**[ร่าง] ตัวอย่าง** ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับความหมาะสมของวิธีทดสอบการวิเคราะห์หา *Salmonella species* ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

**[Draft]** **Example** Method suitability test for Tests for Specified-micro-organism: *Salmonella species* 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](#_Toc175747669)

[[English] Analytical Procedure for Tests for Specified-micro-organism: *Pseudomonas aeruginosa* in Herbal Products 4](#_Toc175747670)

[1. Purpose 4](#_Toc175747671)

[2. Scope 4](#_Toc175747672)

[3. Responsibilities 4](#_Toc175747673)

[4. Materials and Equipment 4](#_Toc175747674)

[5. Procedure 8](#_Toc175747675)

[6. Calculations 13](#_Toc175747676)

[7. Acceptance Criteria 13](#_Toc175747677)

[8. Reporting 13](#_Toc175747678)

[9. References 13](#_Toc175747679)

[10. Revision History 14](#_Toc175747680)

[[ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญเติบโตโดยใช้ออกซิเจน (TAMC) ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร 16](#_Toc175747681)

**[1.](#_Toc175747682)*****[วัตถุประสงค์](#_Toc175747682)*** [16](#_Toc175747682)

**[2.](#_Toc175747683)*****[ขอบเขต](#_Toc175747683)*** [16](#_Toc175747683)

**[3.](#_Toc175747684)*****[ความรับผิดชอบ](#_Toc175747684)*** [16](#_Toc175747684)

**[4.](#_Toc175747685)*****[วัสดุและอุปกรณ์](#_Toc175747685)*** [16](#_Toc175747685)

**[5.](#_Toc175747686)*****[ขั้นตอนการปฏิบัติ](#_Toc175747686)*** [20](#_Toc175747686)

**[6.](#_Toc175747687)*****[การคำนวณ](#_Toc175747687)*** [24](#_Toc175747687)

**[7.](#_Toc175747688)*****[เกณฑ์การยอมรับ](#_Toc175747688)*** [24](#_Toc175747688)

**[8.](#_Toc175747689)*****[การรายงานผล](#_Toc175747689)*** [24](#_Toc175747689)

**[9.](#_Toc175747690)*****[เอกสารอ้างอิง](#_Toc175747690)*** [24](#_Toc175747690)

**[10.](#_Toc175747691)*****[ประวัติการแก้ไข](#_Toc175747691)*** [24](#_Toc175747691)

# General considerations

**[EN]**

1. This document was intended present in 2-language options including: English – Thai. Users can choose one language as an example for document preparation in herbal registration processes.
2. This document is not covered: Growth promotion test of culture media, suitability of microbial enumeration method, preservative effectiveness test and other sample preparation techniques which **should be appropriately researched and developed**.
3. This document is not covered: Manufacturing/Quality control testing sites certify processes or any others quality management system certify processes.

**[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: Salmonella species in Herbal Products

#### Purpose

To establish test parameters for the test method of test for specified micro-organism *Salmonella species* 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. **Rappaport – Vassiliadis Soya peptone Broth (RVS)**

Formula:

* Soya Peptone 4.5 g
* Sodium Chloride 8.0 g
* Dipotassium Phosphate 0.4 g
* Potassium Dihydrogenphosphate 0.6 g
* Magnesium Chloride 29.0 g
* Malachite Green 36.0 mg
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

Mix and heat to effect solution.

pH after sterilization: 5.2 ± 0.2

* + 1. **Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD Agar)**

Formula:

* Xylose 3.5 g
* L- lysine 5.0 g
* Lactose 7.5 g
* Sucrose 7.5 g
* Sodium Chloride 5.0 g
* Yeast Extract 3.0 g
* Agar 13.5 g
* Sodium desoxycholate 2.5 g
* Sodium Thiosulfate 6.8 g
* Ammonium Iron (III) citrate 0.8 g
* Phenol Red 80.0 mg
* DI Water 1000 ml

Heat the mixture of solids and water, with swirling, just to the boiling point. Do not overheat or sterilize. Transfer at once to a water-bath maintained at about 50 ˚C, and pour into plates as soon as the medium has cooled.

pH after sterilization 7.4 ± 0.2.

