**[ร่าง] ตัวอย่าง** ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับความหมาะสมของวิธีทดสอบการวิเคราะห์หา *Clostridium spp.* ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

**[Draft]** **Example** Method suitability test for Tests for Specified-micro-organism: *Clostridium spp.* in Herbal Products

**Disclaimers:** เอกสารฉบับที่ใช้เพื่อเป็นตัวอย่างเอกสารอ้างอิง ในการจัดเตรียมเอกสารประกอบการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สมุนไพรเท่านั้น ไม่สามารถใช้ทดแทนเอกสารระบบคุณภาพและไม่รวมถึงการรับรองอื่นๆ

This document is intended for usage as a guidance reference for herbal products registration only. This document cannot replace quality management system document and other certify processes.

Contents

[General considerations 3](#_Toc175743382)

[[English] Analytical Procedure for Tests for Specified-micro-organism: *Escherichia coli* in Herbal Products 4](#_Toc175743383)

[1. Purpose 4](#_Toc175743384)

[2. Scope 4](#_Toc175743385)

[3. Responsibilities 4](#_Toc175743386)

[4. Materials and Equipment 4](#_Toc175743387)

[5. Procedure 6](#_Toc175743388)

[6. Calculations 10](#_Toc175743389)

[7. Acceptance Criteria 10](#_Toc175743390)

[8. Reporting 10](#_Toc175743391)

[9. References 10](#_Toc175743392)

[10. Revision History 10](#_Toc175743393)

[[ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญเติบโตโดยใช้ออกซิเจน (TAMC) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร 11](#_Toc175743394)

[**1.** ***วัตถุประสงค์*** 11](#_Toc175743395)

[**2.** ***ขอบเขต*** 11](#_Toc175743396)

[**3.** ***ความรับผิดชอบ*** 11](#_Toc175743397)

[**4.** ***วัสดุและอุปกรณ์*** 11](#_Toc175743398)

[**5.** ***ขั้นตอนการปฏิบัติ*** 13](#_Toc175743399)

[**6.** ***การคำนวณ*** 17](#_Toc175743400)

[**7.** ***เกณฑ์การยอมรับ*** 17](#_Toc175743401)

[**8.** ***การรายงานผล*** 17](#_Toc175743402)

[**9.** ***เอกสารอ้างอิง*** 17](#_Toc175743403)

[**10.** ***ประวัติการแก้ไข*** 17](#_Toc175743404)

# General considerations

**[EN]**

1. This document was intended present in 2-language options including: English – Thai. Users can choose one language as example for document preparation in herbal registration processes.
2. This document is not covered: Growth promotion test of culture media, preservative effectiveness test and other sample preparation techniques which **should be appropriately researched and developed before commencing suitability of test method intended to establish test method parameters**.
3. This document is not covered: Manufacturing/Quality control testing sites certify processes or any others quality management system certify processes.
4. Anaerobic condition in this document may achieve using anaerobic jar/chamber or liquid paraffin overlayed based on suitability test
5. This document is not covered: Preservation and removal of culture stock from the storage system and other seeds train/bank including establishment of reference strains

**[TH]**

1. เอกสารฉบับนี้จัดเตรียมขึ้นเป็น 2 ภาษา ไทย - อังกฤษ สามารถเลือกใช้ภาษาใดภาษาหนึ่งเป็นตัวอย่างในการอ้างอิงเพื่อจัดเตรียมเอกสาร ประกอบการพิจารณาขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สมุนไพร
2. เอกสารฉบับนี้ ไม่ครอบคลุมถึง Growth promotion test of culture media, suitability of microbial enumeration method, preservative effectiveness test รวมถึง technique ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมของแต่ละประเภทลักษณะผลิตภัณฑ์ ซึ่งรายละเอียดของแต่ละผลิตภัณฑ์จะต้องผ่านการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม
3. เอกสารฉบับนี้ ไม่ครอบคลุมการรับรองมาตรฐานสถานที่ผลิต และมาตรฐานสถานที่ทดสอบด้านจุลชีววิทยา และไม่รวมถึงการรับรองระบบคุณภาพอื่นๆ

### [English] Method suitability test for Tests for Specified-micro-organism: *Escherichia coli* in Herbal Products

#### Purpose

To establish test parameters for the test method of test for the presence of *Clostridium* spp. in herbal finished products by pour plating technique according to … [Reference].

