

การวิเคราะห์การปนเปื้อน *Clostridium botulinum* และสารพิษโบทูลินัมในน้ำปลาไทย

ดวงดาว วงศ์สมมาตร สมภพ วัฒนมณี ปัทมา แดงชาติ กนกพรรณ สมยุทธ์ทรัพย์

ศศิธร จิตเพชรกุล และสุภารัตน์ ศรีน้อยเมือง

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การที่ประเทศสหรัฐอเมริกาห้ามนำเข้าน้ำปลาจากประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2557 เพราะขาดข้อมูลสารพิษโบทูลินัม ส่งผลกระทบต่อมูลค่าและสัดส่วนการตลาดของน้ำปลาไทยในสหรัฐอเมริกาเป็นอย่างมาก เพื่อสนับสนุนการส่งออก จึงได้ตรวจสอบการปนเปื้อน *Clostridium botulinum* และสารพิษโบทูลินัม ในน้ำปลา จำนวน 117 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 48 และ 69 ตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2559 และ 2560 ตามลำดับ ทำการตรวจหา *C. botulinum* ด้วยเทคนิคเพาะเชื้อ และตรวจหาสารพิษโบทูลินัม type A, B, E และ F ซึ่งเป็น type ที่ก่อโรคในคน ด้วยเทคนิค ELISA (ชุดน้ำยา Tetracore®, USA) ผลการตรวจไม่พบทั้ง *C. botulinum* และสารพิษโบทูลินัม ในน้ำปลาทุกตัวอย่าง แต่พบ *Clostridium sporogenes*, *Clostridium bifermentans* และ *Bacillus cereus* group ในน้ำปลาจำนวน 7, 3 และ 3 ตัวอย่าง ตามลำดับ ข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษโบทูลินัม และ *C. botulinum* ในน้ำปลานี้ ได้ถูกนำไปเป็นส่วนหนึ่งของข้อมูลสนับสนุนในการเจรจการค้าระหว่างประเทศ เพื่อต่อรองการส่งออกน้ำปลาไทยไปยังสหรัฐอเมริกา เพื่อช่วยรักษาและเพิ่มศักยภาพการแข่งขันของตลาดน้ำปลาไทยในต่างประเทศ และทำให้ผู้บริโภคมั่นใจได้ว่าน้ำปลาไทยปลอดภัยจากสารพิษที่มีอันตรายร้ายแรง

Accepted for publication, 11 December 2018

บทนำ

Clostridium botulinum เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ และสามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อน ทำให้เกิดโรค Botulism ซึ่งเป็นอันตรายร้ายแรง เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างสารพิษโบทูลินัม (Botulinum toxin) ที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาท และมีความเป็นพิษรุนแรงที่สุดเท่าที่พบในปัจจุบัน แม้โรคนี้จะเกิดขึ้นนาน ๆ ครั้ง แต่พบอัตราการตายสูง สารพิษจาก *C. botulinum* จำแนกได้เป็น 7 type คือ A, B, C, D, E, F และ G โดยที่ type A, B, E และ F ก่อให้เกิดโรค ในขณะที่ type C, D และ E ก่อให้เกิดโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ สัตว์ปีก และปลา⁽¹⁾ นอกจากนี้ *C. botulinum* ยังจำแนกตามหลักการเพาะเชื้อ คุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยา ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ย่อยโปรตีน (proteolytic strains) ได้แก่ ทุกสายพันธุ์ของ type A และบางสายพันธุ์ของ type B และ F และกลุ่มที่ไม่ย่อยโปรตีน (non-proteolytic strains) ได้แก่ ทุกสายพันธุ์ของ type E และสายพันธุ์อื่นๆ ที่เหลือของ type B และ F⁽²⁾

C. botulinum พบทั่วไปในดิน ตะกอนดินในมหาสมุทรและทะเลสาบ type E พบบ่อยในแหล่งน้ำทั้งน้ำจืดและน้ำทะเล รวมทั้งปลาหรืออาหารทะเลอื่น โดยพบตามเหงือก เครื่องใน ของปลา ปู และหอย ส่วน type A และ B มักพบในอาหารที่ปนเปื้อนดิน และพบในน้ำได้ด้วย⁽³⁾ รายงานการสำรวจ *C. botulinum* ในดิน ทราญ และปลาบริเวณอ่าวไทย เมื่อปี ค.ศ. 1979 พบ *C. botulinum* type D และ type E⁽⁴⁾ ขณะที่รายงานการศึกษาของประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี ค.ศ. 1980 พบ *C. botulinum* type C และ D ในปลาและอาหารทะเลที่จำหน่ายในซูเปอร์มาร์เกตในเมืองโอซากา⁽⁵⁾

ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความเสี่ยงต่อการก่อโรค Botulism ส่วนใหญ่เป็นอาหารกระป๋องที่ผลิตในครัวเรือน (home-canned หรือ home-bottled foods) อาหารที่ผ่านกระบวนการถนอมอาหาร หรือแปรรูปที่ไม่สมบูรณ์หรืออาหารหมัก (fermented food)⁽¹⁾ อาจมีสปอร์ของ *C. botulinum* ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบอาหาร นอกจากนี้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตโดยไม่ผ่านความร้อนหรือกระบวนการผลิตที่มีการให้ความร้อนไม่เพียงพอ ทำให้สปอร์ยังคงหลงเหลืออยู่และหากอาหารนั้นอยู่ในภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ สปอร์จะงอกเป็นตัวเชื้อ เจริญเพิ่มจำนวน และสร้างสารพิษโบทูลินัมในอาหารนั้นๆ ได้ ภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ ได้แก่ ภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือออกซิเจนต่ำ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สูงกว่า 4.6 มีส่วนผสมของเกลือไม่เกิน 5-10%⁽⁶⁾ นอกจากนั้น การเก็บรักษาอาหารในช่วงอุณหภูมิที่พอเหมาะกับการเจริญของเชื้อ เป็นปัจจัยร่วมที่ทำให้เชื้อเจริญและสร้างสารพิษในอาหารได้ เช่น เก็บรักษาในอุณหภูมิปกติ หรือไม่เกิน 45-50 องศาเซลเซียส (เช่น อาหารหมัก และหมุยที่นิยมวางจำหน่ายโดยไม่แช่เย็น เป็นต้น) สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารพิษของ *C. botulinum* กลุ่มที่ย่อยโปรตีน (proteolytic strains) ประมาณ 35 องศาเซลเซียส ส่วนกลุ่มที่ไม่ย่อยโปรตีน (non-proteolytic strains) อยู่ในช่วง 26-28 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ไม่ย่อยโปรตีน (non-proteolytic strains) types B, E, and F ยังสามารถสร้างสารพิษได้ แม้เก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิ 3-4 องศาเซลเซียส⁽²⁻³⁾

ประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานผู้ป่วยด้วยโรค Botulism ในปี ค.ศ. 2016 จำนวน 205 ราย โดยพบว่าเป็น Foodborne Botulism 29 ราย (ร้อยละ 14) ซึ่งมีสาเหตุจากทั้ง home-canned food และอาหารอื่นๆ โดยพบ *C. botulinum* type A, E และ B⁽⁷⁾ สำหรับประเทศไทย มีรายงานการระบาดของ Foodborne Botulism ที่เกิดจากการบริโภคอาหารต่างๆ ได้แก่ หน่อไม้ปิ้งที่จังหวัดน่าน เมื่อปี พ.ศ. 2541⁽⁸⁾ และ พ.ศ. 2549⁽⁹⁾ หน่อไม้ปิ้งที่จังหวัดลำปาง ปี พ.ศ. 2546⁽¹⁰⁾ ลาบเนื้อแก้งดิบที่จังหวัดพะเยา ปี พ.ศ. 2549⁽¹¹⁾ หมุย (พบสารพิษ type A) ที่จังหวัดนครราชสีมาปี พ.ศ. 2553⁽¹²⁾ ถั่วเน่า (ถั่วเหลืองหมัก) (พบสารพิษ type B) ที่จังหวัดแม่ฮ่องสอนปี พ.ศ. 2553⁽¹³⁾ ปูดองที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี ปี พ.ศ. 2555⁽¹⁴⁾ และหน่อไม้ต้มบรรจุถุงพลาสติก (พบสารพิษ type B) ที่จังหวัดชัยภูมิ และจังหวัดชลบุรี ปี พ.ศ. 2557⁽¹⁵⁾ ซึ่งอาหารดังกล่าวเป็นกลุ่มอาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทที่ผ่านความร้อนไม่สมบูรณ์และอาหารหมักเป็นหลัก