* + 1. **Brilliant Green Agar (BG Agar)**

Formula:

* Yeast extract 3.0 g
* Peptic Digest of Animal Tissue 5.0 g
* Pancreatic Digest of Casein 5.0 g
* Lactose 10.0 g
* Sodium Chloride 5.0 g
* Sucrose 10.0 g
* Phenol Red 80.0 mg
* Agar 20.0 g
* Brilliant Green 12.5 mg
* Water 1000 ml

Boil the solution of solids for 1 minute. Sterilize just prior to use. Melt the medium, pour into Petri dishes, and allow to cool.

pH after sterilization 6.9 ± 0.2.

* + 1. **Tetrathionate bile brilliant green broth (TBG)**

Formula:

* Peptone 8.6 g
* Ox bile, dried 8.0 g
* Sodium Chloride 6.4 g
* Calcium carbonate 20.0 g
* Potassium tetrathionate 20.0 g
* Brilliant Green 70.0 mg
* DI Water 1000 ml

Heat the solution of solids to boiling. Do not reheat

Final pH: 7.0±0.2

* + 1. **Bismuth sulfite agar**

Formula:

* Beef extract 5.0 g
* Pancreatic digest of casein 5.0 g
* Peptic digest of animal tissue 5.0 g
* Dextrose monohydrate 5.0 g
* Disodium hydrogenphosphate heptahydrate 4.0 g
* Iron(II) sulfate 0.3 g
* Bismuth sulfite indicator 8.0 g
* Agar 20.0 g
* Brilliant Green 25.0 mg
* DI Water 1000 ml

Heat the mixture of solids and water, with swirling, just to the boiling poin. Do not overheat or sterilize. Transfer at once to a water-bath maintained at about 50 ˚C, and pour into plates as soon as the medium has cooled.

Final pH: 7.6 ±0.2

* + 1. **Triple sugar-iron (TSI) agar**

Formula:

* Pancreatic digest of casein 10.0 g
* Pancreatic digest of animal tissue 10.0 g
* Lactose 10.0 g
* Sucrose 10.0 g
* Dextrose monohydrate 1.0 g
* Ammonium iron (II) sulfate 0.2 g
* Sodium chloride 5.0 g
* Sodium thiosulfate 0.2 g
* Agar 13.0 g
* Phenol red 25.0 mg
* Deionized water (DI water) 1000 ml

Dissolve the soluble solids in the water, using heat, if necessary, to effect complete solution. Adjust pH with hydrochloric or sodium hydroxide, determine the pH at 25 ±2 ˚C. Sterilization by mean of Autoclave 121 ˚C for 15 minutes.

pH after sterilization 7.3 ± 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 tubes
  14. Test micro-organism:
      1. *[Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 or DMST 13311 or *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Abony NCTC 6017 or DMST 21863 or C.I.P 80.39 or NBRC 100797] [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. ... …
  2. Sample Preparation and pre-enrichment
     1. Weigh [25 g or 25 ml (10 g or 10 ml for herbal products from animal or mineral origins)] of the herbal product aseptically into [ 500-ml duran bottle screw cap]
     2. Add [225 mL (or 90 ml)] of [TSB or suitable diluent]
     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)
     6. Incubate in 30-35 ˚C for 18 hours
  3. Selective Enrichment
     1. Transfer 0.1 ml of incubated pre-enrichment culture into 10-ml Rappaport - Vassiliadis Soya peptone (RVS) Broth.
     2. Transfer 1.0 ml of incubated pre-enrichment culture into 10-ml Tetrathionate bile brilliant green broth.
     3. [well mixed]
     4. Incubate in 30-35 ˚C for 18 hours
  4. Selective agar plating
     1. [well mix sample from 5.2 after incubation completed]
     2. Streak mixture from 5.3.1 onto surface of
* Xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD) plate,
* Brilliant green agar (BG) plate,
* Bismuth sulfite agar (BS) plate

Respectively.

* + 1. Cover and invert the plates.
    2. Incubate the plate in 30-35 oC for 18 hours
  1. Examination

Observe all plates, if no colony growth on any plates, the product meets the requirement for absence of the genus salmonella in [… g] if colonies of Gram-negative rods matching the description in the following table:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Selective Medium | Characteristic colonial morphology | Gram staining |
| Xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD) plate | Red, with or without black centres | Gram (-) rods |
| Brilliant green agar (BG) plate | Small, transparent, colourless or pink to white opaque (frequently surrounded by pink to red zone) | Gram (-) rods |
| Bismuth sulfite agar (BS) plate | Black or green | Gram (-) rods |

Then, proceed to the step of identification.

* 1. Identification
     1. Transfer suspected colonies with inoculating wire [or inoculating needle] to a butt-slant tube of Triple sugar-iron (TSI) agar by first streaking on the surface of the slant and then stabbing the wire well beneath the surface (without flaming). Repeat step with blank control diluent solution and positive control in place of suspected colonies.
     2. Incubate TSI slants at 30 - 35 ˚C for 24 ± 2 h. Cap tubes loosely to maintain aerobic conditions while incubating lants to prevent excessive H2S production.
     3. Observe culture slant, if the culture produces characteristics of the following:

|  |  |
| --- | --- |
| Biochemical screening medium | Characteristic produces |
| TSI slants | Alkaline (red) |
| TSI butt | Acid (yellow) with or without blackening of the butt |

Then, the result of presence of *Salmonella spp.* May presumed. The presence of *Salmonella spp.* May beconfirmed by other suitable cultural or biochemical and serological test, if necessary

9x TSB

[25 g or 25 ml or amount eq. to 25g]

Sample  
(Homogenized)

18 h

30-35 ˚C

XLD

Absence (negative)

Pre-enriched

18-72 h

Examination

BG

Selective enriched

10-ml RVS

10-ml TT

0.1 ml

1.0 ml

18 h

30-35 ˚C

18 h

30-35 ˚C

BS

XLD

BG

Selective enriched

BS

No growth observed

Typical/Atypical colonies found

TSI slant

TSI slant

TSI slant

Diluent (negative)   
control

Std. culture (positive)   
control

30-35 ˚C   
24 ± 2 h

30-35 ˚C   
24 ± 2 h

30-35 ˚C   
24 ± 2 h

Presence (positive)

Produce characteristics   
patterns

Not Produce characteristics patterns

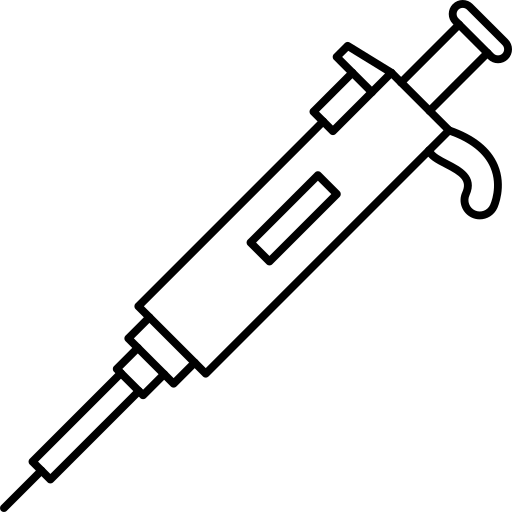
Alkaline (red) slant

Acid (yellow) butt

18 h

30-35 ˚C

Spike NMT 100 CFU of reference strains



#### Calculations

-

#### Acceptance Criteria

* 1. Positive product control spiked with *Salmonella spp.* as specified in section 4.16 should be positive.
  2. Positive control spiked with *Salmonella spp.* as specified in section 4.16 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
  4. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5 – May 2024 Edition, USFDA, available online: https://www.fda.gov/media/178914/download?attachment

#### 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 more flexible diluent in steps of pre-enrichment based on suitability of test method.

#### Fixed erroneously mentioned incubation time of agar plating from 18-72 hrs to 18-48 hrs

#### Replace TSI slant incubation temperature from 35±2 ˚C to 30-35 ˚C

### [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 after sterilization: 7.3 ± 0.2

* + 1. **Rappaport – Vassiliadis Soya peptone Broth (RVS)**

Formula:

* Soya Peptone 4.5 g
* Sodium Chloride 8.0 g
* Dipotassium Phosphate 0.4 g
* Potassium Dihydrogenphosphate 0.6 g
* Magnesium Chloride 29.0 g
* Malachite Green 36.0 mg
* Deionized Water (DI Water) 1,000 ml

Mix and heat to effect solution.

pH after sterilization: 5.2 ± 0.2

* + 1. **Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD Agar)**

Formula:

* Xylose 3.5 g
* L- lysine 5.0 g
* Lactose 7.5 g
* Sucrose 7.5 g
* Sodium Chloride 5.0 g
* Yeast Extract 3.0 g
* Agar 13.5 g
* Sodium desoxycholate 2.5 g
* Sodium Thiosulfate 6.8 g
* Ammonium Iron (III) citrate 0.8 g
* Phenol Red 80.0 mg
* DI Water 1000 ml

Heat the mixture of solids and water, with swirling, just to the boiling point. Do not overheat or sterilize. Transfer at once to a water-bath maintained at about 50 ˚C, and pour into plates as soon as the medium has cooled.

pH after sterilization 7.4 ± 0.2.

* + 1. **Brilliant Green Agar (BG Agar)**

Formula:

* Yeast extract 3.0 g
* Peptic Digest of Animal Tissue 5.0 g
* Pancreatic Digest of Casein 5.0 g
* Lactose 10.0 g
* Sodium Chloride 5.0 g
* Sucrose 10.0 g
* Phenol Red 80.0 mg
* Agar 20.0 g
* Brilliant Green 12.5 mg
* Water 1000 ml

Boil the solution of solids for 1 minute. Sterilize just prior to use. Melt the medium, pour into Petri dishes, and allow to cool.

pH after sterilization 6.9 ± 0.2.

* + 1. **Tetrathionate bile brilliant green broth (TBG)**

Formula:

* Peptone 8.6 g
* Ox bile, dried 8.0 g
* Sodium Chloride 6.4 g
* Calcium carbonate 20.0 g
* Potassium tetrathionate 20.0 g
* Brilliant Green 70.0 mg
* DI Water 1000 ml

Heat the solution of solids to boiling. Do not reheat

Final pH: 7.0±0.2

* + 1. **Bismuth sulfite agar**

Formula:

* Beef extract 5.0 g
* Pancreatic digest of casein 5.0 g
* Peptic digest of animal tissue 5.0 g
* Dextrose monohydrate 5.0 g
* Disodium hydrogenphosphate heptahydrate 4.0 g
* Iron(II) sulfate 0.3 g
* Bismuth sulfite indicator 8.0 g
* Agar 20.0 g
* Brilliant Green 25.0 mg
* DI Water 1000 ml

Heat the mixture of solids and water, with swirling, just to the boiling poin. Do not overheat or sterilize. Transfer at once to a water-bath maintained at about 50 ˚C, and pour into plates as soon as the medium has cooled.

Final pH: 7.6 ±0.2

* + 1. **Triple sugar-iron (TSI) agar**

Formula:

* Pancreatic digest of casein 10.0 g
* Pancreatic digest of animal tissue 10.0 g
* Lactose 10.0 g
* Sucrose 10.0 g
* Dextrose monohydrate 1.0 g
* Ammonium iron (II) sulfate 0.2 g
* Sodium chloride 5.0 g
* Sodium thiosulfate 0.2 g
* Agar 13.0 g
* Phenol red 25.0 mg
* Deionized water (DI water) 1000 ml

Dissolve the soluble solids in the water, using heat, if necessary, to effect complete solution. Adjust pH with hydrochloric or sodium hydroxide, determine the pH at 25 ±2 ˚C. Sterilization by mean of Autoclave 121 ˚C for 15 minutes.

pH after sterilization 7.3 ± 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. การเตรียมตัวอย่างและขั้นตอนการเพิ่มจำนวนขั้นต้น (pre-enrichment)
     1. ชั่ง [25 กรัม หรือ 25 มิลลิลิตร (10 กรัม หรือ 10 มิลลิลิตร ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากสัตว์หรือแร่ธาตุ)] ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรอย่างปราศจากเชื้อ ใน [ขวดดูแรนฝาเกรียว 500 มิลลิลิตร]
     2. เติมสาร TSB ที่ปราศจากเชื้อ [225 มิลลิลิตร (หรือ 90 มิลลิลิตร)]
     3. [ผสมให้เข้ากัน]
     4. บ่มที่อุณหภูมิ 30 – 35 ˚C เป็นเวลานาน 18 – 24 ชั่วโมง
  3. การเพิ่มจำนวนเชื้ออย่างจำเพาะเจาะจง (selective enrichment)
     1. นำสารละลายจากขั้นตอนการเพิ่มจำนวนขั้นต้นที่ผ่านการบ่มแล้ว (pre-enrichment culture) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Rappaport-Vassiliadis Soya peptone (RVS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
     2. นำสารละลายจากขั้นตอนการเพิ่มจำนวนขั้นต้นที่ผ่านการบ่มแล้ว (pre-enrichment culture)ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tetrathionate bile brilliant green ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
     3. ผสมให้เข้ากัน
     4. บ่มที่อุณหภูมิ 30 – 35 ˚C เป็นเวลานาน 18 – 24 ชั่วโมง
  4. การเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ
     1. [หลังจากบ่มเสร็จแล้ว (ข้อ 5.2) ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน]
     2. ขีดสารจากข้อ 5.3.1 ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปนี้ ตามลำดับ
* จานอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD)
* จานอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green agar (BG)
* จานอาหารเลี้ยงเชื้อ Bismuth sulfite agar (BS)
  + 1. ปิดฝา และคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
    2. บ่มขวดที่ 30-35 ℃ นาน 18-72 ชั่วโมง
  1. การตรวจสอบผลการทดสอบ

ตรวจสอบทุกจารอาหารเลี้ยงเลี้ยงเชื้อ หาไม่พบการเจริญเติบโตของโคโลนีในอาหารเลี้ยงใดเลย ให้พิจารณาว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรดังกล่าวไม่มีการเจือปนของเชื้อแซลโมเนลลา ใน [… กรัม] แต่หากพบโคโลนีของเชื้อแกรมลบรูปแท่งที่มีลักษณะตรงกับรายละเอียดดังแสดงในตารางต่อไปนี้ ให้ปฏิบัติตามขั้นตอนถัดไป

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะเจาะจง | ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี | การย้อมแกรม |
| จานอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD) | สีแดง โดยจะมีสีดำตรงกลาง  หรือไม่ก็ได้ | แกรมลบ รูปแท่ง |
| จานอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green agar (BG) | ขนาดเล็ก โปรงใส ไม่มีสีหรือสีชมพูจนขาวขุน (โดยมากมักจะล้อมรอบด้วยโซนสีแดงหรือชมพู) | แกรมลบ รูปแท่ง |
| จานอาหารเลี้ยงเชื้อ Bismuth sulfite agar (BG) | สีดำหรือสีเขียว | แกรมลบ รูปแท่ง |

* 1. การพิสูจน์เอกลักษณ์
     1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อย้ายโคโลนีที่สงสัยลงส่วนล่างและส่วนลาดเอียง (butt-slant tube) ของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Triple sugar-iron (TSI) อยู่
     2. บ่มหลอดอาหาร TSI ที่ 35 2 นาน 24 2 ชั่วโมง โดยปิดฝาหลอดให้อยู่ในลักษณะหลวมเพื่อให้รักษาสภาวะที่มีอากาศและป้องกันการสร้าง H2S ที่มากเกินไป
     3. สังเกตผลการเพาะเชื้อ หากพบเชื้อที่มีลักษณะตรงกับรายละเอียดดังแสดงในตารางต่อไปนี้ ให้พิจารณาว่ามีการปะปนชองเชื้อแซลโมเนลลา ซึ่งสามารถยืนยันผลการทดสอบต่อด้วยการทำการเพาะเชื้อวิธีอื่น ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแซลโมเนลลา หรือการทำ biochemical test และ serological test หากจำเป็น

|  |  |
| --- | --- |
| อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดกรองทางชีวเคมีเบื้องต้น | ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้ |
| ส่วนลาดเอียงของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI (slant) | ด่าง (สีแดง) |
| ส่วนล่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI (butt) | กรด (สีเหลือง) ร่วมกับ การเกิดหรือไม่เกิดสีดำที่ส่วนล่างของหลอด |

9x TSB

[25 g or 25 ml or amount eq. to 25g]

Sample  
(Homogenized)

18-24 h

30-35 ˚C

XLD

Absence (negative)

Pre-enriched

18-72 h

Examination

BG

Selective enriched

10-ml RVS

10-ml TT

0.1 ml

1.0 ml

18-24 h

30-35 ˚C

18-24 h

30-35 ˚C

BS

XLD

BG

Selective enriched

BS

No growth observed

Typical/Atypical colonies found

TSI slant

TSI slant

TSI slant

Diluent (negative)   
control

Std. culture (positive)   
control

35 ± 2 ˚C   
24 ± 2 h

35 ± 2 ˚C   
24 ± 2 h

35 ± 2 ˚C   
24 ± 2 h

Presence (positive)

Produce characteristics   
patterns

Not Produce characteristics patterns

Alkaline (red) slant

Acid (yellow) butt

#### ***การคำนวณ***

-

#### ***เกณฑ์การยอมรับ***

ต้องไม่พบเชื้อแซลโมเนลลา (แสดงผลเป็นลบ) ใน ... กรัม หรือมิลลิลิตร [ตามข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์]

#### ***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
  4. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5 – May 2024 Edition, USFDA, available online: https://www.fda.gov/media/178914/download?attachment

#### ***ประวัติการแก้ไข***

[บันทึกประวัติการแก้ไขของ Analytical procedure นี้]