**[ร่าง] ตัวอย่าง** ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับความหมาะสมของวิธีทดสอบการวิเคราะห์หา *Staphylococcus aureus* ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

**[Draft]** **Example** Method suitability test for Tests for Specified-micro-organism: *Staphylococcus aureus* 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](#_Toc175748841)

[[English] Analytical Procedure for Tests for Specified-micro-organism: *Staphylococcus aureus* in Herbal Products 4](#_Toc175748842)

[1. Purpose 4](#_Toc175748843)

[2. Scope 4](#_Toc175748844)

[3. Responsibilities 4](#_Toc175748845)

[4. Materials and Equipment 4](#_Toc175748846)

[5. Procedure 7](#_Toc175748847)

[6. Calculations 10](#_Toc175748848)

[7. Acceptance Criteria 10](#_Toc175748849)

[8. Reporting 10](#_Toc175748850)

[9. References 10](#_Toc175748851)

[10. Revision History 10](#_Toc175748852)

[[ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการวิเคราะห์หา *Staphylococcus aureus* ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร 11](#_Toc175748853)

[**1.** ***วัตถุประสงค์*** 11](#_Toc175748854)

[**2.** ***ขอบเขต*** 11](#_Toc175748855)

[**3.** ***ความรับผิดชอบ*** 11](#_Toc175748856)

[**4.** ***วัสดุและอุปกรณ์*** 11](#_Toc175748857)

[**5.** ***ขั้นตอนการปฏิบัติ*** 14](#_Toc175748858)

[**6.** ***การคำนวณ*** 17](#_Toc175748859)

[**7.** ***เกณฑ์การยอมรับ*** 17](#_Toc175748860)

[**8.** ***การรายงานผล*** 17](#_Toc175748861)

[**9.** ***เอกสารอ้างอิง*** 17](#_Toc175748862)

[**10.** ***ประวัติการแก้ไข*** 17](#_Toc175748863)

# 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 for Tests for Specified-micro-organism: *Staphylococcus aureus* in Herbal Products

#### Purpose

To establish test parameters for the method of test presence of *Staphylococcus aureus* 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. **Mannitol Salt Agar Medium (MSA)**

Formula:

* Pancreatic Digest of Casein 5.0 g
* Papaic Digest of Animal Tissue 5.0 g
* Beef Extract 1.0 g
* Mannitol 10.0 g
* Sodium Chloride 75.0 g
* Agar 15.0 g
* Phenol Red 25.0 mg
* DI Water 1,000 ml

pH after sterilization: 7.4 ± 0.2

* + 1. **Baird Parker Agar Base (BP)**

Formula:

* Pancreatic digest of casein 10.0 g
* Beef Extract 5.0 g
* Yeast Extract 1.0 g
* Lithium Chloride 5.0 g
* Agar 20.0 g
* Glycine 12.0 g
* Sodium pyruvate 10.00 g
* Deionized water (DI water) 950 ml

Heat with frequent agitation, and boil for 1 minute. Sterilize, cool to between   
45 °C and 50 °C, and add 10 mL of a sterile, 1 per cent w/v solution of *potassium tellurate(IV)* and 50 mL of egg-yolk emulsion. Mix intimately but gently, and pour into plates.

pH after sterilization: 6.8 ± 0.2

Preparation of the egg-yolk emulsion: Disinfect the surface of whole shell eggs aseptically crack the eggs, and separate out intact yolks into a sterile graduated cylinder. Add *saline TS* to obtain a 3 to 7 ratio of egg-yolk to saline. Add to a sterile blender cup, and mix at high speed for 5 seconds.

* + 1. **Vogel-Johnson agar (VJ)**

Formula:

* Pancreatic digest of casein 10.0 g
* Yeast Extract 5.0 g
* Mannitol 10.0 g
* Dipotassium hydrogenphosphate 5.0 g
* Lithium Chloride 5.0 g
* Glycine 10.0 g
* Agar 16.0 g
* Phenol red 25.0 mg
* Deionized water (DI water) 1000 ml

Boil the solution of solid for 1 minute. Sterilize, cool to between 45 °C and 50 °C, and add 20 ml of sterile 1 percent w/v solution of *potassium tellurate (IV)*

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. [*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 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 into each sample serial dilution]
     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. Incubate in 30-35 ˚C for 18 hours
  1. Selective agar streak plate
     1. [well mix sample from 5.2 after incubation completed]
     2. Streak mixture from step 5.3.1 on the surface of:

- Mannitol-Salt Agar (MSA) plate,

- Baird- Parker Agar (BPA) plate,

- Vogel-Johnson Agar (VJ) plate,

Respectively.

* + 1. Incubate the plates in 30-35 oC for 18 hours

TSB

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

Sample

18 h

30-35 ˚C

Mannitol-salt agar (MSA)

Absence (negative)

Baird-Parker agar (BP)

Vogel-Johnson (VJ) agar

enriched

18 h

30-35 ˚C

18 h

30-35 ˚C

18 h

37 ˚C

Suspected  
morphology  
colonies characteristics

Gram staining

No colony found

Gram (+) cocci

(In cluster)

0.5 ml Mammalian plasma

Test (unknow)

Positive   
control

Negative   
control

Water-bath

3, 24 h interval

Presence (positive)

Is coagulation observed?

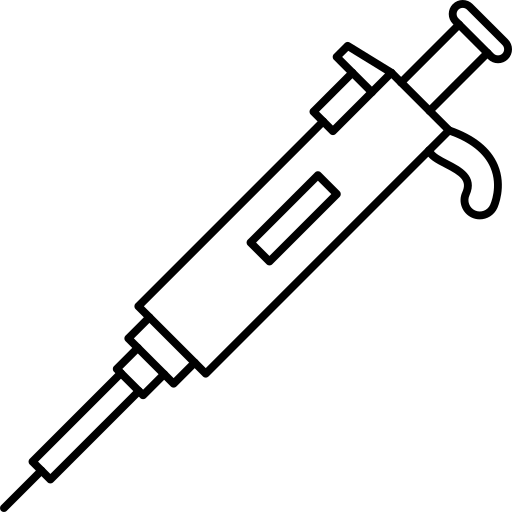
No Gram (+) cocci

yes

No any degree observed

30-35 ˚C

Spike NMT 100 CFU of reference strains



Test

* 1. Colony observation and Morphological Identification
     1. After incubation, observe colony on plates. 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. Perform, gram-staining of the positive morphology colonies. If the gram-stain resulting in: positive cocci (in clusters), then proceed to the next step.
    2. Transfer a loopful of the suspect colonies individually from agar surfaces of mannitol-salt agar (Baird-Parker agar or Vogel-Johnson agar) into individual tubes, each containing 0.5ml of mammalian, preferably rabbit or horse, plasma with or without suitable additives.
    3. Incubate the tubes in 37 oC water-bath, [examine the tubes at 3 hours and subsequently at suitable intervals up to 24 hours].
    4. Interpret the identification results:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Coagulase test results [example]** | | | |
| Positive control | Negative  control | Test (unknown) | Conclusion |
| + | - | + | Presence (positive) |
| + | + | + | Invalid |
| - | + | + | Invalid |
| + | - | - | Absence (negative) |
| - | - | - | Invalid |

#### Calculations

-

#### Acceptance Criteria

#### Positive product control spiked with *S. aureus* should be positive.

#### Positive control spiked with *S. aureus* should be positive.

#### Negative control spiked with *E. coli* should be negative.

#### 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

#### 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.

### [ภาษาไทย] ขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับการวิเคราะห์หา *Staphylococcus aureus* ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

#### ***วัตถุประสงค์***

เพื่อวิเคราะห์หา *Staphylococcus aureus* 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
     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. **Mannitol Salt Agar Medium (MSA)**

Formula:

* Pancreatic Digest of Casein 5.0 g
* Papaic Digest of Animal Tissue 5.0 g
* Beef Extract 1.0 g
* Mannitol 10.0 g
* Sodium Chloride 75.0 g
* Agar 15.0 g
* Phenol Red 25.0 mg
* DI Water 1,000 ml

pH after sterilization: 7.4 ± 0.2

* + 1. **Baird Parker Agar Base (BP)**

Formula:

* Pancreatic digest of casein 10.0 g
* Beef Extract 5.0 g
* Yeast Extract 1.0 g
* Lithium Chloride 5.0 g
* Agar 20.0 g
* Glycine 12.0 g
* Sodium pyruvate 10.00 g
* Deionized water (DI water) 950 ml

ให้ความร้อน คนบ่อยๆ และต้มเป็นเวลา 1 นาที ฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้เย็นลง ระหว่างอุณหภูมิ 45 °C ถึง 50 °C แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมเทลลูเรต (IV) 1 เปอร์เซ็นต์ w/v ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มล. และอิมัลชันไข่แดง 50 มล. ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วเทลงในจาน

pH หลังฆ่าเชื้อ:6.8 ± 0.2

การเตรียมอิมัลชันไข่แดง: ฆ่าเชื้อบนพื้นผิวของเปลือกไข่ทั้งฟอง ตอกไข่ให้แตกโดยปราศจากเชื้อ แล้วแยกไข่แดงที่ยังไม่แตกออกใส่กระบอกตวงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำเกลือ TS เพื่อให้ได้อัตราส่วนไข่แดงต่อน้ำเกลือ 3 ต่อ 7 ใส่ในถ้วยปั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และปั่นด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 5 วินาที

* + 1. **Vogel-Johnson agar (VJ)**

Formula:

* Pancreatic digest of casein 10.0 g
* Yeast Extract 5.0 g
* Mannitol 10.0 g
* Dipotassium hydrogenphosphate 5.0 g
* Lithium Chloride 5.0 g
* Glycine 10.0 g
* Agar 16.0 g
* Phenol red 25.0 mg
* Deionized water (DI water) 1000 ml

ต้มสารละลายของแข็งเป็นเวลา 1 นาที ฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้เย็นลง ระหว่างอุณหภูมิ 45 °C ถึง 50 °C แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมเทลลูเรต (IV) 1 เปอร์เซ็นต์ w/v ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 20 มล.

ค่า pH หลังการฆ่าเชื้อ: 7.2 ±0.2

* + 1. …
  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
  11. ขวดดูแรนปราศจากเชื้อ 250 มล.
  12. ตะเกียงบุนเซน
  13. ลูปเขี่ยเชื้อ
  14. สารละลายย้อมแกรม

#### ***ขั้นตอนการปฏิบัติ***

* 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเจือจางที่ปราศจากเชื้อ
     1. ...
  2. การเตรียมตัวอย่าง
     1. ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร 1 กรัม อย่างปราศจากเชื้อ
     2. เติมสารละลาย TSB เจือจางที่ปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร (เพื่อเตรียมเป็น 1:10 dilution)
     3. บดผสมในเครื่องปั่น/บด เป็นเวลา … นาที
     4. บ่มที่อุณหภูมิ 30-35 ˚C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
  3. Selective agar streak plate
     1. [ผสมตัวอย่างจาก 5.2 หลังจากการบ่มเสร็จสิ้น]
     2. ขีดตัวอย่างจาก 5.3.1 บนพื้นผิวของ Mannitol-Salt Agar (MSA) plate
     3. ขีดตัวอย่างจาก 5.3.1 บนพื้นผิวของ Baird- Parker Agar (BPA) plate
     4. ขีดตัวอย่างจาก 5.3.1 บนพื้นผิวของ Vogel-Johnson Agar (VJ) plate
     5. บ่มในขวดที่อุณหภูมิ 30-35 ˚C เป็นเวลา 18–72 ชั่วโมง

TSB

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

Sample

18-24 h

30-35 ˚C

Mannitol-salt agar (MSA)

Absence (negative)

Baird-Parker agar (BP)

Vogel-Johnson (VJ) agar

enriched

18-72 h

30-35 ˚C

18-72 h

30-35 ˚C

18-72 h

37 ˚C

Suspected  
morphology  
colonies characteristics

Gram staining

No colony found

Gram (+) cocci

(In cluster)

0.5 ml Mammalian plasma

Test (unknow)

Positive   
control

Negative   
control

Water-bath

3, 24 h interval

Presence (positive)

Is coagulation observed?

No Gram (+) cocci

yes

No any degree observed

* 1. สังเกตโคโลนี และลักษณะทางสัณฐานวิทยา
     1. หลังการบ่ม สังเกตโคโลนีบนจาน ตามคำอธิบายต่อไปนี้

| อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ | ลักษณะโคโลนี | ผลการย้อมแกรม |
| --- | --- | --- |
| Mannitol-salt agar | โคโลนีสีเหลืองที่ล้อมรอบด้วยบริเวณสีเหลือง | Positive cocci (ในคลัสเตอร์) |
| Baird-Parker agar | โคโลนีสีดำมันวาว ล้อมรอบด้วยบริเวณสีใสขนาด 2 ถึง 5 มม. | Positive cocci (ในคลัสเตอร์) |
| Vogel-Johnson agar | สีดำล้อมรอบด้วยบริเวณสีเหลือง | Positive cocci (ในคลัสเตอร์) |

ดำเนินการทดสอบโคอะกูเลสตามขั้นตอน 5.4.3 ร่วมกับการย้อมแกรม (สันนิษฐาน) ตามขั้นตอน 5.4.2

* + 1. ทำการย้อมแกรมของโคโลนีที่มีสัณฐานวิทยาเป็นแกรมบวก หากการย้อมแกรมส่งผลให้มีโคกคัส (cocci)ที่เป็นแกรมบวก (ในคลัสเตอร์) ให้ดำเนินการตามขั้นตอนถัดไป
    2. ย้ายโคโลนีด้วยลูป (loopful) ของกลุ่มที่ต้องสงสัยทีละกลุ่มจากพื้นผิวของ mannitol-salt agar (Baird-Parker agar หรือ Vogel-Johnson agar) ลงในหลอดแต่ละหลอด โดยแต่ละหลอดมีพลาสมาของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 0.5 มิลลิลิตร โดยควรเป็นพลาสมาของกระต่ายหรือม้า เติมสารหรือไม่มีสารเติมแต่งที่เหมาะสม
    3. บ่มหลอดทดลองในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 ˚C [ตรวจสอบหลอดทดลองหลังจากผ่านไป 3 ชั่วโมง และจากนั้นในช่วงเวลาที่เหมาะสมจนถึง 24 ชั่วโมง]
    4. แปลผลการพิสูจน์เอกลักษณ์:

| **ผลการทดสอบโคอะกูเลส [ตัวอย่าง]** | | | |
| --- | --- | --- | --- |
| Positive control | Negative  control | Test (unknown) | สรุป |
| + | - | + | พบ (แกรมบวก) |
| + | + | + | ไม่สามารถแปลผลได้ (Invalid) |
| - | + | + | ไม่สามารถแปลผลได้ (Invalid) |
| + | - | - | ไม่พบ (แกรมลบ) |
| - | - | - | ไม่สามารถแปลผลได้ (Invalid) |

#### ***การคำนวณ***

-

#### ***เกณฑ์การยอมรับ***

ไม่พบเชื้อ (ผลลบ) ใน … กรัม หรือ … มล. [ตามข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์]

#### ***การรายงานผล***

[บันทึกผลในระบบบริหารจัดการตามที่บริษัทกำหนด]

รายงานผลการตรวจไม่พบเชื้อ (ลบ) หรือมีเชื้อ (บวก) ในตัวอย่าง … กรัมหรือ … มล.

หากพบเชื้อที่สงสัยว่าเป็นโคโลนี ควรบันทึกผลการตรวจเชื้อ

#### ***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]