น้ำปลาเป็นอาหารหมักที่นิยมใช้เป็นเครื่องปรุงรสในอาหารไทย จัดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปผ่านกระบวนการหมัก โดยนำปลาทะเลขนาดเล็ก เช่น ปลาช่อน ปลาสร้อย ปลาไส้ตัน ปลาเกะตัก มาหมักเกลือนาน 6-18 เดือน จึงกรองและบรรจุขวด จำหน่ายเป็นน้ำปลาน้ำที่หนึ่งและหลังจากหมักกากปลาที่เหลือต่อ โดยเติมน้ำเกลืออิมตัวทิ้งไว้ 3-6 เดือน ผ่านการกรองและบรรจุขวด ได้เป็นน้ำปลาน้ำที่สอง⁽¹⁶⁾ น้ำปลาจึงเป็นอาหารที่ไม่ได้ผ่านความร้อน หากมีการปนเปื้อนสปอร์ของ *C. botulinum* มาตั้งแต่ในวัตถุดิบ เชื้ออาจเจริญในปลาหมักได้ น้ำปลาเป็นอาหารกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 203 พ.ศ. 2543 เรื่องน้ำปลา⁽¹⁷⁾ ซึ่งมีการจัดเกรดเป็นน้ำปลาแท้ หรือน้ำปลาผสม โดยพิจารณาจากคุณภาพ เช่น ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และสัดส่วนของกรดกลูตามิกต่อไนโตรเจนทั้งหมด เป็นต้น แต่ทั้งน้ำปลาแท้และน้ำปลาผสม ต้องมีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์และ/หรือเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ รวมกันแล้วไม่น้อยกว่า 200 กรัม ต่อ น้ำปลา 1 ลิตร (20%) ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าค่าปริมาณเกลือสูงสุดในการเจริญของ *C. botulinum* (10 % เกลือ)⁽⁶⁾

ประเทศไทยส่งออกน้ำปลาไปยังหลายประเทศ แต่เมื่อปี พ.ศ. 2557 ประเทศสหรัฐอเมริกาห้ามนำเข้าน้ำปลาจากผู้ผลิต 4 บริษัทของประเทศไทย เนื่องจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สหรัฐอเมริกา (US FDA) อ้างว่าการผลิตน้ำปลาไม่ได้มาตรฐานตามกฎระเบียบเรื่องการวิเคราะห์จุดความเสี่ยงอันตรายและการจัดทำแผนเพื่อควบคุมอันตรายที่อาจเกิดขึ้น (Hazard Analysis & Critical Control Points: HACCP) ซึ่งอาจก่อให้เกิดสารฮีสตามีนและสารพิษโบทูลินัม การห้ามนำเข้าสินค้านี้ส่งผลกระทบต่อมูลค่าและสัดส่วนการตลาดของน้ำปลาไทยในสหรัฐอเมริกาเป็นอย่างมาก แม้ว่ากรมประมงได้ทำการศึกษาวิจัยวัตถุดิบและน้ำปลาที่ผลิตในโรงงานผลิตน้ำปลาภายในประเทศ 3 แห่ง เพื่อตรวจหาการปนเปื้อน *C. botulinum* ใน 3 กลุ่มตัวอย่าง รวมทั้งหมด 370 ตัวอย่าง คือ ปลาเกะตักที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำปลา ปลาเกะตักเคล้าเกลือ และน้ำปลาในบ่อหมักตั้งแต่เดือนที่ 1 จนถึงเดือนสุดท้ายที่หมักน้ำปลา (หมักนาน ตั้งแต่ 10 เดือนขึ้นไป) และผลการศึกษาไม่พบปนเปื้อน *C. botulinum*⁽¹⁸⁾ แต่ไม่ได้ศึกษาการปนเปื้อนสารพิษโบทูลินัม US FDA จึงพิจารณาว่าข้อมูลไม่เพียงพอ ทำให้มีการกักกันสินค้าจากผู้ผลิตทั้ง 4 บริษัทต่อไป เพื่อสนับสนุนข้อมูลในการแก้ปัญหการส่งออกน้ำปลาไทย จึงได้ทำการศึกษาวิเคราะห์การปนเปื้อน *C. botulinum* และสารพิษโบทูลินัมในน้ำปลา โดยใช้ชุดน้ำยา Tetracore[®] ซึ่งผลิตโดย Tetracore, Inc. USA และได้รับการทวนสอบโดยหน่วยงาน U.S. Environmental Protection Agency⁽¹⁹⁾

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและเชื้ออ้างอิง

สารมาตรฐาน : สารพิษโบทูลินัม type A, B, E และ F ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายแบคทีเรียไร้อากาศ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เชื้ออ้างอิง : *Clostridium sporogenes* DMST 15536 (ATCC 11437) จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ ใช้ในการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ และเป็น positive analytical control สำหรับการตรวจหา *C. botulinum* ในน้ำปลา