#### Scope

This procedure applies to test method number: […provide internal reference number] for physical address of: […Quality control testing site address]

#### Responsibilities

* 1. Quality Control personnel
  2. Microbiology laboratory staff

#### Materials and Equipment

* 1. Sterile diluent - [e.g., peptone saline buffer, phosphate buffer...] \*
     1. [provide name and list of ingredients diluent]
     2. …

\* Diluent according to Thai herbal pharmacopeia appendix 10.2 under stock buffer solution section

* 1. Culture medium
     1. **Reinforced Clostridial Medium (RCM)**

Formula:

* Beef Extract 10.0 g
* Peptone 10.0 g
* Yeast Extract 3.0 g
* Soluble Starch 1.0 g
* Dextrose Monohydrate 5.0 g
* Cysteine Hydrochloride 0.5 g
* Sodium Chloride 5.0 g
* Sodium Acetate 3.0 g
* Agar 0.5 g
* Water 1000 ml

Hydrate the agar, and dissolve by heating to boiling with continuous stirring.

pH after sterilization: 6.8 ± 0.2

* + 1. **Columbia Agar (CB)**

Formula:

* Pancreatic Digest of Casein 10.0 g
* Peptic Digest of Animal Tissue 5.0 g
* Heart Pancreatic Digest 3.0 g
* Yeast Extract 5.0 g
* Maize Starch 1.0 g
* Sodium Chloride 5.0 g
* Agar, according to gelling power 10 – 15 g
* Water 1,000 ml

Hydrate the agar, and dissolve by heating to boiling with continuous stirring. Sterilize, cool to between 45 ˚C and 50 ˚C and add, where necessary, gentamicin sulfate corresponding to 20mg of gentamicin base. Pour into plates.

pH after sterilization: 7.3 ± 0.2

* + 1. **Defibrinated sheep blood agar (DSB)**

Heat soybean casein digest agar and cool to 45 °C to 50 °C in a water-bath. Add sufficient amount of defrinated sheep blood (5%)

* 1. Petri dishes
  2. [pipettes or automate pipettes]
  3. Incubator (30-35°C)
  4. Autoclave
  5. Biosafety cabinet class II (BSC II)
  6. flask
  7. water bath
  8. Vertex mixers
  9. Test tubes
  10. Bunsen burner
  11. [Sterile loop or other mean of inoculating equipment]
  12. Gram staining solution
  13. Anaerobic jar / Anaerobic chamber
  14. Test micro-organism:
      1. *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (DMST 15536, NCIMB 12343, C.I.P. 100651, NBRC 14293) or ATCC 19404 (DMST 15282, NCTC 532, C.I.P. 79.03)

#### Procedure

* 1. Culture media Preparation
     1. [Weigh …. g of … into …]
     2. [Add … ml of water]
     3. [Autoclave at 121 ˚C for 15 minutes]
     4. ... CB agar plate …
  2. Sample Preparation
     1. Weigh … g of the herbal product aseptically
     2. Add … mL of diluent (to yield 1:10 dilution, 10^-1)
     3. [Transfer reference strain suspension of not more than 100 CFU with volume not exceed 1%]
     4. [Mix the sample well with …]
     5. Repeat step 5.2.1 to 5.2.4, while replace reference strain (remarked as: positive product control, negative control) and without product (remarked as positive control)
  3. Heat treatment and enrichment
     1. Transfer … (g/ml) sample from step 5.2.3 into [suitable test tube] containing … ml of Reinforced Clostridial Medium (RCM).
     2. Transfer another … (g/ml) sample from step 5.2.3 into [suitable test tube] containing … ml of Reinforced Clostridial Medium (RCM). Heat mixture at 80 ˚C for 10 minutes and cooling rapidly. **(Do not heat portion in step 5.3.1)**
     3. [Mix the sample well with …]
     4. Incubate the tubes at 30-35 ˚C for 48 hours under anaerobic condition.
  4. Selective agar streak plate
     1. [Mix the sample from 5.3 after incubation completed well with …]
     2. Streak on surface of Columbia Agar (CB) plate for each portion.
     3. Incubate the plate in 30-35 ˚C for 48 hours under anaerobic condition.
  5. Examination
     1. If no growth occurs, the product passes the test for absence of *Clostridium spp.* Else, proceed to the next step;
     2. Subculture colony growth onto surface of 2 Columbia Agar (CB) plates.
     3. Incubate 1 plates in 30-35 ˚C for 48 hours under **anaerobic condition** and another in 30-35 ˚C for 48 hours under **aerobic condition.**
     4. Re-examination the colony growth on **anaerobic condition**. Perform gram staining of the suspect colony, if the colony is Gram (+) bacilli; then proceed to the next step.
  6. Identification
     1. Subculture of the suspect colony by transfer a loopful of individual colony onto surface of Defibrated sheep blood agar
     2. Observe colony growth on Defibrated sheep blood agar, if any extent of hemolysis observed and other description including gram staining match the following table,

