**[ร่าง] ตัวอย่าง** ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับความหมาะสมของวิธีทดสอบการวิเคราะห์หา *Escherichia coli* ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

**[Draft]** **Example** Method suitability test Tests for Specified-micro-organism: *Escherichia coli* 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](#_Toc175745247)

[[English] Analytical Procedure for Tests for Specified-micro-organism: *Escherichia coli* in Herbal Products 4](#_Toc175745248)

[1. Purpose 4](#_Toc175745249)

[2. Scope 4](#_Toc175745250)

[3. Responsibilities 4](#_Toc175745251)

[4. Materials and Equipment 4](#_Toc175745252)

[5. Procedure 6](#_Toc175745253)

[6. Calculations 9](#_Toc175745254)

[7. Acceptance Criteria 9](#_Toc175745255)

[8. Reporting 9](#_Toc175745256)

[9. References 10](#_Toc175745257)

[10. Revision History 10](#_Toc175745258)

[[ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการวิเคราะห์เชื้อเอสเชอริเชีย โคไล [*Escherichia coli*]ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร 11](#_Toc175745259)

[**1.** ***วัตถุประสงค์*** 11](#_Toc175745260)

[**2.** ***ขอบเขต*** 11](#_Toc175745261)

[**3.** ***ความรับผิดชอบ*** 11](#_Toc175745262)

[**4.** ***วัสดุและอุปกรณ์*** 11](#_Toc175745263)

[**5.** ***ขั้นตอนการปฏิบัติ*** 13](#_Toc175745264)

[**6.** ***การคำนวณ*** 15](#_Toc175745265)

[**7.** ***เกณฑ์การยอมรับ*** 16](#_Toc175745266)

[**8.** ***การรายงานผล*** 16](#_Toc175745267)

[**9.** ***เอกสารอ้างอิง*** 16](#_Toc175745268)

[**10.** ***ประวัติการแก้ไข*** 16](#_Toc175745269)

# 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. 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 Specified-micro-organism: *Escherichia coli* in Herbal Products

#### Purpose

To establish test parameters for the test method of test for Specified-micro-organism: *Escherichia coli* in Herbal Products 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. 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. Soybean-Casein Digest Broth (TSB) or [TAT]

Formula:

* Pancreatic Digest of Casein 17.0 g
* Papaic Digest of Soybean Meal 3.0 g
* Sodium Chloride 5.0 g
* Dipotassium hydrogenphosphate 2.5 g
* Dextrose Monohydrate 2.5 g
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

pH after sterilization: 7.3 ± 0.2

* + 1. MacConkey Broth (MB)

Formula:

* Pancreatic digest of gelatin 20.00 g
* Lactose 10.00 g
* Dehydrated ox bile 5.00 g
* Bromocresol purple 10.00 mg
* Deionized (DI Water) 1,000 ml

pH after sterilization: 7.3 ± 0.2

* + 1. MacConkey Agar (MA)

Formula:

* Pancreatic Digest of Gelatin 17.00 g
* Pancreatic Digest of Casein 1.50 g
* Peptic Digest of Animal Tissue 1.50 g
* Lactose 10.00 g
* Bile Salts mixture 1.50 g
* Sodium Chloride 5.00 g
* Agar 13.50 g
* Neutral Red 30.0 g
* Crystal Violet 1.0 mg
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

pH after sterilization: 7.1 ± 0.2

* + 1. Levine Eosin-Methylene Blue Agar

Formula:

* Pancreatic Digest of Gelatin 10.0 g
* Dipotassium Hydrogen phosphate 2.0 g
* Agar 15.0 g
* Lactose 10.0 g
* Eosin Y 0.04 g
* Methylene Blue 0.065 g
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

pH after sterilization 7.1 ± 0.2

* 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. Duran bottles 250 ml
  10. Bunsen burner
  11. [Sterile loop or other mean of inoculating equipment]
  12. Gram staining solution
  13. Test micro-organism:
      1. *[Escherichia coli* ATCC 8739, DMST 15537, NCIMB 8545, C.I.P. 53.126 or NBRC*]:* [passage count/seed reference number]
      2. [*Staphylococcus aureus* ATCC 6538]: [passage count/seed reference number]

#### Procedure

* 1. Culture media Preparation
     1. [Weigh …. g of … into …]
     2. [Add … ml of water]
     3. ... MacConkey agar plate …
  2. Sample Preparation and enrichment
     1. Weigh … g of the herbal product aseptically
     2. Add … mL of suitable 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. Transfer … ml of mixture corresponding to 1 g or 1 ml of original sample from step 5.2.3 to inoculate … TSB\*

\* Suitable amount according to suitability test of the method generally 1 in 10 is acceptable.

* + 1. [Mix the sample well with …]
    2. 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. Incubate in 30-35 ˚C for 18 hours
  1. Selective broth subculture
     1. [well mix sample (enriched) with vertex mixer]
     2. Transfer 1 ml of sample with sterile pipette into 250-ml Duran bottle containing 100 ml MacConkey Broth
     3. [Mix the sample well with …]
     4. Incubate the bottle in 42-44 oC for 24 hours
  2. Selective agar streak plate
     1. [well mix sample from 5.3 after incubation completed]
     2. Streak on surface of MacConkey agar plate
     3. Incubate the plate in bottle in 30-35 oC for 18 hours

TSB

1 ml or   
eq. to 1 g of sample

MacConkey broth

1 g or 1 ml

Sample

18 h

30-35 ˚C

24 h

42-44 ˚C

MacConkey agar

30-35 ˚C

18 h

Suspect colonies presence

No colony found

Eosin methylene blue agar (EMB)

Absence (negative)

Gram staining: Gram (-) rods

18 h

30-35 ˚C

Positive colonies morphology characteristic

Presence (positive)

100ml

* 1. Colony observation and Morphological Identification
     1. After incubation, observe colony on plates. If the colonies matching the following description:

|  |
| --- |
| **Characteristic Colonial Morphology:** |
| “Brick-red; may have surrounding zone of precipitated bile” |

Proceed to the next step of gram-staining test.

* + 1. Perform, gram-staining of the positive morphology colonies. If the gram-stain resulting in: Negative rods (cocco-bacilli), then proceed to the next step.
    2. Transfer the suspect colonies individually onto the surface of Levine eosin-methylene blue agar using sterile loop streaking technique.
    3. Incubate the plate in 30-35 oC for 18 hours.
    4. After incubate, carefully examine the plate under transmitted light. If the colony exhibits characteristic as following:

|  |  |
| --- | --- |
| **Light/direction** | **Characteristic Colonial Morphology:** |
| Reflected light on colonies-sided: | Metallic sheen |
| Transmitted light Under colonies sided: | Blue-black |

Then, the product is considered presence (positive) for *Escherichia coli.* The presence of for *Escherichia coli* May be confirmed by suitable cultural and, if necessary, biochemical tests. Further serological test may be performed.

* + 1. Record the results as per section 8.

**Semi-quantitative test**

* 1. Prepare Serial dilution enrichment
     1. Transfer mixture from step 5.2.3. containing successively 0.1 g (or 0.1 ml), 0.01 g (or 0.01 ml), and 0.001 g (or 0.001 ml) of original sample to inoculate … TSB \*

\* Suitable amount according to suitability test of the method generally 1 in 10 is acceptable.

* + 1. [Mix the sample well with …]
    2. Incubate in 30-35 ˚C for 18 hours
  1. Selection enrichment
     1. Shake well the mixture from step 5.6.3
     2. Transfer 1.0 ml of the enrichment culture to 100 ml of MacConkey broth
     3. Shake well the mixture
     4. Incubate the broth bottle at 42-44 ˚C for 24 hours
  2. Selective Subculture
     1. Shake well the mixture from step 5.7.4
     2. Transfer a loopful of mixture from step 5.8.1 onto MacConkey agar plate
     3. Incubate the plates at 30-35 ˚C for 18 hours
  3. Interpret result as following table of most probability number (MPN):

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Results for each quantity of product** | | | Probable Number (PN) of bacteria  per g or ml of product |
| 0.1 g  (or 0.1ml) | 0.01 g  (or 0.01ml) | 0.001 g  (or 0.001ml) |
| + | + | + | More than 103 |
| + | + | - | Less than 103 and more than 102 |
| + | - | - | Less than 102 and more than 10 |
| - | - | - | Less than 10 |

* 1. Record the result as prescribed in section 8.

#### Calculations

-

#### Acceptance Criteria

* 1. Positive product control spiked with *E. coli* as specified in section 4.15 should be positive.
  2. Positive control spiked with *E. coli* as specified in section 4.15 should be positive.
  3. Negative control spiked with S. aureus should be negative.
  4. Negative control with diluent 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

#### Revision History

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

#### Revision 2.1

#### Generally removed ‘sterile’ from equipment as for general acknowledged.

#### 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 missing step of enrichment in TSB before subculture.

#### Fixed erroneously mentioned inoculum volume in selective broth.

#### Added new section of semi-quantitative testing.

### [ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการวิเคราะห์เชื้อเอสเชอริเชีย โคไล [*Escherichia coli*]ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

#### ***วัตถุประสงค์***

เพื่อการวิเคราะห์จำนวนเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำเร็จรูป ตาม ... [Reference]

#### ***ขอบเขต***

ขั้นตอนนี้ใช้กับผลิตภัณฑ์สมุนไพร [ชื่อผลิตภัณฑ์, รูปแบบ] ทั้งหมดที่ผลิตหรือแปรรูปใน [สถานที่ผลิต]

#### ***ความรับผิดชอบ***

* 1. บุคลากรฝ่ายควบคุมคุณภาพ
  2. เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

#### ***วัสดุและอุปกรณ์***

* 1. สารละลายเจือจางที่ปราศจากเชื้อ - [เช่น น้ำเปปโตน, บัฟเฟอร์ฟอสเฟต]
     1. [แสดง ชื่อและสูตรส่วนประกอบของแต่ละ diluent ที่ใช้]
     2. ...
  2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose Agar (SDA)
     1. Soybean-Casein Digest Broth (TSB)

Formula:

* Pancreatic Digest of Casein 17.0 g
* Papaic Digest of Soybean Meal 3.0 g
* Sodium Chloride 5.0 g
* Dipotassium hydrogenphosphate 2.5 g
* Dextrose Monohydrate 2.5 g
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

pH after sterilization: 7.3 ± 0.2

* + 1. MacConkey Broth (MB)

Formula:

* Pancreatic digest of gelatin 20.00 g
* Lactose 10.00 g
* Dehydrated ox bile 5.00 g
* Bromocresol purple 10.00 mg
* Deionized (DI Water) 1,000 ml

pH after sterilization: 7.3 ± 0.2

* + 1. MacConkey Agar (MA)

Formula:

* Pancreatic Digest of Gelatin 17.00 g
* Pancreatic Digest of Casein 1.50 g
* Peptic Digest of Animal Tissue 1.50 g
* Lactose 10.00 g
* Bile Salts mixture 1.50 g
* Sodium Chloride 5.00 g
* Agar 13.50 g
* Neutral Red 30.0 g
* Crystal Violet 1.0 mg
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

pH after sterilization: 7.1 ± 0.2

* + 1. Levine Eosin-Methylene Blue Agar

Formula:

* Pancreatic Digest of Gelatin 10.0 g
* Dipotassium Hydrogen phosphate 2.0 g
* Agar 15.0 g
* Lactose 10.0 g
* Eosin Y 0.04 g
* Methylene Blue 0.065 g
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

pH after sterilization 7.1 ± 0.2

* 1. จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
  2. ปิเปตที่ปราศจากเชื้อ
  3. ตู้บ่มเชื้อ (30-35°C)
  4. เครื่องบดผสมหรือเครื่องปั่นปราศจากเชื้อ
  5. เครื่องนับโคโลนี
  6. Autoclave
  7. ตู้ปลอดเชื้อ Biosafety cabinet
  8. เครื่องแก้วปราศจากเชื้อ
  9. Water bath
  10. Vertex mixers

#### ***ขั้นตอนการปฏิบัติ***

* 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเจือจางที่ปราศจากเชื้อ
     1. …
  2. การเตรียมตัวอย่างและขั้นตอนก่อนบ่ม (Pre-incubation)
     1. ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร … กรัม อย่างปราศจากเชื้อ
     2. เติมสารละลายเจือจาง TSB ที่ปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร (เพื่อเตรียมเป็น 1:10 dilution, 10^-1)
     3. บดผสมในเครื่องปั่น/บด เป็นเวลา … นาที
     4. บ่มที่อุณหภูมิ 30-35 ˚C เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง
  3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่จำเพาะต่อการเจริญของเชื้อ
     1. บดผสมในเครื่องปั่น/บด เป็นเวลา … นาที
     2. ย้ายสารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ด้วยปิเปตปราศจากเชื้อใส่ในขวดแก้ว Duran ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MacConkey Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
     3. ผสมให้เข้ากัน
     4. บ่มขวดที่อุณหภูมิ 42-44 ˚C เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง
  4. การขีดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อเชื้อ
     1. ผสมตัวอย่างจากข้อ 5.3 หลังจากที่บ่มเสร็จแล้วให้เข้ากัน
     2. ขีดเชื้อบนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey
     3. บ่มที่อุณหภูมิ 30-35 ˚C เป็นเวลานาน 18-72 ชั่วโมง

TSB

10 ml or   
eq. to 1 g of sample

MacConkey broth

1 g or 1 ml

Sample

18-24 h

30-35 ˚C

24-48 h

42-44 ˚C

MacConkey agar

30-35 ˚C

18-72 h

Suspect colonies presence

No colony found

Eosin methylene blue agar (EMB)

Absence (negative)

Gram staining: Gram (-) rods

18-24 h

30-35 ˚C

Positive colonies morphology characteristic

Presence (positive)

* 1. การสังเกตโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์
     1. หลังจากเสร็จสิ้นการบ่ม ให้สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น ถ้าพบว่าโคโลนีมีลักษณะตรงกับรายละเอียดดังแสดงในตารางต่อไปนี้ ให้ปฏิบัติตามขั้นตอนถัดไป

|  |
| --- |
| ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี |
| สีแดงอิฐ โดยรอบอาจมีการตกตะกอนของน้ำดี |

* + 1. ทำการยอมแกรมของโคโลนีที่มีลักษณะดังตารางแสดงข้างต้น ถ้าพบว่าผลของการย้อมแกรมออกมาเป็นแกรมลบรูปแท่ง (negative rod: cocco-bacilli) ให้ปฏิบัติตามขั้นตอนถัดไป
    2. ย้ายโคโลนีที่สงสัยไปยังพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ Levine eosin-methylene blue ด้วยลูปปราศจากเชื้อและ streaking technique โดยต้องมั่นใจว่าไม่มีการปนเปื้อนของโคโลนีอื่นในขั้นตอนดังกล่าว
    3. บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 30-35 นาน 18-24 ชั่วโมง
    4. หลังจากเสร็จสิ้นการบ่ม ให้ตรวจสอบอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างระมัดระวังภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง หากพบว่าโคโลนีมีลักษณะตรงกับรายละเอียดดังแสดงในตารางต่อไปนี้ ให้พิจารณาว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีเชื้อเอสเชอริเชีย โคไลปะปนอยู่ (แสดงผลเป็นบวก) ซึ่งสามารถยืนยันผลการทดสอบต่อด้วยการทำการเพาะเชื้อวิธีอื่น ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล หรือการทำ biochemical test และ Serological test หากจำเป็น

|  |  |
| --- | --- |
| **ทิศทางของแสง** | ลักษณะสัณฐานของโคโลนี |
| ส่องแสงเข้าด้านข้างโคโลนี  ส่องแสงจากทางด้านล่างโคโลนี | สีมันวาวคล้ายโลหะ (metallic sheen)  สีฟ้า-ดำ |

* + 1. บันทึกผลตามข้อ 8.

#### ***การคำนวณ***

-

#### ***เกณฑ์การยอมรับ***

ต้องไม่พบเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล (แสดงผลเป็นลบ)

#### ***การรายงานผล***

[บันทึกผลในรูปแบบของแต่ละบริษัท]

รายงานผลการไม่พบเชื้อ (ผลเป็นลบ) หรือพบเชื้อ (ผลบวก) ในหน่วย ... กรัม หรือ ... มิลลิลิตร ของตัวอย่าง

ในกรณีที่พบโคโลนีทีี่่สงสัย ต้องมีการแสดงผลการพิสูจน์เอกลักษณ์

#### ***เอกสารอ้างอิง***

* 1. USP <61> การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อ: การทดสอบการนับจำนวนจุลินทรีย์
  2. Ph. Eur. 2.6.12 การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ปราศจากเชื้อ: การทดสอบการนับจำนวนจุลินทรีย์
  3. ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ปี 2021 supplement 2023 – Appendix 10

#### ***ประวัติการแก้ไข***

[บันทึกประวัติการแก้ไขของ Analytical procedure นี้]