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเชื้อ *C. botulinum* : gel-phosphate buffer, cooked meat medium (CM) (Oxoid, England), trypticase-peptone-glucose-yeast extract broth (TPGY), anaerobic egg yolk agar (anaerobic-EY)

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างน้ำปลาแท้และน้ำปลาผสม จำนวนรวม 117 ตัวอย่าง ที่นำส่งสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยหน่วยงานภาครัฐคือ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด และภาคเอกชน รวมทั้งตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากท้องตลาด เป็น 2 ช่วงเวลา ดังนี้

1. ช่วงที่ 1 เดือนกรกฎาคม-พฤศจิกายน 2559 สํารวจน้ำปลา จำนวน 48 ตัวอย่าง แยกเป็นน้ำปลาแท้ 28 ตัวอย่าง 21 เครื่องหมายการค้า จาก 18 แหล่งผลิตใน 12 จังหวัด (กรุงเทพฯ จันทบุรี ชลบุรี นครปฐม นนทบุรี ปทุมธานี ระยอง สตูล สมุทรปราการ สมุทรสงคราม สมุทรสาคร อุทัยธานี) และน้ำปลาผสม 20 ตัวอย่าง 18 เครื่องหมายการค้า จาก 14 แหล่งผลิตใน 9 จังหวัด (กรุงเทพฯ ชุมพร นนทบุรี ปทุมธานี ระยอง ราชบุรี สมุทรสงคราม สระบุรี อุทัยธานี)

2. ช่วงเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม 2560 จำนวน 69 ตัวอย่าง แยกเป็นน้ำปลาแท้ 44 ตัวอย่าง 20 เครื่องหมายการค้า จาก 10 แหล่งผลิตใน 9 จังหวัด (กรุงเทพฯ ชลบุรี นครปฐม ปทุมธานี ปราจีนบุรี ระยอง ราชบุรี สมุทรปราการ สมุทรสงคราม) ซึ่งรวมถึงน้ำปลาแท้ที่นำเข้าจากประเทศเวียดนามอีก 1 ตัวอย่าง และน้ำปลาผสม 25 ตัวอย่าง 24 เครื่องหมายการค้า จาก 11 แหล่งผลิตใน 11 จังหวัด (กรุงเทพฯ ชุมพร นครปฐม นนทบุรี ปราจีนบุรี สมุทรปราการ สมุทรสงคราม สิงห์บุรี ระยอง ราชบุรี อุทัยธานี)

การเตรียมตัวอย่าง

เขย่าขวดให้น้ำปลาผสมกันให้ทั่ว เปิดฝาด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ และปิเปตตัวอย่างน้ำปลา 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดฝาเกลียวที่ปราศจากเชื้อ

การตรวจวิเคราะห์

การตรวจหาสารพิษโบทูลินัม type A, B, E และ F:

ทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค indirect capture ELISA ด้วยชุดน้ำยา Tetracore® (Tetracore, Inc., USA) กล่าวคือ เติม ELISA dilution/blocking buffer ลงใน 96-well pre-coated ELISA plate สำหรับแต่ละ type ของ toxin แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส (°C) 1 ชั่วโมง หลังจากล้างด้วย Phosphate Buffered Saline with tween-20 (PBST) เติมตัวอย่างน้ำปลาทดสอบที่ได้เตรียมไว้ (undiluted sample) โดยมีตัวอย่างน้ำปลาที่ spike toxin แต่ละ type เป็นตัวอย่างควบคุมบวก และ ELISA dilution/blocking buffer เป็นตัวอย่างควบคุมลบ และตัวอย่างน้ำปลาที่มีสีเข้มที่สุดของการวิเคราะห์แต่ละครั้งเป็น blank control แล้วบ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม detector antibody (Mab anti-Bot Toxin A, Rabbit anti-Bot tox, biotinylated Horse anti-bot toxin E, biotinylated Horse anti-bot toxin F ที่เจือจาง 2.5, 5, 5 และ 4 µg/ml ในการตรวจหา toxin type A, B, E และ F ตามลำดับ) บ่มต่อที่ 37°C 1 ชั่วโมง แล้วเติม conjugate antibody (Goat anti-Mouse IgG-HRP และ Streptavidin-HRP ที่เจือจาง 1:5000 สำหรับการตรวจหา Toxin type A, B และ E, F ตามลำดับ) บ่มที่ 37°C 1 ชั่วโมง หลังจากล้าง plate ด้วย PBST แล้วจึงเติม substrate (ABTS peroxidase Substrate (1 component)) แล้วบ่มที่ 37°C 30 นาที จากนั้นอ่านค่า Optical Density (OD) ที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA plate reader (Tecan®, Tecan Austria GmbH, Austria)

