THJPH

Giardia duodenalis Contamination of Fresh Vegetables in a Wholesale Market

Jariya Sripanompong[1], Mathuros Tipayamongkholgul[2], Aongart Mahittikron[3], Varakorn Kosaisavee[1]

THJPH 2021; 51(3): 276-283

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

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

Received: March 30 2021;
Revised: June 3 2021;
Accepted: June 11 2021

Extended Abstract

Thai menus usually contain raw vegetables as the main or side dish. Currently, many outbreaks of intestinal parasitic infections that are related to eating raw vegetables have been revealed worldwide. Fresh vegetables can be contaminated by protozoan cysts, helminth eggs and larvae. The detection of helminth eggs and larvae by microscopy is easier than the detection of protozoan cysts which depends on expertise and techniques. The protozoan contamination of vegetables, which has been reported in the U.S., other western countries, and Thailand is mostly from food- and water-borne protozoa. However, little is known about the prevalence or distribution of these waterborne protozoa due to difficulty related to detection methods. *Giardia duodenalis* is one of the waterborne protozoa that cause diarrhea in humans and many animals. Most infected adults are asymptomatic. They are less concerned about getting diagnosed, which results in a low estimated prevalence. However, infection has an adverse impact on children's linear growth and psychomotor development. The conventional method of *G. duodenalis* detection is microscopy which has low sensitivity and specificity.

To estimate the possible occurrence of *G. duodenalis* in lettuce, white cabbage and cabbage from one large wholesale market, a sensitive molecular tool was used to detect protozoan DNA. These three vegetables are mostly eaten raw in many Thai food dishes. A total of 96 unwashed vegetables (35 lettuces, 30 nappa cabbages and 31 cabbages) were collected from September 2019 to June 2020. Samples were prepared as follows: 1) 200g of vegetable were chopped and washed with 0.85% saline, 2) sediment was concentrated by leaving it overnight, 3) DNA was extracted from the sediment. Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) was used to detect *G. duodenalis* contamination targeting the glutamate dehydrogenase gene *(gdh)*.

The results of this study showed 6 positives for *G. duodenalis* out of 96 (6.25%) samples. The protozoa were found in nappa cabbage (10.0%), cabbage (6.45%) and lettuce (2.86%). Unwashed vegetables from the largest wholesale vegetable market were contaminated with *G. duodenalis*. The *Giardia* cysts may be in the inner layers of these vegetable leaves due to the physical characteristics of the vegetables.

Although a small number of *G. duodenalis* contaminated vegetables were found, consistent and prolonged consumption of these vegetables may lead to Giardiasis. At present, many intestinal parasitic infections occur without knowing the sources of infection. One contaminated food is raw vegetables. Therefore, it is important to wash vegetables several times with running water or a washing solution, to reduce protozoal contamination from each leaf layer. The washing step is important to remove any pathogens from vegetables, before consuming them in their raw form.

The results of this study can be used as baseline data for *G. duodenalis* contamination in fresh vegetables, especially vegetables that are eaten raw. The benefit of a molecular detection method is that it can detect the minimum number of cysts, as one cyst can be detected by PCR. The development of easier, sensitive and faster detection methods could be valuable in the field of food sanitation, particularly pathogen surveillance systems for fresh vegetables and fruits.

Keywords: *Giardia duodenalis,* Giardiasis, Fresh vegetables, Contamination, Nested PCR

การปนเปื้อน *Giardia duodenalis* ในผักสดจากตลาดค้าส่งแห่งหนึ่ง

จริยา ศรีพนมพงษ์[1], มธุรส ทิพยมงคลกุล[2], องอาจ มหิทธิกร[3], วรากร โกศัยเสวี[1]

THJPH 2021; 51(3): 276-283

[1] ภาควิชาปรสิตวิทยาและกีฏวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[2] ภาควิชาระบาดวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[3] ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันคนไทยมักจะบริโภคผักเพื่อสุขภาพ โดยเมนูส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยผักสด ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนเชื้อหลายชนิดรวมไปถึงโปรโตซัวที่เป็นสาเหตุของโรค Giardiasis ที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขโดยเกิดจากเชื้อไกอาร์เดีย *(Giardia duodenalis)* เป็นเชื้อที่ติดต่อทางน้ำ (Waterborne protozoa) และเป็นเชื้อที่องค์การอนามัยโรค ให้ความสำคัญเนื่องจากมักก่อโรค ในกลุ่มนักท่องเที่ยว จากรายงานในประเทศไทยพบการปนเปื้อนเชื้อไกอาร์เดียในผักทั้งจากสวนและตลาดสด ดังนั้นการรับประทานอาหารที่มีผักสดเป็นส่วนประกอบอาจทำให้ได้รับเชื้อโปรโตซัวก่อโรคได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจหาเชื้อ *G. duodenalis* คือการใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ต่ำ เนื่องจากเชื้อมีขนาดเล็กการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานจึงอาจจะไม่เหมาะสม จึงมีการนำวิธีการทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการตรวจ โดยในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อ *G. duodenalis* ที่ปนเปื้อนในผัก โดยเก็บผักกาดหอม ผักกาดขาวและกะหล่ำปลี จำนวนทั้งสิ้น 96 ตัวอย่างจากตลาดค้าส่งผักขนาดใหญ่แห่งหนึ่งในช่วงระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2562 ถึงมิถุนายน พ.ศ. 2563 ผักทั้งหมดถูกชั่งและล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 % แล้วนำตะกอนที่ได้ไปสกัด DNA เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) ผลการศึกษาพบ *G. duodenalis* ปนเปื้อนในผัก 6 (6.25%) ตัวอย่างแสดงให้เห็นว่าผักในการศึกษานี้ยังคงมีการปนเปื้อนของปรสิต ถึงแม้ว่าจะพบการปนเปื้อน *G. duodenalis* เพียงเล็กน้อย แต่การบริโภคผักเหล่านี้เป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดโรค Giardiasis ได้

คำสำคัญ: ไกอาร์เดีย, ไกอาร์เดียซิส, ผักสด, การปนเปื้อน, Nested PCR

บทนำ

ไกอาร์เดีย *(Giardia duodenalis)* เป็นโปรโตซัวที่สำคัญที่เป็นสาเหตุของโรค Giardiasis ก่อให้เกิดอาการโรคท้องร่วงในคน โดยเชื้อชนิดนี้สามารถอาศัยอยู่ในโฮสต์ที่มีความหลากหลาย ทำให้เชื้อมีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้สูง ทำให้ *G. duodenalis* เป็นเชื้อที่องค์การอนามัยโลก ให้ความสำคัญเนื่องจากโรค Giardiasis เป็นโรคที่พบได้บ่อยในกลุ่มนักท่องเที่ยวและในมนุษย์ทั่วโลกโดยประมาณ 2.8 ล้านรายในแต่ละปี[1] อีกทั้งยังเป็นโรคที่มักมีการติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ ทำให้การติดเชื้อ *G. duodenalis* ได้รับการตรวจวินิจฉัยที่น้อยกว่าความเป็นจริงและยังมีการประเมินความชุกที่ต่ำกว่าความเป็นจริง [1] โดยมีการศึกษาความชุกของการติดเชื้อปรสิตของผู้ป่วยที่มาตรวจอุจจาระเพื่อตรวจหาโรคติดเชื้อทางปรสิตในโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย พบการติดเชื้อ *G. duodenalis* (0.76 %)[2] เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้จึงมีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนในดินหรือในน้ำเป็นจำนวนมาก [3-5] ซึ่งพบว่าดินและน้ำเป็นแหล่งรังโรคที่เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในมนุษย์[6] โดยมนุษย์ได้รับเชื้อจากการอุปโภค บริโภค การทำกิจกรรมต่าง ๆ ที่มีการสัมผัสกับเชื้อที่มีการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม

Giardia spp. มีการตั้งชื่อที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดโฮสต์ ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะใช้ชื่อ *G. duodenalis* และมีอีกสองชื่อที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือ *G. lamblia* หรือ *G. intestinalis* โดยเชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อโปรโตซัวในกลุ่มของ Flagellated protozoan ที่พบได้ทั่วไปในลำไส้เล็กส่วนต้นของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ สุนัข แมว วัว ควาย ฯลฯ[1] ติดต่อสู่คนและสัตว์โดยการกินเชื้อระยะซิสต์ 4 นิวเคลียสเข้าไปทางเดินอาหาร โดยเชื้อจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็น trophozoite แบ่งตัวเพิ่มจำนวนและแย่งการดูดซึมสารอาหารและน้ำจากโฮสต์ ในปัจจุบันสามารถจำแนกสายพันธุ์ของโปรโตซัวชนิดนี้ออกเป็น 8 กลุ่ม (Assemblage) ได้แก่ Assemblage A-H ซึ่งกลุ่มที่พบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ assemblage A และ B[7] โดยเชื้อชนิดนี้มักอยู่ในสิ่งแวดล้อมในรูปแบบของซีสต์ (Cyst) ซึ่งจะมีความคงทนต่อสิ่งแวดล้อมได้ดี[8] และพบปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำหรือแม้กระทั่งผักและผลไม้ [9-11]

เมนูอาหารของคนไทยส่วนใหญ่ประกอบด้วยผักสดเป็นส่วนประกอบหลักหรืออาจจะเป็นเครื่องเคียง เช่น น้ำพริกผักสด เมี่ยงปลาทู อาหารอีสานที่มีผักสดเป็นเครื่องเคียง รวมทั้งสลัดผักสดต่าง ๆ โดยผักที่นิยมรับประทานสด ได้แก่ ผักกาดหอม ผักกาดขาว กะหล่ำปลี เป็นต้น ซึ่งผักสดเหล่านี้มักมีการรายงานการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และปรสิตรวมถึงเชื้อกลุ่มโปรโตซัว โดยส่วนใหญ่มักจะให้ความสำคัญกับเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และปรสิตหนอนพยาธิ แต่ยังคงละเลยปรสิตในกลุ่มของโปรโตซัวที่มีขนาดเล็กและต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานผ่านกล้องจุลทรรศน์ โดยมีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *G. duodenalis* ร้อยละ 30 ในผักสดจากตลาดสดเมืองพะเยา[12] และในหลายประเทศทั่วโลกยังพบรายงาน *G. duodenalis* ปนเปื้อนในน้ำและผักสดอีกมายมาย ได้แก่ น้ำ[5,10] ผัก[13-15] จะเห็นได้ว่าผักสดจากสวนมักจะพบการปนเปื้อนเชื้อโปรโตซัว ซึ่งผักเหล่านี้จะถูกส่งมายังตลาดค้าส่งขนาดใหญ่เพื่อกระจายไปสู่ตลาดย่อยต่าง ๆ ด้วยเหตุนี้อาจพบการปนเปื้อนในผักได้ การตรวจการปนเปื้อนเชื้อโปรโตซัวในผักสดในตลาดค้าส่งขนาดใหญ่จึงมีโอกาสที่จะพบการปนเปื้อนและสามารถใช้ในการวางแผนควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อก่อนไปสู่ตลาดรายย่อยได้ นอกจากนี้เชื้อโปรโตซัวเป็นเชื้อที่มีขนาดเล็ก วิธีการตรวจอาจจะยังไม่เหมาะสมสำหรับงานตรวจพื้นฐาน ในปัจจุบันสามารถตรวจได้หลายวิธีโดยวิธีมาตรฐาน (Conventional method) คือการดูสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ (Specificity) สูงถึง 100% เนื่องจากเป็นการตรวจดูรูปร่างของเชื้อโดยตรง แต่พบว่ามีความไว (Sensitivity) ต่ำ (85.7 %) กล่าวคือต้องมีเชื้อปริมาณมาก จึงจะสามารถตรวจพบได้ และต้องอาศัยความชำนาญในดูกล้องจุลทรรศน์โดยมีหลายการศึกษาที่ทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานควบคู่ไปกับวิธีการทางชีวโมเลกุลแล้วพบว่าวิธีการทางชีวโมเลกุลสามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่าวิธีการมาตรฐาน[12,16] โดยพบว่า จำนวนซีสต์ที่น้อยที่สุดที่วิธีการทางชีวโมเลกุลจะสามารถตรวจพบได้คือ 1 ซีสต์[17] จึงมีการนำวิธีการทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการตรวจ เช่น วิธี PCR[12] Real-time PCR[18] ถ้ามีวิธีการตรวจที่รวดเร็วและง่ายสำหรับการใช้งานในภาคสนามจะสามารถพัฒนาวิธีเพื่อใช้ในงานเฝ้าระวังการปนเปื้อนเชื้อโปรโตซัวก่อโรคในผักและผลไม้หรือใช้ในงานด้านสุขาภิบาลอาหารได้ โดยในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อ *G. duodenalis* ในผักกาดหอม ผักกาดขาวและกะหล่ำปลีด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา ซึ่งผลจากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของการปนเปื้อนเชื้อ *G. duodenalis* ในผักสดและทำให้ประชาชนเห็นความสำคัญของการล้างผักให้สะอาดปลอดเชื้อโปรโตซัวและเชื้อก่อโรคอื่น ๆ ต่อไปได้

วิธีการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างผักสามชนิด ได้แก่ ผักกาดหอม ผักกาดขาวและกะหล่ำปลี ซึ่งเป็นผักที่ประชาชนนิยมบริโภคสด โดยรวบรวมมาจากตลาดค้าส่งขนาดใหญ่แห่งหนึ่งในจังหวัดปทุมธานี ระหว่างเดือนกันยายน 2562 ถึงมิถุนายน พ.ศ. 2563 การคำนวณขนาดตัวอย่างคิดจากการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับความชุกของโปรโตซัวในผักสดโดยใช้วิธี Nested PCR พบว่ามีการปนเปื้อนของโปรโตซัวในผักสดโดยรวม 57 เปอร์เซ็นต์[12] ดังนั้น ขนาดตัวอย่างของผักจึงถูกคำนวณโดยสูตร[19]

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

n = ขนาดตัวอย่าง

Z = Standard Normal Score

P = อุบัติการณ์การตรวจพบปรสิต ในผักสด เท่ากับร้อยละ 57 คิดเป็น 0.57[12]

e = ความความผิดพลาดในการประมาณค่าอุบัติการณ์การตรวจสูงสุดที่ยอมรับ 10%

α = ความผิดพลาดของการสรุปลักษณะประชากรจากค่าสถิติตัวอย่าง

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.57) (0.43)}{0.1^2} \approx 95 \text{ samples}$$

การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างจะใช้เทคนิคการเลือกตัวอย่างแบบเจาะจง เพื่อเลือกผักจากร้านขายผักทั้งหมด 40 ร้านจาก 49 ร้าน โดยการคัดเลือกตามประเภทของผัก หลังจากเก็บตัวอย่างผักมาแล้ว ทำการหั่นผักแต่ละตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยใช้ตัวอย่างผัก 200 กรัม นำผักที่หั่นแล้วมาล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์[28,29] ทำการกรองแยกผักออกและนำน้ำล้างผักปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้ข้ามคืนเพื่อให้ตกตะกอน จากนั้นทำการดูดน้ำล้างผักส่วนบน 2/3 ของทั้งหมดทิ้ง เก็บเพียงน้ำและตะกอนส่วนล่างใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรและปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนด้านบนตะกอนทิ้งและเก็บตะกอนไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

นำตะกอนไปทำให้เซลล์แตก (Cell lysis) โดยการทำให้อุณหภูมิสูงและต่ำสลับกัน (Freeze-thaw) ที่อุณหภูมิ -83°C เป็นเวลา 10 นาที และ 56°C เป็นเวลา 5 นาที สลับกันทั้งหมด 5 รอบ จากนั้นนำตะกอนไปสกัดดีเอ็นเอ ตามคู่มือชุดสกัดดีเอ็นเอ (FavorPrep™ Soil DNA Isolation Mini Kit, FAVORGEN) เก็บ DNA ที่สกัดแล้วใน -20°C จนกว่าจะทำการตรวจหาเชื้อในขั้นตอนต่อไป

การตรวจหา *G. duodenalis* ในผักที่นำมาทดสอบด้วยวิธี Nested PCR

นำ DNA ที่สกัดได้ไปตรวจหา *G. duodenalis* โดยใช้วิธี Nested PCR โดยใช้ยีน Glutamate dehydrogenase *(gdh)* เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจหาเชื้อ[20] กล่าวโดยสรุปคือ ผสมสารต่าง ๆ ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems, U.S.A.) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase (RNase-free water) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (Forward primer) และไพรเมอร์รีเวิร์ส (Reverse primer) ปริมาตรชนิดละ 1 ไมโครลิตรและดีเอ็นเอตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 0.2 มิลลิลิตร และใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณ สารพันธุกรรม (PCR Thermocycler, Bio-Rad, USA) จากนั้นนำ PCR product จากการทำครั้งที่ 1 มาเป็น DNA ตั้งต้นในการทำ PCR ในครั้งที่ 2 โดย ใช้ Condition ทุกอย่างเหมือน PCR รอบแรกแต่เปลี่ยน primer คู่นอกเท่านั้น และอ่านผลที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (Agarose gel) ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยนำเจลไปอ่านภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจลและวิเคราะห์เจล (Gel documentation)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการศึกษานี้ ใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) เช่น ความถี่ และร้อยละ เพื่ออธิบายลักษณะของกลุ่มตัวอย่างผักที่เก็บรวบรวมมาและผลการตรวจหาเชื้อ *Giardia* ด้วยวิธี Nested PCR

ผลการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ได้รวบรวมตัวอย่างทั้งหมด 96 ตัวอย่าง ประกอบด้วยผักกาดหอม 35 ตัวอย่าง ผักกาดขาว 30 ตัวอย่าง และกะหล่ำปลี 31 ตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดได้รับการตรวจหา *G. duodenalis* โดยวิธี Nested PCR ผลการตรวจพบเชื้อ *G. duodenalis* ทั้งหมด 6 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 96 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงใน Table 1 และผลการตรวจโดยวิธี Nested PCR แสดงใน Figure 1

Table 1 The results of *G. duodenalis* detection from selected vegetables detected by using the Nested PCR method

Type of vegetable	Positive sample/total number of samples (%)
Nappa cabbage	3/30 (10.00)
Cabbage	2/31 (6.45)
Lettuce	1/35 (2.86)
Total	6/96 (6.25)

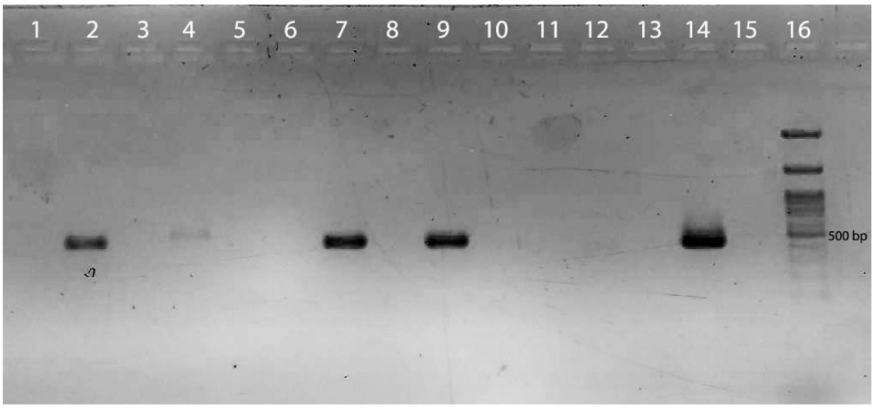

Figure 1 Positive PCR amplifications of *G. duodenalis* gdh gene in selected vegetables on 1.5% agarose gel stained with gel staining (SERVA DNA Stain G). Lanes 1-13: samples. Lane 14: positive control. Lane 15: negative control. Lane 16: 100 bp standard DNA ladder

อภิปรายผล

ผลการศึกษานี้พบการติดเชื้อ *G. duodenalis* ในตัวอย่างผัก 6 ตัวอย่าง คิดเป็น 6.25% จาก 96 ตัวอย่าง โดยการตรวจด้วยวิธี Nested PCR แสดงให้เห็นว่าผักในการศึกษานี้ยังคงมีการปนเปื้อนของปรสิต ผลลัพธ์นี้เกี่ยวข้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบความชุกของ *G. duodenalis* 5% ในผักสดจากตลาดท้องถิ่นทางตอนเหนือของอินเดีย[21] และมีการศึกษาอื่นๆที่เก็บตัวอย่างผักประเทศจอร์แดน พบการปนเปื้อนของ *G. duodenalis* 6.8% ในผักกาดหอมและขึ้นฉ่าย[22] นอกจากนี้ผักสลัดพร้อมรับประทานที่จำหน่ายในอิตาลีมีการปนเปื้อนของ *G. duodenalis* 0.6%[13] ความชุกของ *G. duodenalis* ทั่วโลกคล้ายคลึงกับหลายการศึกษาในประเทศไทยรวมถึงการศึกษาครั้งนี้ด้วย โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ในจังหวัดพะเยา ประเทศไทยรายงานการปนเปื้อนของ *G. duodenalis* ในผักสด 30% ซึ่งพบว่าเชื้อ *G. duodenalis* ยังคงปนเปื้อนและยังมีการตรวจพบในผักสดได้[12] จากงานวิจัยอื่น ๆ ในประเทศไทยพบว่า มีการตรวจหาปรสิตในผักและผลไม้[23, 24] ซึ่งส่วนใหญ่มักจะตรวจเพียงแค่ไข่หนอนพยาธิ โดยอาจจะไม่ได้ตรวจหาเชื้อโปรโตซัวเนื่องจากต้องอาศัยความชำนาญในการดูกล้องและเชื้อโปรโตซัวบางชนิดอาจจะต้องใช้เทคนิคพิเศษในการตรวจ เป็นต้น ถ้ามีการพัฒนาเทคนิคการตรวจหาเชื้อโปรโตซัวก่อโรคในผักและผลไม้ที่ง่ายและสะดวกในการตรวจ อาจจะเป็นประโยชน์ในการใช้ในงานเฝ้าระวังเชื้อก่อโรคจากผักผลไม้ซึ่งผู้คนมักจะนิยมบริโภคแบบสด ๆ ต่อไป

ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อทั้งหมดถูกตรวจโดยวิธี Nested PCR ในขณะที่งานวิจัยครั้งนี้จริงๆแล้วได้ทำการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยวิธีการตรวจอย่างง่าย (Simple smear) และวิธีการทำให้เข้มข้น (Formalin Ethyl Acetate Concentration Technique: FECT) ด้วย (แต่ไม่ได้กล่าวถึงในวิธีและผลการศึกษา) แต่ไม่สามารถตรวจพบโปรโตซัวขนาดเล็กนี้ได้อาจเป็นเพราะเชื้อโปรโตซัวในผักที่นำมาตรวจมีปริมาณน้อย ดังนั้นเทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงไม่เหมาะสำหรับการตรวจหาพยาธิในตัวอย่างหรือพื้นที่ที่มีรายงานความชุกน้อย ในทำนองเดียวกันการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าวิธีการตรวจโปรโตซัวด้วยกล้องจุลทรรศน์มีความไวน้อยกว่าเทคนิคระดับโมเลกุล[13,16,25] นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าวิธีการทางชีวโมเลกุลสามารถตรวจพบ *Giardia* ซีสต์ จำนวนน้อยที่สุดเพียงแค่ 1 ซีสต์[26] ซึ่งจากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าผักที่นำมาตรวจมีการปนเปื้อนซีสต์ของ *Giardia* จำนวนน้อยมากซึ่งสามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลเท่านั้น

ฤดูกาลเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Giardia* ในตัวอย่างผัก โดยมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาความชุกของเชื้อ *G. duodenalis* จะพบความชุกสูงสุดในช่วงปลายฤดูร้อนและต้นฤดูใบไม้ร่วง ซึ่งอุณหภูมิจะอยู่ที่ประมาณ 22 องศาเซลเซียส[13] แต่เนื่องจากอุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปีของประเทศไทยอยู่ที่ 28 องศาเซลเซียส[30] จึงอาจส่งผลต่อการพบเชื้อที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ลักษณะผักยังมีผลกับการตรวจพบเชื้ออีกด้วยโดยมีการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *G. duodenalis* ในผัก 4 ชนิด ได้แก่ ผักกาดหอม ขึ้นฉ่าย มะเขือเทศ และแตงกวา ซึ่งเก็บตัวอย่างในประเทศจอร์แดน พบว่าตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อมากที่สุดคือผักกาดหอมและขึ้นฉ่าย เนื่องจากใบของผัก 2 ชนิดนี้มีพื้นที่ผิวหยาบกว่าเมื่อเทียบกับพื้นผิวมะเขือเทศและแตงกวา[22] สอดคล้องกับผลในงานวิจัยนี้ซึ่งผักทั้ง 3 ชนิดที่นำมาทดสอบมีลักษณะพื้นผิวที่หยาบ อาจทำให้ *Giardia* ซีสต์ ติดอยู่ในใบผักได้ เนื่องจากมีรายงานการศึกษาที่เก็บตัวอย่างน้ำรดผักจากแผงขายผักในตลาดประเทศเวียดนามมาตรวจ ซึ่งพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Giardia spp.* (8.5%)[27] ดังนั้นการรดน้ำเพื่อความสดของผักในระหว่างการขายทำให้ *Giardia* ซีสต์ หลุดออกจากใบและสามารถตรวจพบในน้ำล้างผักได้

อีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญคือขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง ในการศึกษานี้ใช้น้ำเกลือสำหรับขั้นตอนการล้างตัวอย่าง ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้านี้ได้เปรียบเทียบน้ำยาล้างผักและประเภทของผัก ผลการวิจัยพบว่าน้ำเปล่าสามารถลดการปนเปื้อน (ล้างไข่พยาธิหรือระยะซิสต์ของโปรโตซัว) ในผักที่ผ่านการทดสอบได้ 4 ชนิด ได้แก่ ผักกาดขาว ขึ้นฉ่าย กุยช่ายและคะน้า ในขณะที่น้ำเกลือสามารถลดการปนเปื้อนในผักที่ผ่านการทดสอบได้ 7 ชนิด ได้แก่ สะระแหน่ ผักกาดหอม ต้นหอม ผักชีฝรั่ง กุยช่าย ผักชีฝรั่งและคะน้า น้ำส้มสายชูสามารถลดการปนเปื้อนในผักที่ผ่านการทดสอบทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ ผักกาดหอม ผักชี ใบบัวบก กุยช่าย ผักกาดขาว และคะน้า จะเห็นได้ว่าการล้างผักด้วยวิธีต่างๆสามารถลดการปนเปื้อนได้แตกต่างกันไปในผักแต่ละชนิด[28] โดยการใช้น้ำเกลือในการศึกษาครั้งนี้สามารถล้างระยะซีสต์ของ *Giardia* ให้ออกมาจากผักได้เช่นกัน ผลการตรวจพบเชื้อโปรโตซัวในผักที่นำมาตรวจสามารถเสนอแนะว่าการล้างผักก่อนบริโภคจึงเป็นสิ่งสำคัญมากเพื่อลดความเสี่ยงในการสัมผัสเชื้อโปรโตซัวเหล่านี้

สรุปผลการศึกษา

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ผักที่นำมาตรวจยังคงพบการปนเปื้อนโปรโตซัวอยู่ โดยมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการตรวจหาเชื้อโปรโตซัว ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงวิธีที่ใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อโปรโตซัว *G. duodenalis* พบว่า วิธี Nested PCR เป็นวิธีที่เหมาะสมในการศึกษานี้ สำหรับใช้ในการตรวจกรณีที่มีการปนเปื้อนเชื้อปริมาณน้อย เนื่องจากในการตรวจเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่พบ *Giardia* ซีสต์ ในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ โดยอาจจะประยุกต์วิธีการตรวจหาเชื้อโปรโตซัวโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในงานเฝ้าระวังการปนเปื้อนของน้ำและอาหาร รวมทั้งผักและผลไม้ในแหล่งเพาะปลูกหรือแม้กระทั่งในตลาดสดต่าง ๆ ซึ่งถ้าสามารถนำวิธีการตรวจไปใช้ในภาคสนามได้ด้วยจะยิ่งเป็นประโยชน์ต่องานทางด้านสาธารณสุขมาก นอกจากนั้นการศึกษาในครั้งนี้ถึงแม้ว่าจะพบจำนวนผักที่ปนเปื้อนเชื้อ *G. duodenalis* เพียงเล็กน้อย แต่ในปัจจุบันมีการติดเชื้อปรสิตในลำไส้จำนวนมากที่เกิดขึ้นโดยไม่ทราบแหล่งที่มาของการติดเชื้อ การบริโภคผักเหล่านี้สม่ำเสมอและเป็นระยะเวลานานอาจทำให้ได้รับเชื้อปรสิตโดยไม่รู้ตัวและอาจจะก่อโรคได้ ดังนั้นการล้างผักด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้งจึงเป็นสิ่งที่ง่ายและสำคัญที่สุดเพื่อลดการปนเปื้อนของโปรโตซัวก่อโรคเหล่านี้ได้

การมีส่วนร่วมของผู้นิพนธ์

วรากร โกศัยเสวี มธุรส ทิพยมงคลกุล และ องอาจ มหิทธิกร ออกแบบกระบวนการวิจัย ให้คำปรึกษา และแก้ไขร่างบทความวิจัย จริยา ศรีพนมพงษ์ ดำเนินงานวิจัย เก็บตัวอย่าง ตรวจหาเชื้อทางห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์ผลและเขียนร่างบทความ ผู้นิพนธ์ทุกคนอ่านและตรวจสอบบทความวิจัยก่อนส่งตีพิมพ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยาและกีฏวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลสำหรับคำแนะนำและช่วยเหลือทางห้องปฏิบัติการ

แหล่งทุนวิจัย

ไม่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย

ผลประโยชน์ทับซ้อน

ไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน

References

1. Travaillé E, La Carbona S, Gargala G, Aubert D, Guyot K, Dumètre A, et al. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. Food Control 2016; 59: 359-65.
2. Chonsawat P, Wongphan B. Prevalence of parasitic infections in patients at hospital for tropical diseases, Mahidol University. J Med Assoc Thai 2017; 45(2): 6073-84. (In Thai)
3. Korkes F, Kumagai FU, Belfort RN, Szejnfeld D, Abud TG, Kleinman A, et al. Relationship between intestinal parasitic infection in children and soil contamination in an urban slum. J Trop Pediatr 2009; 55(1): 42-5.
4. Aghaindum AG, Atud AQ, Nadège OAT. Implications of soils around domestic water points in the spread of intestinal parasites in the city of Yaounde (Cameroon). J Water Health 2019; 17(2): 318-28.
5. Hamilton KA, Waso M, Reyneke B, Saeidi N, Levine A, Lalancette C, et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and surface water environments. J Environ Qual 2018; 47(5): 1006-23.
6. Rivero MR, Feliziani C, De Angelo C, Tiranti K, Salomon OD, Touz MC. *Giardia spp.*, the most ubiquitous protozoan parasite in Argentina: Human, animal and environmental surveys reported in the last 40 years. Parasitol Res 2020; 119(10): 3181-201.
7. Fantinatti M, Bello AR, Fernandes O, Da-Cruz AM. Identification of *Giardia lamblia* assemblage E in humans points to a new anthropozoonotic cycle. J Infect Dis 2016; 214(8): 1256-9.

8. Leahy JG, Rubin AJ, Sproul OJ. Inactivation of *Giardia muris* cysts by free chlorine. Appl Environ Microbiol 1987; 53(7): 1448-53.
9. Sakkas H, Economou V, Bozidis P, Gousia P, Papadopoulou C, Karanis P. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in foods of plant origin in North-Western Greece. J Water Health 2020; 18(4): 574-8.
10. Chaidez C, Soto M, Gortares P, Mena K. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in irrigation water and its impact on the fresh produce industry. Int J Environ Health Res 2005; 15(5): 339-45.
11. Amorós I, Alonso JL, Cuesta G. *Cryptosporidium* oocysts and *giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. J Food Prot 2010; 73(6): 1138-40.
12. Tantiamornkul K, Mataradchakul T. Detecting insecticide contamination and determining prevalence of protozoa in fresh vegetables from fresh markets, Maung Phayao, Phayao Province. Journal of Public Health 2019; 49(1): 118-29. (In Thai)
13. Caradonna T, Marangi M, Chierico FD, 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.
14. Eraky MA, Rashed SM, Nasr ME-S, El-Hamshary AMS, Salah El-Ghannam A. Parasitic contamination of commonly consumed fresh leafy vegetables in Benha, Egypt. J Parasitol Res 2014; 2014: 613960.
15. Mohamed MA, Siddig EE, Elaagip AH, Edris AMM, Nasr AA. Parasitic contamination of fresh vegetables sold at central markets in Khartoum state, Sudan. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2016; 15: 17.
16. Elsafi SH, Al-Maqati TN, Hussein MI, Adam AA, Hassan MM, Al Zahrani EM. Comparison of microscopy, rapid immunoassay, and molecular techniques for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum.* Parasitol Res 2013; 112(4): 1641-6.
17. Miller KM, Sterling CR. Sensitivity of nested PCR in the detection of low numbers of *Giardia lamblia* cysts. Appl Environ Microbiol 2007; 73(18): 5949-50.
18. Suwatchinjaroen S, Songthamwa D. The development of *Giardia lamblia* detection in lettuce by using the real-time PCR method. J Med Assoc Thai 2016; 44(2): 5700-16. (In Thai)
19. Parker P. Sample size requirements for confidence intervals on distribution parameters. In: Meeker WQ, Hahn GJ, Escobar LA, eds. Statistical intervals: A guide for practitioners and researchers. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons. Inc.; 2017. p.284-307.
20. Read CM, Monis PT, Andrew TRC. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect Genet Evol 2004; 4(2): 125-30.
21. Utaaker KS, Kumar A, Joshi H, Chaudhary S, Robertson LJ. Checking the detail in retail: Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* on vegetables sold across different counters in Chandigarh, India. Int J Food Microbiol 2017; 263: 1-8.
22. Ismail Y. Prevalence of parasitic contamination in salad vegetables collected from supermarkets and street vendors in Amman and Baqa'a - Jordan. Pol J Microbiol 2016; 65(2): 201-7.
23. Jongkolnee N, Songthamwat D. Detection of parasitic contamination in vegetables from Phra Nakhon Si Ayutthaya district, Phra Nakhon Si Ayutthaya. J Med Assoc Thai 2015; 43(1): 5141-50. (In Thai)
24. Punsawad C, Phasuk N, Thongtup K, Nagavirochana S, Viriyavejakul P. Prevalence of parasitic contamination of raw vegetables in Nakhon Si Thammarat Province, southern Thailand. BMC Public Health 2019; 19(1): 34.
25. Alharbi A, Toulah FH, Wakid MH, Azhar E, Farraj S, Mirza AA. Detection of *Giardia lamblia* by microscopic examination, rapid chromatographic immunoassay test, and molecular technique. Cureus 2020; 12(9): e10287.
26. Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). Cold Spring Harb Protoc 2019; 2019(2): doi: 10.1101/pdb.prot095182.
27. Tram NT, Dalsgaard A. Water used to moisten vegetables is a source of *Escherichia coli* and protozoan parasite contamination at markets in Hanoi, Vietnam. J Water Health 2014; 12(4): 896-900.
28. Satjapala T, Toonsakool K, Pednog K. Contamination and reducing of parasite in fresh vegetables by washing. Bulletin of the Department of Medical Science 2014; 56(4): 205-12. (In Thai)
29. Kalani H, Daryani A, Sharif M, Ahmadpour E, Alizadeh A, Nasrolahei M, et al. Comparison of eight cell-free media for maintenance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Iran J Parasitol 2016; 11(1): 104-9.
30. Climatological Center, Meteorological Department. Monthly and annual mean (dry-bulb) temperature of Thailand 2020. Available from https://www.tmd.go.th/climate/climate.php?FileID=5, accessed 3 June 2021.