
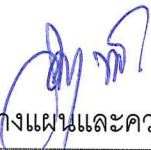
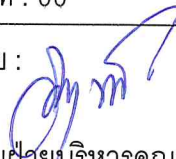
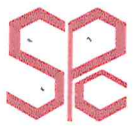




บริษัท นอร์ทเทอรัน ฟู้ด คอมเพล็กซ์ จำกัด

วิธีการปฏิบัติงาน	เรื่อง คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ Coliform และ E.coli ยี่ห้อ <i>Biomerieux</i>	หน้า 1 ของ 1
รหัสเอกสาร : SP-QC-99	วันที่ประกาศใช้ : 26 กรกฎาคม 2562	แก้ไขครั้งที่ : 00
จัดทำโดย :  หัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพ	ทบทวนโดย :  ผู้จัดการฝ่ายวางแผนและควบคุมการผลิต	อนุมัติโดย :  ตัวแทนฝ่ายบริหารคุณภาพ

ต้นฉบับ



บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด

SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD

1759 ซอยวชิรธรรมสาธิต 57 ถนนสุขุมวิท 101/1 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ 10260
1759 Soi Wachirathamsathit 57 Sukhumvit 101/1 Rd., Bangchak Prakanong Bangkok 10260 Thailand
Tel. 0-2185-4333 Fax. 0-2331-8809 Email : info@spcgroup.co.th Website : www.spcgroup.co.th



1. วัตถุประสงค์

สำหรับเป็นคู่มือปฏิบัติงานให้กับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการทดสอบเชื้อ Coliforms และ β D-glucuronidase positive *E. coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ chromID™ Coli agar (COLI ID-F) ตาม certified NF VALIDATION according to ISO 16140 no. BIO12/19-12/06. และ BIO 12/5-01/99

2. ขอบข่าย

วิธีการปฏิบัติงานนี้ครอบคลุมการทดสอบหาเชื้อ Coliforms และ

β D-glucuronidase positive *E. coli* ในตัวอย่างอาหารคน และตัวอย่างน้ำเพื่อการบริโภค (น้ำประปา และน้ำบรรจุขวด) ที่วิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการ

3. อ้างอิง

- 3.1 Certified Protocols NF VALIDATION (BIO12/19-12/06.)
- 3.2 Certified Protocols NF VALIDATION (BIO 12/5-01/99.)
- 3.3 ISO 16140 :2016
- 3.4 ISO 8199
- 3.5 ISO 9308-1
- 3.4 คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ chromID™ Coli agar (COLI ID-F)

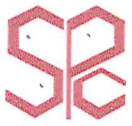
4. คำนิยาม และหลักการ

อาหารเลี้ยงเชื้อ chromID™ Coli agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Chromogenic medium สำหรับใช้ในการตรวจนับเชื้อ β D-glucuronidase positive *Escherichia coli* และเชื้อกลุ่ม Coliforms bacteria

chromID™ Coli agar มีส่วนประกอบที่เป็นตัวคัดแยกเชื้อหลักๆ 2 ชนิด คือ ส่วนประกอบชนิดที่ 1 เป็นส่วนประกอบที่ใช้สำหรับการตรวจจำแนกเชื้อ β D-glucuronidase positive *E. coli* โดยจะให้ลักษณะ โคโลนีสีชมพู หรือสีม่วง ส่วนประกอบที่ 2 เป็นส่วนประกอบที่ใช้สำหรับการตรวจจำแนกเชื้อกลุ่ม galactosidase positive หรือ กลุ่มเชื้อ Coliforms โดยจะให้ลักษณะ โคโลนีสี ฟ้ำ หรือ สีเทา (สำหรับ Gram negative bacteria อื่นๆ จะให้โคโลนีสีใส ไม่มีสี) นอกจากนี้ยังยับยั้งการเจริญของเชื้อแกรมบวก แทบทั้งหมดด้วย

	β D-glucuronidase positive <i>E. coli</i>	Other coliforms	Other Gram negatives
Color	Pink/violet	Blue/grey	Colorless
Size (mm)	0.5 - 2.0	0.5 - 2.0	0.1 - 1.0

ต้นฉบับ



บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด
SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD

1759 ซอยวชิรธรรมสาธิต 57 ถนนสุขุมวิท 101/1 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ ๑ 10260
1759 Soi Wachirathamsathit 57 Sukhumvit 101/1 Rd., Bangchak Prakanong Bangkok 10260 Thailand
Tel. 0-2185-4333 Fax. 0-2331-8809 Email : info@spcgroup.co.th Website : www.spcgroup.co.th



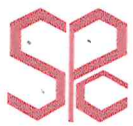
5. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 5.1 เครื่องชั่ง ชั่งได้ละเอียดถึง 0.1 กรัม และ 0.01 กรัม
- 5.2 Stomacher และ Stomacher bag
- 5.3 Inoculating needle และ Inoculating loop
- 5.4 ช้อน กรรไกร และ forceps ปลดเชื้อ
- 5.5 ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร
- 5.6 Incubator $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 5.7 Incubator $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 5.8 เครื่อง water-baths ที่ตั้งอุณหภูมิได้ตั้งแต่ $50 - 95^{\circ}\text{C}$
- 5.9 เครื่อง water-baths ที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิที่ $44 - 47^{\circ}\text{C}$
- 5.10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบปลอดเชื้อ
- 5.11 เครื่องกรอง และ กระดาษกรอง

6. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 6.1 Buffer Peptone water
- 6.2 Peptone Salt Solution
- 6.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ chromID™ Coli agar (COLI ID-F) (REF. 42017)
 - 6.3.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 6.3.1.1 นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
 - 6.3.1.2 คลายฝาขวด ให้หลวมเล็กน้อย
 - 6.3.1.3 วางขวดอาหารเลี้ยงเชื้อลงในเครื่อง water-baths ที่ตั้งค่าอุณหภูมิประมาณ 50°C จากนั้น จึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 95°C และตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งละลาย (ประมาณ 45 นาที)
 - 6.3.1.4 หมุนฝาขวดปิดกลับ (สวมถุงมือเพื่อป้องกันความ ร้อน) และ ทำการ เช้าเบาๆ ให้เข้ากัน
 - 6.3.1.5 ตั้งขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 15 วินาทีก่อนนำไปตั้งไว้ใน เครื่อง water-baths ที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิที่ $44 - 47^{\circ}\text{C}$ จนกว่าจะใช้งาน ซึ่งไม่ควรตั้งทิ้ง ไว้เกิน 6 ชั่วโมง

ต้นฉบับ



บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด

SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD

1759 ซอยวชิรธรรมสาธิต 57 ถนนสุขุมวิท 101/1 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ 10260
1759 Soi Wachirathamsathit 57 Sukhumvit 101/1 Rd., Bangchak Prakanong Bangkok 10260 Thailand
Tel. 0-2185-4333 Fax. 0-2331-8809 Email : info@spcgroup.co.th Website : www.spcgroup.co.th



7. การควบคุมคุณภาพ

- 7.1 การทำ QC Air Sampling บริเวณที่วิเคราะห์ โดยกำหนดไม่เกิน 15 โคโลนี/เพลท/15 นาที
- 7.2 อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบต้องเป็นอุปกรณ์ปลอดเชื้อทั้งหมด รวมถึงอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบด้วย
- 7.3 ในทุกขั้นตอนของการทดสอบต้องใช้ Aseptic technique
- 7.4 ระวังเรื่อง การปนเปื้อนและการปนเปื้อนข้ามของจุลินทรีย์

8. ขั้นตอนการวิเคราะห์

8.1 วิธีการผ่านการรับรองจาก NF Validation

8.1.1 การนับจำนวน β D-glucuronidase positive *E. coli* ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส

(NF VALIDATION certificated No. BIO 12/5-01/99)

8.1.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างอย่างน้อย 25 กรัม แล้วเติม Peptone Salt Solution (หรือ Sterile Diluent อื่นๆ) ในอัตราส่วน 1: 9 (หรือ 225 มิลลิลิตร)

8.1.1.2 ตีบดผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ด้วยเครื่องตีบด ผสมตัวอย่าง

8.1.1.3 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ

8.1.1.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ chrom ID™ Coli agar ที่มีอุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส ปริมาตร 15 มิลลิลิตร

8.1.1.5 ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้จนอาหารแข็ง (หากตัวอย่างอาหารที่นำมาทดสอบ มีการปนเปื้อนของเชื้อสูง ให้ทำการเททับด้วย chrom ID™ Coli agar ประมาณ 5 มิลลิลิตรอีกครั้ง และรอให้อาหารแข็ง)

8.1.1.6 คว่ำเพลท และนำเข้าบ่มที่ตู้บ่ม 44 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

8.1.1.7 อ่านผลลักษณะ Typical colony ที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี (โคโลนีรวมทั้งหมด ไม่เกิน 300โคโลนี)

8.1.2 การนับจำนวน β D-glucuronidase positive *E. coli* และ Coliforms ที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส (NF VALIDATION certificated No.BIO12/19-12/06.)

8.1.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

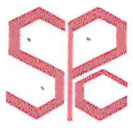
เตรียมตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างอย่างน้อย 25 กรัม แล้วเติม Peptone Salt Solution (หรือ Sterile Diluent อื่นๆ) ในอัตราส่วน 1: 9 (หรือ 225 มิลลิลิตร)

8.1.2.2 ตีบดผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ด้วยเครื่องตีบด ผสมตัวอย่าง

8.1.2.3 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ

8.1.2.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ chrom ID™ Coli agar ที่มีอุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส

ต้นฉบับ



ปริมาตร 15 มิลลิลิตร

- 8.1.2.5 ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้จนอาหารแข็ง (เพื่อช่วยให้การอ่านผลเป็นไปได้ง่ายขึ้น แนะนำให้ผู้ใช้งานทำการเททับด้วย chrom ID™ Coli agar ประมาณ 5 มิลลิลิตรอีกครั้ง และรอให้อาหารแข็ง เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่อาจปรากฏหลังจากการบ่ม)
- 8.1.2.6 คว่ำเพลท และนำเข้าบ่มที่ตู้บ่ม 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง
- 8.1.2.7 อ่านผลลักษณะ Typical colony ที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี (โคโลนีรวมทั้งหมด ไม่เกิน 300 โคโลนี)

8.2 วิธีการที่ไม่ได้ผ่านการรับรองจาก NF Validation

8.2.1 การนับจำนวน β D-glucuronidase positive *E. coli* และ Coliforms ในตัวอย่างน้ำเพื่อการบริโภค (เช่นน้ำประปา หรือน้ำบรรจุขวด)

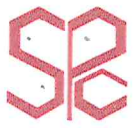
8.2.1.1 การอาหารเลี้ยงเชื้อ และเตรียมตัวอย่าง

- ทำการเทอาหาร chrom ID™ Coli agar ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในเพลทอาหาร รอจนอาหารแข็ง และทำให้ผิวหน้าอาหารแห้ง
- กรองตัวอย่างน้ำ ตามปริมาตร ที่ต้องการทดสอบ เช่น 100 หรือ 250 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองตามวิธีมาตรฐาน ISO9308-1

8.2.1.2 นำกระดาษกรองวางบนผิวหน้าอาหาร chrom ID™ Coli agar ไม่ให้เกิดฟองอากาศ

8.2.1.3 นำเข้าบ่มที่ตู้บ่ม 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ± 3 ชั่วโมง

8.2.1.4 อ่านผลลักษณะ Typical colony ที่ขึ้นบนกระดาษกรอง ทำการคำนวณจำนวนของเชื้อ β D-glucuronidase positive *E. coli* และโคลิฟอร์มที่ปรากฏต่อปริมาตรตัวอย่างน้ำตามมาตรฐาน ISO 8199



บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด
SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD

1759 ซอยวชิรธรรมสาธิต 57 ถนนสุขุมวิท 101/1 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ ๑0260
1759 Soi Wachirathamsathit 57 Sukhumvit 101/1 Rd., Bangchak Prakanong Bangkok 10260 Thailand
Tel. 0-2185-4333 Fax. 0-2331-8809 Email : info@spcgroup.co.th Website : www.spcgroup.co.th



Certificate Number TH03/2708



Certificate Number TH00/2709



9. การอ่านผลการทดสอบ

อ่านลักษณะโคโลนี

- เชื้อ β D-glucuronidase positive *E. coli* จะให้ลักษณะโคโลนีสีชมพูเข้ม จนถึงสีม่วง
- เชื้อ Coliforms จะให้ลักษณะโคโลนีสีฟ้า-เทา
- เชื้ออื่นๆ จะให้ลักษณะโคโลนีไม่มีสี

	β D-glucuronidase positive <i>E. coli</i>	เชื้อโคลิฟอร์มอื่นๆ	เชื้อแกรมลบอื่นๆ
สี	ชมพู/ ม่วง	ฟ้า/ เทา	ไม่มีสี
ขนาด (mm.)	0.5 - 2.0	0.5 - 2.0	0.1 - 1.0

10. การรายงานผลการทดสอบ

รายงานผลในหน่วยของ CFU ต่อตัวอย่างกรัม หรือ มิลลิลิตร

11. การเก็บรักษา

- 11.2 เก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 2-8°C
- 11.2 หลีกเลี้ยงไม่ให้สัมผัสกับแสงโดยตรง

ต้นฉบับ



Validation of alternative
analysis methods
NF 102 - Application to the food industry

Certificate

Certificate No.: BIO 12/05-01/99
Renewal decision dated: 27-11-2014
Expiry date: 19-01-2019

The Company:

bioMérieux
Chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile - France

Is authorized to affix the NF VALIDATION mark on the alternative analysis method cited below, in accordance with the NF VALIDATION general rules and the certification rules NF 102 - Validation of alternative analysis methods (Application to the food industry):

chromID™ Coli Agar (COLI ID-F)

Validated for the enumeration of *β*-glucuronidase-positive *Escherichia coli* at 44 °C

Technical sheet
reference's
Ref. 42 017 - 08142 version J

This decision attests that the alternative analysis method has been assessed by AFNOR Certification and found to conform to the standards cited in page 212 and complementary requirements, as specified in the certification reference document. The principal certified characteristics are the analytical performances, as defined in the associated validation study summarized report (linearity, relative accuracy ...), available on the certification dedicated website <http://nf-validation.org/en>.

This certificate supersedes all previous certificates (last version dated 24-05-2012). This NF VALIDATION certificate, included 2 pages, is valid until 19th January 2019. It is subject to the results obtained upon regular controls carried out by AFNOR Certification. Appropriate decision is made by AFNOR Certification in accordance with the NF VALIDATION general rules and certification rules NF 102 - Validation of alternative analysis methods (Application to the food industry).



AFNOR
CERTIFICATION
11, rue Francis de Pressensé - 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France - T. +33 (0)1 41 62 80 00 - F. +33 (0)1 49 17 50 00
SAS au capital de 18 187 000 € - 479 076 002 RCS Nanterre - www.afnor.org

Managing Director
Franck LEBEUGLE

Page 1/2



Validation of alternative
analysis methods
NF 102 - Application to the food industry

Certificate

Certificate No.: BIO 12/05-01/99
Renewal decision dated: 27-11-2014
Expiry date: 19-01-2019

The alternative analysis method:

chromID™ Coli Agar (COLI ID-F)

Validated for the enumeration of *β*-glucuronidase-positive *Escherichia coli* at 44 °C

Manufactured by:

bioMérieux
Zone d'activités des Lias
5, rue des aigues
69280 Craponne - France

Has been certified according to the reference documents and the application scope specified here after:

Validation protocol	NF EN ISO 16140 (October 2003): Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods.
Reference method(s)	NF ISO 16649-2 (July 2001): Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of <i>β</i> -glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i> - Part 2: colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl <i>β</i> -D-glucuronate.
Scope	All human food products.
Restriction(s)	None.
Warning	None.
Other Informations	Non applicable.

Please send any queries concerning the performances of the certified alternative method to AFNOR Certification.

You may download the validation study summarized report on <http://nf-validation.org/en>.

ข้อมูล

Page 2/2



Validation of alternative
analysis methods
NF 102 - Application to the food industry

Certificate

Certificate No.: BIO 12/19-12/06
Renewal decision dated: 27-11-2014
Expiry date: 14-12-2018

The Company:

bioMérieux
Chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile - France

Is authorized to affix the NF VALIDATION mark on the alternative analysis method cited below, in accordance with the NF VALIDATION general rules and the certification rules NF 102 - Validation of alternative analysis methods (Application to the food industry):

chromID™ Coli Agar (COLI ID-F)

Validated for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* at 37°C

Technical sheet
reference s
Ref: 42 017 - 08142 version J

This decision attests that the alternative analysis method has been assessed by AFNOR Certification and found to conform to the standards cited in page 2/2 and complementary requirements, as specified in the certification reference document. The principal certified characteristics are the "analytical performances" as defined in the associated validation study summarized report (hereby, relative accuracy ...), available on the certification dedicated website <http://nf-validation.org/en>.

This certificate supersedes all previous certificates (last version dated: 16-03-2011). This NF VALIDATION certificate, included 2 pages, is valid until 14th December 2018. It is subject to the results obtained upon regular controls carried out by AFNOR Certification. Appropriate decision is made by AFNOR Certification in accordance with the NF VALIDATION general rules and certification rules NF 102 - Validation of alternative analysis methods (Application to the food industry).



AFNOR
CERTIFICATION
ET SERVICES
11, rue Francis de Pressensé - 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France - T. +33 (0)1 41 62 80 00 - F. +33 (0)1 49 17 90 00
SAS au capital de 18 187 000 € - 479 076 002 RCS Bobigny - www.afnor.org

Managing Director
Franck LEBEUGLE

Issue dated: 22-12-2014

Page 1/2



Validation of alternative
analysis methods
NF 102 - Application to the food industry

Certificate

Certificate No.: BIO 12/19-12/06
Renewal decision dated: 27-11-2014
Expiry date: 14-12-2018

The alternative analysis method:

chromID™ Coli Agar (COLI ID-F)

Validated for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* at 37°C

Manufactured by:

bioMérieux
Zone d'activités des Lias
5, rue des séquestrés
69280 Craponnot - France

Has been certified according to the reference documents and the application scope specified here after:

Validation protocol	NF EN ISO 16140 (October 2003): Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods.
Reference method(s)	NF ISO 16649-2 (July 2001): Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i> - Part 2: colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronate.
Scope	All human food products.
Restriction(s)	None.
Warning	None.
Other informations	Non applicable.

Please send any queries concerning the performances of the certified alternative method to AFNOR Certification.

You may download the validation study summarized report on <http://nf-validation.afnor.org/en>.

ค้นหาแบบ

Issue dated: 22-12-2014

Page 2/2