ตัดสินผลการตรวจพบ/ไม่พบ Botulinum toxin โดยเปรียบเทียบกับค่า positive cutoff (คำนวณจากค่า mean ของ negative control + 3SD ของ negative control + 0.150 (ค่า blank control ของผู้ผลิตชุดน้ำยา) + ค่า blank control ของน้ำปลา) โดยตัวอย่างที่อ่านค่า OD ได้มากกว่าค่า positive cutoff อ่านผลเป็นบวก ซึ่ง positive control เตรียมจากตัวอย่างน้ำปลาที่ spike toxin แยกแต่ละ type โดยให้มี final concentration ของ toxin น้อยกว่า 5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

การตรวจหา C. botulinum:

ทำการตรวจด้วยเทคนิคเพาะเชื้อตามวิธีมาตรฐาน USFDA BAM 2001⁽²⁾ โดยปิเปตตัวอย่างน้ำปลา 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ CM และ TPGY ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ชนิดละ 2 หลอด บ่มหลอด CM ที่ 35°C และ บ่มหลอด TPGY ที่ 28°C นาน 5 วัน ตรวจสอบความขุ่น ก๊าซ กลิ่นเหม็น การย่อยสลายของเนื้ออาหาร และย้อมสีแกรม หากไม่พบการเจริญ (no growth) บ่มต่ออีก 10 วัน จากนั้นนำอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อจากใน CM และ TPGY ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียวปราศจากเชื้อ และเติม absolute ethanol ที่ปราศจากเชื้อ (โดยกรองผ่าน แผ่นกรองเมมเบรน ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้น ถ่ายเชื้อ 1 loop บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ anaerobic-EY บ่มที่ 35°C 48 ชั่วโมง ในภาชนะที่ไร้ออกซิเจน เมื่อพบลักษณะโคโลนีที่สงสัย ส่งตรวจยืนยันที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ผล

จากการวิเคราะห์น้ำปลาแท้และน้ำปลาผสม เพื่อตรวจหาการปนเปื้อน *C. botulinum* และสารพิษโบทูลินัม ในช่วงปี พ.ศ. 2559 และ 2560 จำนวน 48 และ 69 ตัวอย่างตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 117 ตัวอย่าง ผลการตรวจวิเคราะห์ ไม่พบสารพิษโบทูลินัม และ *C. botulinum* ในน้ำปลาทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจการวิเคราะห์การปนเปื้อน *C. botulinum* และสารพิษโบทูลินัมในน้ำปลา ปี พ.ศ. 2559 และปี พ.ศ. 2560

แหล่งผลิต	ปี พ.ศ. 2559		ปี พ.ศ. 2560	
	จำนวนตัวอย่างตรวจ (ไม่ผ่านเกณฑ์)		จำนวนตัวอย่างตรวจ(ไม่ผ่านเกณฑ์)	
	น้ำปลาแท้	น้ำปลาผสม	น้ำปลาแท้	น้ำปลาผสม
กรุงเทพฯ	1 (0)	3 (0)	1 (0)	6 (0)
จันทบุรี	1 (0)	-	-	-
ชลบุรี	1 (0)	-	4 (0)	-
ชุมพร	-	3 (0)	-	3 (0)
นครปฐม	2 (0)	-	2 (0)	1 (0)
นนทบุรี	1 (0)	1 (0)	-	2 (0)
ปราจีนบุรี	-	-	2 (0)	2 (0)
ปทุมธานี	2 (0)	3 (0)	1 (0)	-
ระยอง	9 (0)	5 (0)	10 (0)	2 (0)
ราชบุรี	-	2 (0)	1 (0)	5 (0)
สระบุรี	-	1 (0)	-	-
สมุทรปราการ	4 (0)	-	4 (0)	1 (0)
สมุทรสาคร	2 (0)	-	-	-
สมุทรสงคราม	2 (0)	1 (0)	18 (0)	1 (0)
สตูล	1 (0)	-	-	-
สิงห์บุรี	-	-	-	1 (0)
อยุธยา	-	-	-	1 (0)
อุทัยธานี	2 (0)	1 (0)	-	-
เวียงจันทน์	-	-	1 (0)	-
รวม	28 (0)	20 (0)	44 (0)	25 (0)

เมื่อเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ anaerobic-EY พบโคลิฟอร์มหัวขาว หรือค่อนข้างขาว และมีโซนสีเหลืองขึ้น จากตัวอย่างน้ำปลาแท้และน้ำปลาผสม จำนวน 8 และ 5 ชนิด ตามลำดับ ผลการตรวจยืนยันเชื้อพบ *Clostridium sporogenes* ในน้ำปลาแท้ 3 ตัวอย่าง และน้ำปลาผสม 4 ตัวอย่าง *Clostridium bifermentans* ในน้ำปลาแท้ 2 ตัวอย่าง และน้ำปลาผสม 1 ตัวอย่าง และพบ *Bacillus cereus* group ในน้ำปลาแท้ 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจยืนยันเชื้อแบคทีเรียลักษณะเฉพาะที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำปลา ปี พ.ศ. 2559 และ ปี พ.ศ. 2560

ปี พ.ศ.	ประเภท น้ำปลา	จำนวน ตัวอย่าง ตรวจยืนยัน	จำนวนตัวอย่างตรวจพบเชื้อ			
			<i>C. botulinum</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. bifermentans</i>	<i>B. cereus</i> group
2559	แท้	4	0	0	1	3
	ผสม	1	0	1	0	0
2560	แท้	4	0	3	1	0
	ผสม	4	0	3	1	0
รวม		13	0	7	3	3

วิจารณ์

จากการวิเคราะห์การปนเปื้อนสารพิษโบทูลินัม และ *C. botulinum* ในน้ำปลาแท้และน้ำปลาผสมจำนวนรวม 117 ตัวอย่าง ไม่พบทั้งสารพิษโบทูลินัม และ *C. botulinum* แต่พบ *C. sporogenes* และ *C. bifermentans* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเช่นเดียวกับ *C. botulinum* แตต่างกันที่ *C. sporogenes* และ *C. bifermentans* ตามปกติเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค รวมทั้งตรวจพบ *Bacillus cereus* group ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มนี้เป็นเชื้อที่สามารถสร้างสปอร์ และพบได้ตามธรรมชาติในสิ่งแวดล้อม ดินและแหล่งน้ำเช่นเดียวกับ *C. botulinum*⁽²⁰⁻²¹⁾ การตรวจพบเชื้อเหล่านี้แสดงว่าน้ำปลาที่มีการปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อ จึงมีโอกาที่จะพบการปนเปื้อนสปอร์ของ *C. botulinum* ที่มาจากสิ่งแวดล้อมได้ด้วย แต่หากการผลิตน้ำปลาได้ตามมาตรฐานกำหนด จะมีส่วนผสมของเกลือไม่น้อยกว่า 20% (200 กรัม ต่อน้ำปลา 1 ลิตร) ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *C. botulinum* จะทำให้เชื้อไม่เจริญ จึงไม่สามารถสร้างสารพิษโบทูลินัมได้ อย่างไรก็ตามหากมีการสร้างสารพิษโบทูลินัมในน้ำปลา สารพิษจะถูกทำลายได้โดยการต้มเดือด นานอย่างน้อย 5 นาที (อุณหภูมิภายในอาหารสูงกว่า 85 องศาเซลเซียส)⁽¹⁾ เพราะสารพิษชนิดนี้ไม่ทนความร้อน การต้มเป็นวิธีหนึ่งที่จะสามารถป้องกันการเกิดโรค Botulism ในผู้บริโภคได้ และสอดคล้องกับข้อเสนอของ US FDA ที่ให้ผู้ผลิตต้มน้ำปลาก่อนนำไปจำหน่ายในประเทศสหรัฐอเมริกา

สรุป

จากข้อมูลการสำรวจที่ไม่พบสารพิษโบทูลินัม และ *C. botulinum* ในน้ำปลา ทำให้ผู้บริโภคมั่นใจว่าน้ำปลาไทยปลอดจากสารพิษที่มีอันตรายร้ายแรง อย่างไรก็ตามผู้ประกอบการผลิตน้ำปลาควรเคร่งครัดในการปฏิบัติตามกฎหมายอาหารของไทย และจำหน่ายน้ำปลาที่มีคุณภาพได้มาตรฐาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณเกลือในน้ำปลาต้องไม่น้อยกว่า 20% เพื่อยับยั้งการเจริญของ *C. botulinum* ได้อย่างสมบูรณ์ ข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์นี้เป็นส่วนหนึ่งของข้อมูลสนับสนุนในการเจรจการค้าระหว่างประเทศ เพื่อต่อการส่งออกน้ำปลาไทยไปยังสหรัฐอเมริกา เพื่อช่วยรักษาและเพิ่มศักยภาพการแข่งขันของตลาดน้ำปลาไทยในต่างประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวจรรวณ ลัมสัจจะสกุล รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่เป็นผู้ผลักดันให้เกิดงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สารมาตรฐานและตรวจยืนยันเชื้อ และเจ้าหน้าที่ฝ่ายอาหาร กลุ่มจุลชีววิทยา ที่ช่วยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและเตรียมตัวอย่างในการตรวจวิเคราะห์ และขอขอบคุณนางสาวณัฐกานต์ ดิยติวาพร นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ ที่ช่วยสืบค้นเอกสารอ้างอิง และนายกรกช พรหมจันทร์ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ ที่ช่วยทวนสอบเอกสาร และทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Botulism. [Online]. 2018; [cited 2018 Aug 12]; [7 screens]. Available from: URL: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/botulism>.
2. FDA/CFSAN – BAM. Chapter 17: *Clostridium botulinum*. [Online]. 2001; [cited 2018 Aug 12]; [7 screens]. Available from: URL: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/fda-bam-chap17.pdf>.
3. Chapter 13: *Clostridium botulinum* toxin formation. In: Barry L, editor. Fish and fishery products hazards and controls guidance. 4th ed. [Online]. 2011; [cited 2018 Aug 10]; [48 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM252416.pdf>.
4. Tanasugarn L. *Clostridium botulinum* in the Gulf of Thailand. Appl Environ Microbiol 1979; 37(2): 194–7.
5. Haq I, Sakaguchi G. Prevalence of *Clostridium botulinum* in fishes from markets in Osaka. Jpn J Med Sci Biol. 1980; 33(1): 1–6.
6. ปรีชา จิงสมานกุล, ลดาวัลย์ จิงสมานกุล. เชื้อโรคทางเดินอาหาร. ใน: มยุรา กุสุมภ์, สุนันท์ จำรูญ, บรรณาธิการ. การตรวจวินิจฉัยโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจาก *Clostridium botulinum* ในห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: อรุณการพิมพ์; 2549. หน้า 7–13.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National botulism surveillance summary 2016. [online]. 2017; [cited 2018 Aug 10]; [10 screens]. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/botulism/pdf/Botulism-2016-SUMMARY-508.pdf>.
8. พงศ์เทพ วงศ์วัชรไพบูลย์. รายงานเบื้องต้น: การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ Botulism ที่สงสัยปนเปื้อนในหน่อไม้ดองปี. รายงานการเฝ้าระวังโรคประจำสัปดาห์ 2541; 29(192): 269–70.
9. กู้ศักดิ์ บำรุงเสนา. รายงานการสอบสวนโรคเบื้องต้นอาหารเป็นพิษ Botulism จากหน่อไม้ปู้ป จังหวัดน่าน 2549. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2549; 37(12): 201–3.
10. ไพรินทร์ บุตรกระจำง. สาเหตุการป่วยและการตายหลังบริโภคหน่อไม้ดองในอำเภอสบปราบ จังหวัดลำปาง ปี พ.ศ. 2546. [ออนไลน์]. 2546; [สืบค้น 10 ส.ค. 2561]; [13 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://dmisc2.dmisc.moph.go.th/ChiangMai/Clostridium%20%20botulinum.doc>.
11. อุบลรัตน์ นฤพนธ์จิรกุล, อัสตง วรรณจักร. รายงานการสอบสวนโรคเบื้องต้นอาหารเป็นพิษ สงสัยจากโรคโบทูลิซึม จังหวัดพะเยา, มิถุนายน 2549. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2549; 37(29): 513–6.

12. MGR Online. ชาวบ้านสามหมอกได้รับสารพิษ “โบทูลินัม” หวิดดับยกครัว/แพทย์เตือนกินอาหารถูกสัญลักษณ์หัวน้เชื้อปนเปื้อน. [ออนไลน์]. 2550; [สืบค้น 10 ส.ค. 2561]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://mgronline.com/local/detail/9500000071129>.
13. นิพนธ์ ชินานนท์เวช, ศิริพร วัชรการ, สุวิมล พลวรรณ, ณรัชต์พงศ์ ตุงคะมณี, นิพนธ์ สุ่มดีบ, ชัยมงคล คัมภีรานนท์. การสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษโบทูลิซึมจากหมุยอ อำเภोजेलิมพระเกียรติ จังหวัดสระบุรี เดือนพฤษภาคม 2553. รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2554; 42(1): 1-6.
14. หิรัญวุฒิ แพร่คุณธรรม, มานิตา พรณวดี, สุชาดา ทรัพย์สุนทร, คมกริช ไกรเกริกเกียรติ, นาฏสุดา ตันวัฒนกุล, เจลินพล เจนวิทยา และคณะ. การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษโบทูลิซึม ในหมู่บ้านพะไซโหล อำเภोजังหวัดแม่ฮ่องสอน เดือนธันวาคม 2553. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2555; 43(3): 33-40.
15. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การปนเปื้อนของแบคทีเรีย *Clostridium botulinum* ในผลิตภัณฑ์นมจากประเทศนิวซีแลนด์. [ออนไลน์]. 2556; [สืบค้น 10 ส.ค. 2561]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: [http://e-library.dmsc.moph.go.th/ebooks/files/showimgpic%20\(1\).pdf](http://e-library.dmsc.moph.go.th/ebooks/files/showimgpic%20(1).pdf).
16. กรรณิการ์ หมอนพั้งเทียม, พรเอื้อ บุญยไพศาลเจริญ, หัทยา กาญจนสมบัติ, สุกัญญา อภัย, วีระพล ความหมั่น, วัชรวิทย์ ทองอ่อน, และคณะ. การระบาดของโรคโบทูลิซึมสาเหตุจากหน่อไม้ต้มบรรจุถุงพลาสติก อำเภोजังหวัดชัยภูมิ และอำเภोजังหวัดลพบุรี เดือนเมษายน 2557. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2558; 45(51): 801-9.
17. อรรพรรณ คงพันธุ์. การผลิตน้ำปลาด้วยวิธีการหมักแบบธรรมชาติ. กรุงเทพฯ: กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2553.
18. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 203 (พ.ศ. 2543) เรื่อง น้ำปลา. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 118 ตอนพิเศษ 6 ง. (วันที่ 24 มกราคม 2544).
19. กนกพรรณ ศรีมโนภาส, เรณูภา นิธิบุญยบดี, วชิร คร้ามวอน. ศึกษาการปนเปื้อนของคลอสตริเดียม โบทูลินัม และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในกระบวนการผลิตน้ำปลา. [ออนไลน์]. 2557; [สืบค้น 10 ส.ค. 2561]; [26 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://elib.fisheries.go.th/LIBCAB/DRAWERS/ABS/DATA0001/00001429.PDF>.
20. James R, Dindal A, Willenberg Z, Riggs K. Environmental technology verification report: Tetracore, Inc. anthrax, botulinum toxin, and ricin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). [Online]. 2004; [cited 2018 Aug 10]; [41 screens]. Available from: URL: https://archive.epa.gov/nrmrl/archive-etv/web/pdf/01_vr_elisa.pdf.
21. สมณฑา วัฒนสินธุ์. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2545. หน้า 154-156.
22. Dennis L, Amy EB, Karen C. Clostridium. In: James HJ, Michael AP, editors. Manual of clinical microbiology Volume 1. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p.940-966.

Determination of *Clostridium botulinum* and Botulinum Toxin Contamination in Thai Fish Sauce

Duangdao Wongsommart Sompob Vattanamanee Pattama Daengchart Kanokpan
Somyoonsup Sasithorn Titipetkul and Sudarat Srinoimueang

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road,
Nonthaburi 11000, Thailand.

Abstract In 2014, the United States banned the import of certain brands of fish sauce from Thailand due to lack of laboratory tests on botulinum toxin. This has an impact on the market share of Thai fish sauce in the US. The objective of this study was to ensure the safety to the consumers and to fulfil the requirements for exporting Thai fish sauce to the US. A total of 117 samples collected during 2016–2017 were investigated. The contaminations of *Clostridium botulinum* and botulinum toxin types A, B, E and F were detected using media culture and ELISA techniques, respectively. All samples were free from *Clostridium botulinum* bacteria and its toxin. However, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium bifermentans* and *Bacillus cereus* were present in 7, 3 and 3 samples, respectively. The results indicated that Thai fish sauces were safe for human consumption and can be used to reassure the product quality of Thai fish sauce exports to the US.

Keywords: Thai fish sauce, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin