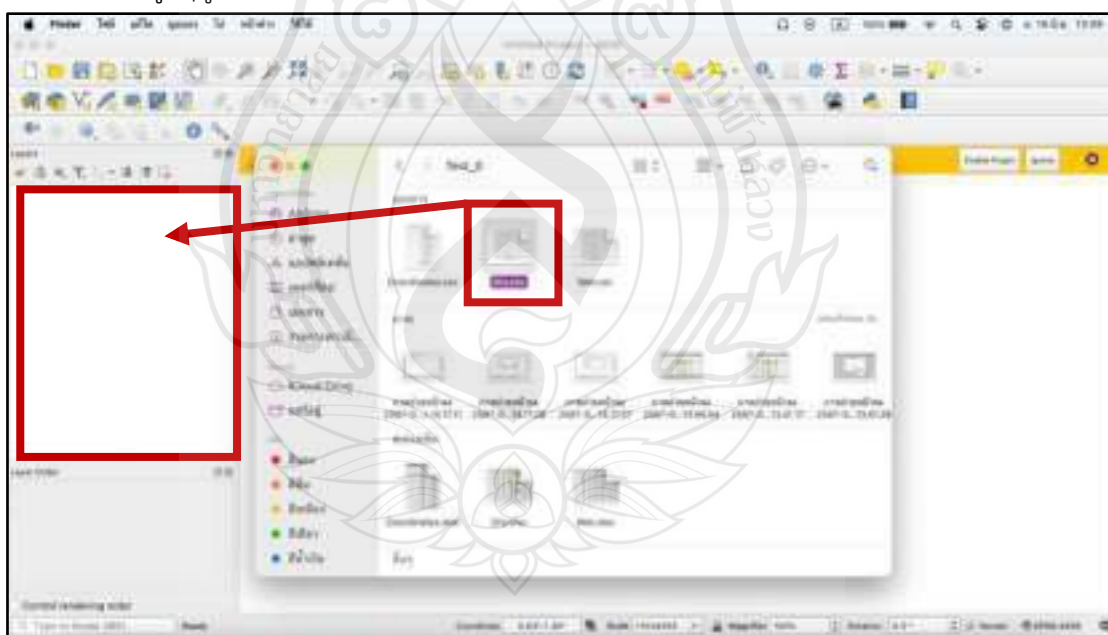
3. บันทึกไฟล์เป็น .csv พร้อมกับตั้งชื่อไฟล์



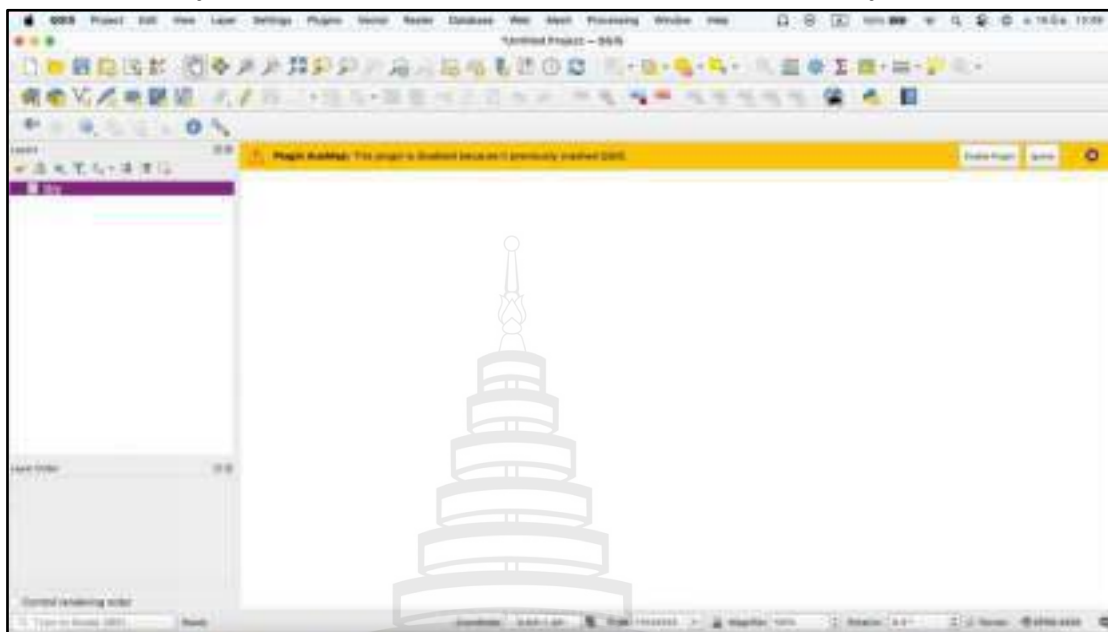
6. เข้าโปรแกรม QGIS จากนั้นกด Project Templates



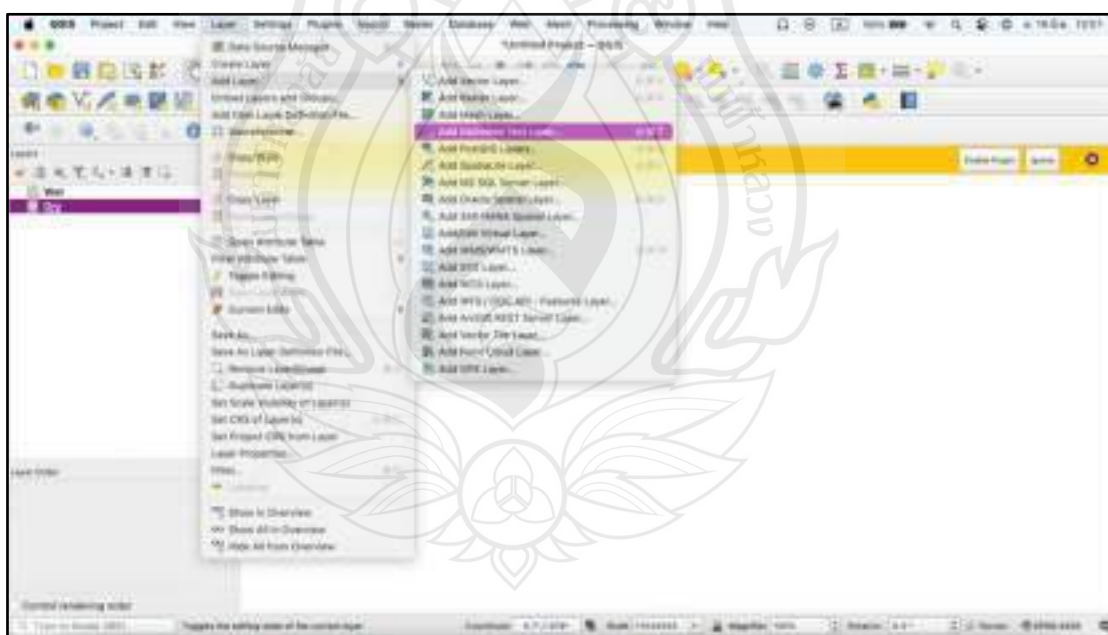
7. นำไฟล์ข้อมูลฤดูแล้ง Dry.csv ลากมาใส่ในช่องพื้นที่ว่างของ Layers



8. เมื่อลากไฟล์ฤดูแล้ง Dry.csv มาใส่แล้วจะปรากฏดังภาพ จากนั้นให้ใส่ไฟล์ฤดูฝน Wet.csv



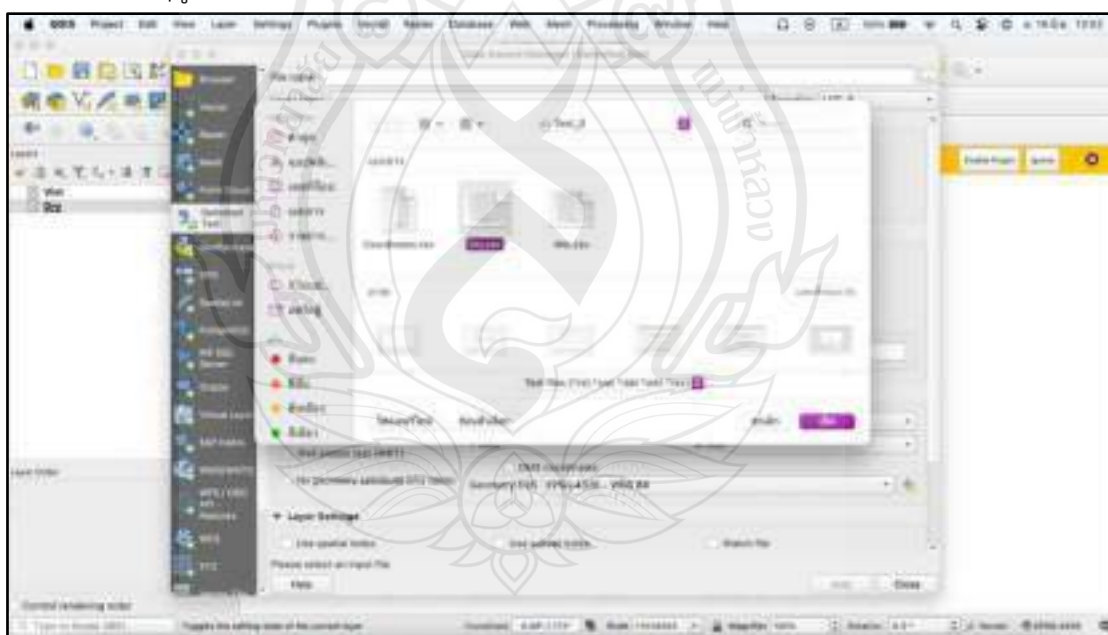
9. กดแถบข้อความว่า Dry จากนั้นกด Layer → Add layer → Add Delimited Text Layer...



10. กดช่อง ... ที่อยู่มุมบนด้านขวา เพื่อค้นหาไฟล์



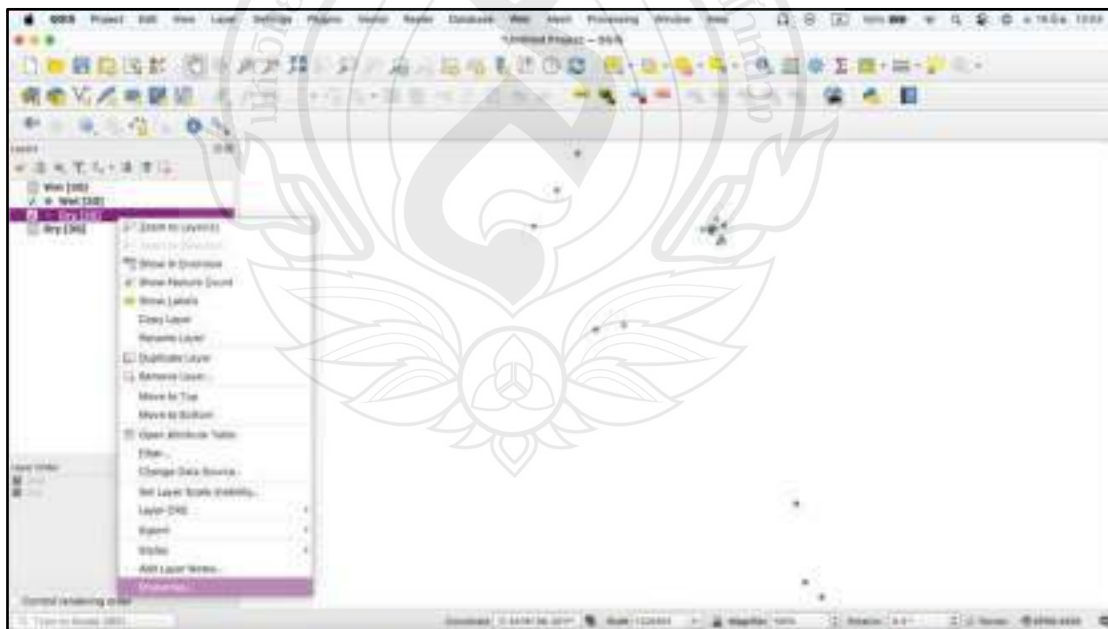
11. เลือกไฟล์ฤดูแล้ง Dry.csv จากนั้นกด เปิด



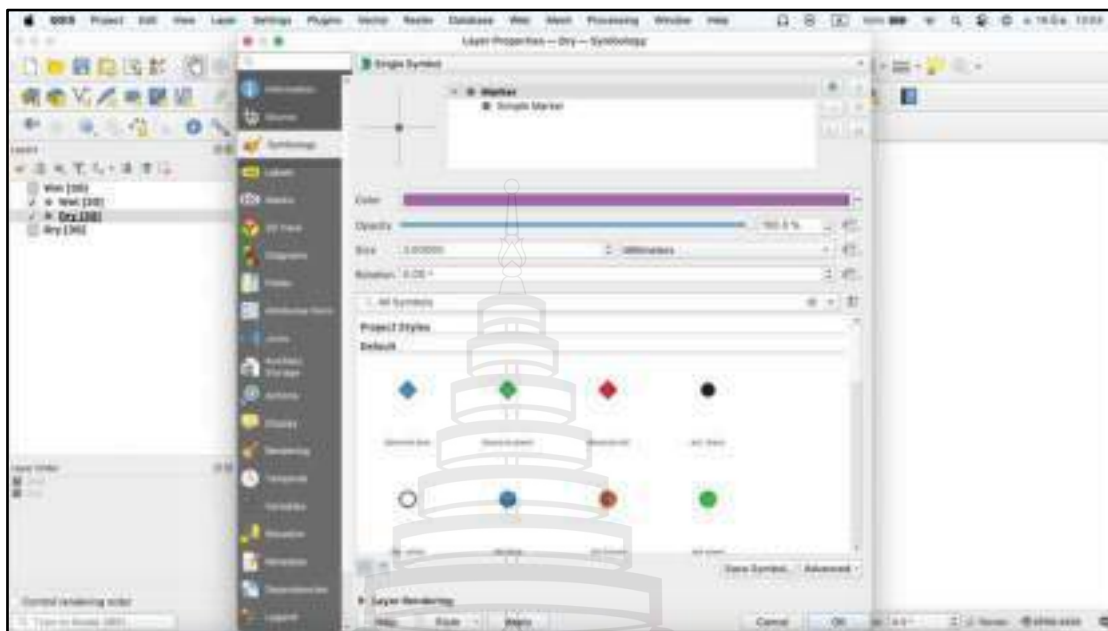
12. กด Add



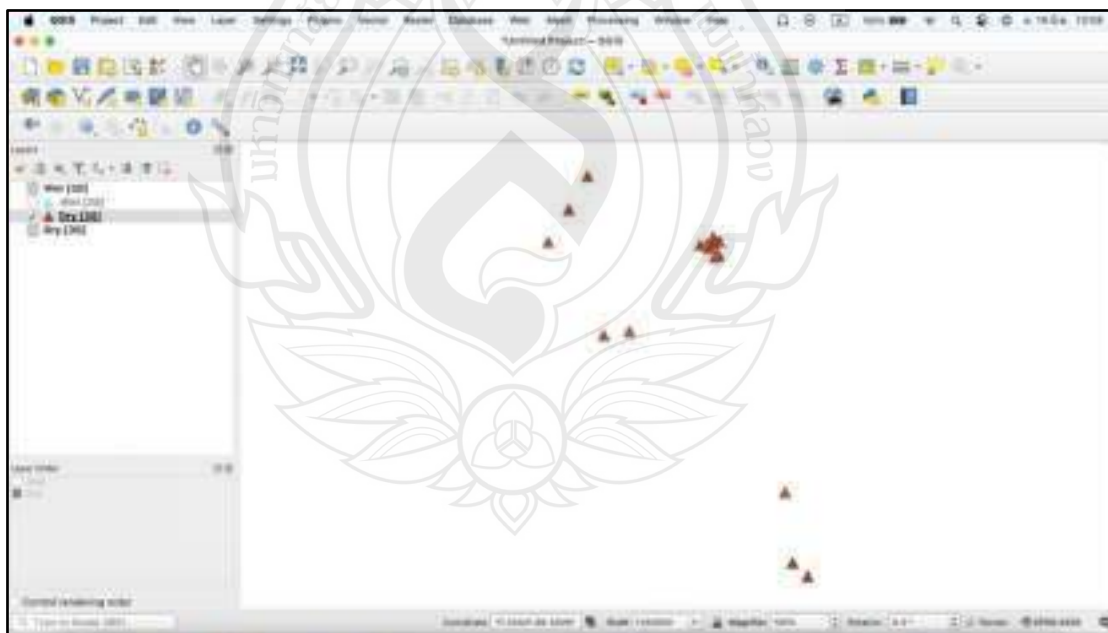
13. หลังจากกด Add จุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำจะปรากฏเป็นสัญลักษณ์รูปวงกลมขึ้นมาบนพื้นที่วางสีขาว สามารถเปลี่ยนสีและขนาดได้ โดยกดไปยังแถบชื่อที่ต้องการจะเปลี่ยน คลิกขวาแล้วกดคำสั่ง Properties...



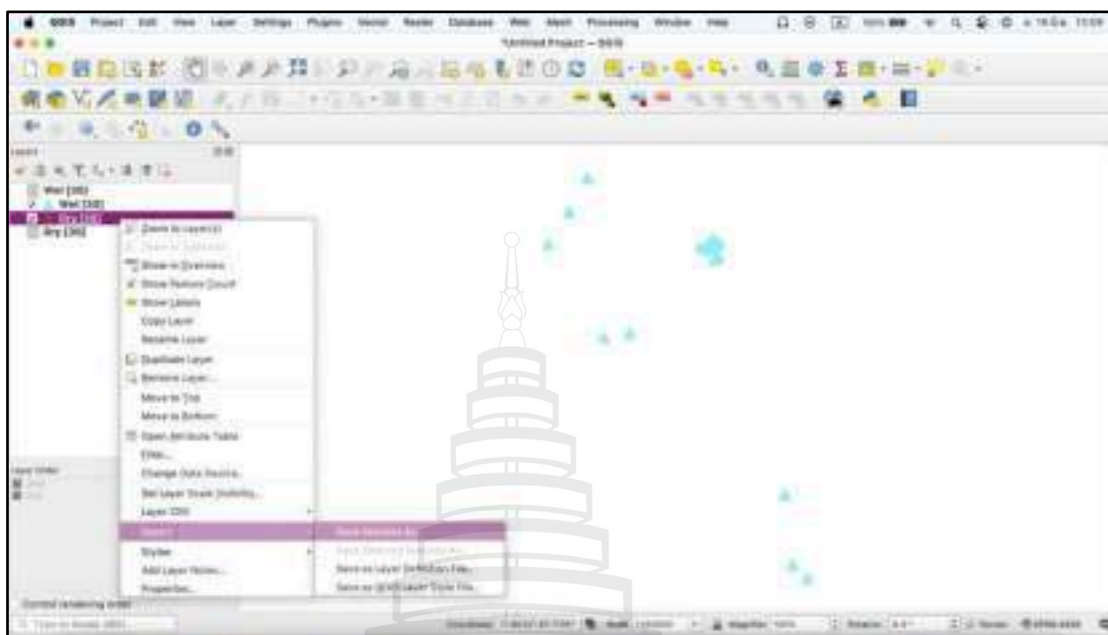
14. เมื่อกดคำสั่ง Properties... แล้ว จะปรากฏหน้าต่างที่แสดงการแก้ไขสัญลักษณ์ในหมวด Symbology เมื่อแก้ไขเสร็จแล้วให้กด OK



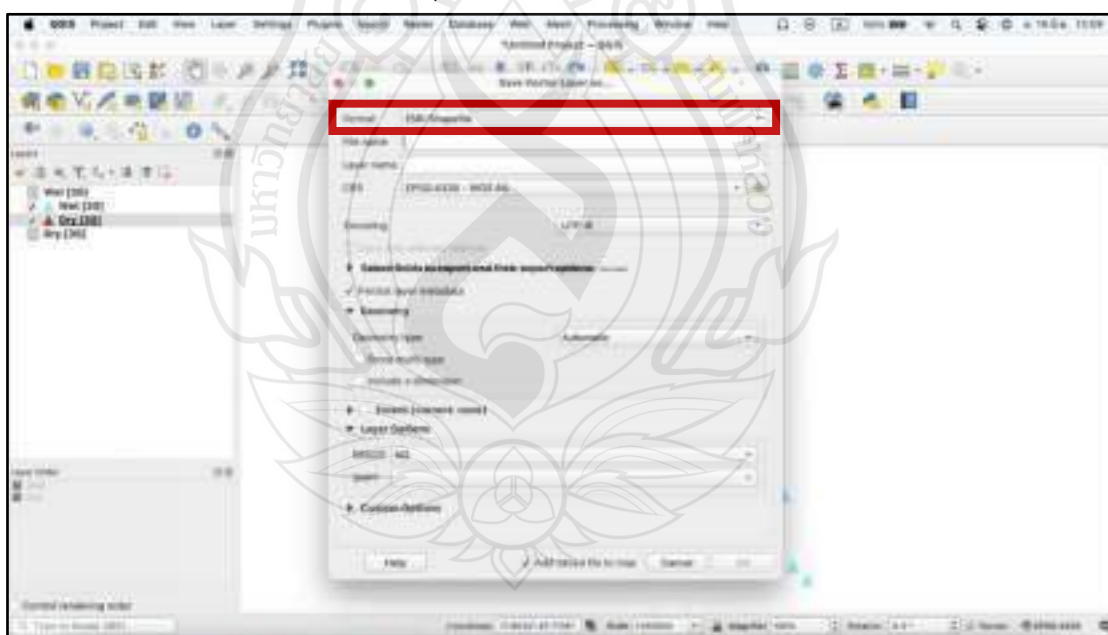
15. สัญลักษณ์ที่แก้ไขเรียบร้อยแล้วจะปรากฏบนพื้นที่วางสีขาว



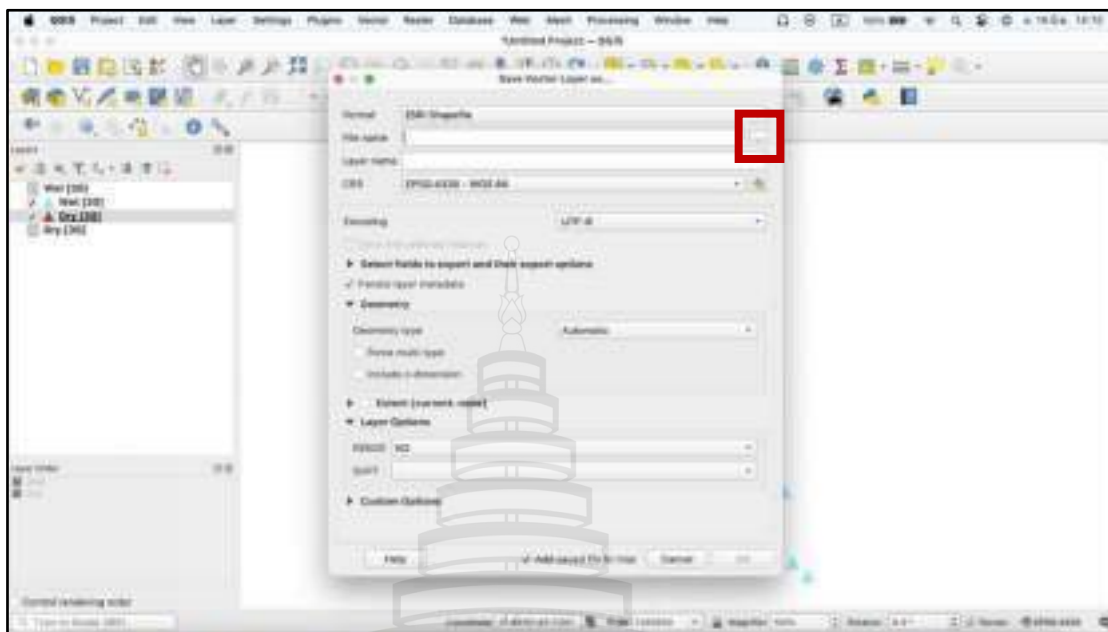
16. กดแถบชื่อที่ต้องการ คลิกขวา → Export → Save Features As...