| **Selective species** | **Colonies** | **Hemolysis** | **Spore (staining)** |
| --- | --- | --- | --- |
| *Clostridium botulinum* | Irregular, translucent with a granular surface and indefinited fimbriated spreading edge. | + | Oval, central, subterminal distend bacilli |
| *Clostridium perfringens* | Large, circular, convex, semitranslucent, smooth with an entire edged. | Double zone | Oval and subterminal (very rare) |
| *Clostridium tetani* | Transparent with long feathery spreading projections. | + | Spherical and terminal (drumstick) |

then the result may preclude presence (Positive) of *Clostridium spp.* Further suitable biochemical and biological tests may be performed for confirmatory on the presence of clostridium of *Clostridium spp.* in the product.

...ml diluent, homogenized sample

… ml or amount corresponding   
to 1 g or 1ml of sample

RCM

... g or ... ml

Sample

Columbia (CB) agar   
(+/- sheep blood, gentamicin)

RCM

Heat treatment  
80 ˚C, 10 minutes

Incubate at  
30-35 ˚C, 48 h

Incubate at  
30-35 ˚C, 48 h

Positive control  
culture

Negative control  
buffer solution

Enriched

Enriched

**Unless otherwise specified, the protocol should be followed under strict anaerobic conditions.**

Incubate at 30-35 ˚C, 48 h  
under anaerobic conditions

Incubate at 30-35 ˚C, 48 h  
under anaerobic conditions

Incubate at 30-35 ˚C, 48 h  
under **aerobic conditions**

Incubate at 30-35 ˚C, 48 h  
under **aerobic conditions**

**Observe growth colonies and interpret results**

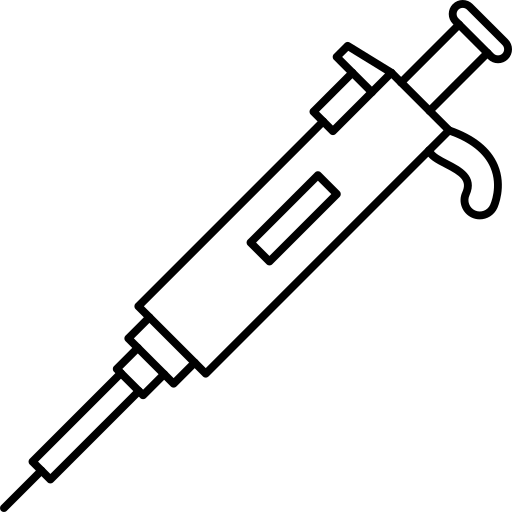
**Colonies Growth found and match description including gram staining: Gram (+) bacilli**

**No growth**

Presence of *Clostridium spp.* (positive)

Absence of *Clostridium spp.* (negative)

Spike NMT 100 CFU of reference strains



#### Calculations

-

#### Acceptance Criteria

#### Positive product control spiked with *Clostridium sporogenes* as specified in section 4.16 should be positive.

#### Positive control spiked with *Clostridium sporogenes* as specified in section 4.16 should be positive.

#### Negative control should be negative.

#### Reporting

[Record results in the designated company management system]

Report for Absence(negative) or Presence(positive) in … gram or … ml of sample.

In case of suspected colonies found, result of identification should be recorded.

#### References

* 1. British Pharmacopoeia 2021, Appendix XVI B. Microbiological Examination of Non-sterile Products
  2. Ph. Eur. 2.6.12 Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Microbial Enumeration Tests
  3. Thai Herbal Pharmacopeia 2021 supplement 2023 - Appendix 10.2

#### Revision History

#### Revision 3: Established suitability based on conditions and test parameters of analytical procedure reference number…

#### Revision 2.1

#### Added general consideration of anaerobic condition

#### Generally removed ‘sterile’ from equipment as known for general practice

#### Generally replaced ‘sterile diluent’ with ‘diluent’ based on suitability test

#### Removed stomacher from equipment as only optional for procedure common in non-homogenize sample

#### Replaced biosafety cabinet with Biosafety cabinet class II (BSC II)

#### Replaced Sterile pipettes with optional automate pipettes

#### Added pre-specified amount of defrinated sheep blood in DSB

#### Added pre-specified amount of defrinated sheep blood in DSB

#### Removed pre-specified amount of herbal product sample and leave as optional based on suitability test

#### Replaced homogenize steps with well mixed

#### Replaced 250-ml duran bottle in test procedure with test tubes based on suitability test [**Important note:** the height of RCM medium to surface should be sufficient to exhibit anaerobic condition]

### [ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญเติบโตโดยใช้ออกซิเจน (TAMC) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

#### ***วัตถุประสงค์***

เพื่อการวิเคราะห์หา Clostridium spp. ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำเร็จรูป ตาม ... [Reference]

#### ***ขอบเขต***

ขั้นตอนนี้ใช้กับผลิตภัณฑ์สมุนไพร [ชื่อผลิตภัณฑ์, รูปแบบ] ทั้งหมดที่ผลิตหรือแปรรูปใน [สถานที่ผลิต]

#### ***ความรับผิดชอบ***

* 1. บุคลากรฝ่ายควบคุมคุณภาพ
  2. เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

#### ***วัสดุและอุปกรณ์***

* 1. สารละลายเจือจางที่ปราศจากเชื้อ - [เช่น น้ำเปปโตน, บัฟเฟอร์ฟอสเฟต]
  2. [แสดง ชื่อและสูตรส่วนประกอบของแต่ละสารเจือจางที่ใช้]
  3. ...
  4. อาหารเลี้ยงเชื้อ
     1. Reinforced Clostridial Medium (RCM)

สูตรและส่วนประกอบ:

* Beef Extract 10.0 กรัม
* Peptone 10.0 กรัม
* Yeast Extract 3.0 กรัม
* Soluble Starch 1.0 กรัม
* Dextrose Monohydrate 5.0 กรัม
* Cysteine Hydrochloride 0.5 กรัม
* Sodium Chloride 5.0 กรัม
* Sodium Acetate 3.0 กรัม
* Agar 0.5 กรัม
* Water 1000 มิลลิลิตร
  1. เติมน้ำใส่ agar จากนั้นละลาย agar โดยการให้ความร้อนจนเดือดพร้อมคนอย่างต่อเนื่อง และให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากขั้นตอนการทำปราศจากเชื้ออยู่ที่ 6.8 ± 0.2
     1. Columbia Agar (CB)

สูตรและส่วนประกอบ:

* Pancreatic Digest of Casein 10.0 กรัม
* Peptic Digest of Animal Tissue 5.0 กรัม
* Heart Pancreatic Digest 3.0 กรัม
* Yeast Extract 5.0 กรัม
* Maize Starch 1.0 กรัม
* Sodium Chloride 5.0 กรัม
* Agar, according to gelling power 10.0 – 15.0 กรัม
* Water 1,000 มิลลิลิตร

เติมน้ำใส่ agar จากนั้นละลาย agar โดยการให้ความร้อนจนเดือดพร้อมคนอย่างต่อเนื่อง จากนั้นนำไปทำการปราศจากเชื้อ และปล่อยให้เย็นโดยที่ให้อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 45-50 องศาเซลเซียส และเติม gentamicin sulfate ซึ่งเทียบเท่ากับ gentamicin base 20 มิลลิกรัมเมื่อจำเป็น หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงลงจานเพาะเชื้อ โดยให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากขั้นตอนการทำปราศจากเชื้ออยู่ที่ 7.3 ± 0.2

* + 1. Defibrinated sheep blood agar (DSB)

ให้ความร้อนแก่ soybean casein digest agar และปล่อยให้เย็นโดยที่ให้อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 45-50 องศาเซลเซียสใน water-bath หลังจากนั้นเติม defibrinated sheep blood ปริมาณหนึ่งเพื่อให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 5 แล้วผสมให้เข้ากัน

* 1. จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
  2. ปิเปตที่ปราศจากเชื้อ
  3. ตู้บ่มเชื้อ (30-35°C)
  4. เครื่องบดผสมหรือเครื่องปั่นปราศจากเชื้อ
  5. Autoclave
  6. ตู้ปลอดเชื้อ Biosafety cabinet
  7. ฟลาสก์ปราศจากเชื้อ
  8. Water bath
  9. Vertex mixers
  10. ขวดดูแรนปราศจากเชื้อปริมาตร 250 มล.
  11. ตะเกียงบุนเสน
  12. ลูปเขี่ยเชื้อ
  13. สีย้อมแกรม
  14. ชุดบ่มเพาะเชื้อชนิดไม่มีอากาศ

#### ***ขั้นตอนการปฏิบัติ***

* 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเจือจางที่ปราศจากเชื้อ
     1. [ ชั่ง…..... g ลงในขวดดูแรนปราศจากเชื้อ]
     2. [ เติมสารเจือจาง … ml]
     3. [ นำเข้าเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ˚C เวลา 15 นาที]
     4. ... CB agar plate …
  2. การเตรียมตัวอย่าง
     1. ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร … กรัม อย่างปราศจากเชื้อ
     2. เติมสารละลายเปปโทนเจือจางที่ปราศจากเชื้อ … มิลลิลิตร (เพื่อเตรียมเป็น 1:10 dilution)
     3. ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยทำให้เกิดฟองอากาศน้อยที่สุด
  3. การให้ความร้อนและการเพิ่มจำนวนเชื้อ
     1. ย้ายตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันจำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี Reinforced Clostridial Medium (RCM) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยทำสองซ้ำ
     2. นำส่วนผสมในขวดดูแรนจากขั้นที่ 5.3.1 หนึ่งขวดมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว ส่วนขวดดูแรนอีกขวดไม่ต้องให้ความร้อน
     3. นำทั้งสองขวดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ
     4. ใช้ตัวอย่างที่บดผสมแล้ว … มิลลิลิตร และสารละลายเจือจางที่ปราศจากเชื้อ … มิลลิลิตร   
        สำหรับแต่ละ ความเจือจาง
  4. การเพาะเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
     1. หลังจากบ่มในขั้นที่ 5.3 เสร็จสิ้น นำส่วนผสมจากแต่ละขวดมาทำการขีดเชื้อ (streak) บนผิวของจานเพาะเชื้อที่มี Columbia Agar (CB) ซึ่งมีการเติม gentamicin แล้ว
     2. นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 ˚C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศอากาศ
  5. การตรวจสอบ
     1. หากไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ แสดงว่าผ่านการทดสอบในหัวข้อการวิเคราะห์หาเชื้อ Clostridium spp. แล้ว หากพบการเจริญ ให้ผู้ทำการทดสอบดำเนินการในขั้นตอนต่อไป
     2. หากพบการเจริญเติบโตของเชื้อให้ทำการเพาะเชื้อ (subculture) จากโคโลนีที่เกิดขึ้น ลงบนพื้นผิวของจานเพาะเชื้อ Columbia Agar (CB) จำนวน 2 จานที่โดยไม่มีการเติม gentamicin
     3. บ่มจานเพาะเชื้อ 1 จานจานแรกที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมงภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ และอีกจานให้บ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีอากาศ
     4. ทำการตรวจสอบอีกครั้งเมื่อมีโคโลนีเกิดขึ้นในสภาวะไม่มีอากาศ โดยทำการย้อมแกรม หากโคโลนีที่เกิดขึ้นเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ให้ดำเนินการในขั้นตอนต่อไป
  6. การทดสอบเอกลักษณ์
     1. เพาะเลี้ยงเชื้อจากโคโลนีที่สงสัย โดยย้ายโคโลนีแต่ละโคโลนีแบบเต็มลูป (loopful) ไปยังพื้นผิวของจานเพาะเชื้อ Defibrinated sheep blood agar
     2. สังเกตการเจริญเติบโตของโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ Defibrinated sheep blood agar หากพบขอบเขตจากการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง ประกอบลักษณะอื่น ๆ การย้อมแกรม โดยเทียบผลดังตาราง

| **สกุลของเชื้อที่ได้รับการคัดเลือก** | **ลักษณะโคโลนี** | **การแตกของเม็ดเลือดแดง** | **การย้อมสปอร์** |
| --- | --- | --- | --- |
| *Clostridium botulinum* | โคโลนีไม่สม่ำเสมอ โปร่งแสง พื้นผิวเป็นเม็ดเล็กๆ และมีขอบที่กระจายอย่างไม่ชัดเจน | + | สปอร์รูปไข่ รี อยู่ตำแหน่งกึ่งกลางหรือใกล้ปลายเซลล์ |
| *Clostridium perfringens* | โคโลนีใหญ่ รูปร่างกลม นูน โปร่งแสงเล็กน้อย พื้นผิวเรียบ และมีขอบเรียบ | Double zone | สปอร์รูปไข่ อยู่ตำแหน่งใกล้ปลายเซลล์ (พบได้น้อย) |
| *Clostridium tetani* | โคโลนีมีลักษณะโปร่งแสง และมีลักษณะคล้ายขนนกที่แผ่ออกไป | + | สปอร์ทรงกลม อยู่ตำแหน่งปลายเซลล์ (drumstick) |

จากผลลัพธ์ที่ได้ อาจแสดงว่ามีการพบเชื้อ *Clostridium spp.* (ผลบวก) ควรมีการทดสอบทางชีวเคมีและชีววิทยาที่เหมาะสมเพิ่มเติมเพื่อยืนยันการมีอยู่ของเชื้อ *Clostridium spp.* ในผลิตภัณฑ์

45ml Peptone, homogenized sample

10 ml or amount corresponding   
to 1 g or 1ml of sample

RCM

5 g or 5 ml

Sample

Columbia (CB) agar   
(+/- sheep blood, gentamicin)

RCM

Heat treatment  
80 ˚C, 10 minutes

Incubate at  
30-35 ˚C, 48 h

Incubate at  
30-35 ˚C, 48 h

Positive control  
culture

Negative control  
buffer solution

Enriched

Enriched

**Unless otherwise specified, the protocol should be followed under strict anaerobic conditions.**

Incubate at 30-35 ˚C, 48 h  
under anaerobic conditions

Incubate at 30-35 ˚C, 48 h  
under anaerobic conditions

Incubate at 30-35 ˚C, 48 h  
under **aerobic conditions**

Incubate at 30-35 ˚C, 48 h  
under **aerobic conditions**

**Observe growth colonies and interpret results**

**Colonies Growth found and match description including gram staining: Gram (+) bacilli**

**No growth**

Presence of *Clostridium spp.* (positive)

Absence of *Clostridium spp.* (negative)

#### ***การคำนวณ***

-

#### ***เกณฑ์การยอมรับ***

ไม่พบเชื้อ (ให้ผลลบ) ในตัวอย่าง …กรัม หรือ …มิลลิลิตร   
[ระบุขีดจำกัดที่ยอมรับได้ตามข้อกำหนดเฉพาะของผลิตภัณฑ์]

#### ***การรายงานผล***

[บันทึกผลลงในระบบคุณภาพของบริษัท]

บันทึกผลเป็นไม่พบเชื้อ (ให้ผลลบ) หรือ พบเชื้อ (ให้ผลบวก) ในตัวอย่าง …กรัม หรือ …มิลลิลิตร

ในกรณีที่พบโคโลนีที่น่าสงสัย ควรทำการบันทึกผลการวิเคราะห์ระบุเชื้อ

#### ***เอกสารอ้างอิง***

* 1. British Pharmacopoeia, Appendix XVI B. Microbiological Examination of Non-sterile Products,
  2. Ph. Eur. 2.6.12 การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อ: การทดสอบการนับจำนวนจุลินทรีย์
  3. ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ปี 2021 supplement 2023 – Appendix 10

#### ***ประวัติการแก้ไข***

[บันทึกประวัติการแก้ไขของ Analytical procedure นี้]