**[ร่าง] ตัวอย่าง** ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับความหมาะสมของวิธีทดสอบการวิเคราะห์หา *Pseudomonas aeruginosa* ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

**[Draft]** **Example** Method suitability test for Tests for Specified-micro-organism: *Pseudomonas aeruginosa* 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](#_Toc175746528)

[[English] Analytical Procedure for Tests for Specified-micro-organism: *Pseudomonas aeruginosa* in Herbal Products 4](#_Toc175746529)

[1. Purpose 4](#_Toc175746530)

[2. Scope 4](#_Toc175746531)

[3. Responsibilities 4](#_Toc175746532)

[4. Materials and Equipment 4](#_Toc175746533)

[5. Procedure 7](#_Toc175746534)

[6. Calculations 10](#_Toc175746535)

[7. Acceptance Criteria 10](#_Toc175746536)

[8. Reporting 10](#_Toc175746537)

[9. References 10](#_Toc175746538)

[10. Revision History 10](#_Toc175746539)

[[ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญเติบโตโดยใช้ออกซิเจน (TAMC) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร 11](#_Toc175746540)

[**1.** ***วัตถุประสงค์*** 11](#_Toc175746541)

[**2.** ***ขอบเขต*** 11](#_Toc175746542)

[**3.** ***ความรับผิดชอบ*** 11](#_Toc175746543)

[**4.** ***วัสดุและอุปกรณ์*** 11](#_Toc175746544)

[**5.** ***ขั้นตอนการปฏิบัติ*** 13](#_Toc175746545)

[**6.** ***การคำนวณ*** 17](#_Toc175746546)

[**7.** ***เกณฑ์การยอมรับ*** 17](#_Toc175746547)

[**8.** ***การรายงานผล*** 17](#_Toc175746548)

[**9.** ***เอกสารอ้างอิง*** 17](#_Toc175746549)

[**10.** ***ประวัติการแก้ไข*** 18](#_Toc175746550)

# 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 Tests for Specified-micro-organism: *Pseudomonas aeruginosa* in Herbal Products

#### Purpose

To establish test parameters for the test method presence of *Pseudomonas aeruginosa* in herbal finished 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. Cetrimide Agar (CT)

Formula:

* Pancreatic Digest of casein 20.0 g
* Magnesium Chloride 1.4 g
* Potassium Sulfate 10.0 g
* Agar 13.6 g
* Cetrimide 0.3 g
* Glycerol 10.0 ml
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

Dissolve all solid components in water and add glycerol. Heat, with frequent agitation and boil for 1 minute to effect solution.

pH after sterilization: 7.2 ± 0.2

* + 1. **Pseudomonas agar for detection of fluorescin**

Formula:

* Pancreatic digest of casein 10.0 g
* Peptic digest of animal tissue 10.0 g
* Dipotassium hydrogenpohsphate 1.5 g
* Magnesium sulfate 1.5 g
* Agar 15.0 g
* Glycerol 10.0 ml
* Deionized water (DI water) 1000 ml

Dissolve the solid components in water before adding glycerol. Heat, with frequent agitation, and boil for 1 minute to effect solution.

pH after sterilization 7.2 ± 0.2.

* + 1. **Pseudomonas agar for detection of pyocyanin**

Formula:

* Pancreatic digest of gelatin 10.0 g
* Magnesium chloride 3.0 g
* Potassium sulfate 10.0 g
* Agar 15.0 g
* Glycerol 10.0 mg
* Deionized water (DI water) 1000 ml

Dissolve the solid components in water before adding glycerol. Heat, with frequent agitation, and boil for 1 minute to effect solution.

pH after sterilization 7.2 ± 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. *[Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, DMST 15501, NCIMB 8626, C.I.P. 82.118 or NBRC 13275*]:* [passage count/seed reference number]
      2. *[Escherichia coli* ATCC 8739, DMST 15537, NCIMB 8545, C.I.P. 53.126 or NBRC*]:* [passage count/seed reference number]

#### Procedure

* 1. Culture media Preparation
     1. [Weigh …. g of … into …]
     2. [Add … ml of water]
     3. ... …
  2. Sample Preparation and enrichment
     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% of diluted product]
     4. [well mix with vertex mixer]
     5. Repeat step to while replace reference strain (re) (remarked as: positive product control, negative control) and without product (remarked as positive control)
     6. Incubate in 30-35 ˚C for 18 hours
  3. Selective agar streak plate
     1. [well mix sample from 5.2 after incubation completed]
     2. Streak mixture from 5.3.1 on surface of Cetrimide agar (CT) plate
     3. Incubate the plate in 30-35 oC for 18 hours

TSB

1 g or 1 ml or amount eq. to 1g

Sample

18 h

30-35 ˚C

Cetrimide agar (CT)

Absence (negative)

enriched

18 h

30-35 ˚C

Suspected  
morphology  
colonies characteristics

Gram staining

No colony growth found

Gram (-) rods

Presence (positive)

No Gram (-) rods

yes

No any degree observed

Growth found

Pseudomonas agar for fluorescin

Pseudomonas agar for pyocynin

30-35 ˚C

30-35 ˚C

3 days

3 days

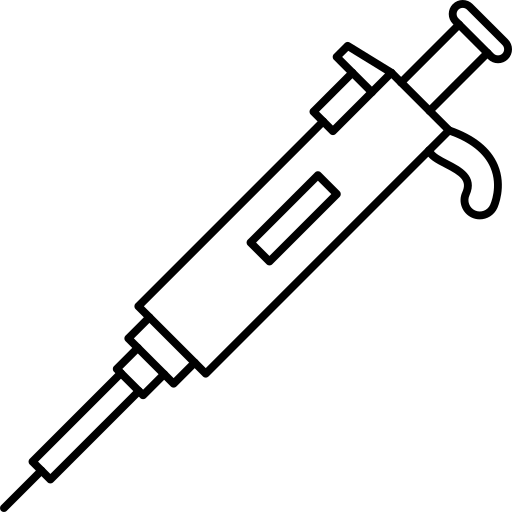
Cover and   
invert plate

Cover and   
invert plate

Observe under UV light

Is pigment observed?

Spike NMT 100 CFU of reference strains



* 1. Subculture and identification
     1. Perform, gram-staining of the suspect morphology colonies.
     2. Transfer a loopful of the suspect colony from the gar surface of cetrimide agar on the agar surface to surface of Pseudomonas agar for fluorescin and Pseudomonas agar for pyocynin.
     3. Cover and invert the inoculated plates and incubate at 30-35 ˚C for 3 days
  2. Colony observation and Morphological Identification
     1. After incubation, observe colony on plates under UV light. If the colonies matching the following description:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Selective medium** | **Characteristic Colonial Morphology** | **Gram stain** |
| Mannitol-salt agar | Yellow colonies surrounded by yellow zone | Positive cocci  (in clusters) |
| Baird-Parker agar | Black, shiny colonies surrounded by clear zones of 2 to 5 mm | Positive cocci  (in clusters) |
| Vogel-Johnson agar | Black surrounded by yellow zones | Positive cocci  (in clusters) |

Perform coagulase test in step according 5.4.3 along with gram-staining (presumptive) according to step 5.4.2

* + 1. Interpret the identification results:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Selective medium** | **Characteristic Colonial Morphology** | **Fluorescence in UV light** | **Oxidase test** | **Gram stain** |
| Cetrimide agar | Generally greenish | Greenish | Positive | Negative rods |
| Pseudomonas agar for to detection of fluorescin | Generally colorless yellowish | Yellowish | Positive | Negative rods |
| Pseudomonas agar for detection of pyocyanin | Generally greenish | Blue | Positive | Negative rods |

If the growth colony match description above, the result considered presence (positive) of *Pseudomonas aeruginosa* in product. The presence of Pseudomonas aeruginosa may be confirmed by suitable cultural and if necessary, biochemical tests.

#### Calculations

-

#### Acceptance Criteria

* 1. Positive product control spiked with *Pseudomonas aeruginosa* as specified in section 4.15 should be positive.
  2. Positive product control spiked with *Pseudomonas aeruginosa.* as specified in section 4.15 should be positive.
  3. Negative control spiked with *E. coli* 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

### [ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญเติบโตโดยใช้ออกซิเจน (TAMC) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

#### ***วัตถุประสงค์***

เพื่อการวิเคราะห์จำนวนจุยีสต์และราทั้งหมดในผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำเร็จรูป ด้วยวิธี pour plating technique 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
     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 หลังจากผ่านการ sterilization: 7.3 ± 0.2

* + 1. Cetrimide Agar (CT)

Formula:

* Pancreatic Digest of casein 20.0 g
* Magnesium Chloride 1.4 g
* Potassium Sulfate 10.0 g
* Agar 13.6 g
* Cetrimide 0.3 g
* Glycerol 10.0 ml
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

ละลายส่วนประกอบที่เป็นของแข็งทั้งหมดในน้ำ ใส่ glycerol นำไปต้มพร้อมคนบ่อย ๆ และต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารละลายสุดท้าย

pH หลังจากผ่านการ sterilization: 7.2 ± 0.2

* + 1. **Pseudomonas agar for detection of fluorescin**

Formula:

* Pancreatic digest of casein 10.0 g
* Peptic digest of animal tissue 10.0 g
* Dipotassium hydrogenpohsphate 1.5 g
* Magnesium sulfate 1.5 g
* Agar 15.0 g
* Glycerol 10.0 ml
* Deionized water (DI water) 1000 ml

ละลายส่วนประกอบที่เป็นของแข็งทั้งหมดในน้ำ ใส่ glycerol นำไปต้มพร้อมคนบ่อย ๆ และต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารละลายสุดท้าย

pH หลังจากผ่านการ sterilization: 7.2 ± 0.2

* + 1. **Pseudomonas agar for detection of pyocyanin**

Formula:

* Pancreatic digest of gelatin 10.0 g
* Magnesium chloride 3.0 g
* Potassium sulfate 10.0 g
* Agar 15.0 g
* Glycerol 10.0 mg
* Deionized water (DI water) 1000 ml

ละลายส่วนประกอบที่เป็นของแข็งทั้งหมดในน้ำ ใส่ glycerol นำไปต้มพร้อมคนบ่อย ๆ และต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารละลายสุดท้าย

pH หลังจากผ่านการ sterilization: 7.2 ± 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. [ ชั่ง ... g ลงในขวดดูแรนปราศจากเชื้อ]
     2. [ เติม diluent … ml]
     3. [ นำเข้าเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ˚C เวลา 15 นาที]
     4. ...
  2. การเตรียมตัวอย่างและการ enrichment
     1. ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร … กรัม อย่างปราศจากเชื้อ
     2. เติมสารละลาย TSB ที่ปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร (เพื่อเตรียมเป็น 1:10 dilution, 10^-1)
     3. [ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vertex mixer]
     4. นำไปบ่มที่ 30 -35 ˚C เป็นเวลา 18-24 ชม.
  3. Selective agar streak plate
     1. [หลังจากบ่มเสร็จ นำตัวอย่างจากข้อ 5.2 มาผสมให้เข้ากัน]
     2. ทำการขีดเชื้อโดยใช้ตัวอย่างจากข้อ 5.3.1 ลงบนพื้นผิว อาหารแข็ง Cetrimide agar (CT) ในจานเพาะเชื้อ
     3. บ่มขวดที่อุณหภูมิ 30 -35 ˚C เป็นเวลา 18-72 ชม.

TSB

1 g or 1 ml or amount eq. to 1g

Sample

18-24 h

30-35 ˚C

Cetrimide agar (CT)

Absence (negative)

enriched

18-72 h

30-35 ˚C

Suspected  
morphology  
colonies characteristics

Gram staining

No colony growth found

Gram (-) rods

Presence (positive)

No Gram (-) rods

yes

No any degree observed

Growth found

Pseudomonas agar for fluorescin

Pseudomonas agar for pyocynin

30-35 ˚C

30-35 ˚C

≥ 3 days

≥ 3 days

Cover and   
invert plate

Cover and   
invert plate

Observe under UV light

Is pigment observed?

* 1. การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ (subculture) และการพิสูจน์เอกลักษณ์
     1. ทำการย้อมแกรมโคโลนีที่สงสัย
     2. ใช้ไม้เขี่ยเชื้อย้ายโคโลนีที่สงสัย โดยนำมาเต็มลูป จากบน cetrimide agar ไปลงบนผิวอาหารแข็ง Pseudomonas agar เพื่อตรวจดูฟลูออเรสซีนและ Pseudomonas agar ที่ตรวจดูไพโอไซยานิน
     3. ปิดฝาและพลิกจานเพาะเชื้อที่บ่มแล้วและบ่มที่ 30-35 ˚C เป็นเวลาไม่เกิน 3 วัน
  2. การสังเกตโคโลนีและการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยา
     1. หลังจากบ่มเสร็จ ตรวจดูโคโลนีบนจานเพาะเชื้อภายใต้แสง UV หากโคโลนีตรงกับคำอธิบายดังตารางนี้

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ** | **ลักษณะของโคโลนี** | **ผลการย้อมแกรม** |
| Mannitol-salt agar | โคโลนีสีเหลืองโดยมีพื้นที่ล้อมรอบเป็นสีเหลือง | Positive cocci  (in clusters) |
| Baird-Parker agar | โคโลนีสีดำมันวาวโดยมีพื้นที่ล้อมรอบรอบใสไม่มีสีขนาด 2 - 5 มิลลิเมตร | Positive cocci  (in clusters) |
| Vogel-Johnson agar | โคโลนีสีดำโดยมีพื้นที่ล้อมรอบรอบใสไม่มีสี | Positive cocci  (in clusters) |

ทำการทดสอบด้วย coagulase test ในขั้นตอนตามข้อ 5.4.3 ร่วมกับการย้อมแกรม (presumptive) ตามขั้นตอนข้อ 5.4.2

* + 1. การแปลผลการพิสูจน์เอกลักษณ์

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ** | **ลักษณะของโคโลนี** | **ฟลูออเรสเซนซ์ภายใต้แสง UV** | **ผล Oxidase test** | **ผลการย้อมแกรม** |
| Cetrimide agar | โดยทั่วไปมีสีเขียว | โดยทั่วไปมีสีเขียว | Positive | Negative rods |
| Pseudomonas agar for to detection of fluorescin | โดยทั่วไปมีสีเหลืองอ่อน | โดยทั่วไปมีสีเหลือง | Positive | Negative rods |
| Pseudomonas agar for detection of pyocyanin | โดยทั่วไปมีสีเขียว | สีน้ำเงิน | Positive | Negative rods |

หากโคโลนีที่เจริญขึ้นมีลักษณะตรงกับคำอธิบายในตารางดังกล่าว สามารถแปลผลได้ว่ามีการพบเชื้อ (ผลบวก) *Pseudomonas aeruginosa* ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งอาจต้องทดสอบยืนยันด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและอาจทดสอบด้วยวิธี biochemical tests หากจำเป็น

* 1. การนับโคโลนี
     1. หลังการบ่มเชื้อ เลือกนับจำนวนโคโลนีบนจานที่มีโคโลนีไม่เกิน 50 โคโลนี

กรณีพบโคโลนีแผ่กว้าง (Spreader) ให้นับ 1 กลุ่มเป็น 1 โคโลนี ถ้าโคโลนีติดกันให้นับเป็น 1 โคโลนี

* + 1. คำนวณค่า TAMC ต่อกรัมของตัวอย่าง ตามข้อ 6. และบันทึกผลตาม ข้อ 8.

#### ***การคำนวณ***

-

#### ***เกณฑ์การยอมรับ***

ไม่พบเชื้อ (ผลลบ) ใน … กรัม หรือ … มิลลิลิตร [ตามข้อกำหนดเฉพาะของผลิตภัณฑ์]

#### ***การรายงานผล***

[บันทึกผลลัพทธ์ลงในระบบบริหารจัดการที่บริษัทกำหนด]

รายงานผลการตรวจไม่พบเชื้อ (ผลลบ) หรือ มีเชื้อ (ผลบวก) ใน … กรัม หรือ … มิลลิลิตร ของตัวอย่าง

กรณีที่พบผลโคโลนีที่ไม่ชัดเจน ควรบันทึกผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ดังกล่าวไว้

#### ***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]