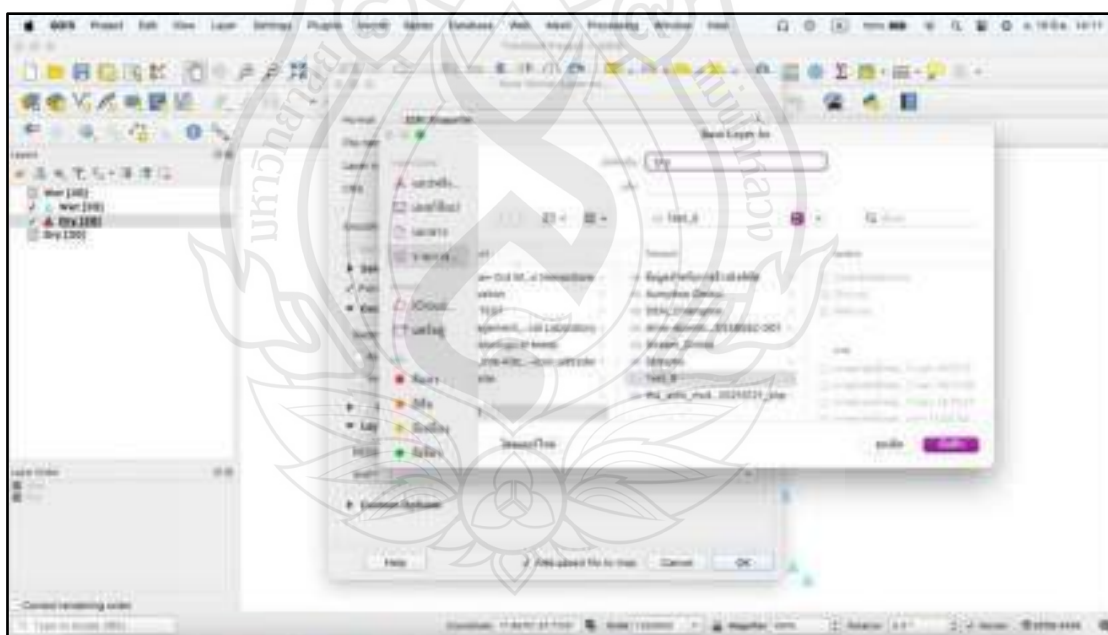
17. หัวข้อ Format ให้เลือก ESRI Shapefile



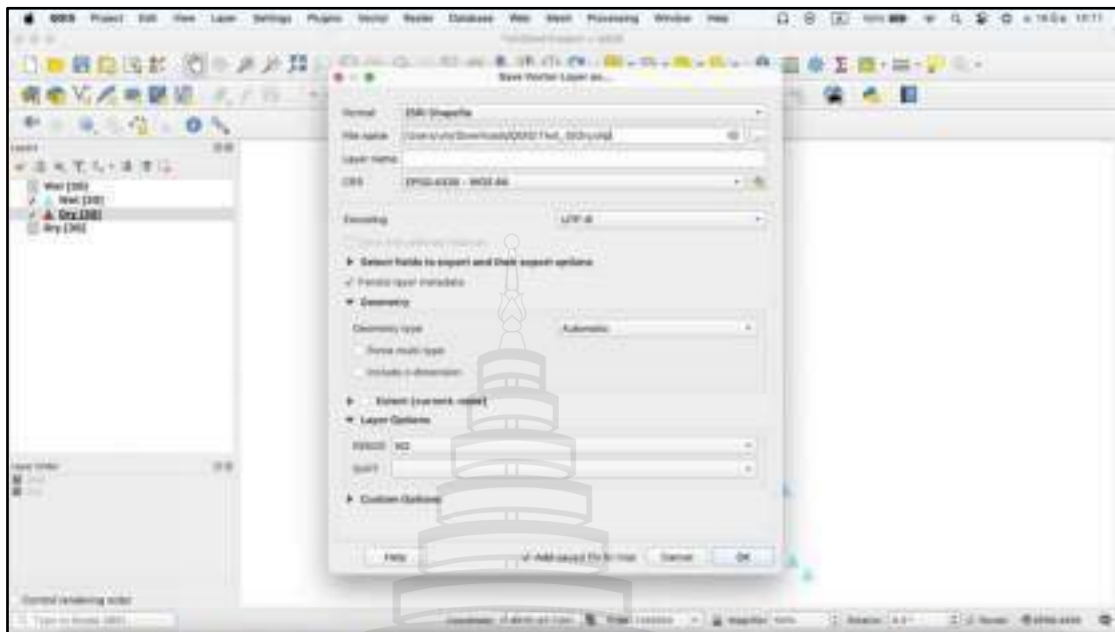
18. กดช่อง ... เพื่อบันทึกไฟล์



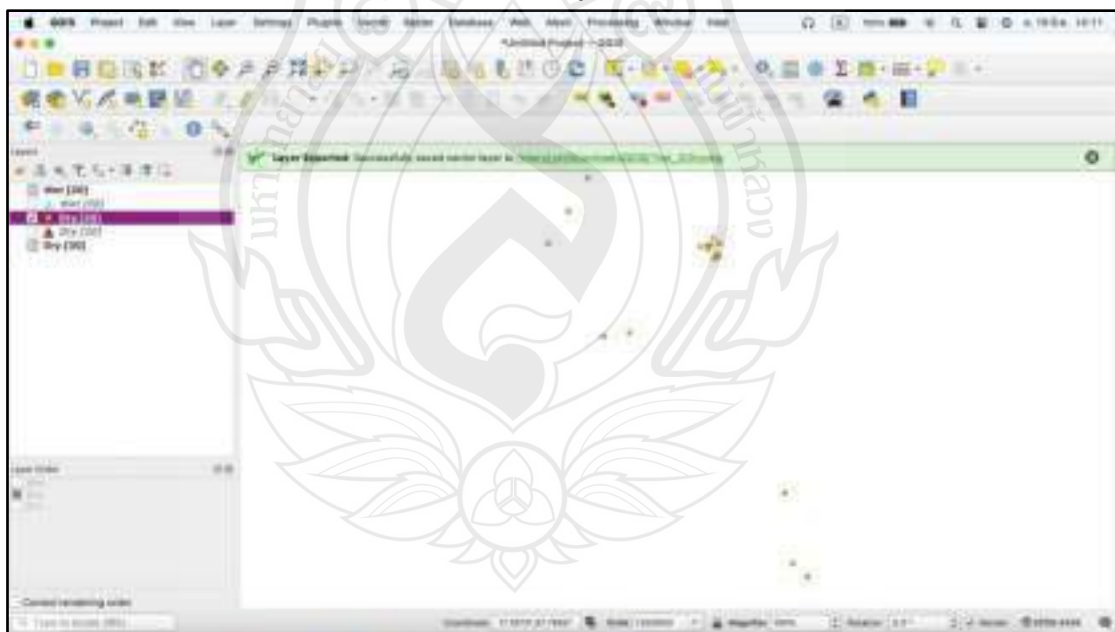
19. ตั้งชื่อและกดบันทึก



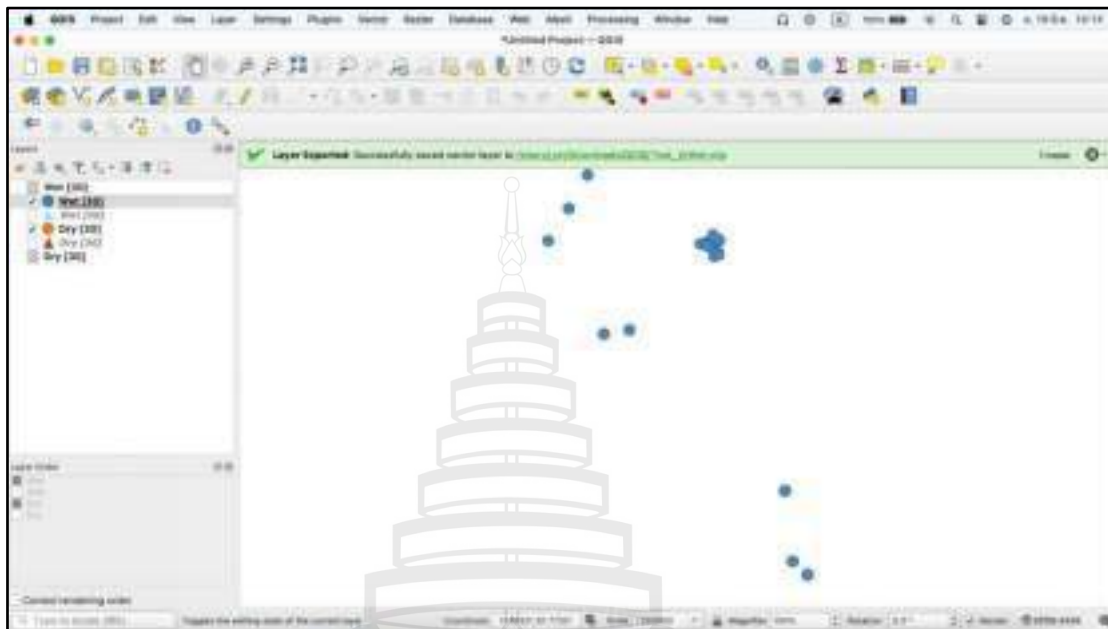
20. กด OK



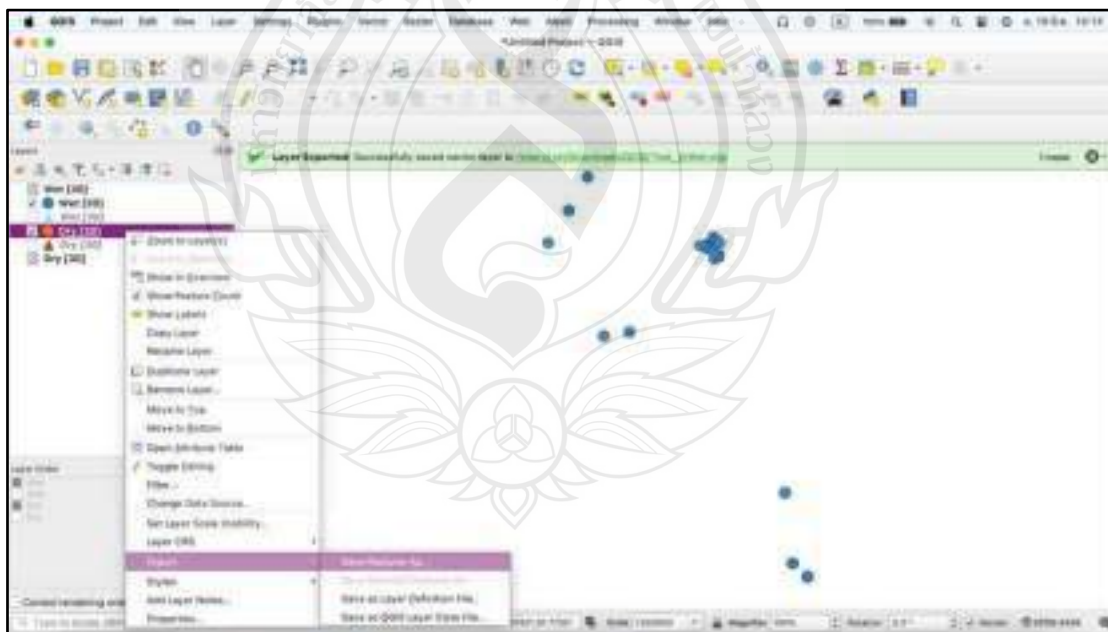
21. เมื่อบันทึกเป็น Shapefile จะปรากฏสัญลักษณ์รูปวงกลมของจุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำเพิ่มขึ้นมา



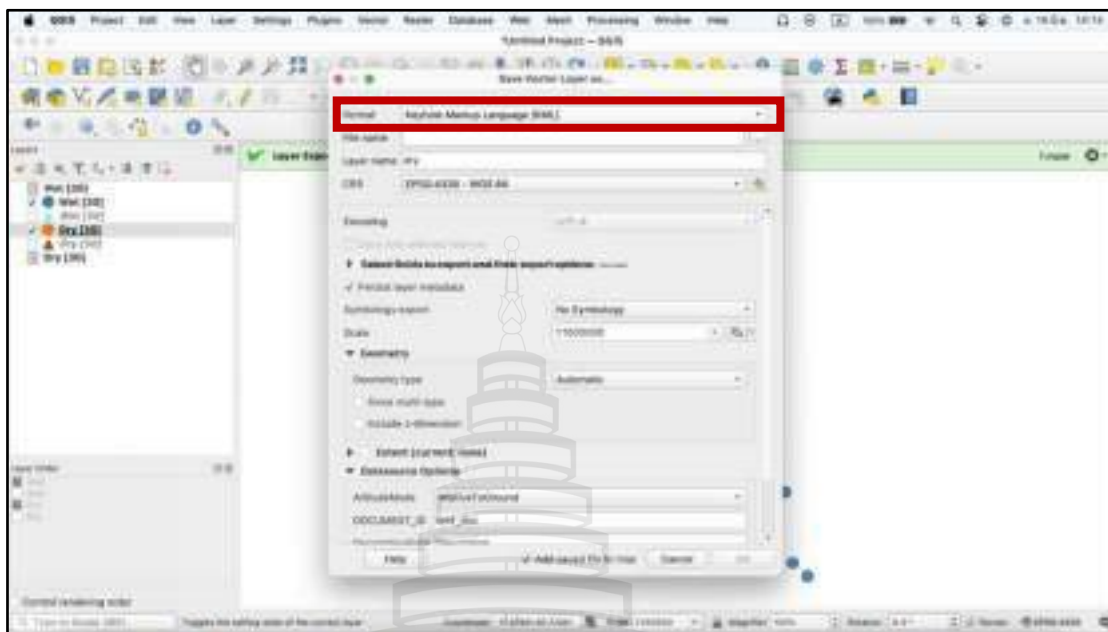
22. สัญลักษณ์แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำทั้งฤดูแล้งและฤดูฝนของ Shapefile ถูกแก้ไขเพื่อง่ายต่อการจำแนก ป้องกันการสับสนกับไฟล์อื่น



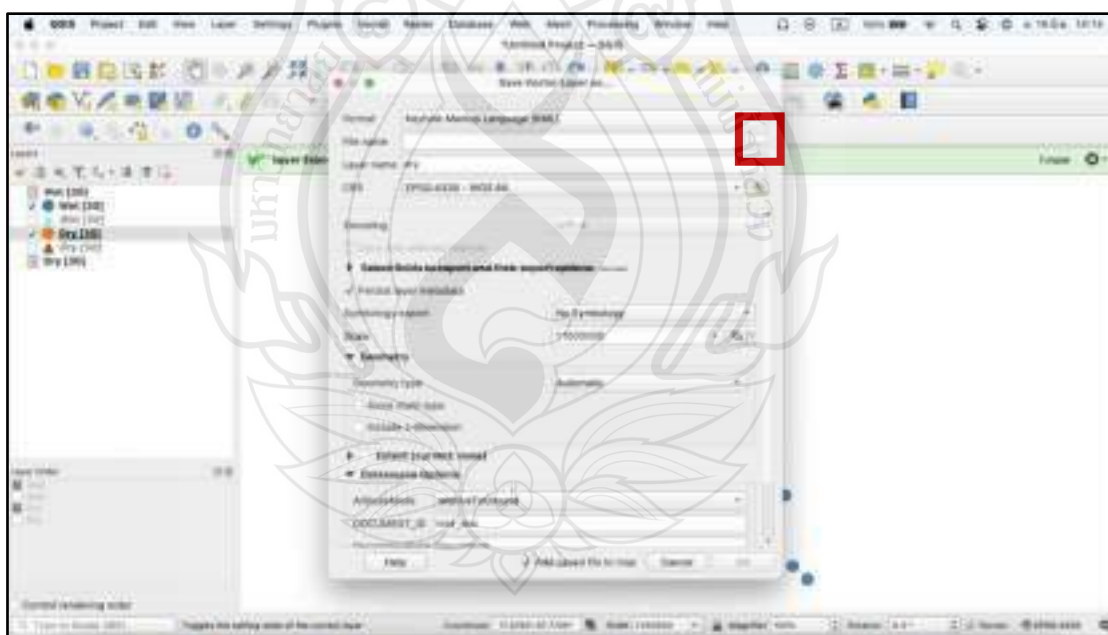
23. กดแถบชื่อช่องที่เป็นของ Shapefile คลิกขวา → Export → Save Features As...



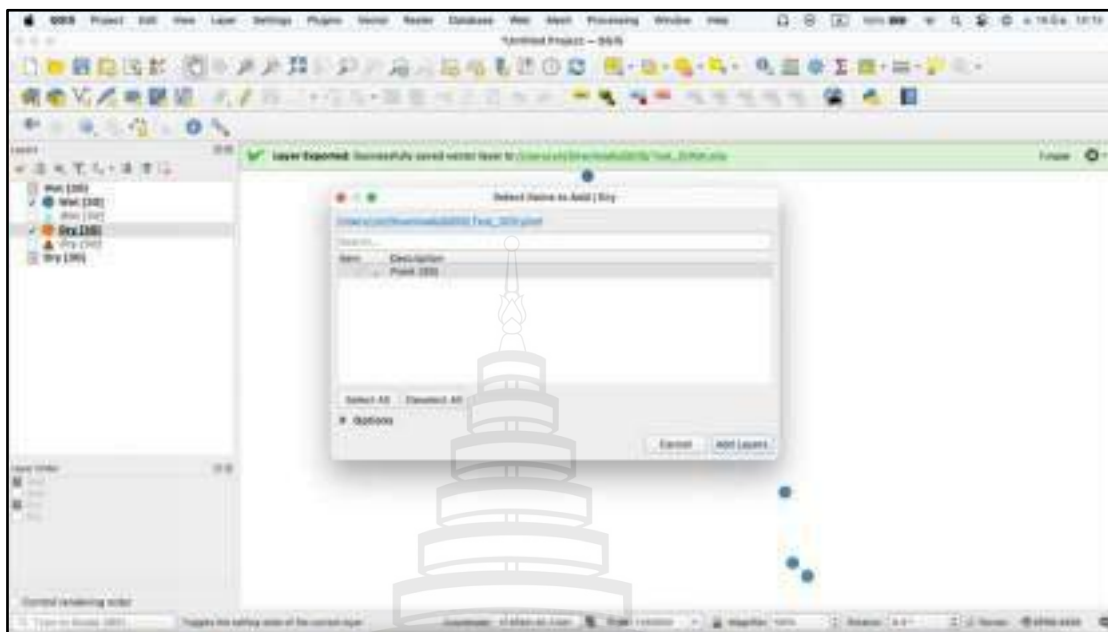
24. หัวข้อ Format ให้เลือก Keyhole Markup Language [KML]



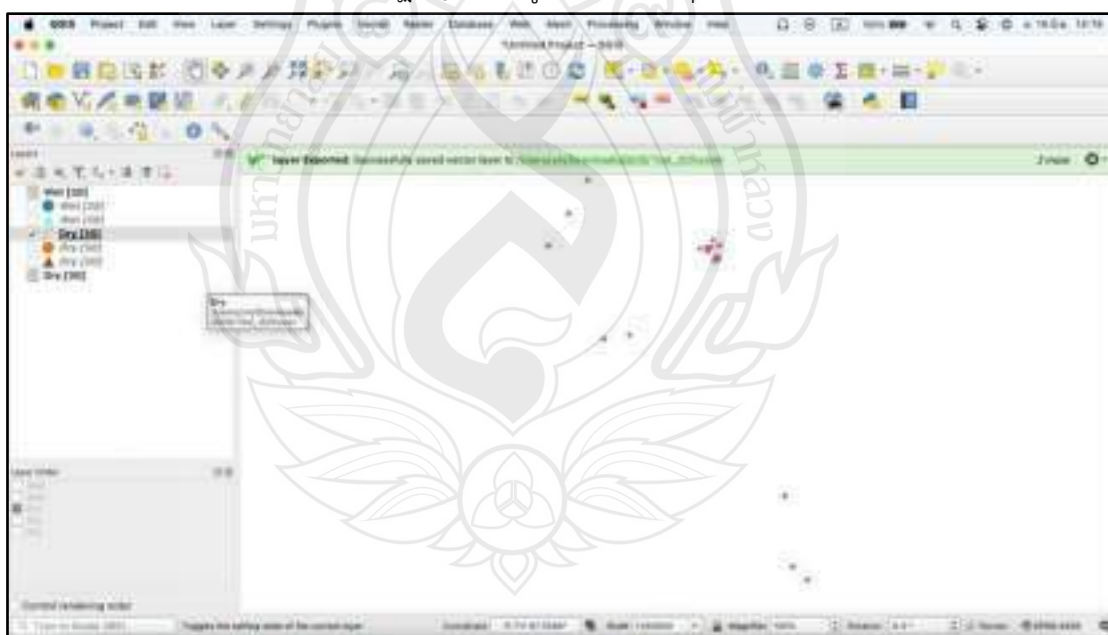
25. กด ... เพื่อบันทึกไฟล์



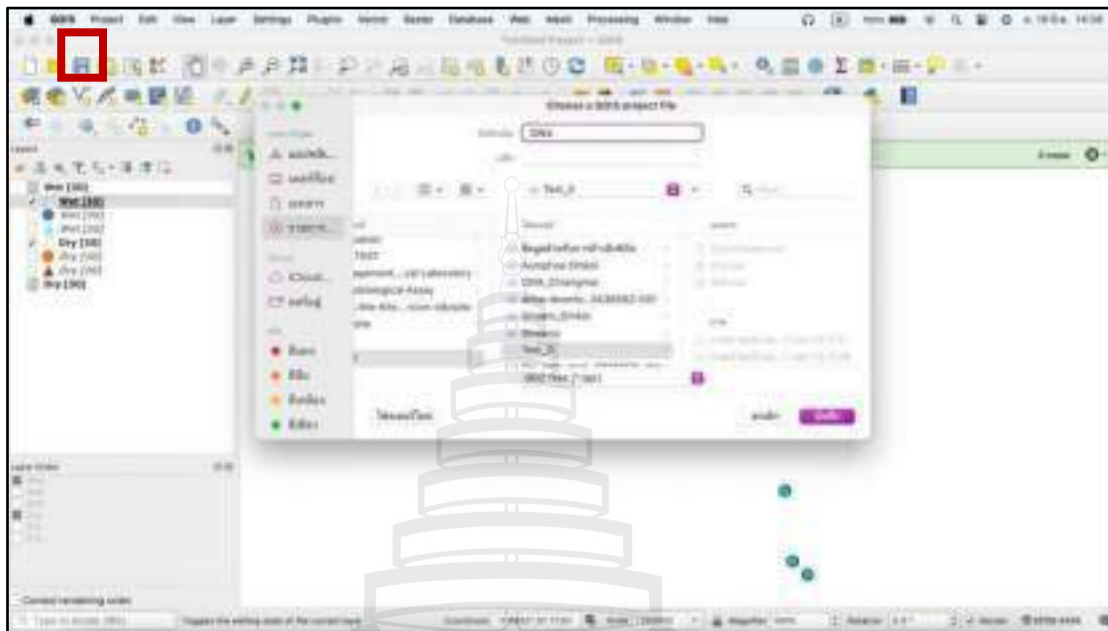
28. กด Add Layers



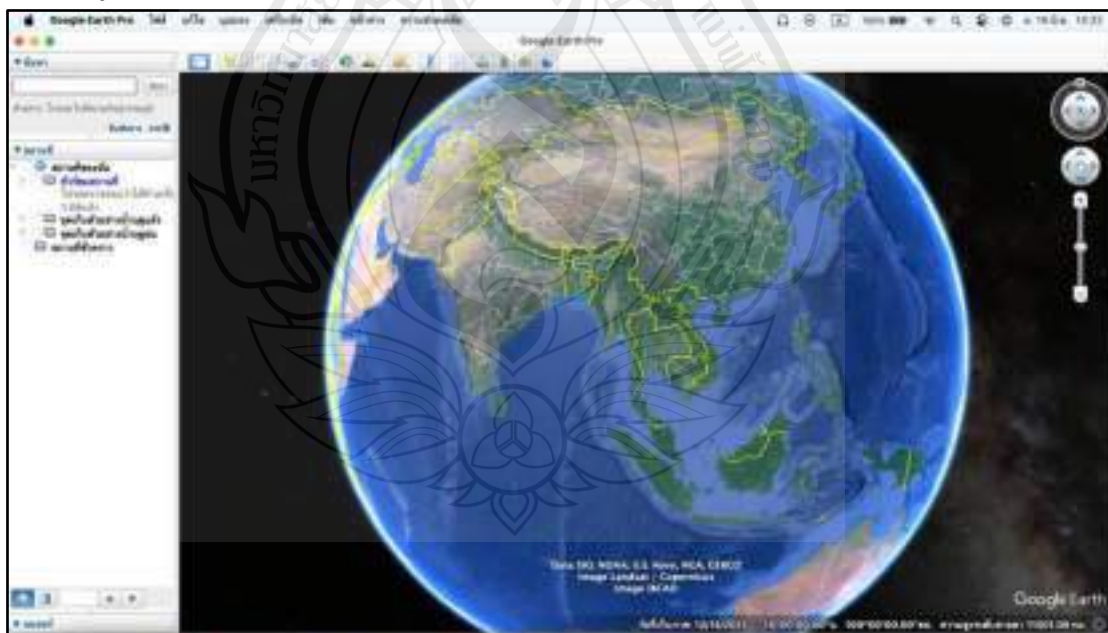
29. เมื่อ Add Layers แล้วจะปรากฏสัญลักษณ์รูปวงกลมของจุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำเพิ่มขึ้น



30. เมื่อบันทึกจุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำทั้งฤดูแล้งและฤดูฝนเป็นไฟล์ .kml แล้ว ให้ทำการตั้งชื่อและบันทึกไฟล์ของ .kml เพื่อที่จะนำไปใช้เปิดใน Google Earth Pro



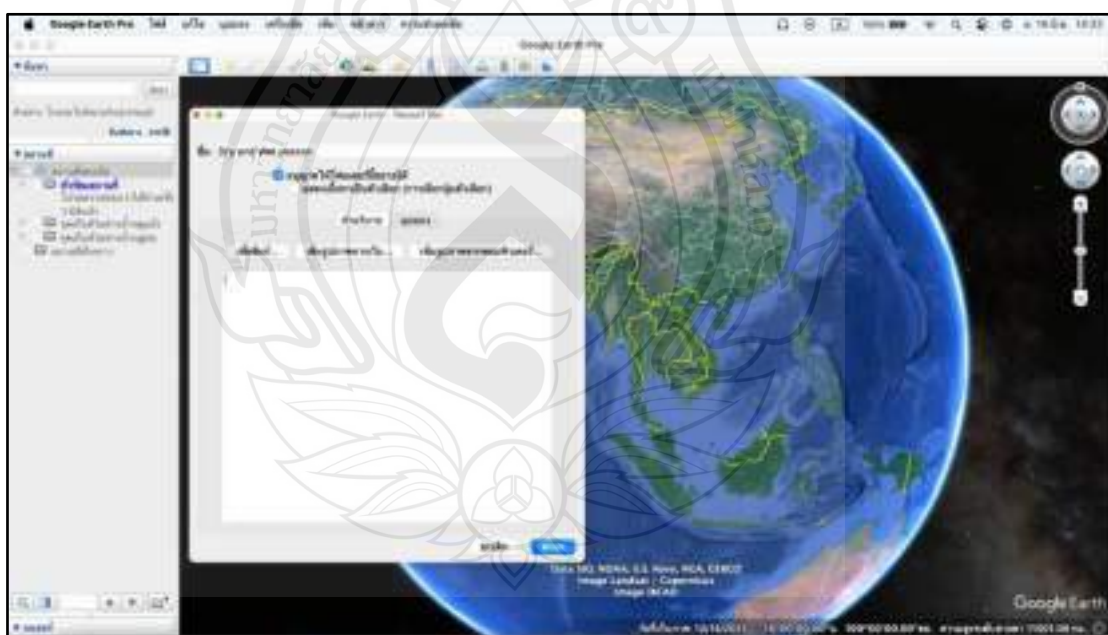
31. เข้าสู่โปรแกรม Google Earth Pro



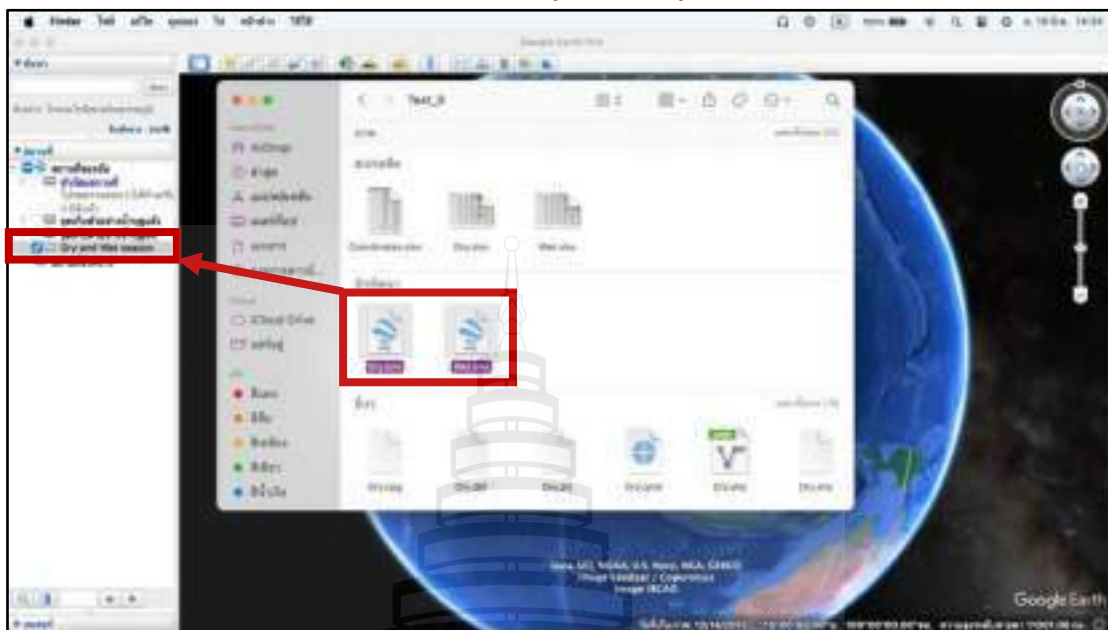
32. กดแถบ สถานที่ของฉัน คลิกขวา → เพิ่ม → โพลเดอร์



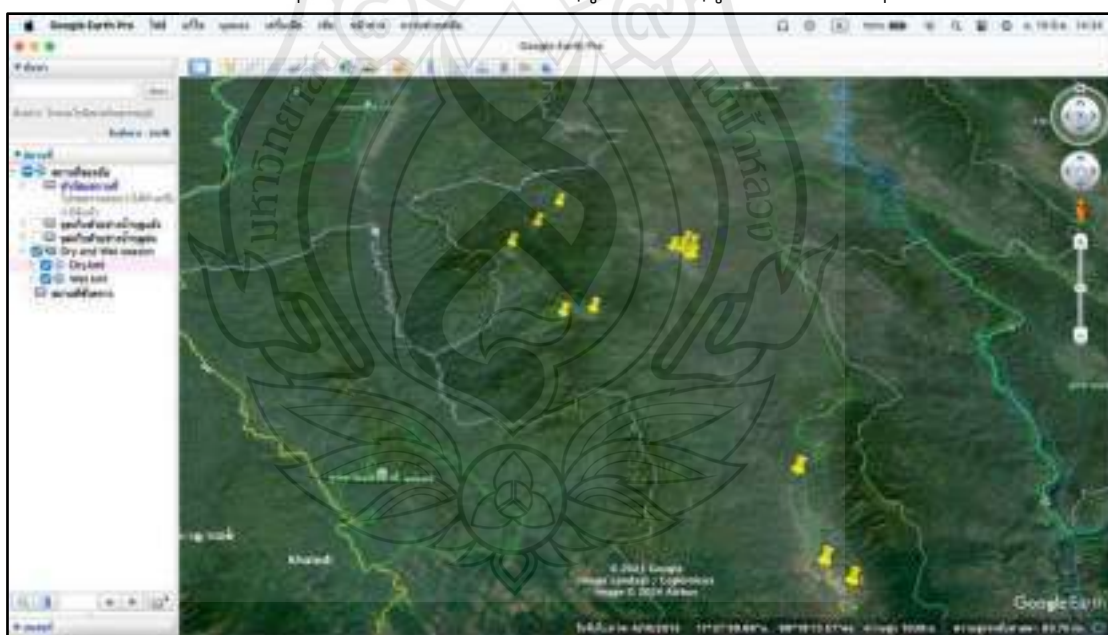
33. ตั้งชื่อโพลเดอร์และกดตกลง



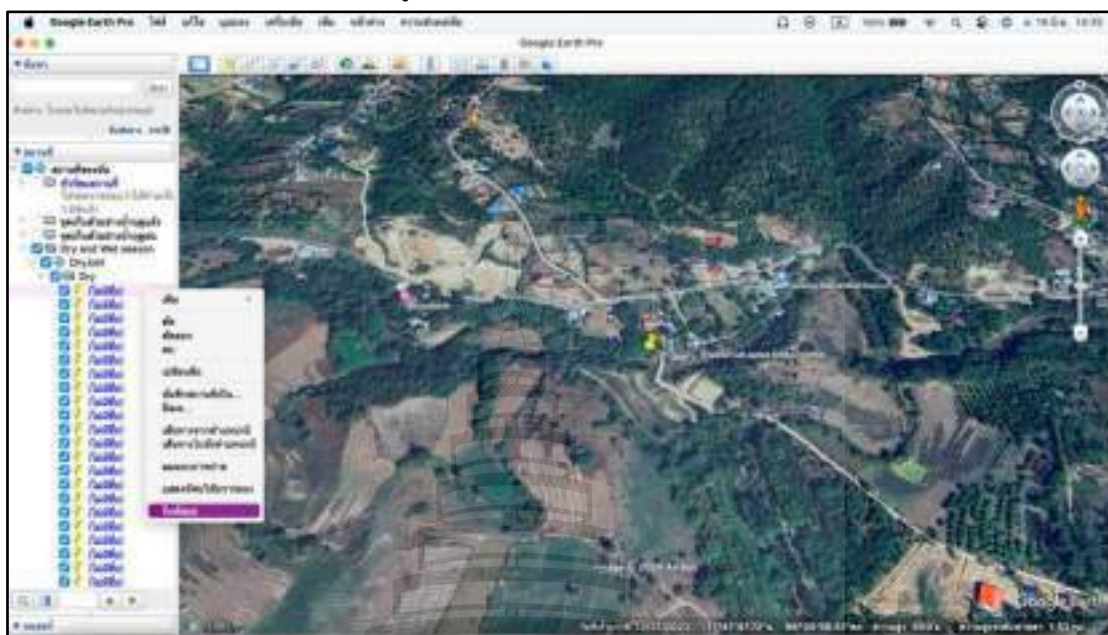
34. นำไฟล์ .kml ของจุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำทั้งฤดูแล้งและฤดูฝนลากมาใส่ในโฟลเดอร์ที่สร้างไว้



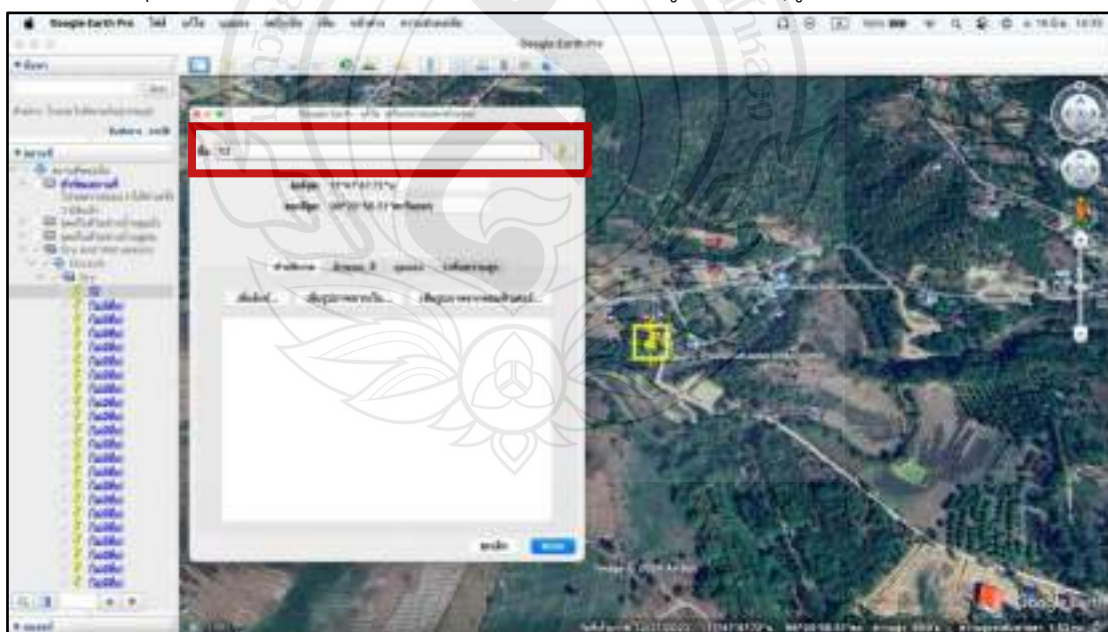
35. เมื่อใส่ไฟล์ .kml ของจุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำทั้งฤดูแล้งและฤดูฝนแล้วจะมีหมุดปักขึ้นมาบนแผนที่



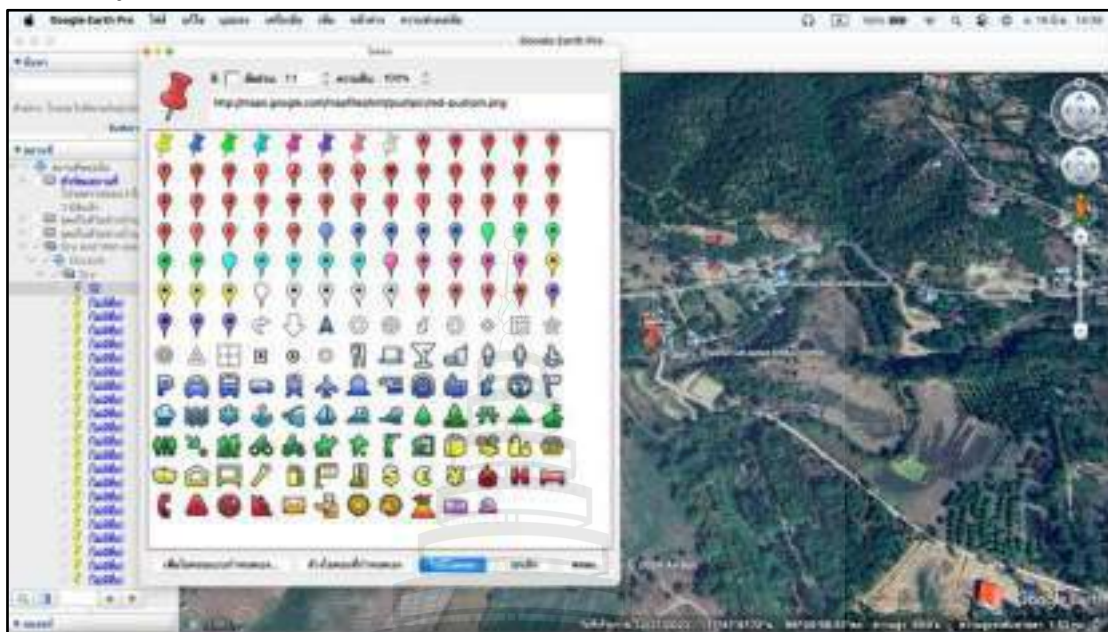
36. กดแถบช่อง ไม่มีชื่อ → รับข้อมูล



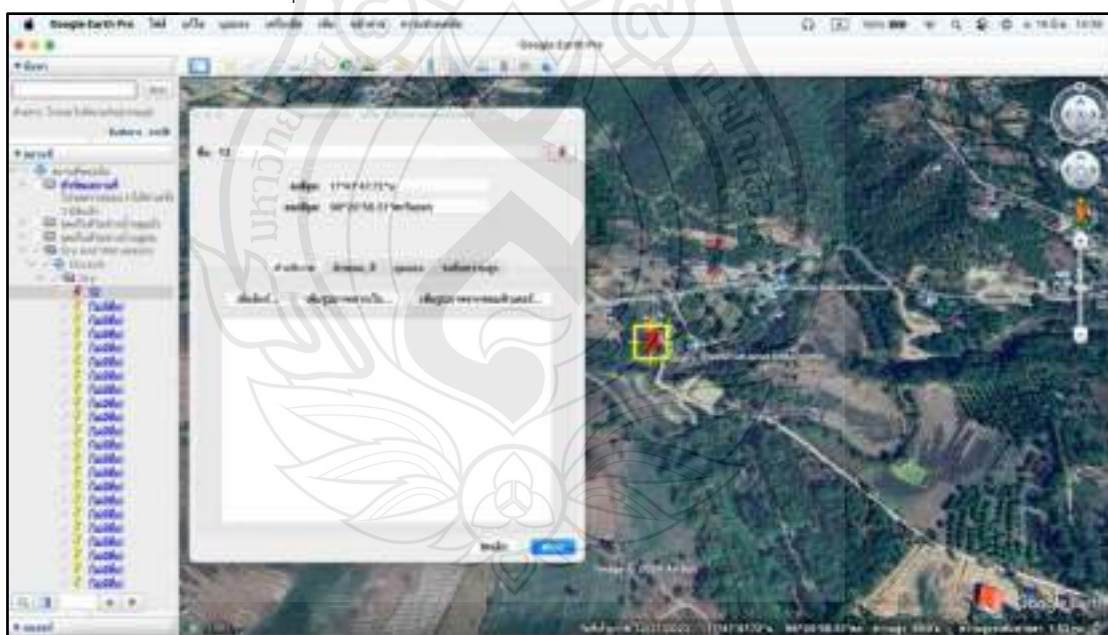
37. ใส่ชื่อเพื่อระบุข้อมูลจุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำทั้งฤดูแล้งและฤดูฝน โดยฤดูแล้งมี 30 จุด ฤดูฝนมี 30 จุด โดยระบุตัวเลขแล้วตามด้วยตัวอักษรย่อที่บ่งบอกฤดูกาล นอกจากนี้ยังสามารถแก้ไขสัญลักษณ์และสีของหมุดได้เพื่อให้เข้าใจง่ายและลดความสับสนของข้อมูลทั้งสองฤดูกาล



38. เลือกรูปแบบสัญลักษณ์และสี จากนั้นกดตกลง



39. เมื่อใส่ชื่อและแก้ไขหมุดเรียบร้อยแล้วให้กด ตกลง



40. เมื่อใส่ชื่อและแก้ไขหมุดของจุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำทั้งฤดูแล้งและฤดูฝนแล้ว ในแผนที่หมุดจะซ้อนทับกัน แต่จะแสดงชื่อทั้งสองฤดูกาล

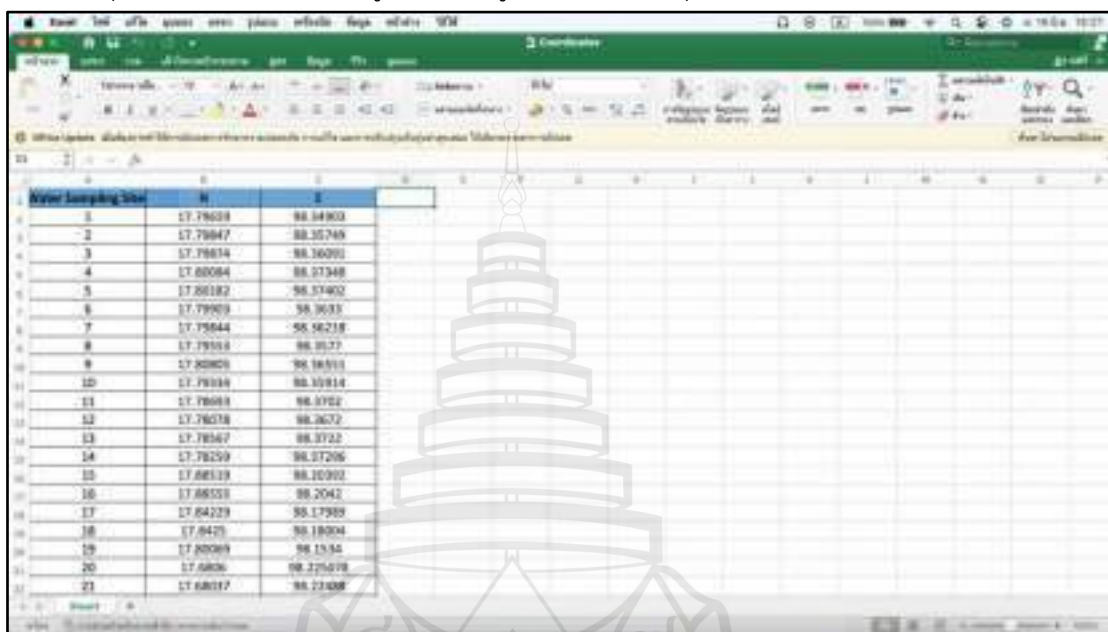


41. เมื่อคลิกไปที่หมุด หมุดจะแยกออกมาเป็นสองแฉก เพราะเป็นจุดพิกัดเดียวกัน แต่มีข้อมูลสองชุด



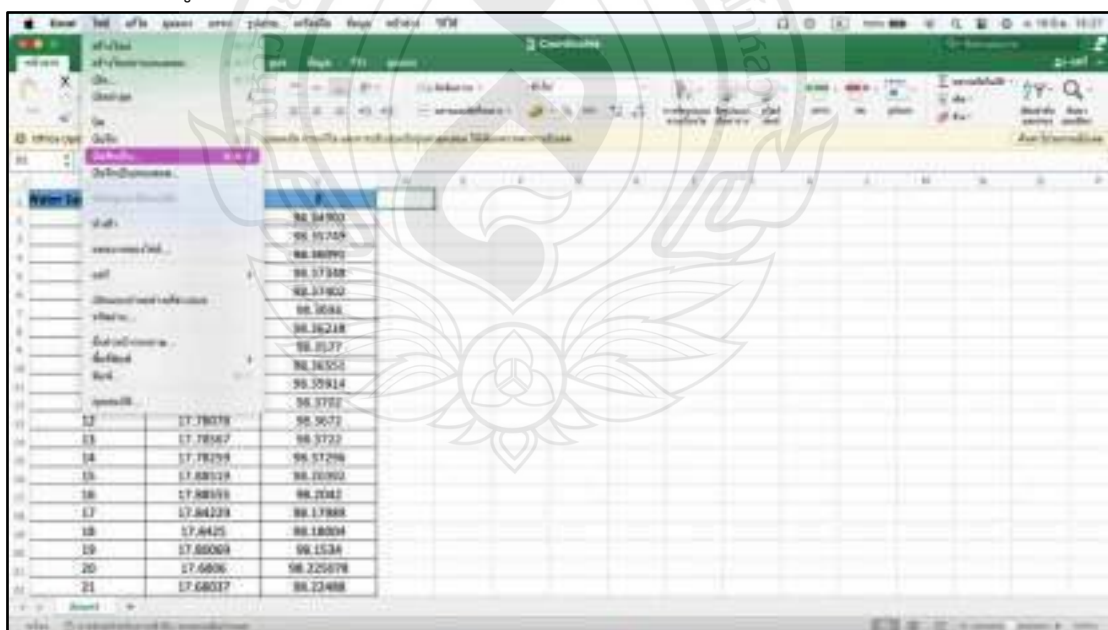
ค2. ขั้นตอนการทำแผนที่แสดงจุดพิกัดตำแหน่งเก็บตัวอย่างน้ำโดยใช้โปรแกรม QGIS

1. กรอกรจุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำฤดูแล้งและฤดูฝนทั้งหมด 30 จุด โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel

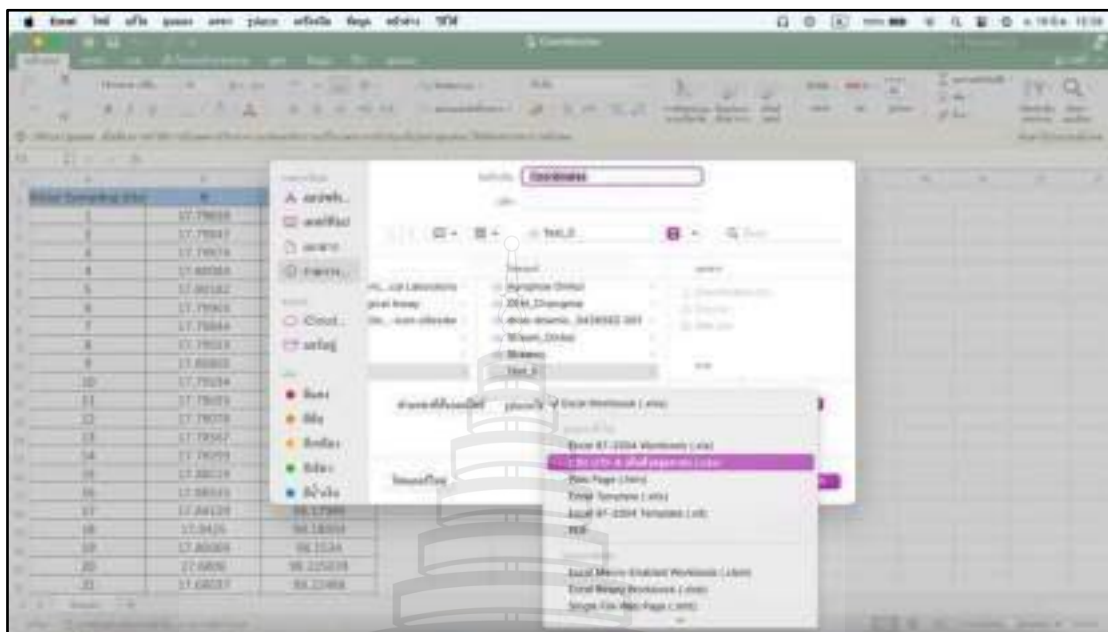


Water Sampling Site	X	Y
1	17.79638	98.14903
2	17.79647	98.15749
3	17.79614	98.16091
4	17.80084	98.17348
5	17.80182	98.17402
6	17.79909	98.16331
7	17.79644	98.16218
8	17.79114	98.15377
9	17.80809	98.16511
10	17.79114	98.15914
11	17.78681	98.17022
12	17.78578	98.16672
13	17.78567	98.17222
14	17.78259	98.17206
15	17.88119	98.10902
16	17.88551	98.20422
17	17.84229	98.17989
18	17.84225	98.18004
19	17.80069	98.15346
20	17.68836	98.225078
21	17.68017	98.23488

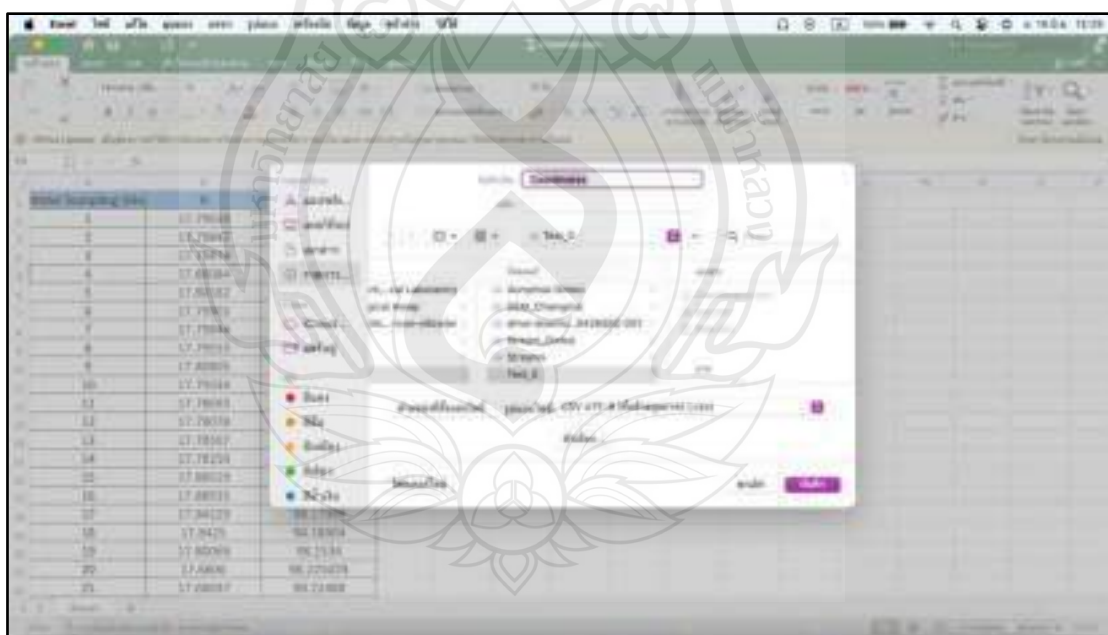
2. เมื่อกรอกข้อมูลครบเรียบร้อยแล้ว กด ไฟล์ จากนั้นกด บันทึกเป็น



3. บันทึกไฟล์เป็น .csv พร้อมกับตั้งชื่อไฟล์



4. กดบันทึก

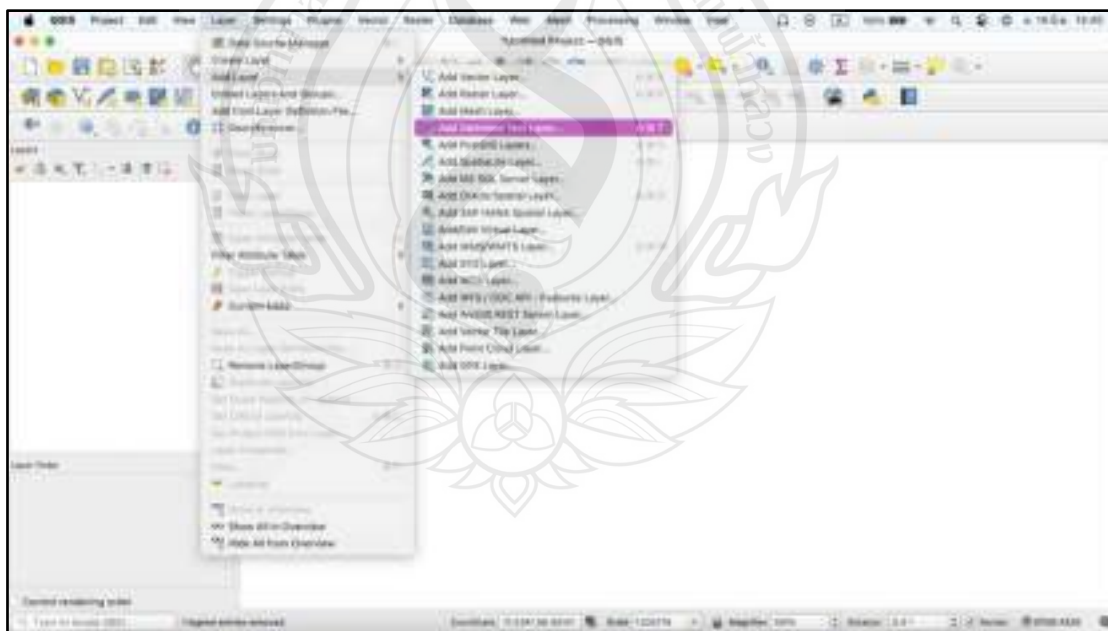


5. ตัวอย่างไฟล์ .csv ของข้อมูลเก็บตัวอย่างน้ำ

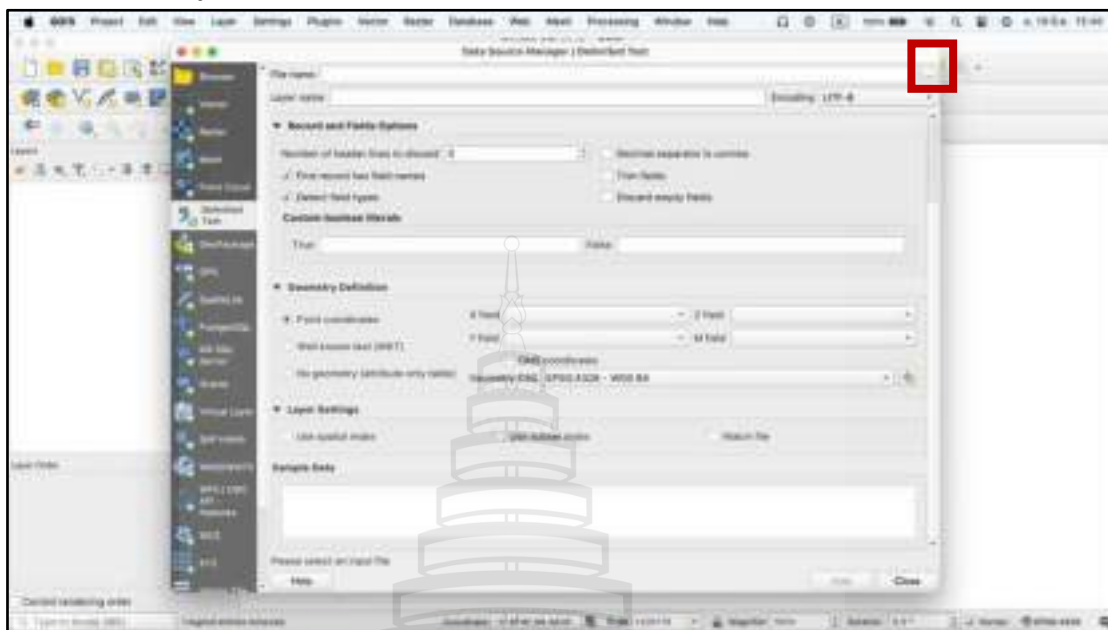


Station Number	Date	Elevation
1	11/10/2018	98.34000
2	11/10/2018	98.35000
3	11/10/2018	98.36000
4	11/10/2018	98.37000
5	11/10/2018	98.38000
6	11/10/2018	98.39000
7	11/10/2018	98.40000
8	11/10/2018	98.41000
9	11/10/2018	98.42000
10	11/10/2018	98.43000
11	11/10/2018	98.44000
12	11/10/2018	98.45000
13	11/10/2018	98.46000
14	11/10/2018	98.47000
15	11/10/2018	98.48000
16	11/10/2018	98.49000
17	11/10/2018	98.50000
18	11/10/2018	98.51000
19	11/10/2018	98.52000
20	11/10/2018	98.53000
21	11/10/2018	98.54000
22	11/10/2018	98.55000
23	11/10/2018	98.56000
24	11/10/2018	98.57000
25	11/10/2018	98.58000
26	11/10/2018	98.59000
27	11/10/2018	98.60000
28	11/10/2018	98.61000
29	11/10/2018	98.62000
30	11/10/2018	98.63000

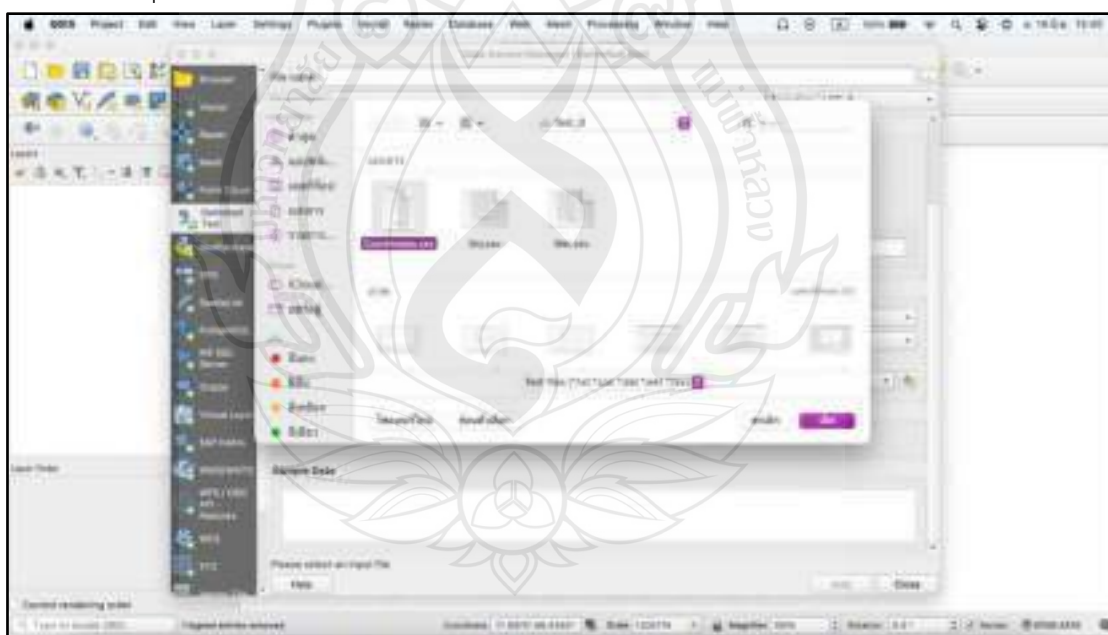
6. เข้าโปรแกรม QGIS จากนั้นกดคำสั่ง Layer → Add Layer → Add Delimited Layer...



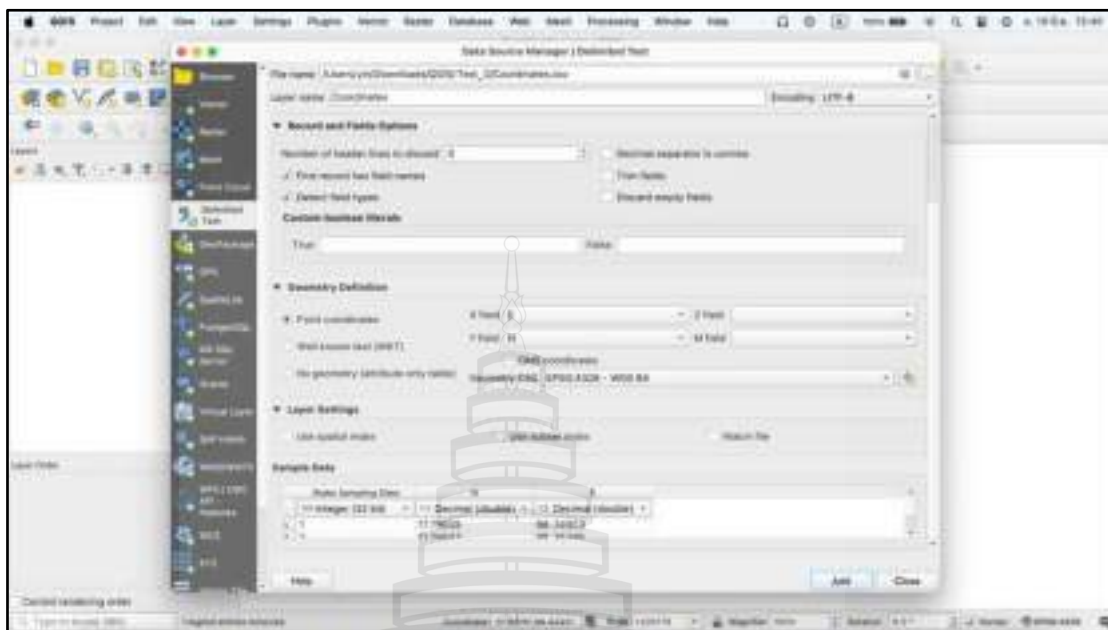
7. กดช่อง ... ที่อยู่มุมบนด้านขวา เพื่อค้นหาไฟล์



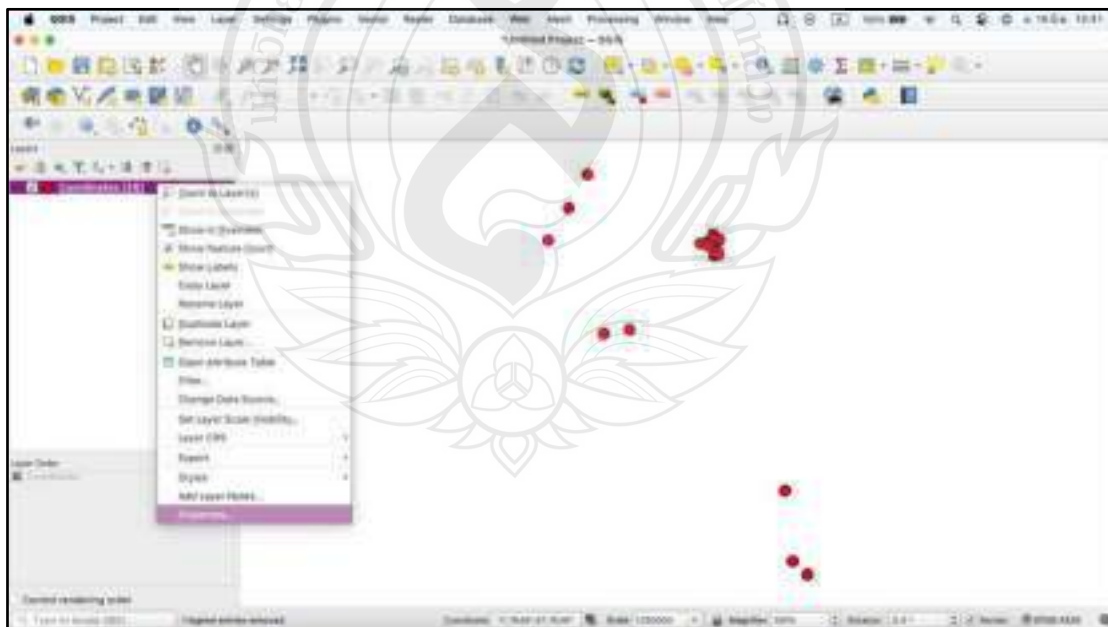
8. เลือกไฟล์จุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำ Coordinates.csv จากนั้นกด เปิด



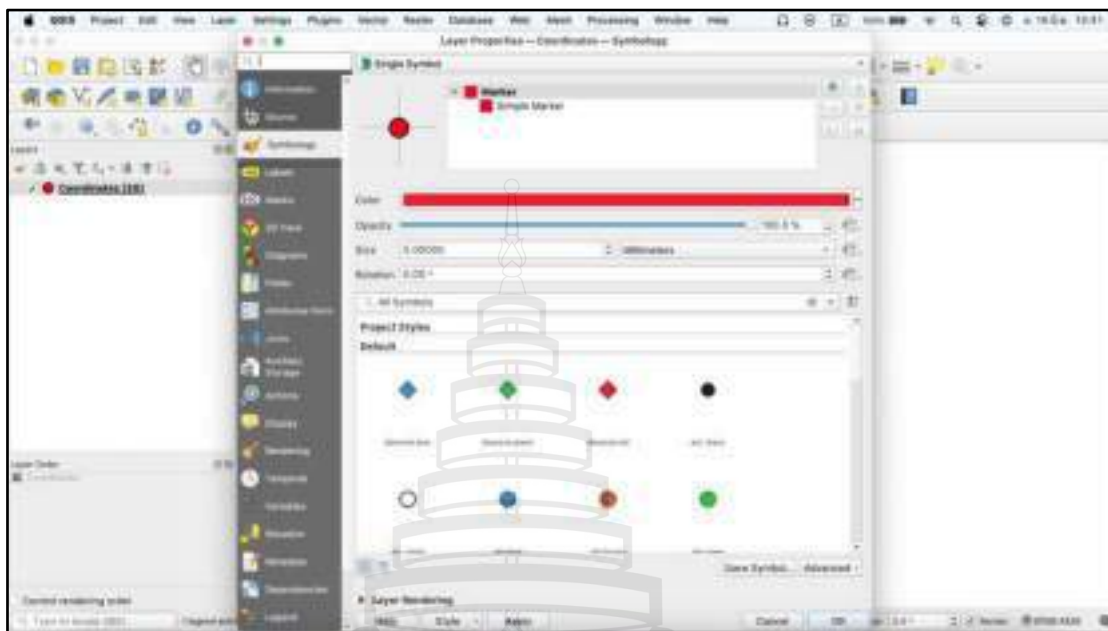
9. กด Add



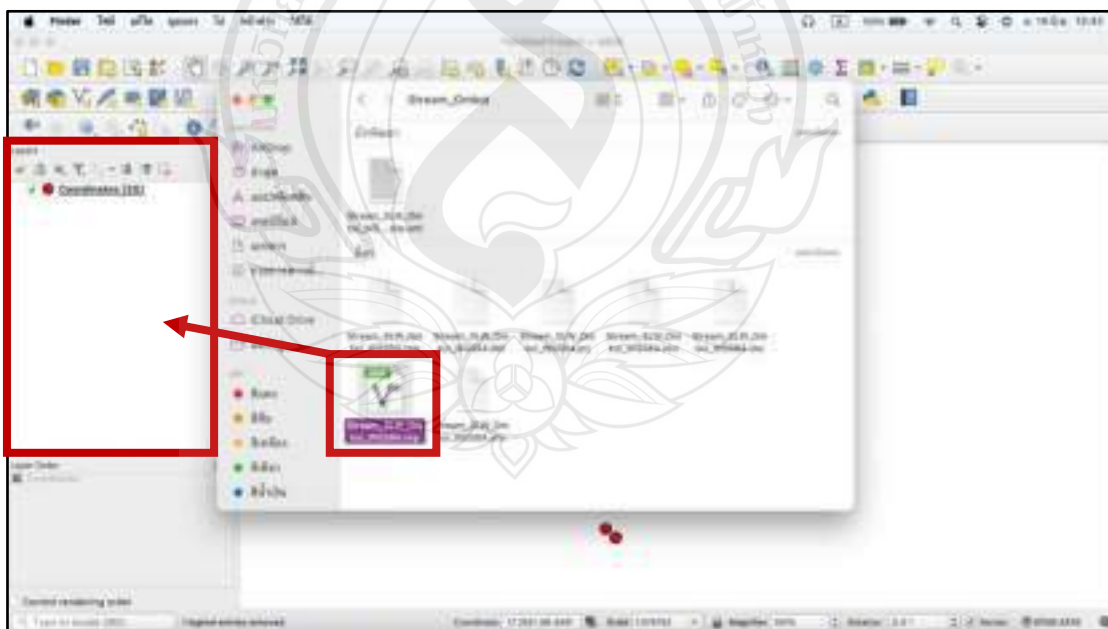
10. หลังจากกด Add จุดพิกัดเก็บตัวอย่างน้ำจะปรากฏเป็นสัญลักษณ์รูปวงกลมขึ้นมามากบนพื้นที่วางสีขาว สามารถเปลี่ยนสีและขนาดได้ โดยกดไปยังแถบชื่อที่ต้องการจะเปลี่ยน คลิกขวาแล้วกดคำสั่ง Properties...



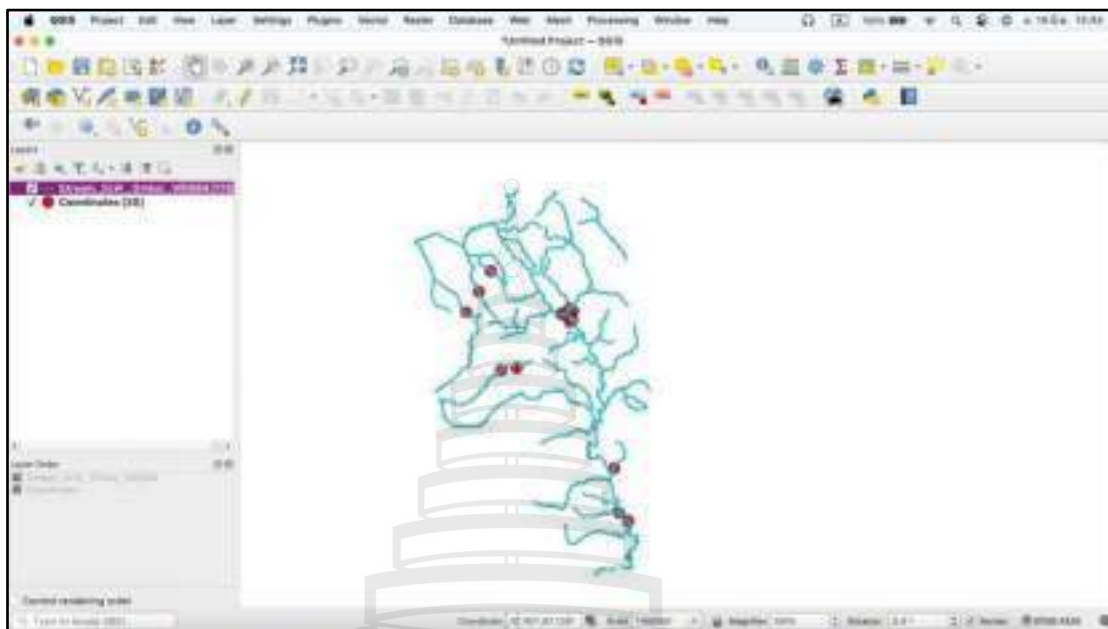
11. เมื่อกดคำสั่ง Properties... แล้ว จะปรากฏหน้าต่างที่แสดงการแก้ไขสัญลักษณ์ในหมวด Symbology เมื่อแก้ไขเสร็จแล้วให้กด OK



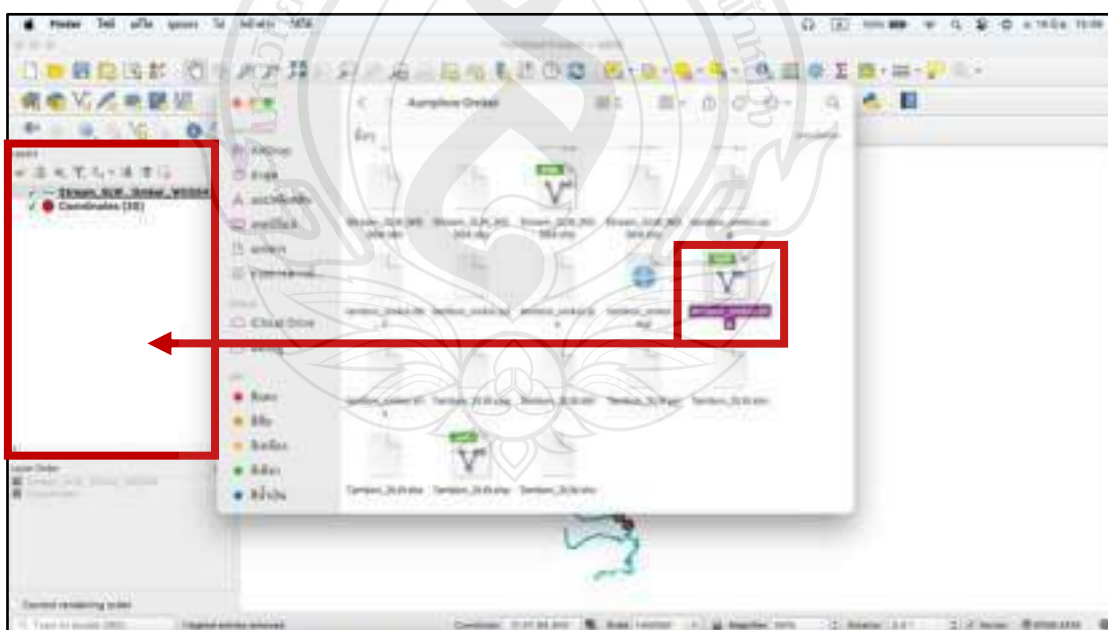
12. นำไฟล์เส้นทางน้ำของอำเภออมก๋อยที่เป็น Shapefile ลากมาใส่ในช่อง Layers ที่เป็นพื้นที่ว่างสีขาว



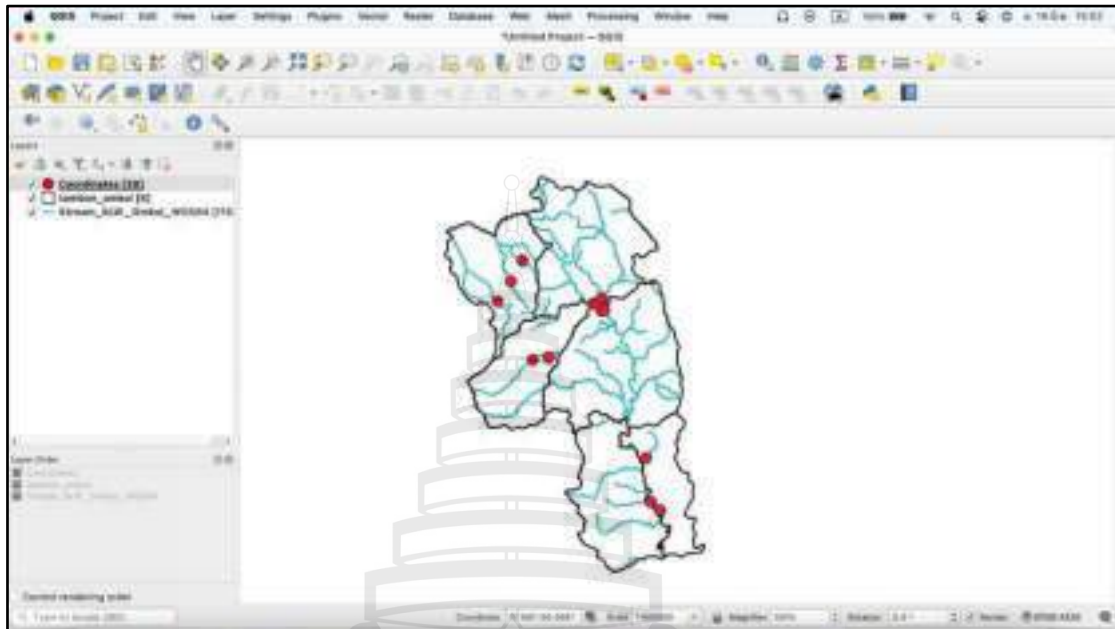
13. เส้นทางน้ำในอำเภอมก๋อยสามารถเปลี่ยนสีและขนาดได้ ให้คลิกขวาแล้วกดคำสั่ง Properties... แล้วจะปรากฏหน้าต่างที่แสดงการแก้ไขสัญลักษณ์ในหมวด Symbology เมื่อแก้ไขเสร็จแล้วให้กด OK



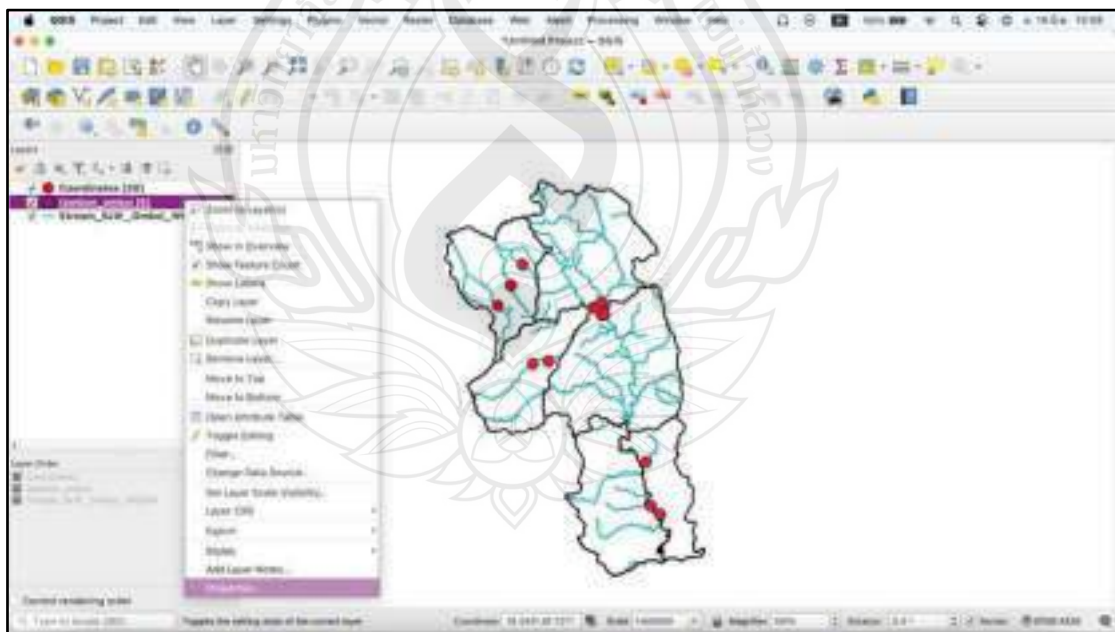
14. นำไฟล์เชตแผนที่ของอำเภอมก๋อยที่เป็น Shapefile ลากมาใส่ในช่อง Layers ที่เป็นพื้นที่ว่างสีขาว



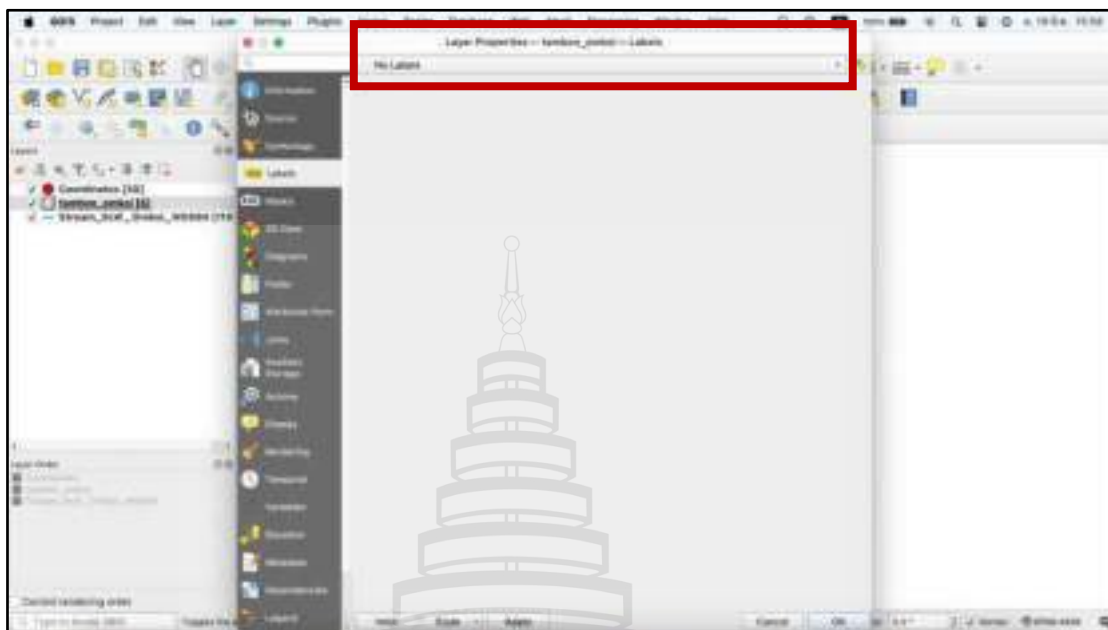
15. เขตแผนที่อำเภออมก๋อยสามารถเปลี่ยนสีและขนาดได้ ให้คลิกขวาแล้วกดคำสั่ง Properties...
แล้วจะปรากฏหน้าต่างแสดงการแก้ไขสัญลักษณ์ในหมวด Symbolology เมื่อแก้ไขเสร็จแล้วให้กด OK



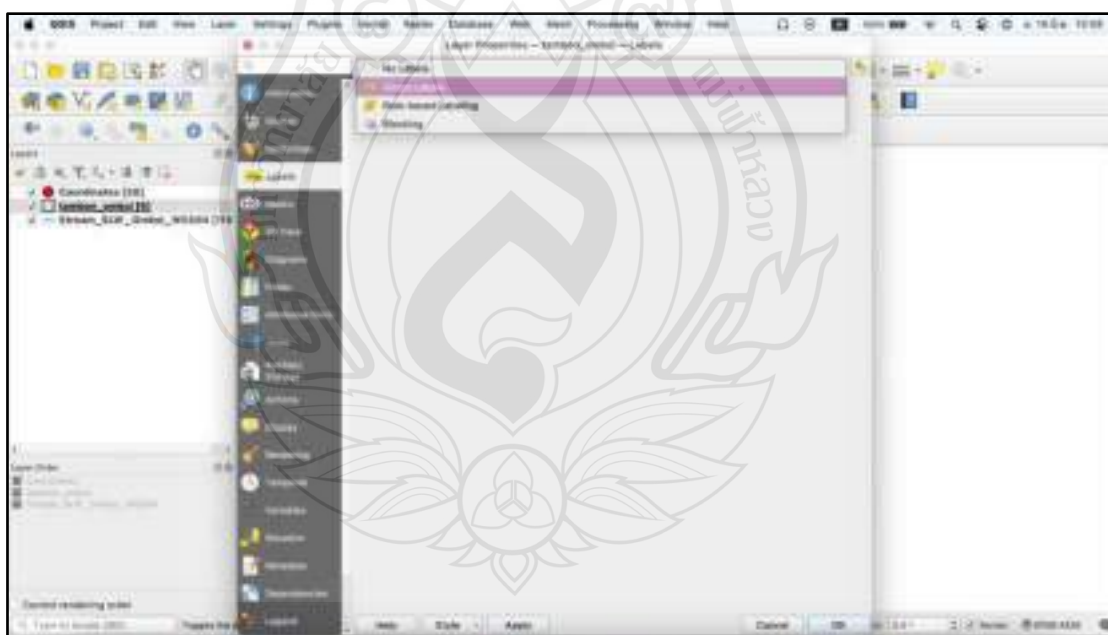
16. กดแถบชื่อเขตแผนที่มกอย คลิ๊กขวา → Properties...



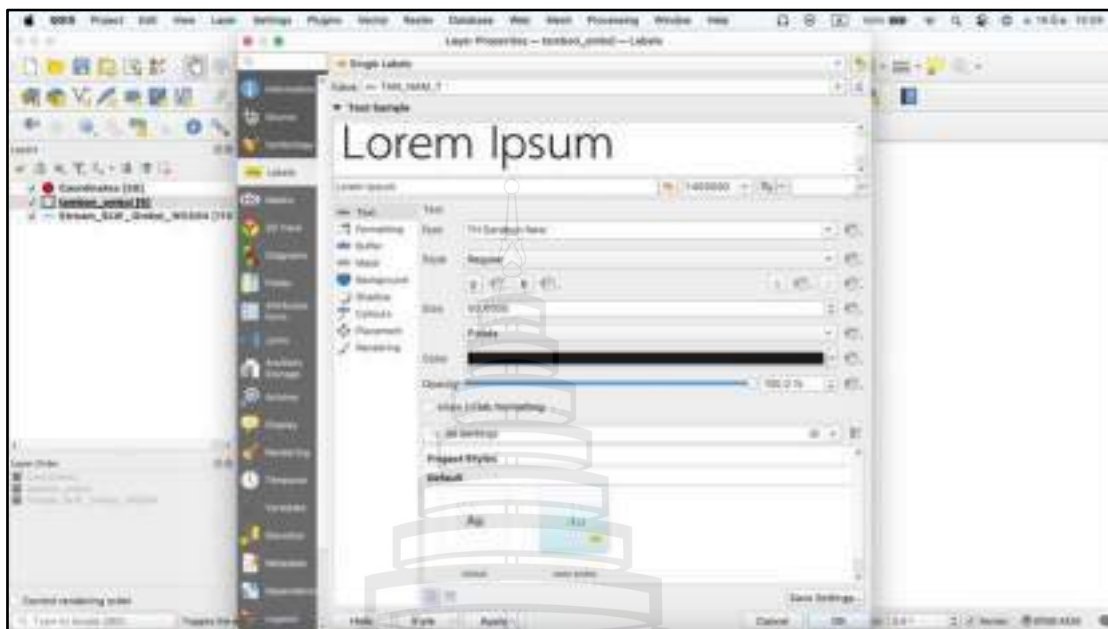
17. กดที่คำสั่ง No Labels



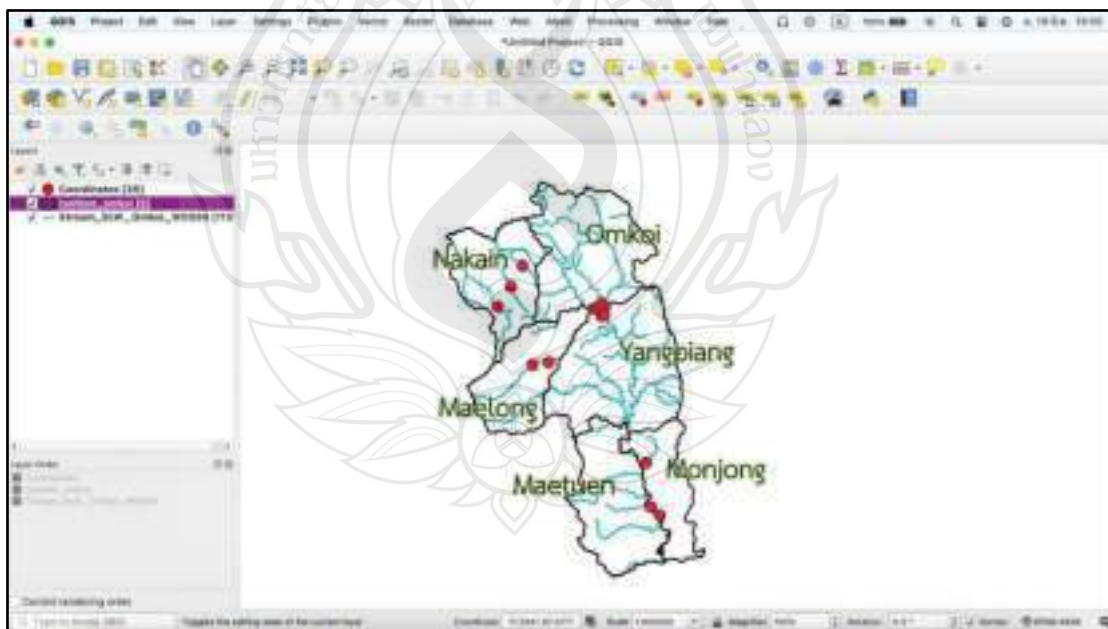
18. เลือก Single Labels



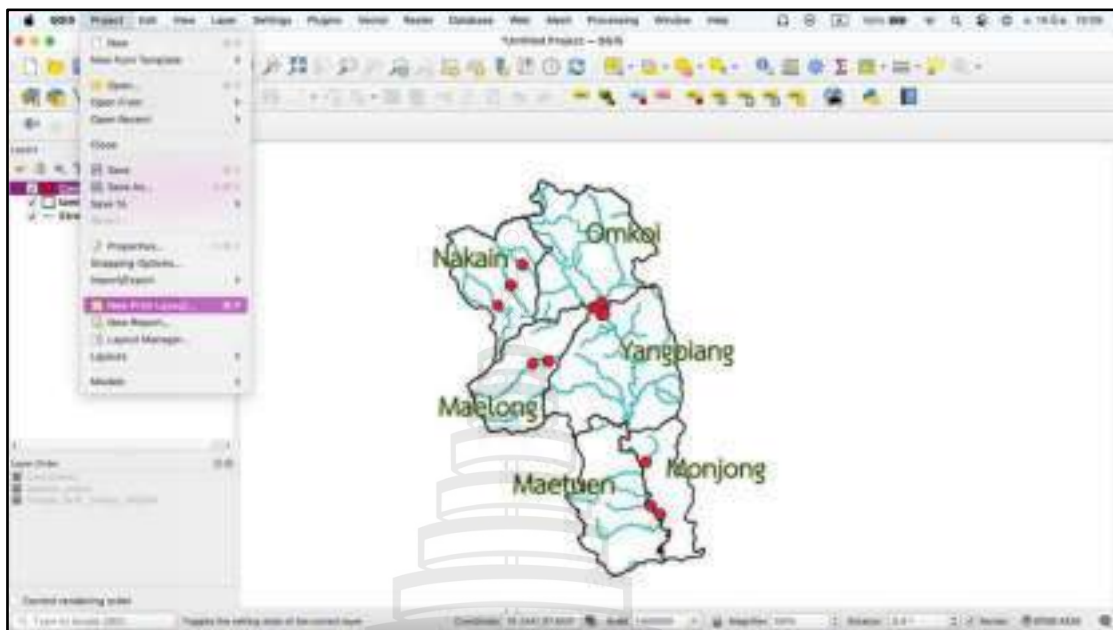
19. หัวข้อ Value ให้เลือกตำบล ซึ่งในตัวอย่างที่แสดงจะเป็น TAM_NAM_T เมื่อแก้ไขตัวอักษรตามที่ต้องการเสร็จแล้วให้กด OK



20. ชื่อตำบลจะปรากฏขึ้นในแผนที่ของอำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่



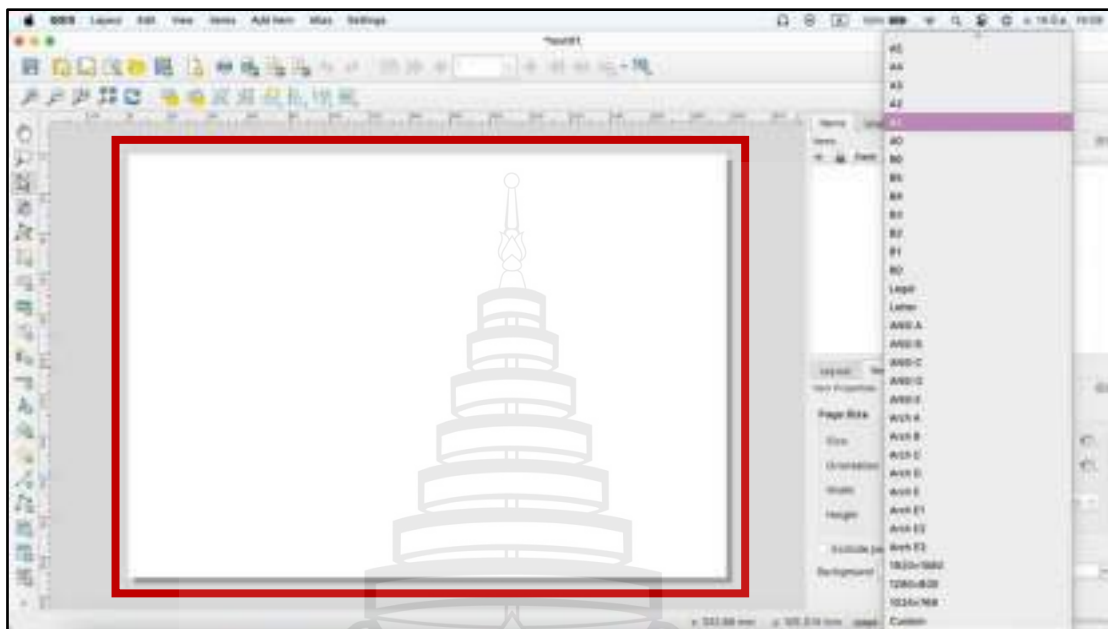
21. กดที่คำสั่ง Project → New Print Layout



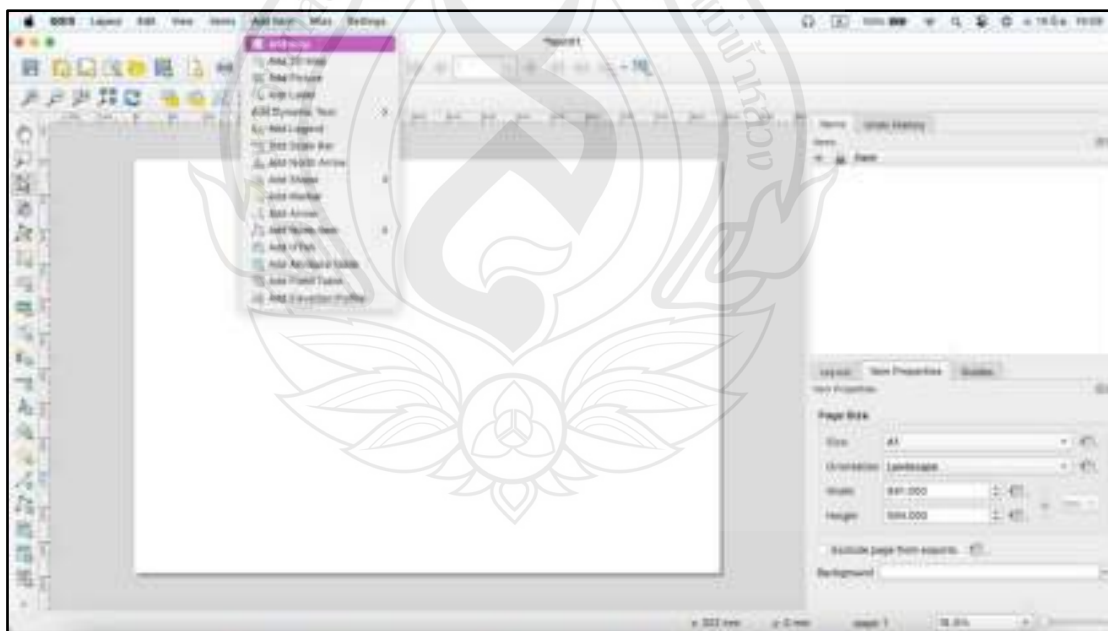
22. ตั้งชื่อ แล้วกด OK



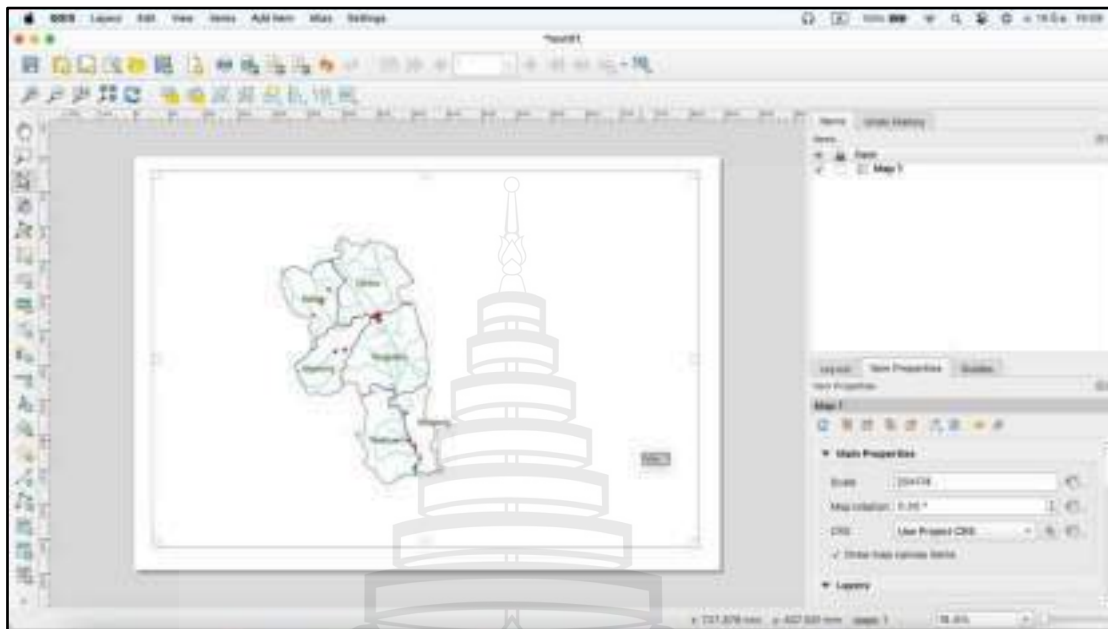
23. คลิกซ้ายในพื้นที่สี่เหลี่ยมสีขาว แล้วจะปรากฏเมนูคำสั่งมุมขวาล่าง จากนั้นกดที่คำสั่ง Item Properties → Size → A1 หรือเลือกขนาดกระดาษตามที่ต้องการ



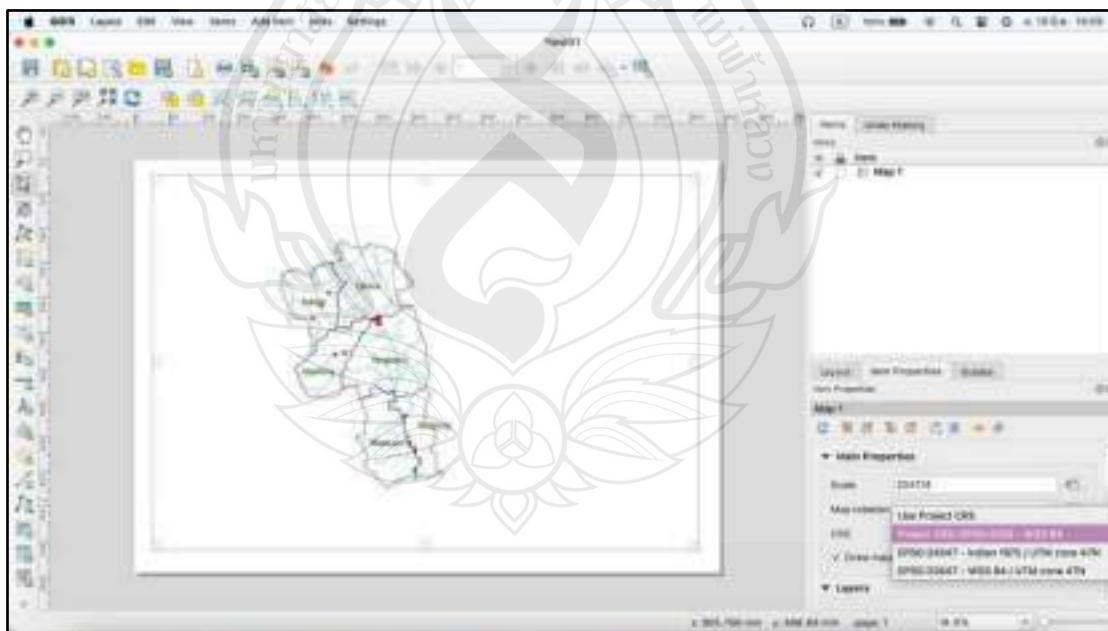
24. กดคำสั่ง Add Item → Add Map



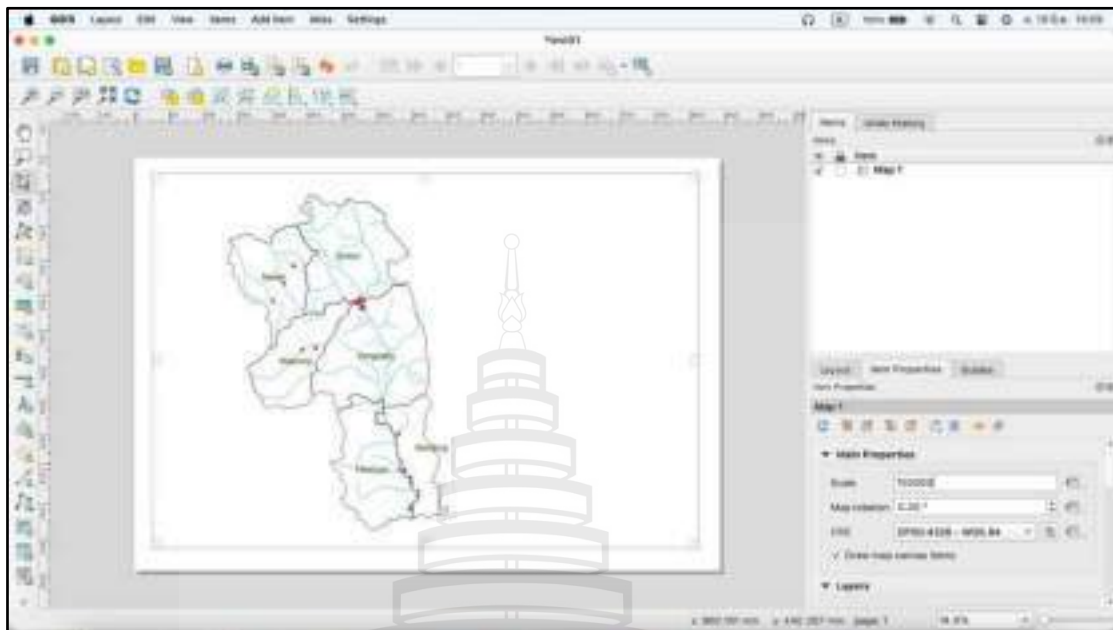
25. คลิกซ้ายในพื้นที่ว่างสี่เหลี่ยมสีขาวแล้วลากให้อยู่ในกรอบพื้นที่ จากนั้นภาพแผนที่จะปรากฏขึ้น สามารถปรับขนาดและตำแหน่งได้



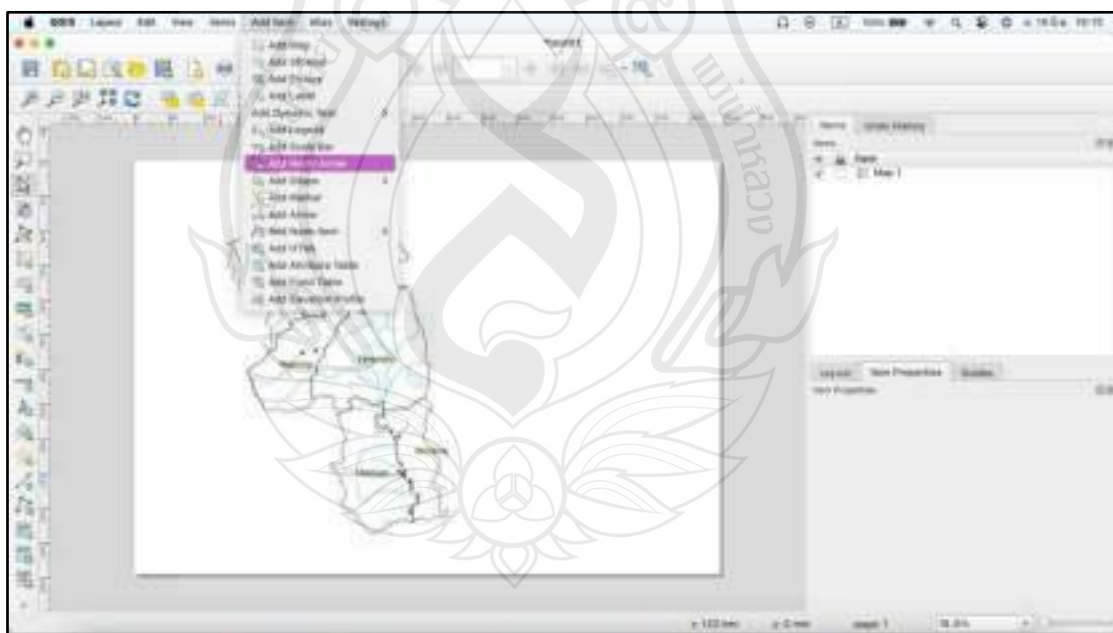
26. หัวข้อ CRS เลือก Project CRS: EPSG:4326 – WGS 84



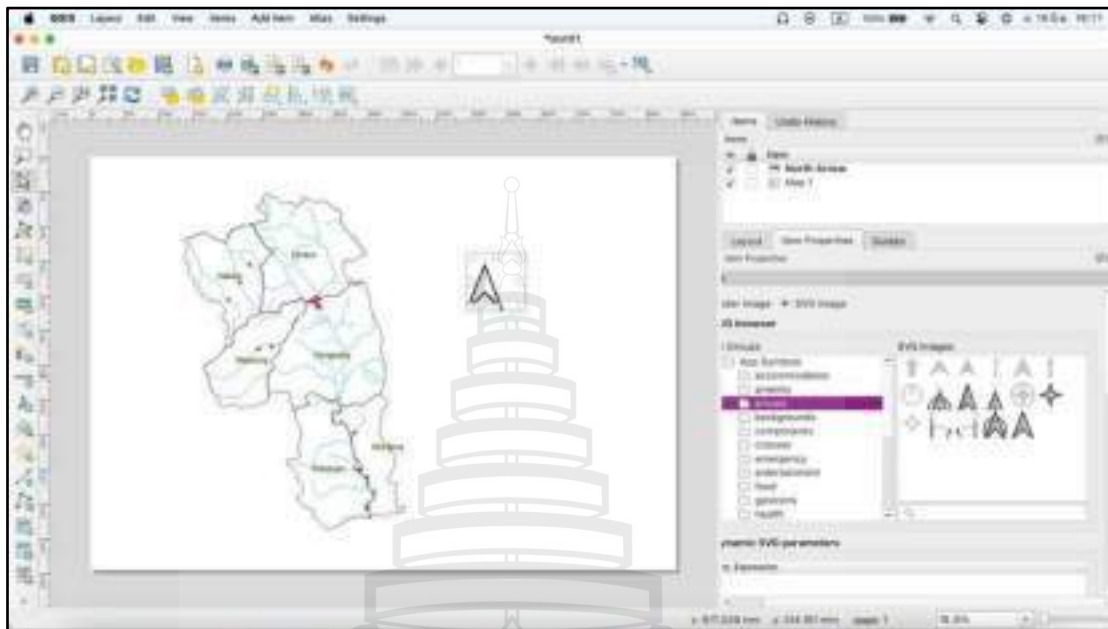
27. ปรับ Scale 150,000 และ Map rotation 0.00 ° หรือปรับตามที่ต้องการ



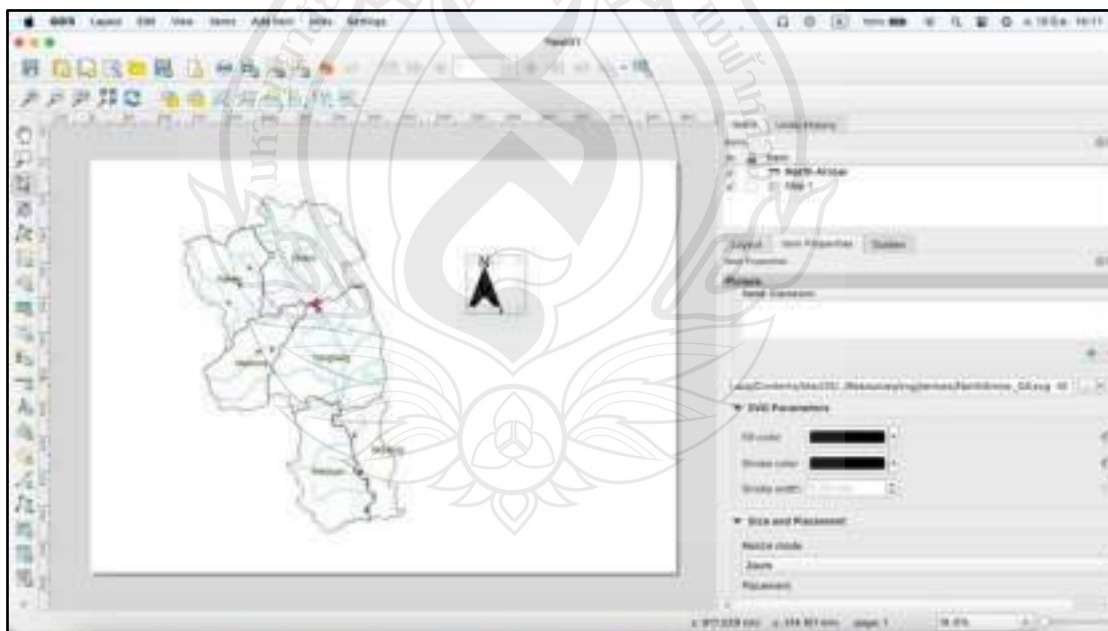
28. กดคำสั่ง Add Item → Add North Arrow



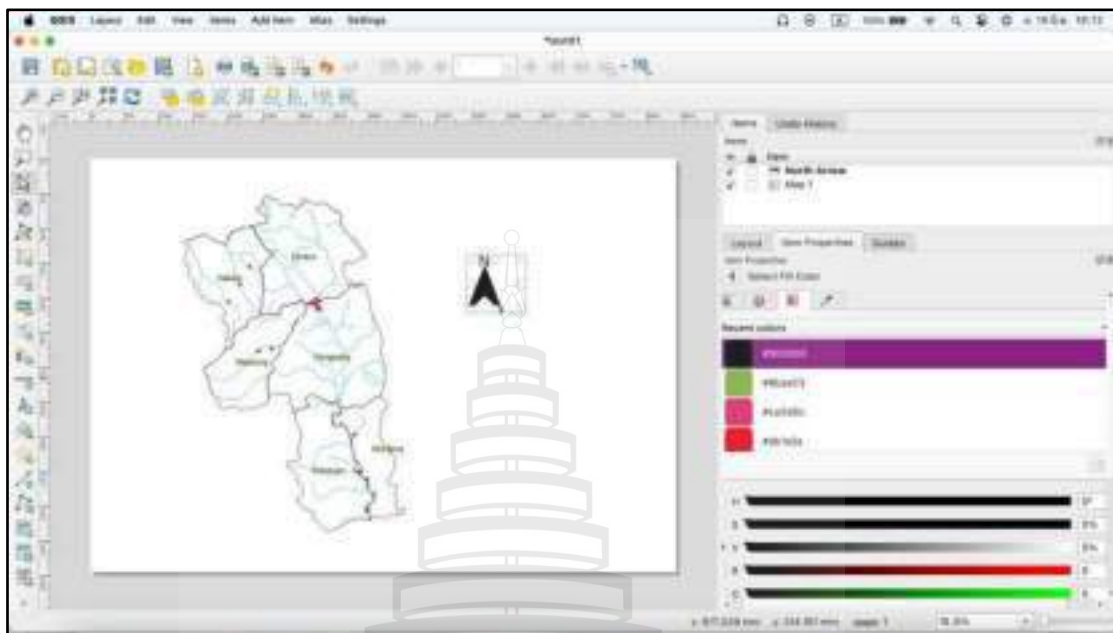
29. คลิกซ้ายในพื้นที่ว่างสีเหลี่ยมสีขาวแล้วลากให้อยู่ในกรอบพื้นที่ จากนั้นเข็มทิศจะปรากฏขึ้น สามารถปรับขนาด ตำแหน่ง สี และเลือกรูปแบบเข็มทิศได้



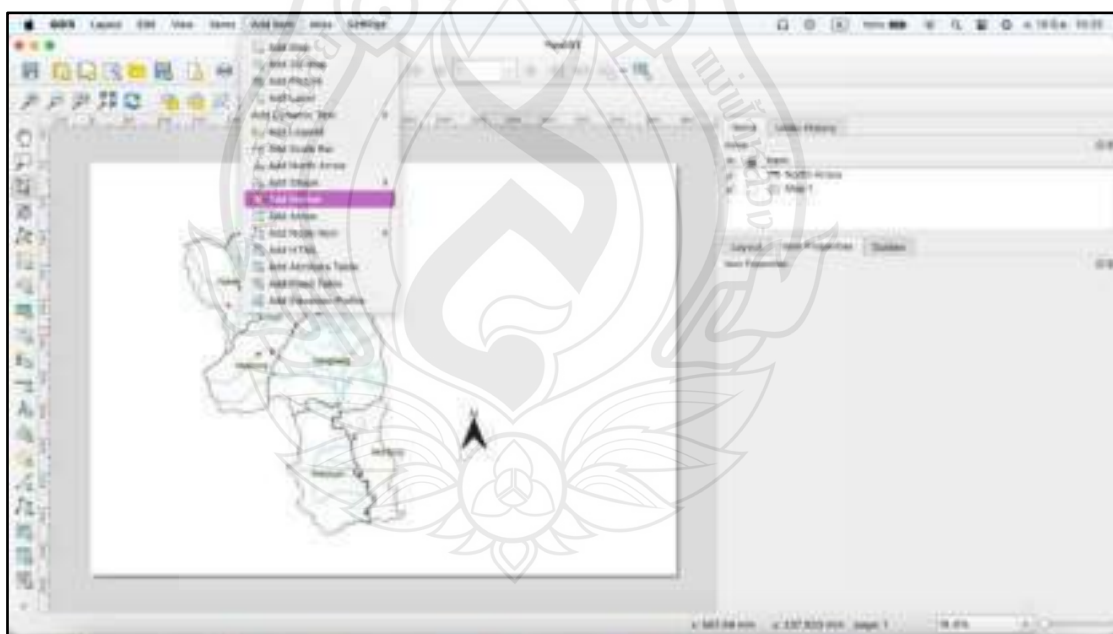
30. หัวข้อ Fill color และ Stroke color ปรับเป็นสีดำ



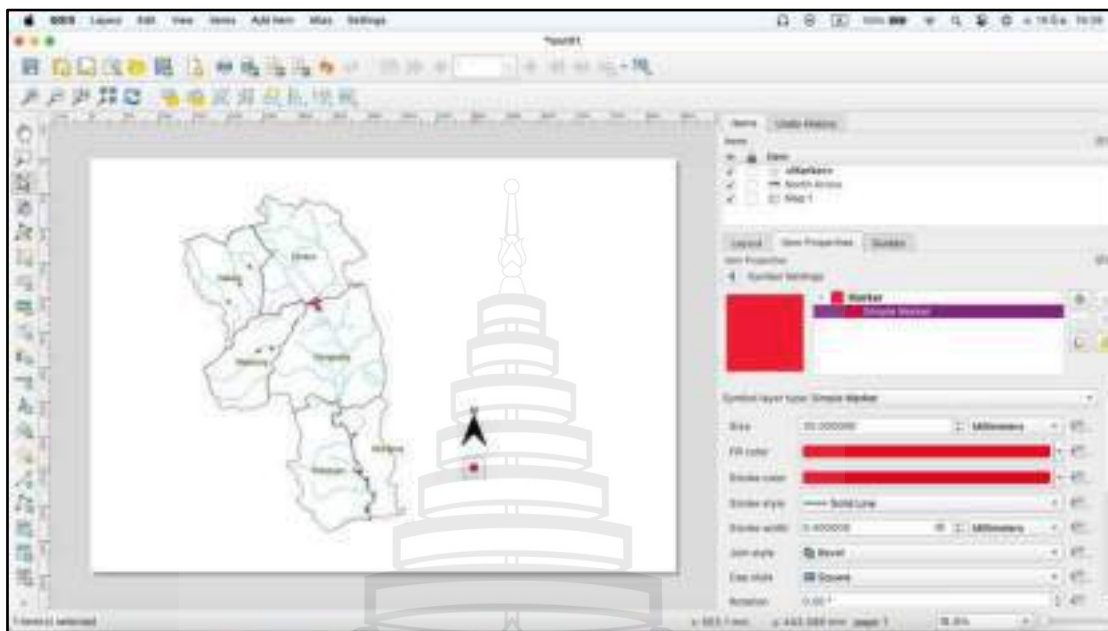
31. สามารถปรับสีได้ใน Item properties → Select Fill Color



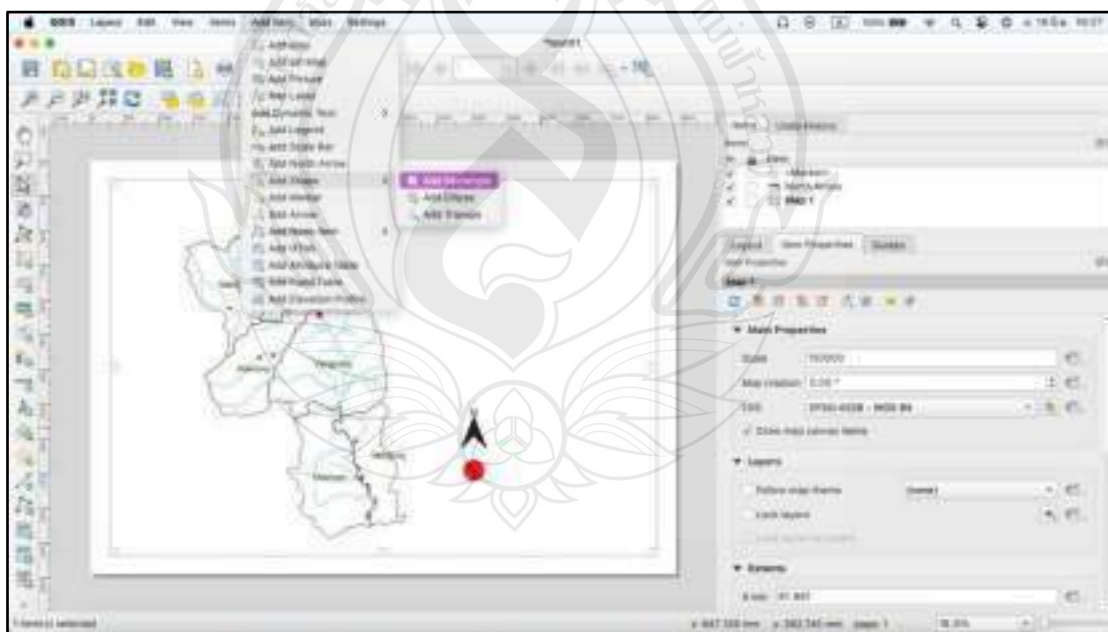
32. กดคำสั่ง Add Item → Add Marker



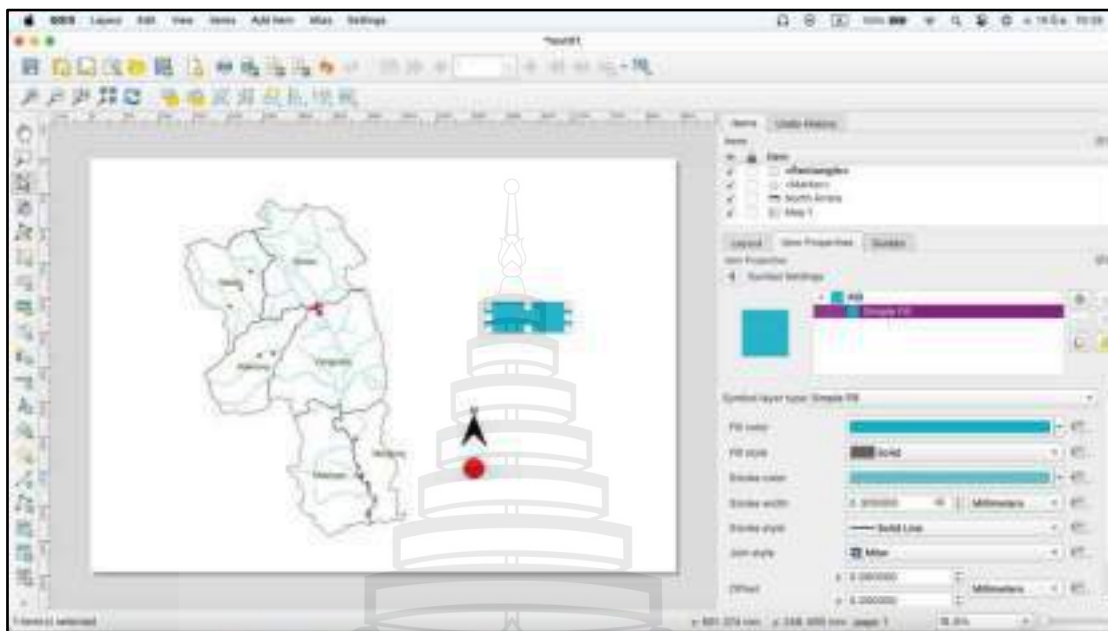
33. คลิกซ้ายในพื้นที่ว่างสีเหลี่ยมสีขาวแล้วลากให้อยู่ในกรอบพื้นที่ จากนั้นรูปวงกลมจะปรากฏขึ้น สามารถปรับขนาดและสีได้



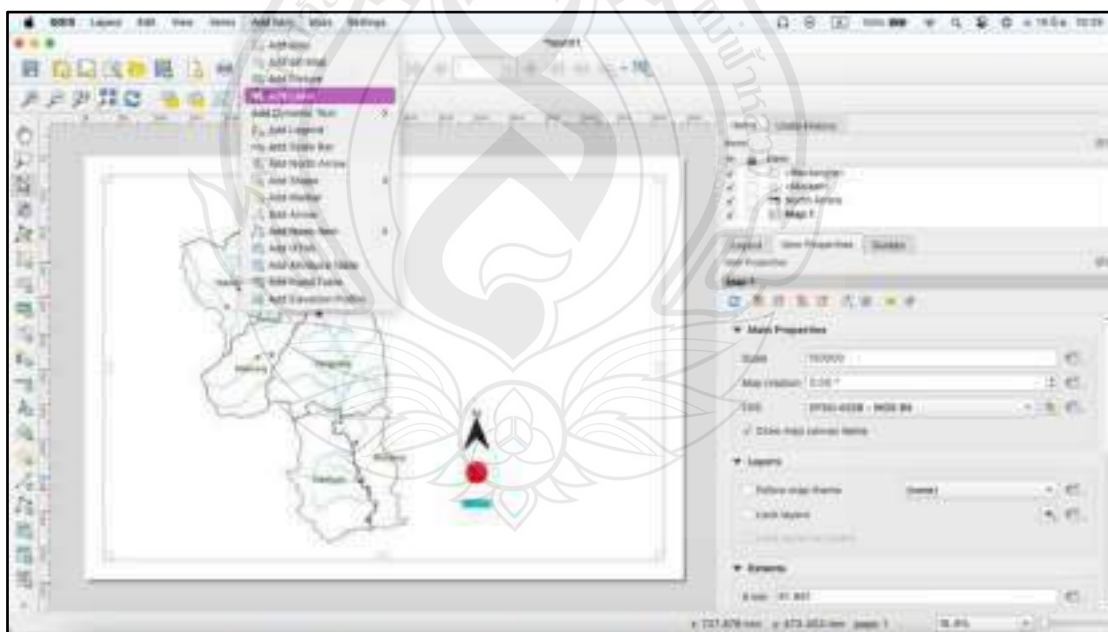
34. กดคำสั่ง Add Item → Add Shape → Add Rectangle



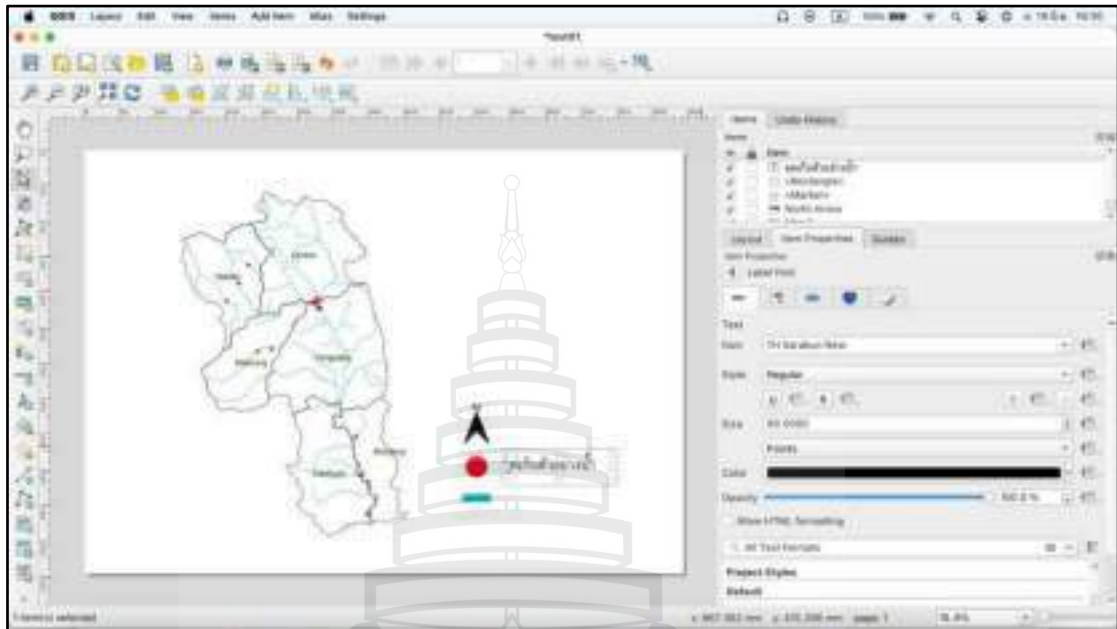
35. คลิกซ้ายในพื้นที่ว่างสี่เหลี่ยมสีขาวแล้วลากให้อยู่ในกรอบพื้นที่ จากนั้นรูปสี่เหลี่ยมจะปรากฏขึ้น สามารถปรับขนาดและสีได้



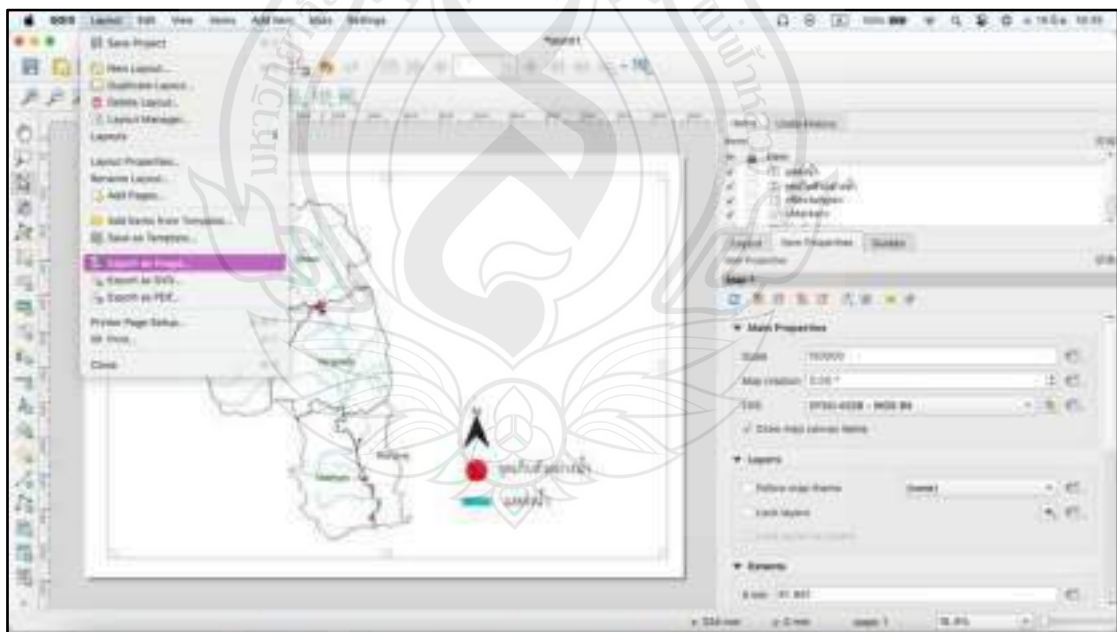
36. กดคำสั่ง Add Item → Add Label

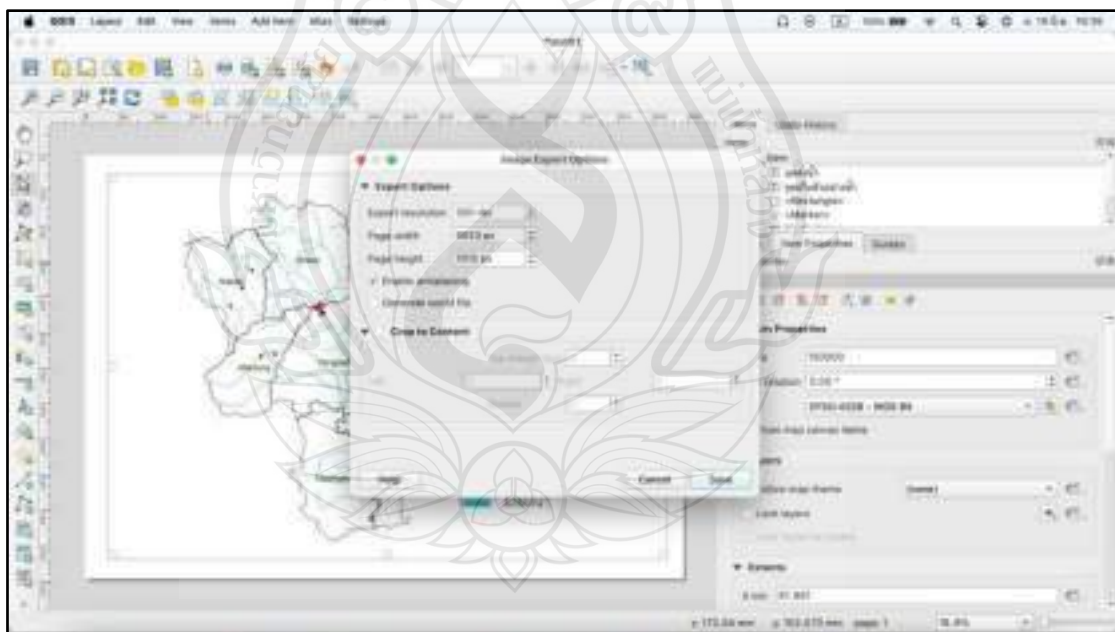
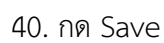


37. คลิ๊กซ้ายในพื้นที่วางสี่เหลี่ยมสีขาวแล้วลากให้อยู่ในกรอบพื้นที่ จากนั้นช่องข้อความจะปรากฏขึ้น สามารถปรับขนาด สี และรูปแบบอักษรได้

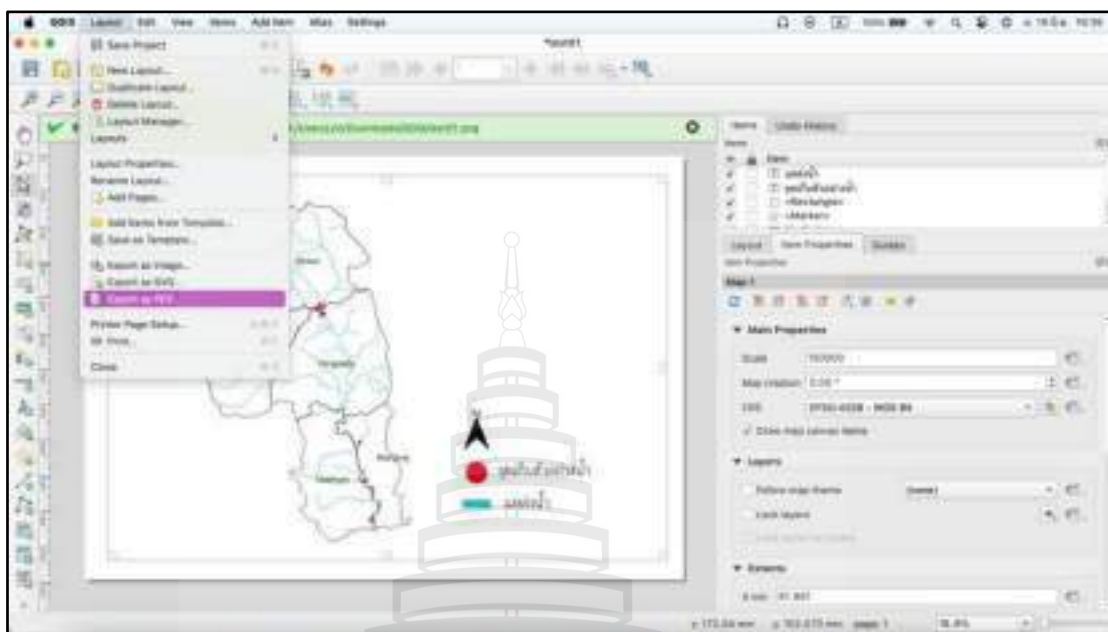


38. เมื่อทำแผนที่เรียบร้อยแล้ว กดคำสั่ง Layout → Export as Image...

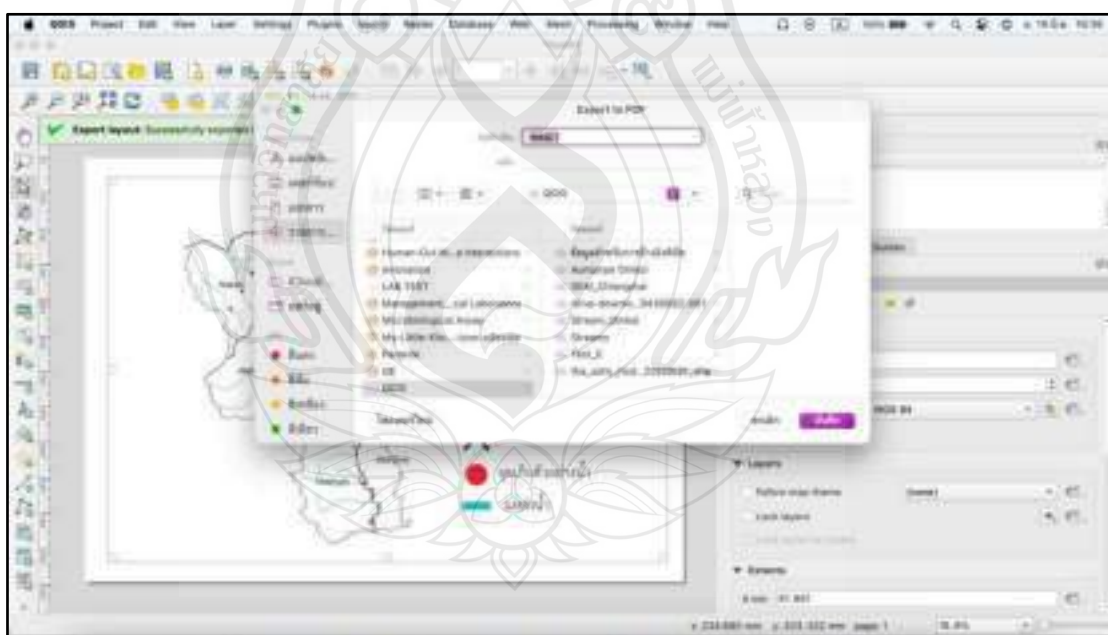




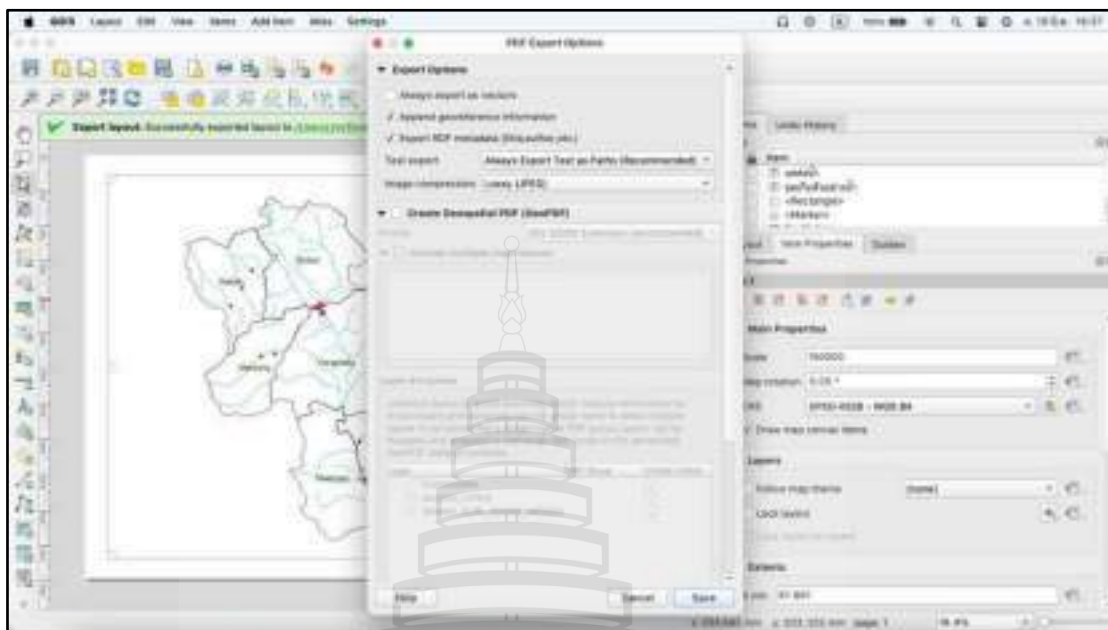
41. กดคำสั่ง Layout → Export as PDF...



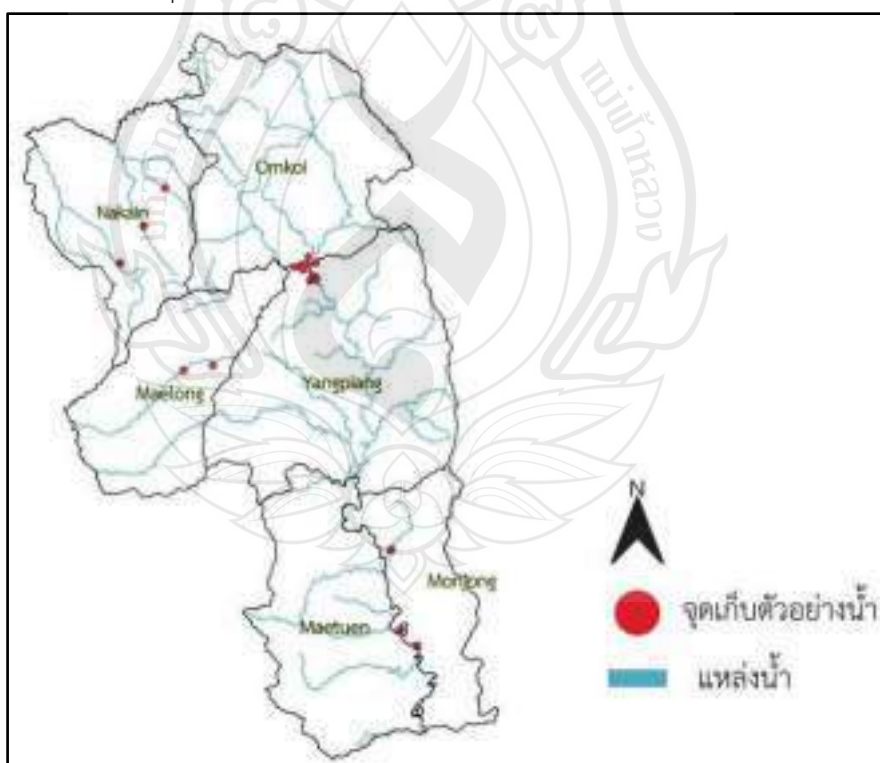
42. ตั้งชื่อ กดบันทึก



43. กด Save



ตัวอย่างของแผนที่แสดงจุดพิกัดตำแหน่งเก็บตัวอย่างน้ำโดยใช้โปรแกรม QGIS

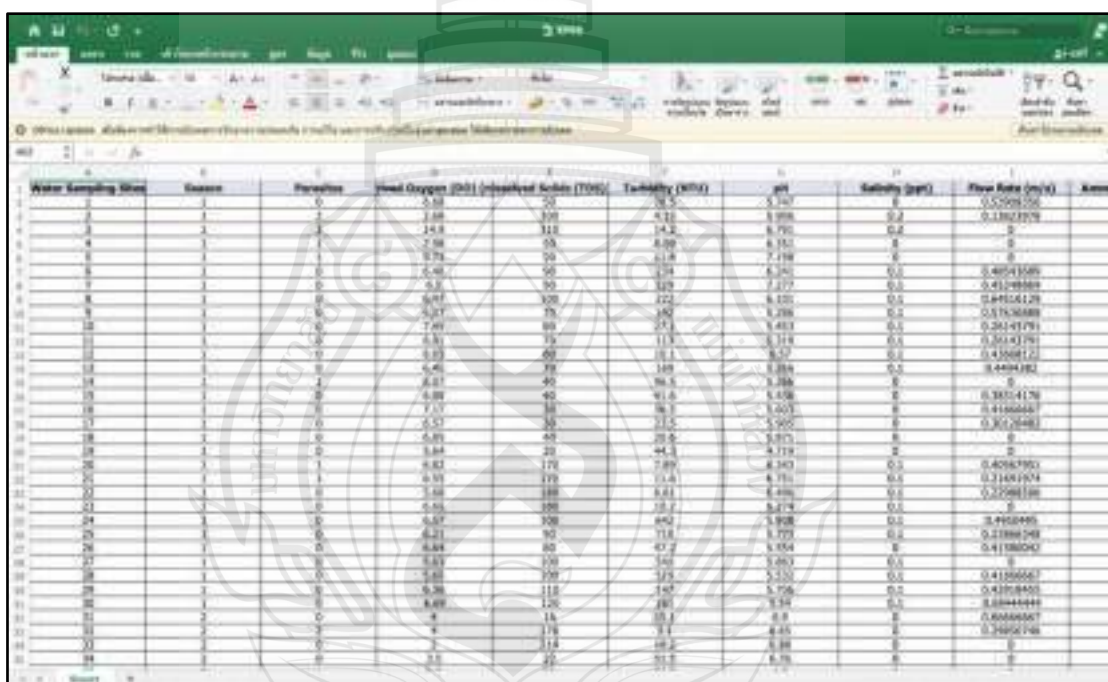


ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของน้ำและ แหล่งน้ำที่พบปรสิตโดยใช้โปรแกรม SPSS

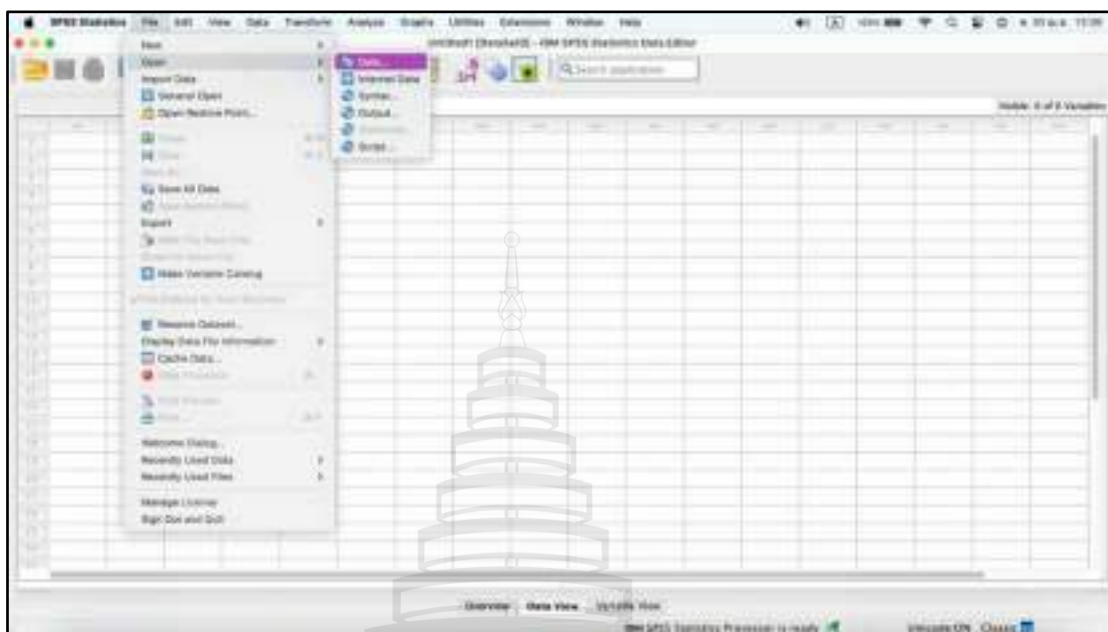
ง1. ขั้นตอนการใช้โปรแกรม SPSS โดยใช้สถิติ Fisher exact

1. กรอกรวบรวมข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละจุดรวมถึงจุดที่พบเชื้อปรสิตให้ครบ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel

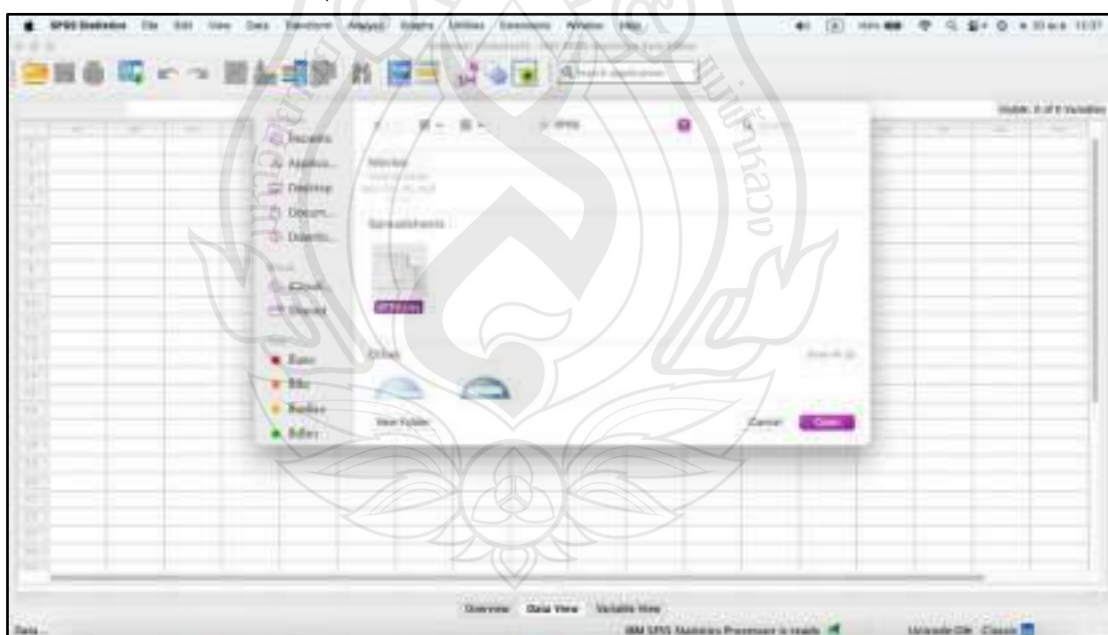


Water Sampling Sites	Season	Parasites	Dissolved Oxygen (DO) (mg/L)	Turbidity (NTU)	pH	Salinity (ppt)	Flow Rate (m³/s)	Amount
1	1	0	5.58	20	6.5	0	0.5205256	
2	1	1	1.68	120	6.11	0.008	0.1362329	
3	1	1	14.1	118	6.70	0.2	0	
4	1	0	2.98	55	6.08	0	0	
5	1	0	0.78	50	6.18	0	0	
6	1	0	2.48	50	6.14	0.0	0.4054350	
7	1	0	0.0	120	7.17	0.0	0.4138889	
8	1	0	6.01	122	6.10	0.0	0.8710412	
9	1	0	5.21	75	6.28	0.0	0.5763688	
10	1	0	7.09	60	6.43	0.0	0.3014979	
11	1	0	0.0	75	6.14	0.0	0.3143176	
12	1	0	0.0	60	6.32	0.0	0.4308112	
13	1	0	6.46	78	6.88	0.0	0.4404382	
14	1	1	6.81	40	6.58	0	0	
15	1	0	6.88	40	6.58	0	0.3871417	
16	1	0	7.17	38	6.01	0	0.4166667	
17	1	0	6.51	30	5.90	0	0.3072548	
18	1	0	6.81	25	6.07	0	0	
19	1	0	6.84	20	6.18	0	0	
20	1	0	6.83	170	7.89	0.0	0.4086990	
21	1	0	6.91	170	7.14	0.0	0.3148167	
22	1	0	5.58	188	6.81	0.0	0.2708138	
23	1	0	6.01	100	7.07	0.0	0.474	
24	1	0	6.07	308	6.98	0.0	0.4950495	
25	1	0	6.21	70	6.77	0.0	0.2188654	
26	1	0	6.84	80	6.94	0	0.4118604	
27	1	0	6.01	150	5.60	0.0	0	
28	1	0	5.81	175	5.30	0.0	0.4136667	
29	1	0	6.38	118	6.76	0.0	0.4330840	
30	1	0	6.89	120	6.91	0.0	0.8844444	
31	2	0	4	16	6.8	0	0.6066667	
32	2	0	6	18	6.4	0	0.2605168	
33	2	0	3.8	20	6.18	0	0	
34	2	0	3.8	20	6.18	0	0	

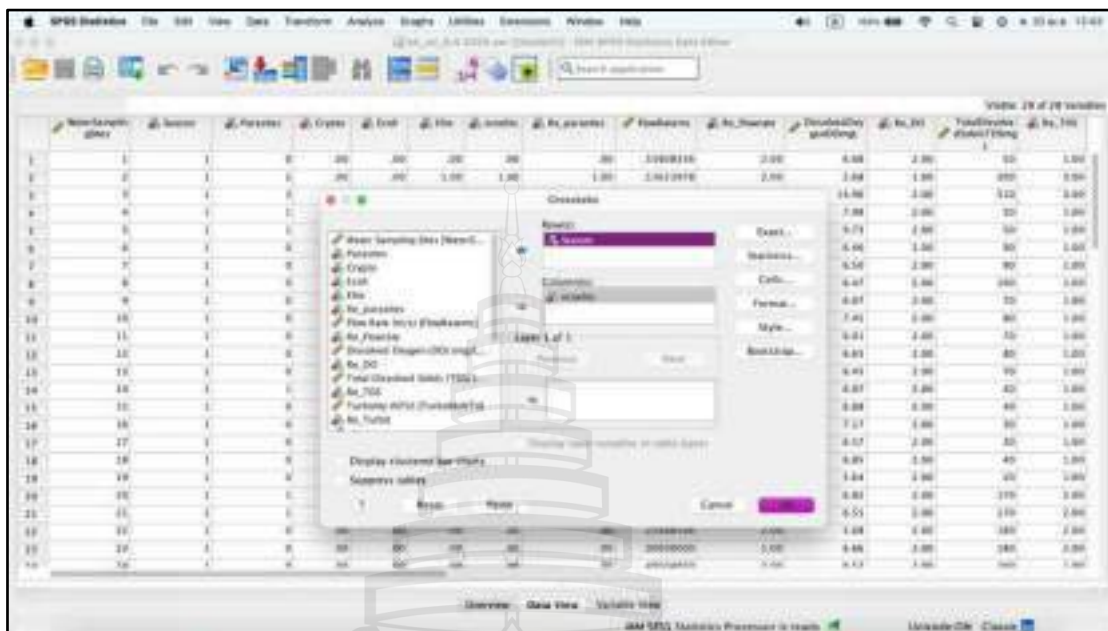
2. เปิดโปรแกรม SPSS แล้วไปที่ File → Open → Data...



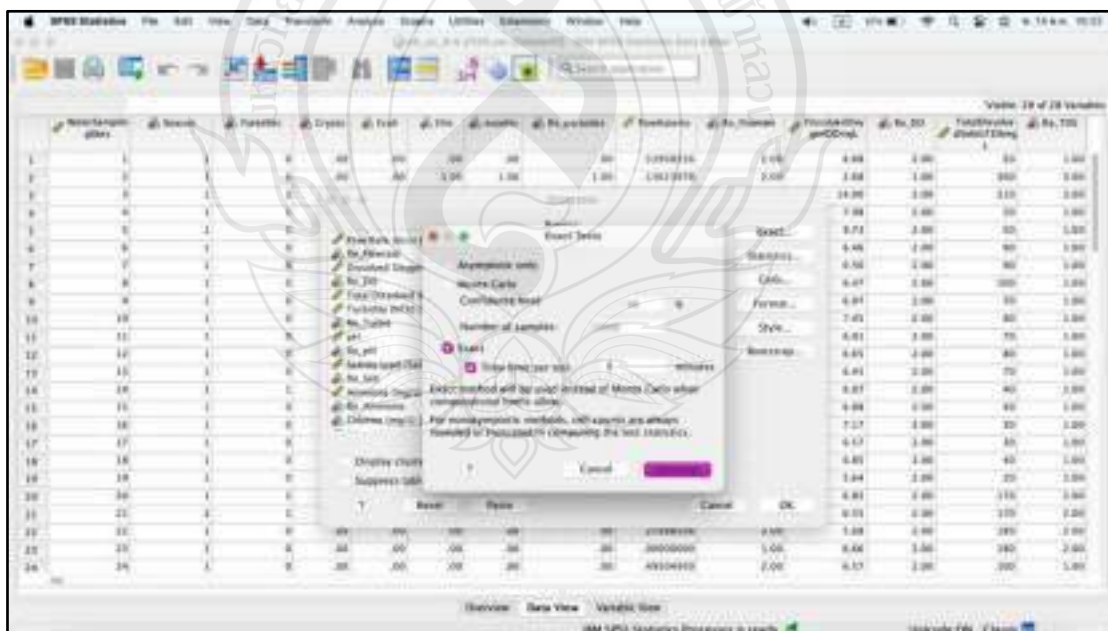
3. เลือกไฟล์ .xlsx แล้วกด Open

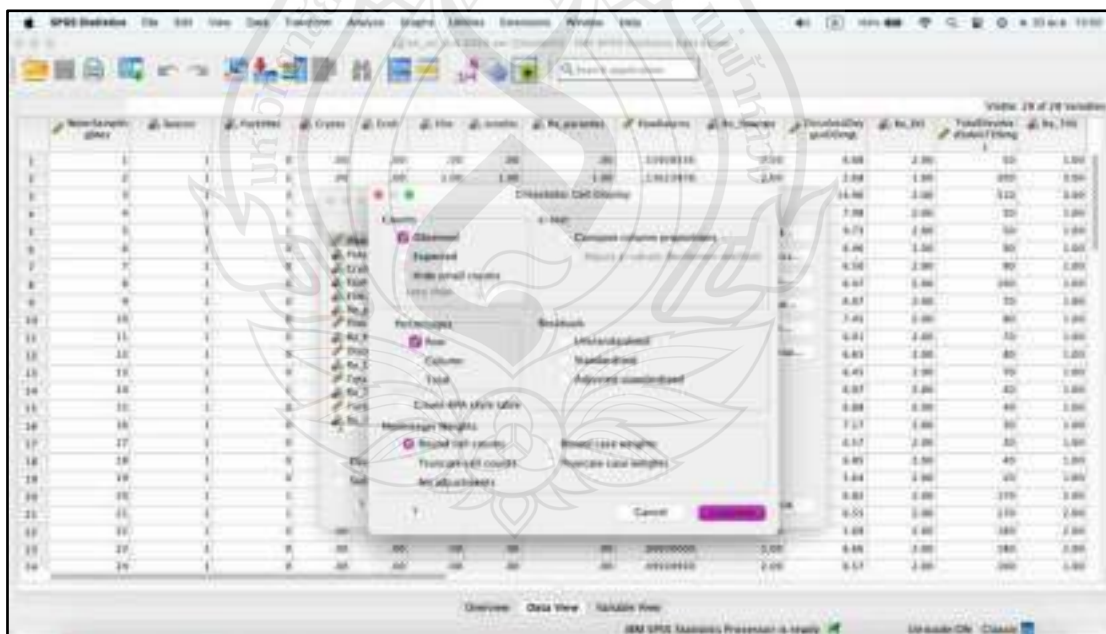


6. ในช่อง Row(s): ให้เลือกใส่หัวข้อของลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำ ส่วนช่อง Column(s): ให้ใส่หัวข้อของเชื้อปรสิิต

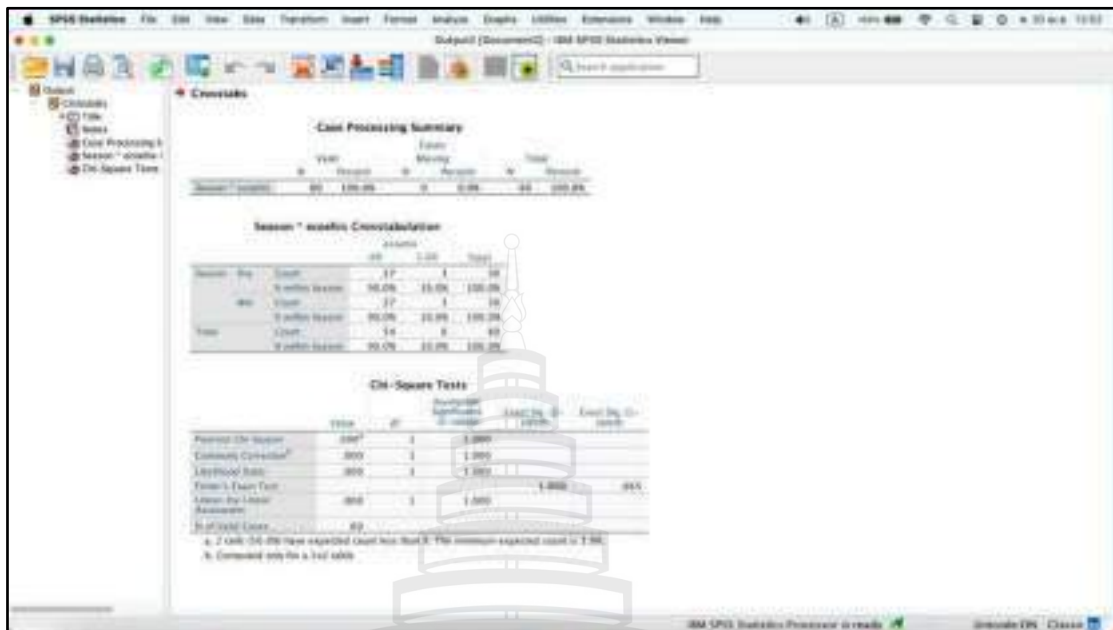


7. กดไปที่เมนู Exact... แล้วกดติ๊กเครื่องหมายถูกในช่องหัวข้อ Exact Time limit test แล้วกด Continue



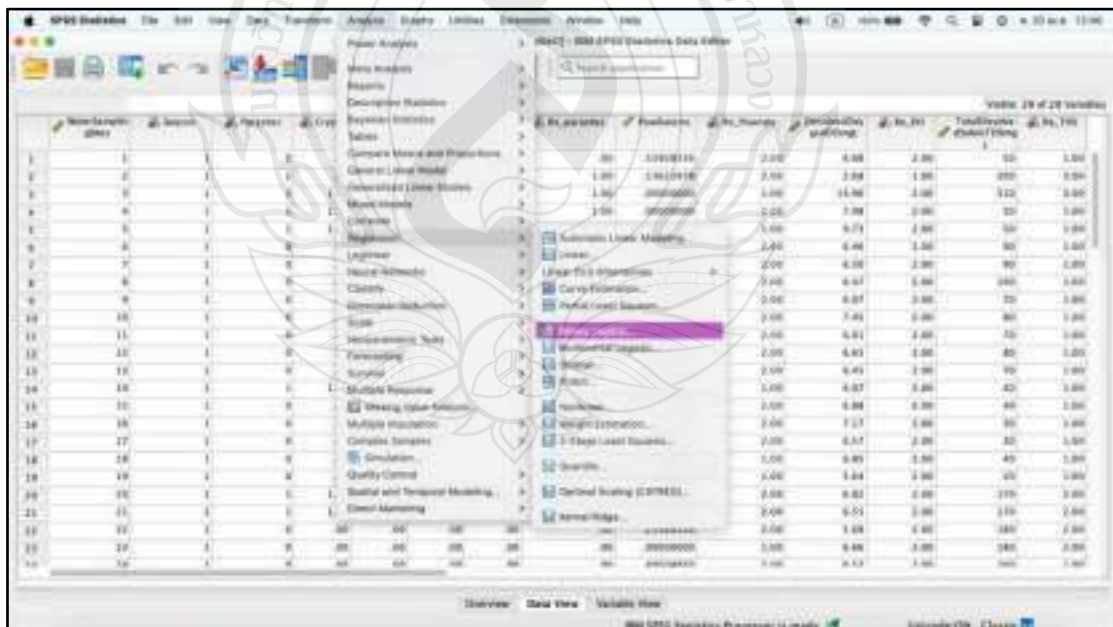


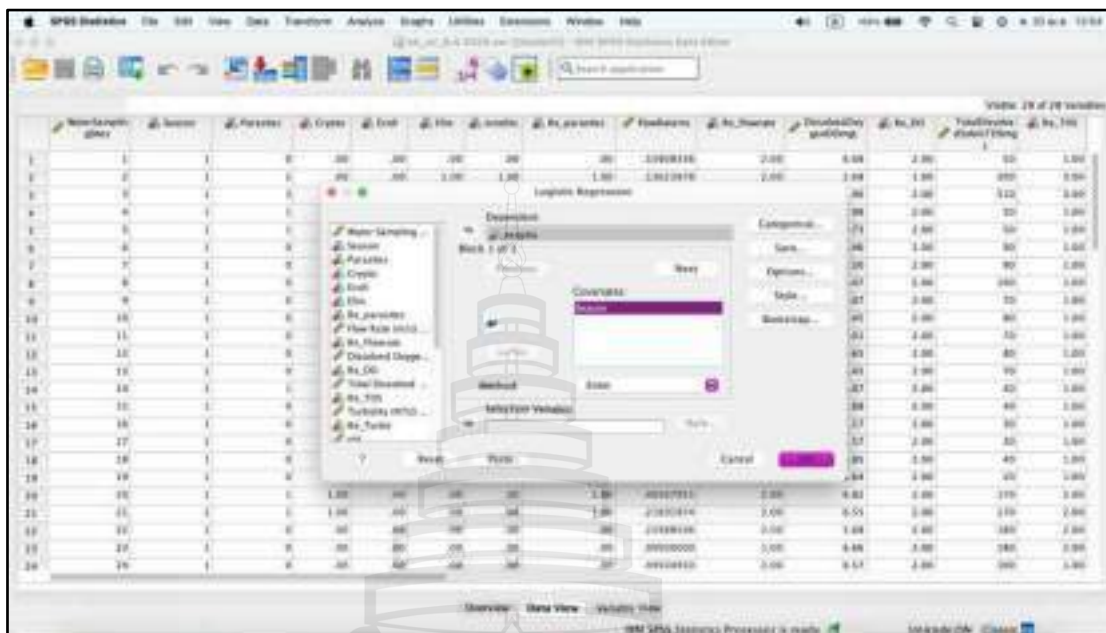
10. หน้าจอแสดงผลลัพธ์



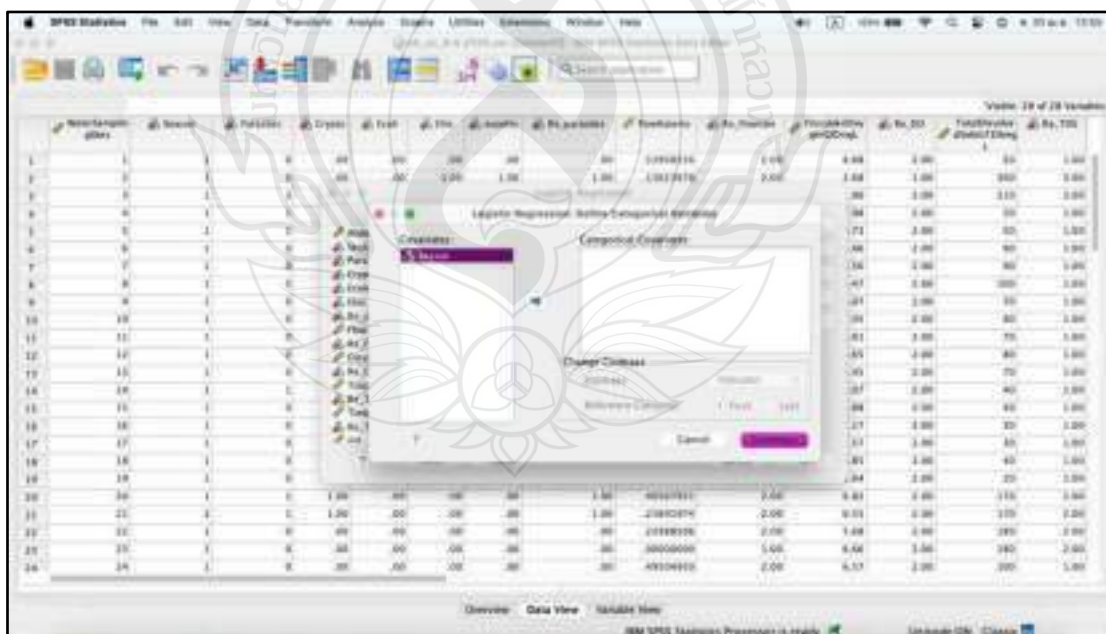
ง2. ขั้นตอนการใช้โปรแกรม SPSS โดยใช้สถิติ Logistic regression

1. กดที่เมนู Analyze → Regression → Binary Logistic...

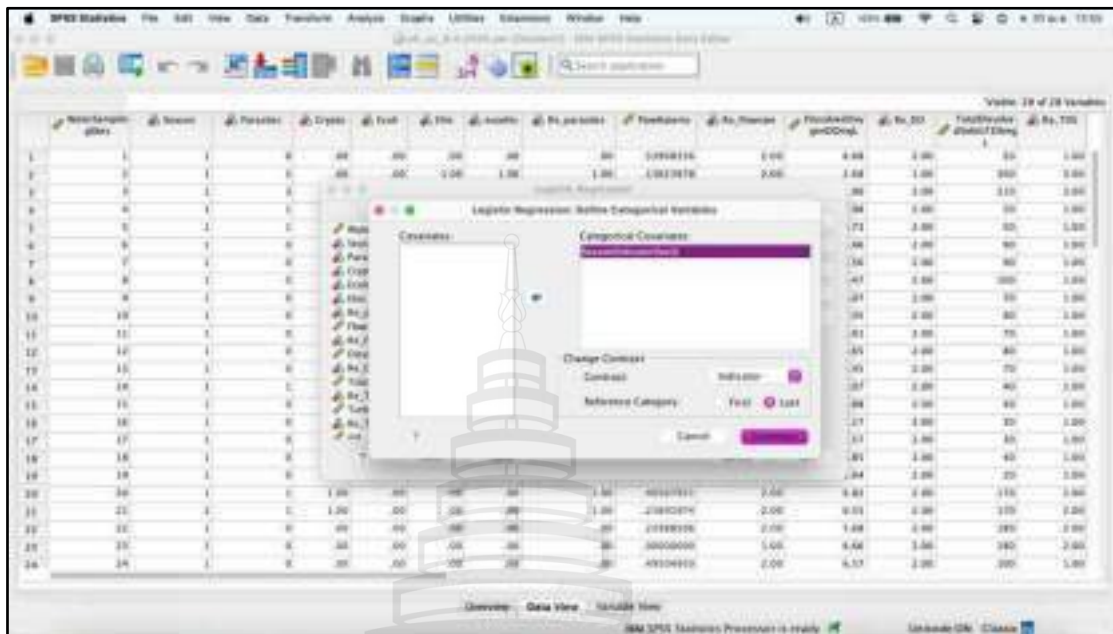




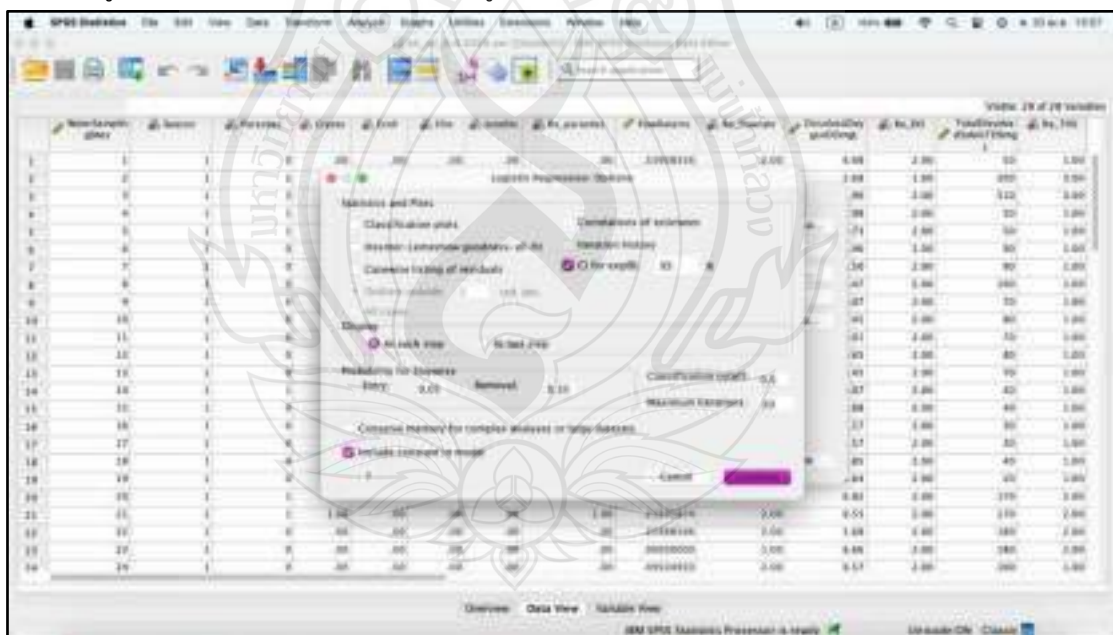
3. กดเมนู Categorical... จากนั้นกดย้ายหัวข้อที่เลือกจากช่อง Covariates: ไปยังช่อง Categorical Covariates:



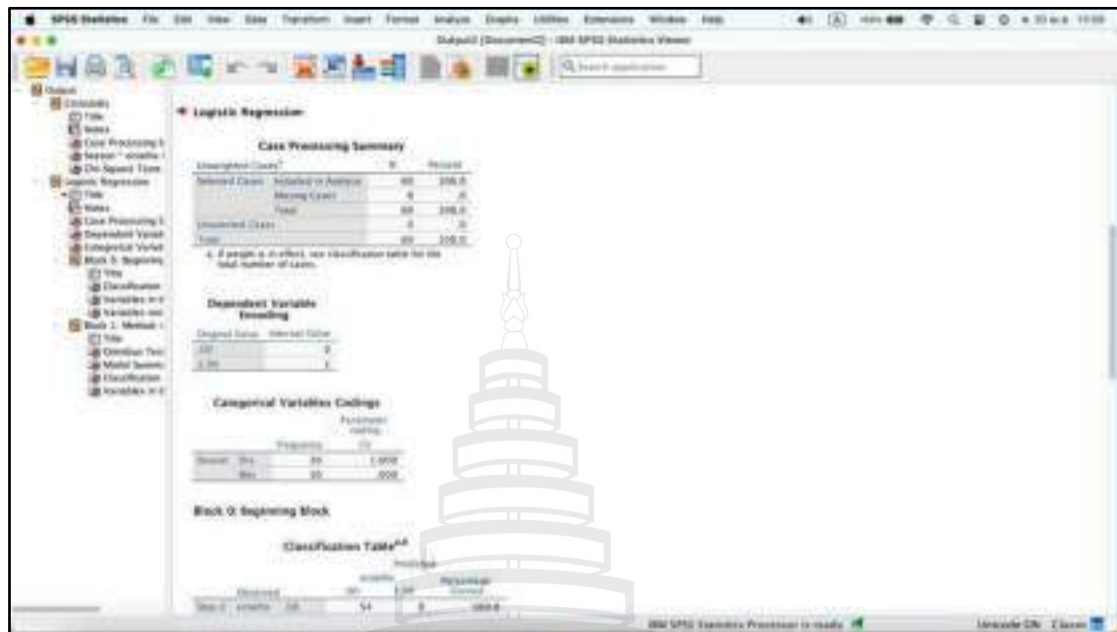
4. เลือก First หรือ Last ในหัวข้อ Reference Category ตามที่ได้กำหนดไว้ แล้วกด Continue



5. กดเมนู Options แล้วกดติ๊กเครื่องหมายถูกในช่องหัวข้อ CI for exp(B): 95%

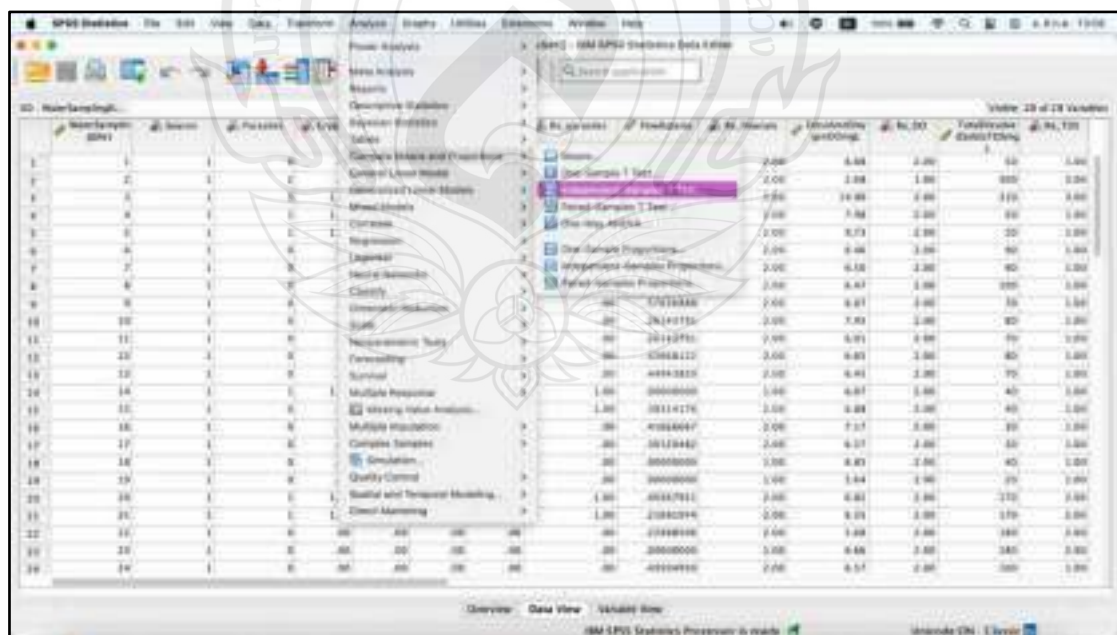


6. หน้าจอแสดงผลลัพธ์



ง3. ขั้นตอนการใช้โปรแกรม SPSS โดยใช้สถิติ t-test

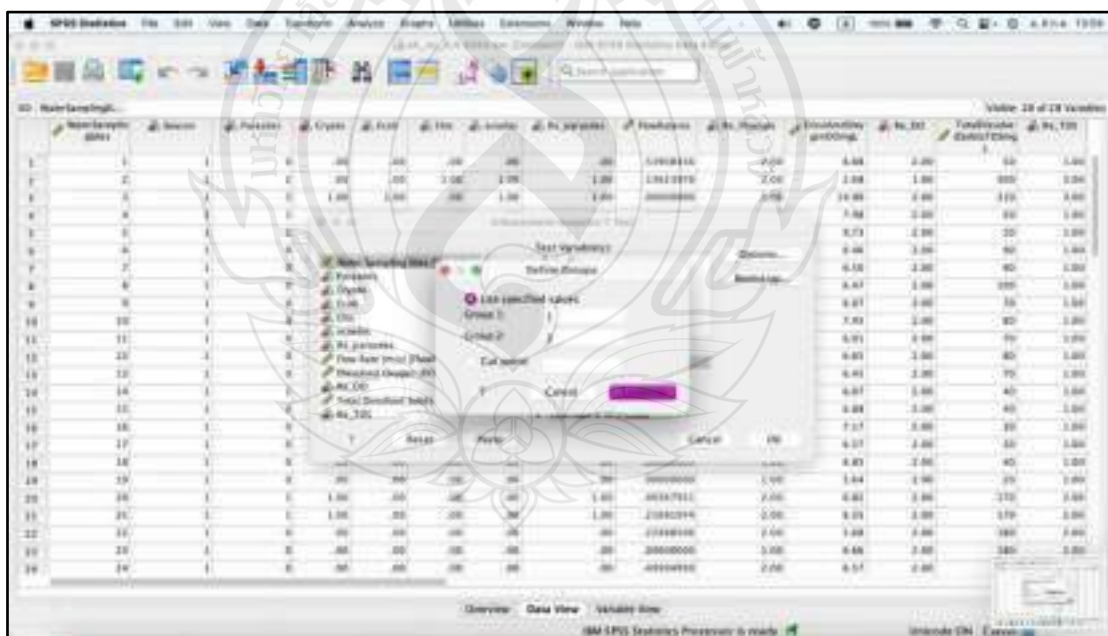
1. กดที่เมนู Analyze → Compare Means and Proportions → Independent-Sample T Test...



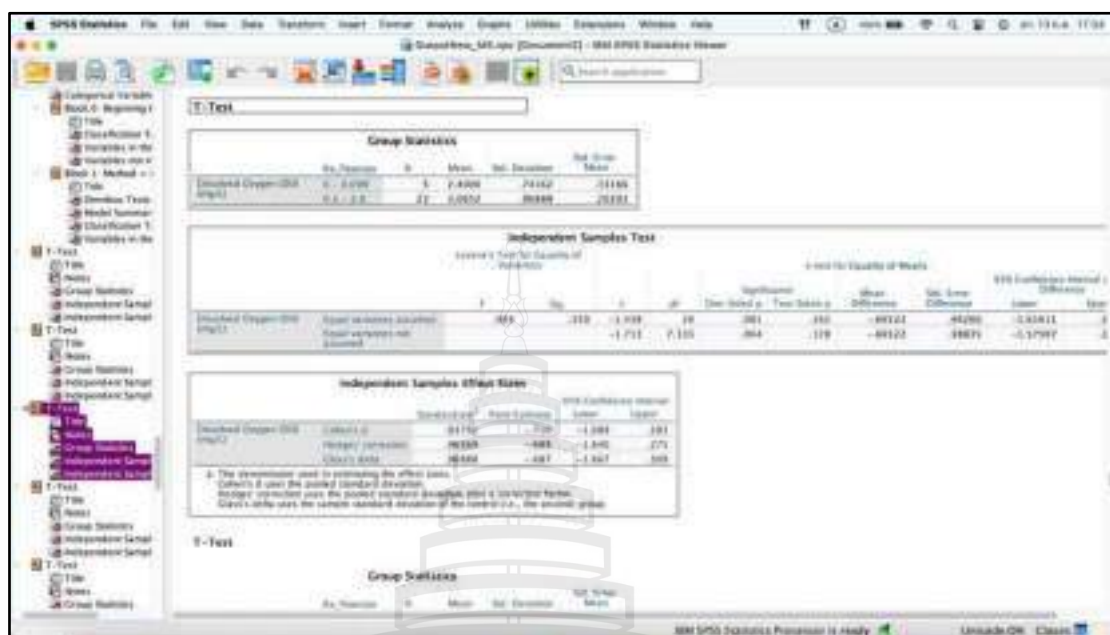
2. ในช่อง Test Variable(s): ให้เลือกใส่หัวข้อของลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำ ส่วนช่อง Grouping Variable: ให้ใส่หัวข้อตัวแปรที่ต้องการเปรียบเทียบ



3. กดช่อง Define Groups... → Continue → OK



4. หน้าจอแสดงผลลัพธ์



ประวัติผู้ประพันธ์

ชื่อ	กุลชญา วงศ์ทองเหลือ
ประวัติการศึกษา	
2563	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต อนามัยสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประวัติการทำงาน	
2565-2567	ผู้ช่วยสอน มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย
2564-2565	ผู้ช่วยนักวิจัย มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย

