Detecting Insecticide Contamination and Determining Prevalence of Protozoa in Fresh Vegetables from Fresh Markets, Maung Phayao, Phayao Province

Kritpaphat Tantiamornkul[*] *Touchchapol Mataradchakul*[*]

ABSTRACT

Organic vegetables remain popular among consumers. Nonetheless, food-borne pathogenic protozoa contaminated from soil, water, transportation and applying organic fertilizers may pose a negative effect on health. The present study aimed to detect insecticide contamination, determine the prevalence of protozoa and using PCR, examine the correlations of vegetables with insecticide contamination and protozoa positive samples in fresh vegetables from fresh markets, Maung Phayao District, Phayao Province. Ten fresh vegetables were randomly bought from markets (100 samples) including kitchen mint, lettuce, coriander, nappa cabbage, chinese kale, cabbage, celery, spring onion, cilantro and Thai water convolvulus. Kitchen mint was the most insecticide contaminated, at 80% (8/10). The most positive results in detecting protozoa were 80% in 3 types of vegetables including kitchen mint, nappa cabbage and chinese kale. The application of insecticide on vegetables was not correlated with the positive identification of protozoa at $\chi^2 = 2.115$, $P > 0.05$. The results of this study included detecting protozoa and defining the factor of protozoa contamination with fresh vegetables that affect humans. This information could be applied to prevent contamination and clean fresh vegetables before consuming.

Keywords: Protozoa, fresh vegetables, PCR, insecticide contamination, fresh market, Phayao Province

J Public Health 2019; 49(1): 118-129

Article info: Received November 14, 2018; Revised January 26, 2019; Accepted February 4, 2019.

Correspondence: Touchchapol Mataradchakul, Division of Microbiology and Parasitology, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao, THAILAND. E-mail: touchchapol@hotmail.com

[*] Division of Microbiology and Parasitology, School of Medical Sciences, University of Phayao

บทนำ

ผักปลอดสารพิษ คือผักที่ไม่มีสารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชตกค้างอยู่ หรือมีตกค้างอยู่แต่ไม่เกินระดับมาตรฐานที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนด[1] อย่างไรก็ตามการรับประทานผักปลอดสารพิษไม่ได้หมายความว่าผักจะไม่มีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับดิน ปุ๋ย การขนส่ง และน้ำที่นำมาใช้รดผัก ปัจจัยเหล่านี้เอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ผู้บริโภคมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นเมื่อรับประทานผักแบบสด การนำมาล้างก่อนรับประทานก็ยังไม่สามารถกำจัดได้หมด โดยเฉพาะปรสิตในกลุ่มหนอนพยาธิ และโปรโตซัว ซึ่งระยะติดต่อส่วนใหญ่จะอยู่ในดิน และน้ำ[2]

โปรโตซัวปนเปื้อนในน้ำ อาหาร รวมถึงผักสดที่มีความสำคัญทางการแพทย์และพบรายงานการแพร่ระบาดทั่วโลก ได้แก่ คริปโตสปอริเดียม พาร์วุ่ม (*Cryptosporidium parvum*) ไกอาร์เดีย ดูโอดีนาลีส (*Giardia duodenalis*) และเอนตามีบา ฮีสโตไลติคา (*Entamoeba histolytica*) ติดต่อสู่คนโดยการบริโภคน้ำและอาหารที่มีการปนเปื้อนโปรโตซัวระยะโอโอซีสต์และซีสต์ซึ่งเป็นระยะติดต่อ เป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของโรคอุจจาระร่วง และการเสียชีวิตโดยเฉพาะผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง[3]

ปัจจุบันมีงานวิจัยการตรวจหาปรสิตในผักสดในหลายพื้นที่ ในปี ค.ศ. 2009 Uga และคณะ[4] ทำการศึกษาหาปรสิตในผักสดด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย Tween-20 เข้มข้นร้อยละ 0.5 นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบการปนเปื้อนของปรสิตร้อยละ 31 ในปี ค.ศ. 2013 Ebrahimzadeh และคณะ[5] ทำการศึกษาหาปรสิตในผักสดด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยน้ำกลั่นและวิธีการลอยตัวด้วยซิงค์ซัลเฟต นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบการปนเปื้อนของปรสิตร้อยละ 44.8 และในปี 2017 Caradonna และคณะ[6] ทำการศึกษาหาปรสิตกลุ่มโปรโตซัวในสลัดผักพร้อมรับประทานที่ประเทศอิตาลี ด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล พบการปนเปื้อนของโปรโตซัวร้อยละ 4.2

สำหรับในประเทศไทยมีเพียงรายงานการตรวจหาปรสิตกลุ่มหนอนพยาธิด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยน้ำกลั่น[7] น้ำยาล้างจาน[8-9] และสารละลาย Sodium Dodecyl Sulfate เข้มข้นร้อยละ 1 และ Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1[10] นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเทคนิคและวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศ์ต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจของผู้ปฏิบัติงาน อีกทั้งมีข้อจำกัดสำหรับปรสิตที่เป็นกลุ่มโปรโตซัว เพราะมีรูปร่างขนาดเล็ก มองเห็นลักษณะภายในไม่ชัดเจน และมีการบดบังของกากตะกอนเศษผัก[11] การนำเทคนิคอณูชีวโมเลกุลซึ่งเป็นการตรวจที่มีความน่าเชื่อถือสูงมาใช้ตรวจหาโปรโตซัว ระบุสายพันธุ์และสปีชีส์ได้อย่างแม่นยำ จึงเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจโปรโตซัวเพื่อให้ผลที่น่าเชื่อถือ[12]

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหาการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดแมลง และความชุกของโปรโตซัวในผักสดที่จำหน่ายในตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา โดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล รวมถึงหาความสัมพันธ์ของสารเคมีกำจัดแมลงต่อการตรวจพบโปรโตซัว เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันโดยการเลือกบริโภคผักสด และล้างผักให้สะอาดปลอดภัย ลดอัตราการติดต่อของโปรโตซัวที่ปนเปื้อนจากผักมาสู่คนต่อไป

วิธีการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงสำรวจแบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional Study) เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของโปรโตซัวในผักสดจากตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา โดยใช้เทคนิคทางพีซีอาร์ การเก็บตัวอย่างดำเนินการตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึงเดือน

กรกฎาคม พ.ศ. 2561 โครงการวิจัยนี้ได้รับยกเว้นจากการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย (Exemption) ของกองจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยพะเยา

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาในครั้งนี้สุ่มเก็บตัวอย่างผักสดจากตลาดสด โดยขนาดตัวอย่างคำนวณจากสูตรเพื่อการสำรวจหาความชุกโดยไม่ทราบจำนวนประชากร คำนวณโดยใช้สูตรการหาขนาดตัวอย่างเพื่อประมาณค่าสัดส่วนประชากร[13]

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

โดย n = ขนาดตัวอย่าง

α = ความผิดพลาดของการสรุปลักษณะประชากรจากค่าสถิติตัวอย่าง

Z = Confidence Coefficient ได้จากค่าความเชื่อมั่นที่กำหนด (1-α) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 90

P = สัดส่วนอุบัติการณ์การตรวจพบปรสิตในผักสด เท่ากับ ร้อยละ 51 คิดเป็น 0.51[10]

Q = 1-P = (0.49)

e = ความกระชับของการประมาณค่ายอมรับการตรวจผิดพลาดได้ ±10 ตัวอย่างจาก 100 ตัวอย่าง = 0.1

$$\text{จะได้ขนาดตัวอย่าง (n)} = \frac{(1.73)^2(0.51)(0.49)}{0.1^2} = 74.79$$

จากการคำนวณหาขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ทั้งหมดประมาณ 75 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากต้องการทราบการกระจายมากขึ้น การศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกศึกษาเพิ่มขึ้นร้อยละ 33 จาก 75 ตัวอย่าง เป็น 100 ตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่าง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผักสดจากตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง โดยแบ่งตัวอย่างเป็นผักสด 10 ชนิด ๆ ละ 10 ตัวอย่าง ดังนี้ สะระแหน่ (Kitchen Mint), ผักกาดหอม (Lettuce), ผักชี (Coriander), ผักกาดขาว (Nappa Cabbage), ผักคะน้า (Chinese Kale), กะหล่ำปลี (Cabbage), ขึ้นฉ่าย (Celery), ต้นหอม (Spring Onion), ผักชีฝรั่ง (Culantro) และผักบุ้งไทย (Thai Water Convolvulus) โดยทำการตรวจวัดการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดแมลงเบื้องต้นด้วยชุดตรวจหาสารเคมีกำจัดแมลง 4 กลุ่ม (GPO TM Kit) ขององค์การเภสัชกรรม โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมท (Organophosphate and Carbamate) และกลุ่มที่ 2 ออร์กาโนคลอรีน และไพเรทรอยด์ (Organochlorine and Pyrethroid)

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างผักสดแต่ละชนิด ๆ ละ 200 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แช่ในสารละลายลดแรงตึงผิว (Sodium Dodecyl Sulphate เข้มข้นร้อยละ 1 และ Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 1) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรในถุงพลาสติก นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าล้าง (Sonicator) ความถี่ 59 เฮิรตซ์ นาน 15 นาที กรองแยกเศษผักออกด้วยผ้าก๊อซ ใส่ภาชนะพลาสติกตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเทน้ำส่วนบนออกจนเหลือปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำน้ำส่วนที่เหลือปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดน้ำส่วนบนทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนก้นหลอด แบ่งตะกอนที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp

DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) เก็บรักษาดีเอ็นเอตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การตรวจตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอตัวอย่างมาทำพีซีอาร์ โดยใช้สารต่าง ๆ ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ดังนี้ 2X Reaction Mix (ประกอบด้วย $MgCl_2$, dNTPs และสารอื่น ๆ ที่สำคัญต่อกระบวนการพีซีอาร์) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (Forward Primer) และไพรเมอร์รีเวิร์ส (Reverse Primer) ปริมาตรชนิดละ 3 ไมโครลิตร, เอนไซม์ Taq DNA Polymerase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase ปริมาตร 12 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากันในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร และใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Thermocycler) ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (Agarose Gel) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ไพรเมอร์ (Primer) ของโปรโตซัวทั้ง 3 ชนิด คือ คริปโตสปอริเดียม พาร์วุ่ม (*Cryptosporidium parvum*) ไกอาร์เดีย ดูโอดีนาลีส (*Giardia duodenalis*) เอนตามีบา ฮีสโตไลติคา (*Entamoeba histolytica*) และสภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์[14] แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 1

Table 1 Oligonucleotide Primers and Conditions Used in PCR Assay for Detection of Intestinal Protozoa.

Primers	Nucleotide Sequences (5' → 3')	PCR Cycling Conditions	Product Size (Base pair)
Cryptosporidium parvum COWP			
Forward	CAAATTGATACCGTTTGTCCTTCTG = 25 Base Pair	95°C 15 min/[95°C 30 s, 58°C 1 min, 72°C 1 min] × 40 cycles, 72°C 5 min	150
Reverse	GGCATGTCGATTCTAATTCAGCT = 23 Base Pair		
Giardia duodenalis SSU rRNA			
Forward	GACGGCTCAGGACAACGGTT = 20 Base Pair	95°C 15 min/[95°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 1 min] × 40 cycles, 72°C 5 min	63
Reverse	TTGCCAGCGGTGTCCG = 16 Base Pair		
Entamoeba histolytica SSU rRNA			
Forward	AACAGTAATAGTTTCTTTGGTTAGT AAAA = 29 Base Pair	95°C 15 min/[95°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 1 min] × 40 cycles, 72°C 5 min	135
Reverse	CTTAGAATGTCATTTCTCAATTCAT = 25 Base Pair		

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 20.0 โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา เช่น ค่าเฉลี่ย และร้อยละ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวแปรใช้ Chi-square Test กำหนด a = 0.05

ผลการศึกษา

การตรวจการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดแมลง

ตัวอย่างผักสดที่ทำการศึกษาทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง จากผักสด 10 ชนิด พบว่าสะระแหน่มีการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงมากที่สุด 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) โดยตรวจพบสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มที่ 1 ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40) กลุ่มที่ 2 ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 70) และพบการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 2 กลุ่ม ในตัวอย่างเดียวกันทั้งหมด 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30) รองลงมาคือขึ้นฉ่าย พบทั้งหมด 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 60) ต้นหอม พบ 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50) ตามลำดับ ส่วนผักที่ไม่พบการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงในการทดลองนี้คือผักกาดหอมและผักบุ้งแดง (ตารางที่ 2)

Table 2 The Contamination of Insecticide Residues in Fresh Vegetables from Fresh Market in Phayao Province, Thailand.

Vegetables	Number of Positive (%)			
	Group 1 Organophosphate and Carbamate	Group 2 Organochlorine and Pyrethroid	Group 1 or Group 2	Group 1 and Group 2
Kitchen Mint	4 (40)	7 (70)	8 (80)	3 (30)
Lettuce	0	0	0	0
Coriander	1 (10)	1 (10)	2 (20)	0
Nappa Cabbage	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)
Chinese Kale	1 (10)	3 (30)	3 (30)	1 (10)
Cabbage	1 (10)	1 (10)	2 (20)	0
Celery	6 (60)	1 (10)	6 (60)	1 (10)
Spring Onion	4 (40)	1 (10)	5 (50)	0
Culantro	4 (40)	1 (10)	4 (40)	1 (10)
Thai Water Convolvulus	0	0	0	0
Total (100)	**22 (22)**	**16 (16)**	**31 (31)**	**7 (7)**

ความชุกของโปรโตซัวในผักสด

ผลการศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (รูปภาพที่ 1) พบการปนเปื้อนของโปรโตซัวทั้งหมด 57/100 ตัวอย่าง (ร้อยละ 57) พบโปรโตซัวมากกว่า 2 ชนิด 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 21) โดยผักที่ตรวจพบโปรโตซัวมากที่สุด (อย่างน้อย 1 ชนิด) 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) ในผัก 3 ชนิดคือ สะระแหน่ ผักกาดขาว และผักคะน้า โดยพบคริปโตสปอริเดียมในผักกาดขาวมากที่สุด 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) ไกอาร์เดียพบในผักกาดหอมมากที่สุด 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30) เอนตามีบาพบในสะระแหน่และผักกาดขาวมากที่สุด 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 70) และพบโปรโตซัวมากกว่า 2 ชนิดในผักกาดขาวมากที่สุด 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 70) ส่วนผักที่พบโปรโตซัวน้อยที่สุดคือผักชีฝรั่ง ซึ่งตรวจพบเพียง คริปโตสปอริเดียม 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20) (ตารางที่ 3 และรูปภาพที่ 2)

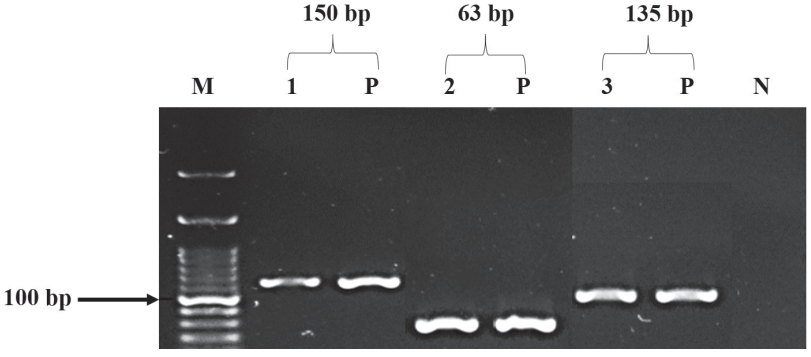

Figure 1 The positive bands of *Cryptosporidium* spp., *G. duodenalis* and *E. histolytica* by using PCR.

Lane M: DNA ladder 25 bp; Lane 1 : *Cryptosporidium* spp. (150 bp); Lane 2 : *G. duodenalis* (63 bp); Lane 3 : *E. histolytica* (135 bp); Lane P: Positive control and Lane N: Negative control.

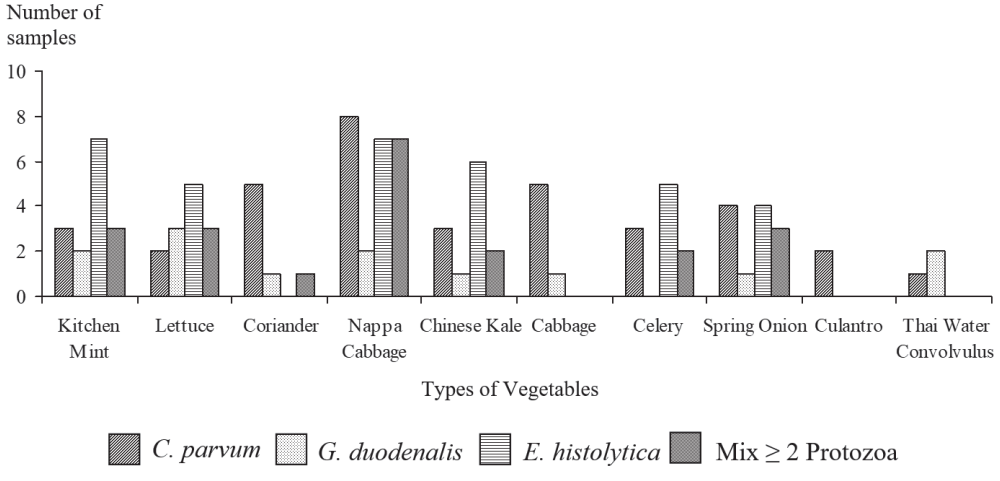

Figure 2 The Prevalence of Protozoa According to Types of Vegetables.

Table 3 The Contamination of Protozoan Parasites in Fresh Vegetables from Fresh Market in Phayao Province, Thailand.

Vegetables	Number of positive (%)				
	Cryptosporidium parvum	*Giardia duodenalis*	*Entamoeba histolytica*	At least 1 Protozoa	≥ 2 Protozoa
Kitchen Mint	3 (30)	2 (20)	7 (70)	8 (80)	3 (30)
Lettuce	1 (10)	3 (30)	5 (50)	6 (60)	3 (30)
Coriander	5 (50)	1 (10)	0 (0)	5 (50)	1 (10)
Nappa Cabbage	8 (80)	2 (20)	7 (70)	8 (80)	7 (70)
Chinese Kale	3 (30)	1 (10)	6 (60)	8 (80)	2 (20)
Cabbage	5 (50)	1 (10)	0	6 (60)	0
Celery	3 (30)	0	5 (50)	6 (60)	2 (20)
Spring Onion	4 (40)	1 (10)	4 (40)	5 (50)	3 (30)
Culantro	2 (20)	0	0	2 (20)	0
Thai Water Convolvulus	1 (10)	2 (20)	0	3 (30)	0
Total (100)	**35 (35)**	**13 (13)**	**34 (34)**	**57 (57)**	**21 (21)**

การปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงต่อการตรวจพบโปรโตซัว

ผลการศึกษาพบโปรโตซัวทั้งหมด 57 ตัวอย่าง (ร้อยละ 57) และไม่พบโปรโตซัว 43 ตัวอย่าง (ร้อยละ 43) ผักที่ตรวจพบสารเคมีกำจัดแมลงสามารถตรวจพบโปรโตซัว 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 67.74) และตรวจไม่พบโปรโตซัว 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 32.26) สำหรับผักที่ตรวจไม่พบสารเคมีกำจัดแมลงสามารถตรวจพบโปรโตซัว 36 ตัวอย่าง (ร้อยละ 52.17) และตรวจไม่พบโปรโตซัว 33 ตัวอย่าง (ร้อยละ 47.83) เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการตรวจพบสารเคมีกำจัดแมลงต่อการตรวจพบโปรโตซัวในผักสดโดยใช้สถิติ Chi-square Test พบว่าสารเคมีกำจัดแมลงไม่มีความสัมพันธ์ต่อการตรวจพบโปรโตซัว ที่ χ^2 = 2.115, $P > 0.05$ (ตารางที่ 4)

Table 4 The Correlation of Insecticide on Protozoa Contamination in Fresh Vegetables.

	Insecticides (%)	No Insecticides (%)	Total (%)
Protozoa	21 (67.74)	36 (52.17)	57 (57)
No Protozoa	10 (32.26)	33 (47.83)	43 (43)
Total	**31 (31)**	**69 (69)**	**100 (100)**

Fisher's Exact Test: χ^2 = 2.115 , P = 0.191

อภิปรายผล

การศึกษาทั้งหมด 100 ตัวอย่าง จากผักสด 10 ชนิด พบว่าสะระแหน่มีการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงมากที่สุด 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) รองลงมาคือขึ้นฉ่าย พบ 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 60) ต้นหอมพบ 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50) ตามลำดับ โดยให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่ตรวจหาสารเคมีกำจัดแมลงตกค้างในผักจากตลาดในอำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่ตรวจพบอยู่ในระดับที่ไม่ปลอดภัย โดยต้นหอมพบสารเคมีกำจัดแมลงมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 39.40 รองลงมาคือผักคะน้าคิดเป็นร้อยละ 6.06[15] และงานวิจัยที่ตรวจสอบสารเคมีกำจัดแมลงตกค้างของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตในผัก จังหวัดสมุทรปราการ พบว่าอยู่ในระดับที่ไม่ปลอดภัยค่อนข้างสูงคือ 194/225 ตัวอย่าง (ร้อยละ 86.22) โดยผักคะน้า ตรวจพบระดับสารเคมีในระดับที่ไม่ปลอดภัยคิดเป็นร้อยละ 80.00[16] แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาถึงการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงในสะระแหน่และขึ้นฉ่ายซึ่งตรวจพบมากที่สุดในงานวิจัยนี้

ผลการศึกษาพบความชุกของโปรโตซัว (อย่างน้อย 1 ชนิด) ทั้งหมด 57 ตัวอย่าง จาก 100 ตัวอย่าง (ร้อยละ 57) พบ คริปโตสปอริเดียม 35 ตัวอย่าง (ร้อยละ 35) ไกอาร์เดีย 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 13) เอนตามีบา 34 ตัวอย่าง (ร้อยละ 34) และพบโปรโตซัวมากกว่า 2 ชนิด 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 21) โดยผักที่ตรวจพบโปรโตซัวมากที่สุด 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) 3 ชนิดคือ สะระแหน่ ผักกาดขาว และผักคะน้า ส่วนผักที่พบโปรโตซัวน้อยที่สุดคือผักชีฝรั่ง ซึ่งตรวจพบเฉพาะคริปโตสปอริเดียม 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20) (ตารางที่ 2 และรูปภาพที่ 1) สอดคล้องกับงานวิจัยที่ตรวจพบโปรโตซัวที่ปนเปื้อนในผักสลัดพร้อมรับประทานที่จำหน่ายในประเทศอิตาลีด้วยเทคนิคตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล พบโปรโตซัวอย่างน้อย 1 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 4.2 โดยตรวจพบคริปโตสปอริเดียมร้อยละ 0.9 และไกอาร์เดียร้อยละ 0.6[6] และงานวิจัยที่ศึกษาความชุกของการปนเปื้อนปรสิตในผักสดในประเทศอิหร่าน ตรวจพบการปนเปื้อนของโปรโตซัวร้อยละ 6 โดยพบเอนตามีบาร้อยละ 1.4 และพบไกอาร์เดียร้อยละ 1.8[17] รวมถึงงานวิจัยที่ศึกษาการปนเปื้อนของปรสิตในผลไม้และผักประเทศเอธิโอเปียด้วยเทคนิคการปั่นตกตะกอนตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบการปนเปื้อนของปรสิตร้อยละ 57.8 โดยพบคริปโตสปอริเดียมร้อยละ 12.8 ไกอาร์เดียร้อยละ 7.5 และพบเอนตามีบาร้อยละ 5.3 ตามลำดับ[18] งานวิจัยที่ศึกษาในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการตรวจหาการปนเปื้อนของปรสิตในกลุ่มหนอนพยาธิและใช้เทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์[7-10] จำเป็นต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจของผู้ปฏิบัติงาน อีกทั้งไม่สามารถเห็นปรสิตกลุ่มโปรโตซัวได้ชัดเจน เพราะมีขนาดรูปร่างเล็กและมีการบดบังของกากตะกอนจากเศษผัก[11] งานวิจัยนี้จึงนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาใช้ตรวจหาโปรโตซัวที่สามารถระบุสายพันธุ์และชนิดของโปรโตซัวอย่างแม่นยำ รวมถึงสามารถตรวจพบโปรโตซัวที่มีอยู่ปริมาณน้อยได้[12] สำหรับจังหวัดพะเยามีเพียงการศึกษาโปรโตซัวในกลุ่มคริปโตสปอริเดียมและไกอาร์เดียที่มีการปนเปื้อนในแหล่งน้ำบริเวณกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยาเท่านั้น[19] การตรวจพบการปนเปื้อนของโปรโตซัวขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่แตกต่างกัน เช่น สภาพภูมิประเทศ สภาพภูมิอากาศ รวมถึงฤดูกาลในบริเวณแหล่งสำรวจและการเก็บตัวอย่าง[6] การล้างทำความสะอาด การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ที่มาจากมูลสัตว์ที่มีการปนเปื้อนของโปรโตซัว และการขนส่งผักสดมาจำหน่ายสู่ผู้บริโภค[2] ปัจจัยเหล่านี้

ย่อมมีผลในการตรวจพบโปรโตซัวในงานวิจัยนี้ทั้งสิ้น

ผลการศึกษาสำหรับผักที่ตรวจไม่พบสารเคมีกำจัดแมลงสามารถตรวจพบโปรโตซัว 36/69 ตัวอย่าง (ร้อยละ 52.17) ซึ่งพบว่าค่าที่ตรวจพบโปรโตซัวมากกว่าผักที่ตรวจพบสารเคมีกำจัดแมลงที่สามารถตรวจพบโปรโตซัว 21/31 ตัวอย่าง (ร้อยละ 67.74) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์การใช้สารเคมีกำจัดแมลงต่อการตรวจพบโปรโตซัว พบว่าสารเคมีกำจัดแมลงไม่มีความสัมพันธ์ต่อการตรวจพบโปรโตซัว ที่ $\chi^2 = 2.115$, $P > 0.05$ ซึ่งอาจเนื่องมาจากโปรโตซัวที่อยู่ในระยะซีสต์หรือโอโอซีสต์ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสูง[20] รวมถึงทนต่อกลุ่มสารเคมีกำจัดแมลง 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ 1 ออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมท (Organophosphate and Carbamate) และกลุ่มที่ 2 ออร์กาโนคลอรีนและไพเรทรอยด์ (Organochlorine and Pyrethroid) จึงทำให้ตรวจพบโปรโตซัวได้ทั้งผักที่ตรวจไม่พบสารเคมีกำจัดแมลงและกลุ่มที่ตรวจพบการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลง

อย่างไรก็ตามการตรวจหาโปรโตซัวด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล (เทคนิคพีซีอาร์) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ตรวจโปรโตซัว แต่เพื่อผลการตรวจที่แม่นยำขึ้นควรทำควบคู่ไปกับเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เช่น Immunofluorescence Assay ที่เป็นมาตรฐานในการตรวจหาโปรโตซัวในสิ่งแวดล้อมของอเมริกา[21] และเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลอื่น ๆ เช่น Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) หรือ Loop Mediated-isothermal Amplification (LAMP) รวมถึงมีการเปรียบเทียบช่วงฤดูกาลในการเก็บตัวอย่าง และวิธีการล้างผักก่อนบริโภค เพื่อเป็นแนวทางควบคุมและป้องกันโปรโตซัวที่ก่อให้เกิดโรคได้อย่างดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยาที่ให้การสนับสนุนสถานที่ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณ นางสาวพาพัชมณฑ์ จันต๊ะวงค์ และนางสาวศศิกานต์ คำเขื่อน ในการดำเนินการเก็บตัวอย่าง และการทำวิจัย และขอขอบคุณทุนสนับสนุนการทำวิจัย ประเภททุนอุดหนุนการวิจัยมุ่งเป้า (อาหาร) บริหารทุนโดยสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

เอกสารอ้างอิง

1. Thailand Ministry of Public Health. Pesticide residues in food. Available at http://www.foodsafety-lcfa.com/files/archive/Pesticide288(ThaiFDA).pdf, accessed September 29, 2018.
2. Ulukanligil M, Seyrek A, Aslan G, Ozbilge H, Atay S. Environmental pollution with soil-transmitted helminths in Sanliurfa, Turkey. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96: 903-9.
3. Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Plutzer J, Noack MJ, Mahmoudi MR, Karanis P. *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. dissemination during wastewater treatment and comparative detection via immunofluorescence assay (IFA), nested polymerase chain reaction (nested PCR) and loop mediated isothermal amplification (LAMP). Acta Trop 2016; 158: 43-51.

4. Uga S, Hoa NT, Noda S, Moji K, Cong L, Aoki Y, *et al*. Parasite egg contamination of vegetables from a suburban market in Hanoi, Vietnam. Nepal Med Coll J 2009; 11(2): 75-8.
5. Ebrahimzadeh A, Jamshidi A, Mohammadi S. The parasitic contamination of raw vegetables consumed in Zahedan, Iran. Health Scope 2013; 1(4): 205-9.
6. Caradonna T, Marangi M, Del Chierico F, Ferrari N, Reddel S, Bracaglia G, *et al*. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. Food Microbiol 2017; 67: 67-75.
7. Anamnart W. Survey of infective stage of *Strongyloides stercoralis* in fresh vegetables at Thasala food market, Nakon Si Thammarat. Vajira Med J 2007; 51: 129-33. (in Thai)
8. Sanghirun S. A survey of parasitic contamination of fresh vegetables from the Bangplee District market, Samutprakarn Province. HCU Journal 1996; 1: 1-18. (in Thai)
9. Prawitthana S, Natreewaranat S. Parasitic contamination of raw vegetables in 4 markets of Phitsanulok province. Forensic Med J 2013; 5: 89-93. (in Thai)
10. Jongkolnee N, Songthamwat D. Detection of parasitic contamination in vegetables from Phra Nakhon Si Ayutthaya District, Phra Nakhon Si Ayutthaya Province. J Med Tech Assoc Thailand 2015; 43(1): 5141-9. (in Thai)
11. Utzinger J, Botero-Kleiven S, Castelli F, Chiodini PL, Edwards H, Kohler N, *et al*. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: a comparison among European reference laboratories. Clin Microbiol Infect 2010; 16(3): 267-73.
12. Mahmoudi MR, Ashrafi K, Abedinzadeh H, Tahvildar-Bideruni F, Haghighi A, Bandehpour M. Development of sensitive detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* from surface water in Iran. Iran J Parasitol 2011; 6(3): 43-51.
13. Meeker WQ, Hahn GJ, Escobar LA. Statistical intervals: A guide for practitioners and researchers. 2nd ed. New Jersey, John Wiley & Sons. Inc. 2017.
14. Llewellyn S, Inpankaew T, Nery SV, Gray DJ, Verweij JJ, Clements AC, *et al*. Application of a multiplex quantitative PCR to assess prevalence and intensity of intestinal parasite infections in a controlled clinical trial. PLoS Negl Trop Dis 2016; 10(1): e0004380.

15. Chaikliang C, Janmanee S, Hnookaw O. 2012. Detection of insecticides residues in vegetables from the market in Muang District Suratthani Province. Proceedings of 50th Kasetsart University Annual Conference: Science, Natural Resources and Environment, January 31- February 2, 2012, Kasetsart University, Thailand, The Thailand Research Fund, 1-9.
16. Pakakasama P, Saisin S, Sutin S. Detection of organophosphate and carbamate pesticides residues in vegetables in Samutprakarn Province. APHEIT Journal (Science & Technology) 2016; 5(1): 22-30. (in Thai)
17. Rahmati K, Fallah M, Maghsood AH, Shamsi-Ehsan T, Matini M. The prevalence of parasitic contamination of vegetables consumed in Malayer city, west of Iran, in 2014. Avicenna J Clin Microb Infec 2017; 4(2): e42380.
18. Tefera T, Biruksew A, Mekonnen Z, Eshetu T. Parasitic contamination of fruits and vegetables collected from selected local markets of Jimma Town, southwest Ethiopia. Int Sch Res Notices 2014; 382715: 1-7.
19. Mataradchakul T, Tantiamornkul K. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Kwan Phayao Lake, Phayao Province, Thailand using microscopic technique comparing direct wet mount, temporary stain, and permanent stain. J Public Health 2018; 48(3): 406-17. (in Thai)
20. Chuah CJ, Mukhaidin N, Choy SH, Smith GJD, Mendenhall IH, Lim YAL, *et al*. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the water resources of the Kuang River catchment, Northern Thailand. Sci Total Environ 2016; 562: 701-13.
21. International Organization for Standardization. ISO 15553: Water quality-isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. Geneva, International Organization for Standardization 2006.

การตรวจหาการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดแมลง และความชุกของโปรโตซัวในผักสดที่จำหน่ายในตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

กฤตปภัช ตันติอมรกุล[*] ธัชพล เมธารัชกุล[*]

บทคัดย่อ

ผักปลอดสารพิษเป็นที่นิยมของผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามอาจมีความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของโปรโตซัวที่มากับดิน น้ำ การขนส่ง รวมถึงการใช้ปุ๋ยอินทรีย์แทนการใช้ปุ๋ยเคมี การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดแมลง และหาความชุกของโปรโตซัวในผักสดที่จำหน่ายในตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ด้วยเทคนิคพีซีอาร์รวมถึงหาความสัมพันธ์การปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดแมลงต่อการตรวจพบโปรโตซัว ทำการสุ่มซื้อผักสด 10 ชนิดจากตลาด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง รวม 100 ตัวอย่าง ได้แก่ สะระแหน่, ผักกาดหอม, ผักชี, ผักกาดขาว, ผักคะน้า, กะหล่ำปลี, ขึ้นฉ่าย, ต้นหอม, ผักชีฝรั่ง และผักบุ้งไทย ผลการศึกษาพบว่าสะระแหน่มีการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดแมลงมากที่สุดร้อยละ 80 (8/10) โดยผักที่ตรวจพบโปรโตซัวมากที่สุดร้อยละ 80 (8/10) มี 3 ชนิดคือ สะระแหน่ ผักกาดขาว และผักคะน้า การใช้สารเคมีกำจัดแมลงไม่มีความสัมพันธ์ต่อการตรวจพบโปรโตซัว ที่ χ^2 = 2.115, P > 0.05 ผลการศึกษาครั้งนี้รายงานการตรวจพบโปรโตซัวปนเปื้อนจากผักมาสู่คน เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกัน รวมถึงการล้างผักสดอย่างปลอดภัยก่อนนำมาบริโภค

คำสำคัญ: โปรโตซัว, ผักสด, พีซีอาร์, การปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดแมลง, ตลาดสด, จังหวัดพะเยา

วารสารสาธารณสุขศาสตร์ 2562; 49(1): 118-129

[*] สาขาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา