

วิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์อาหาร

เล่มที่ 6

Standard Methods for Food Analysis

Volume VI



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์อาหาร

เล่มที่ 6

Standard Methods for Food Analysis

Volume VI



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 6

Standard Methods for Food Analysis, Volume VI

พิมพ์ครั้งที่ 1: สิงหาคม 2561

จำนวน 1,000 เล่ม

ISBN: 978-616-11-3733-5

สงวนลิขสิทธิ์

ที่ปรึกษา

นายแพทย์บัลลังก์ อุปพงษ์

ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร

นางนิภาภรณ์ ลักษณัสมยา

ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านความปลอดภัยของอาหาร

จัดพิมพ์เผยแพร่โดย

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อ.เมือง จ.นนทบุรี

<http://www.dmsc.moph.go.th>

โทรศัพท์/ โทรสาร 0 2951 1021

<http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/index.htm>

พิมพ์ที่

บริษัท พีทู ดีไซน์ แอนด์ พรินท์ จำกัด

100/48 ซอยโยธินพัฒนา ถนนประดิษฐ์มนูธรรม

แขวงคลองจั่น เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร 10240

คำปรารภ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีภารกิจที่สำคัญประการหนึ่งคือ การยกระดับคุณภาพ และศักยภาพของห้องปฏิบัติการอย่างสอดคล้องกับข้อกำหนดที่เกี่ยวข้อง เพื่อความพึงพอใจ ของผู้รับบริการ และประโยชน์สุขของประชาชน ห้องปฏิบัติการด้านวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีทั้งที่ส่วนกลางคือสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และส่วนภูมิภาคคือศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 14 แห่ง กระจายอยู่ทุกภูมิภาคทั่วประเทศ ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจะถูกนำไปใช้ในการกำกับดูแลควบคุมคุณภาพอาหาร ให้สอดคล้องกับมาตรฐานของประเทศและมาตรฐานระหว่างประเทศ รวมทั้งใช้เป็นหลักฐาน ทางคดี ในกรณีที่คุณภาพอาหารไม่เป็นไปตามมาตรฐานกำหนด หรือเมื่อเกิดปัญหา ความขัดแย้ง ทั้งด้านคุณภาพและความปลอดภัย ดังนั้นคุณภาพและความน่าเชื่อถือของ ผลการตรวจวิเคราะห์ ตลอดจนการยอมรับในระดับประเทศและนานาชาติเป็นสิ่งจำเป็น ห้องปฏิบัติการจึงต้องเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ที่ทันสมัย เหมาะสม เป็นที่ยอมรับ และมีการ ควบคุมคุณภาพตามแนวทางสากล

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ได้จัดทำ หนังสือวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร โดยรวบรวมและคัดเลือกวิธีวิเคราะห์ ตามหลักเกณฑ์และแนวทางที่สากลยอมรับ และจัดทำอย่างต่อเนื่อง โดยเล่มนี้เป็นเล่มที่ 6 มีวิธีมาตรฐานรวม 21 วิธี เป็นวิธีมาตรฐานทางเคมี 8 วิธี ทางกายภาพ 2 วิธี และทางชีวโมเลกุล 3 วิธี สำหรับวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาได้ทบทวนให้เป็นวิธีที่ทันสมัย 8 วิธี เพื่อให้ ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปฏิบัติเป็น มาตรฐานเดียวกัน ห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนสามารถนำไปใช้เป็นวิธีปฏิบัติงาน หรือใช้เป็นวิธีอ้างอิงในการวิเคราะห์อาหาร ทำให้ได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ ผู้รับบริการพึงพอใจ ประชาชนมีความสุขมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น เป็นประโยชน์ทั้งด้าน เศรษฐกิจและสังคมโดยรวมของประเทศไทย



(นายแพทย์สุชุม กาญจนพิมาย)

อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

11 มิถุนายน 2561

สารบัญ

	หน้า
วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	9
นิยามและคำย่อ	11
รหัสวิธี	13
DMSc F 1083: การวิเคราะห์ปริมาณน้ำ (ความชื้น) ในน้ำผึ้ง	15
DMSc F 1084: การวิเคราะห์ปริมาณ hydroxymethylfurfural ในน้ำผึ้ง	19
DMSc F 1085: การวิเคราะห์ปริมาณ diastase activity ในน้ำผึ้ง	23
DMSc F 1086: การวิเคราะห์ปริมาณ โซเดียมในเครื่องดื่มเกลือแร่	29
DMSc F 1087: การวิเคราะห์ปริมาณ โพแทสเซียมในเครื่องดื่มเกลือแร่	33
DMSc F 1088: การวิเคราะห์ปริมาณ โลหะหลายชนิด (multi-elements) ที่แพร่จากพลาสติกลงสู่อาหารจำลอง	37
DMSc F 1089: การวิเคราะห์ปริมาณปรอทในน้ำโดยเทคนิค HGAAS	49
DMSc F 1090: การวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนเมตาโบไลต์ในอาหาร โดยวิธี LC-MS/MS	53

สารบัญ

หน้า

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหาร	67
ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	
นิตยสารและคำย่อ	69
รหัสวิธี	69
DMSc F 2030: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Cronobacter</i> spp. ในอาหาร	71
DMSc F 2031: วิธีตรวจวิเคราะห์ Fecal enterococcus และ Fecal streptococcus ในน้ำและน้ำแข็ง	87
DMSc F 2032: วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i> ในอาหาร	105
DMSc F 2033: วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียในน้ำและน้ำแข็งโดยวิธี Pour plate และ Spread plate	137
DMSc F 2034: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Listeria</i> spp. และ <i>Listeria monocytogenes</i> ในอาหาร	151
DMSc F 2035: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. ในอาหาร	173
DMSc F 2036: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในอาหาร	193
DMSc F 2037: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร	215
วิธีมาตรฐานทางกายภาพสำหรับการวิเคราะห์อาหาร	241
ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	
รหัสวิธี	242
DMSc F 3004: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบาในแป้งข้าวเจ้า	243
DMSc F 3005: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบาในผลิตภัณฑ์ข้าวเจ้า	249

สารบัญ

	หน้า
วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุลสำหรับการวิเคราะห์อาหาร	253
ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	
รหัสวิธี	254
DMSc F 4018: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event DAS-59122-7	255
DMSc F 4019: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event TC1507	261
DMSc F 4020: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event T25	267
ภาคผนวก	
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1	273
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2	275
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3	277
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 4	280
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 5	282

วิธีมาตรฐานทางเคมี สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | | |
|---|-----------------------------|--|
| 1 | นางนิภารัตน์ ลักษณะสมยา | ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านความปลอดภัยของอาหาร |
| 2 | นางอุมา บริบูรณ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 3 | นางสาวกรรณิกา จิตติยศรา | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 4 | นางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 5 | นางจินตนา กิจเจริญวงศ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 6 | นางสาวนิตยา สอาด | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |

นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

1. “H₂O” หมายถึง น้ำกลั่น (distilled water) ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้น ๆ
2. สารเคมี (reagents) ทั้งหมดเป็น reagent grade ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้น ๆ
3. กรด และ ด่าง หมายถึง กรด และ ด่าง ที่มีความเข้มข้นดังในตาราง ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้นๆ

	ความเข้มข้น
Sulfuric acid	95.0-98.0% H ₂ SO ₄
Hydrochloric acid	36.5-38.0% HCl
Nitric acid	69.0-71.0% HNO ₃
Fuming nitric acid	≥ 90% HNO ₃
Acetic acid	≥ 99.7% CH ₃ COOH
Hydrobromic acid	47.0-49.0% HBr
Ammonium hydroxide	28-30% NH ₃
Phosphoric acid	≥ 85% H ₃ PO ₄

4. การใช้สัญลักษณ์ (ตัวเลข+ตัวเลข) หลังชื่อของสารเคมี เช่น HCl (1+2) หมายถึง สารผสมระหว่าง HCl 1 หน่วยปริมาตร กับ H₂O 2 หน่วยปริมาตร
5. คำย่อที่ใช้ และ คำเต็ม แสดงในตาราง

Abbreviation	Word/คำเต็ม
AAS	Atomic absorption spectrometer
Ac	acetyl, CH ₃ CO-
diam.	Diameter
FAAS	Flame atomic absorption spectrophotometer
g	Gram
g	gravity in centrifuging
GC	Gas Chromatograph
GFAAS	Graphite furnace atomic absorption spectrophotometer
HPLC	High performance liquid chromatograph
hr	hour
id	inner diameter or dimension
kg	kilogram
L	liter

Abbreviation	Word/คำเต็ม
LC	Liquid Chromatograph
m	meter, milli – as prefix
M	Molar
Me	Methyl, CH ₃ -
MeOH	Methanol, CH ₃ OH
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mm	millimeter
MS	Mass spectrometer
MW	molecular weight
MΩ	megaohm
N	Normal
ng	nanogram
-OAc	acetate
-OCN	cyanate
od	outer diameter or dimension
ppm	part per million
ppb	part per billion
rpm	round per minute
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
w/w	Weight per weight
wt	Weight
μg	microgram (10 ⁻⁶ g)
μL	microliter (10 ⁻⁶ L)
μm	Micron, micrometer (10 ⁻⁶ m)
/	per
%	percent
>	more than
<	less than
≥	equal to and more than
≤	equal to and less than

วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	สารที่ต้องการวัด	Method Type	หน้า
DMSc F 1083	น้ำผึ้ง	ปริมาณน้ำ (ความชื้น)	I	15
DMSc F 1084	น้ำผึ้ง	hydroxymethylfurfural	I	19
DMSc F 1085	น้ำผึ้ง	diastase activity	I	23
DMSc F 1086	เครื่องดื่มเกลือแร่	โซเดียม	III	29
DMSc F 1087	เครื่องดื่มเกลือแร่	โพแทสเซียม	III	33
DMSc F 1088	พลาสติก	โลหะหลายชนิด (multi-elements) ที่แพร่จากพลาสติกลงสู่อาหารจำลอง	III	37
DMSc F 1089	น้ำ	ปรอท	III	49
DMSc F 1090	อาหาร	สารกลุ่มไนโตรฟูแรน เมตาโบไลต์	III	53

DMSc F 1083: การวิเคราะห์ปริมาณน้ำ (ความชื้น) ในน้ำผึ้ง

Determination of water (moisture) in honey

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำ (ความชื้น) ในน้ำผึ้งโดย refractometer

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 AOAC Official Method 969.38 Moisture in Honey, B. By Mean of Refractometer

2.2 Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2009. IHC responsible for the methods: Stefan Bogdanov, Bee Product Science, P. 10-15.

3. หลักการ (Principle)

วิเคราะห์ปริมาณน้ำ (ความชื้น) ในน้ำผึ้ง โดยวัดค่าดัชนีหักเหของแสง หรือ refractive index (RI) ในน้ำผึ้งด้วยเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ยง่ายและมีความเที่ยง แต่เป็นการวิเคราะห์ทางอ้อม (indirect determination) เนื่องจากค่า RI เป็นการวัดความเข้มข้นหรือความหนาแน่นของสารในน้ำผึ้งไม่ใช่การวัดปริมาณน้ำในตัวอย่างโดยตรง จากนั้นนำค่า RI ที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำ (ความชื้น) จากตารางมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำ (หน่วยเป็นร้อยละของน้ำหนัก) และค่า RI ที่กำหนดอุณหภูมิการวัดที่ 20°C หรือ คำนวณโดยใช้สูตรสมการของ Wedmore

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ (refractometer) สามารถควบคุมอุณหภูมิขณะวัด 20°C

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 แท่งแก้ว (glass stirring rod)

4.2.2 Wide mouth bottle ขนาด 250 ml

4.2.3 หลอดหยด (dropper)

4.2.4 ช้อนพลาสติก กรรไกร และ กระจก เป็นต้น สำหรับการจัดการตัวอย่าง

4.2.5 กระจกทึบหรือ กระจกเช็ดเลนส์

5. สารเคมี (Reagents)

- 5.1 น้ำกลั่น 3 ครั้ง หรือน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) ใช้สำหรับตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องมือก่อนใช้งานและใช้ทำความสะอาดปริซึม
- 5.2 Ethanol 95% ใช้ทำความสะอาดปริซึมให้สะอาดและแห้ง

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ให้ทำเมื่อจะเริ่มวิเคราะห์ ไม่ควรทำการสุ่มตัวอย่างทิ้งไว้ โดยให้สุ่มตัวแทนตัวอย่างมาอย่างน้อย 60% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด เปิดภาชนะตัวอย่างแล้วผสมลงใน wide mouth bottle ที่สะอาด คนตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างช้าๆ และเบา (ประมาณ 3 นาที) ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ หรือให้เกิดน้อยที่สุด แบ่งตัวอย่างประมาณ 200 ml เก็บใน wide mouth bottle ที่สะอาด ปิดฝาให้แน่นสนิทก่อนนำไปวิเคราะห์
- 6.2 กรณีตัวอย่างที่มีผลึกน้ำตาลให้อุ่นตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ $50 \pm 20^{\circ}\text{C}$ จนกระทั่งผลึกน้ำตาลละลาย ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง คนให้เข้ากันอีกครั้งก่อนนำไปวิเคราะห์

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 สอบเทียบเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ด้วยน้ำกลั่น (ข้อ 5.1) ทุกครั้งก่อนใช้งาน แล้วทำปริซึมให้สะอาดและแห้ง ตามคู่มือการใช้งานเครื่อง
- 7.2 หยดน้ำผึ้งลงในช่องใส่ตัวอย่างของเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ ปิดฝา
- 7.3 รอสถานะเครื่องพร้อม และแสดงอุณหภูมิเท่ากับค่าที่ตั้งไว้ (ที่ 20°C) อ่านค่า RI
- 7.4 ทำการวิเคราะห์ครั้งที่ 2 (duplicate) โดยทำตามข้อ 7.2 และ 7.3
- 7.5 คำนวณปริมาณน้ำ (ความชื้น) จากตาราง (Table 969.38. Relationship between refractive index and water contents of honeys) หรือคำนวณจากสูตรสมการของ Wedmore
- 7.6 ทำความสะอาดปริซึมของเครื่องตามคู่มือการใช้งานเครื่อง

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

จาก สูตรสมการของ Wedmore

$$\text{ปริมาณน้ำ (ร้อยละของน้ำหนัก)} = [-0.2681 - \log (RI-1)] / 0.002243$$

เมื่อ RI = ค่า refractive index ที่วัดได้ของตัวอย่างที่อุณหภูมิ 20°C

ค่า RI ที่วัดควรอยู่ในช่วง 1.4740-1.5044 หรือ มีปริมาณความชื้นระหว่าง ร้อยละ 25-13

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องก่อนใช้งาน โดยสอบเทียบด้วยน้ำกลั่นทุกครั้ง
(RI=1.33299 ที่ 20°C)

9.2 ทำการวิเคราะห์โดยวัดค่า RI 2 ซ้ำ (duplicate) ทุกตัวอย่าง ค่าความแตกต่างของ
ความชื้น ที่คำนวณได้ทั้ง 2 ครั้ง ไม่เกิน 0.20

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี (method verification) ที่ระดับปริมาณน้ำ
(ความชื้น) ร้อยละ 17-19

10.1.1 Repeatability: % RSD_r มีค่าระหว่าง 0.17-0.33

10.1.2 within reproducibility: %RSD_R มีค่าระหว่าง 2.57-2.59

10.2 ตารางความสัมพันธ์ระหว่างค่า Refractive Index และปริมาณน้ำของน้ำผึ้ง
(Relationship between refractive index and water contents of honeys)

Table 969.38. Relationship between refractive index and water contents of honeys^a

Water content, %	Refractive Index			Water content, %	Refractive Index		
	20°C ^b	60°F ^c	40°C		20°C ^b	60°F ^c	40°C
13.0	1.5044	1.5053	1.4998	19.0	1.4890	1.4900	1.4845
13.2	1.5038	1.5048	1.4993	19.2	1.4885	1.4895	1.4840
13.4	1.5033	1.5043	1.4988	19.4	1.4880	1.4890	1.4835
13.6	1.5028	1.5038	1.4983	19.6	1.4875	1.4885	1.4829
13.8	1.5023	1.5033	1.4978	19.8	1.4870	1.4880	1.4824
14.0	1.5018	1.5027	1.4973	20.0	1.4865	1.4875	1.4819
14.2	1.5012	1.5022	1.4968	20.2	1.4860	1.4870	1.4814
14.4	1.5007	1.5017	1.4962	20.4	1.4855	1.4865	1.4809
14.6	1.5002	1.5012	1.4957	20.6	1.4850	1.4860	1.4804
14.8	1.4997	1.5007	1.4952	20.8	1.4845	1.4855	1.4799
15.0	1.4992	1.5002	1.4947	21.0	1.4840	1.4850	1.4794
15.2	1.4987	1.4997	1.4942	21.2	1.4835	1.4845	1.4788
15.4	1.4982	1.4992	1.4937	21.4	1.4830	1.4840	1.4783
15.6	1.4976	1.4986	1.4932	21.6	1.4825	1.4835	1.4778
15.8	1.4971	1.4981	1.4927	21.8	1.4820	1.4830	1.4773
16.0	1.4966	1.4976	1.4922	22.0	1.4815	1.4825	1.4768
16.2	1.4961	1.4971	1.4916	22.2	1.4810		
16.4	1.4956	1.4966	1.4911	22.4	1.4805		
16.6	1.4951	1.4961	1.4906	22.6	1.4800		
16.8	1.4946	1.4956	1.4901	22.8	1.4795		
17.0	1.4940	1.4951	1.4896	23.0	1.4790		
17.2	1.4935	1.4946	1.4891	23.2	1.4785		
17.4	1.4930	1.4940	1.4886	23.4	1.4780		
17.6	1.4925	1.4935	1.4881	23.6	1.4775		
17.8	1.4920	1.4930	1.4876	23.8	1.4770		
18.0	1.4915	1.4925	1.4870	24.0	1.4765		
18.2	1.4910	1.4920	1.4865	24.2	1.4760		
18.4	1.4905	1.4915	1.4860	24.4	1.4755		
18.6	1.4900	1.4910	1.4855	24.6	1.4750		
18.8	1.4895	1.4905	1.4850	24.8	1.4745		
				25.0	1.4740		

^a Values for 20°C and 60°F are Wedmore's calculations [Bee World 36, 197(1955)]; 40°C values are calculated from Auerbach and Borries equation [Z. Nahr. Genussm. 22, 353-358(1924)]. Values >22.0% were extended by FAO/WHO Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (1968).

^b If refractive index is measured at temperature above (below) 20°C, add (subtract) 0.00023/°C above (below) 20°C before using table.

^c If refractive index is measured at temperature above (below) 60°F, add (subtract) 0.00013/°F above (below) 60°F before using table.

DMSc F 1084: การวิเคราะห์ปริมาณ hydroxymethylfurfural ในน้ำผึ้ง

Determination of hydroxymethylfurfural in honey

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ Hydroxymethylfurfural (HMF) ในน้ำผึ้งโดย Spectrophotometric method

2. เอกสารอ้างอิง (References)

2.1 AOAC Official Method 980.23 Hydroxymethylfurfural in Honey

3. หลักการ (Principle)

การวิเคราะห์ hydroxymethylfurfural (HMF) ในน้ำผึ้ง สามารถวิเคราะห์โดยการวัดค่า absorbance ของ HMF ด้วย Spectrophotometer ที่ wavelength 284 nm เติม bisulphite เพื่อกำจัดสารรบกวนอื่นๆ วัด background absorbance ที่ wavelength 336 nm คำนวณค่า absorbance ที่ต่างกันระหว่างสารละลายตัวอย่างน้ำผึ้งที่เตรียม (Sample solution) กับ สารละลายตัวอย่างน้ำผึ้ง ที่เติม bisulphite (Reference solution) แล้วหักลบกับค่า background absorbance ที่ wavelength 336 nm คำนวณปริมาณ HMF และรายงานค่า ในหน่วย mg/kg

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 Spectrophotometer สามารถวัดค่า absorbance ที่ 284 และ 336 nm

4.1.2 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.1.3 Vortex mixer

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 Test tube ขนาด 18x150 ml

4.2.2 Cuvette ขนาด 1 ml

4.2.3 Volumetric flask ขนาด 50, 100 ml

4.2.4 Beaker ขนาด 50, 100 ml

- 4.2.5 Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml
- 4.2.6 Graduate pipette ขนาด 1 ml
- 4.2.7 Autopipette ขนาด 5 ml
- 4.2.8 กรวยกรอง
- 4.2.9 ขวดน้ำกลั่น
- 4.2.10 กระดาษกรอง Whatman No.1 หรือเทียบเท่า

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 M\Omega\cdot cm$

5.1 Carrez I solution (เก็บได้นาน 6 เดือน): ละลาย potassium hexacyanoferrate

($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) 15.0 g ด้วย H_2O ประมาณ 30 ml ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.2 Carrez II solution (เก็บได้นาน 6 เดือน): ละลาย Zinc acetate ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) 30.0 g ด้วย H_2O ประมาณ 80 ml แล้วถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรจนครบด้วย H_2O

5.3 Sodium bisulphite solution 0.2% (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน): ละลาย Sodium hydrogen sulphite ($NaHSO_3$) 0.20g ด้วย H_2O ประมาณ 30 ml ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรจนครบด้วย H_2O

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ลุ่มตัวแทนตัวอย่างอย่างน้อย 60% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด เปิดภาชนะตัวอย่างแล้วทดสอบลงในภาชนะที่สะอาด คนตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างช้าๆและเบา (ประมาณ 3 นาที) ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ หรือให้เกิดน้อยที่สุด แบ่งตัวอย่างประมาณ 200 ml เก็บใน wide mouth bottle ที่สะอาด ปิดฝาให้แน่นสนิทก่อนนำไปวิเคราะห์ (ห้ามให้ความร้อนกับตัวอย่าง)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 5.0 g ใส่ใน beaker ขนาด 20 ml ละลายด้วย H_2O 10 ml ถ่ายสารละลายลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml
- 7.2 เติม Carrez I 0.5 ml และ Carrez II 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน
- 7.3 เติม Ethanol 2-3 หยด เพื่อกำจัดฟองอากาศ จากนั้นปรับปริมาตรด้วย H_2O จนครบ 50 ml เขย่าให้เข้ากัน
- 7.4 ค่อยๆ กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองโดยทิ้งส่วนแรกที่กรองได้ประมาณ 10 ml
- 7.5 ปิเปิดสารละลายที่ได้หลังจากกรอง ลงในหลอดทดลองขนาด 18 x 150 ml จำนวน 2 หลอด หลอดละ 5 ml จากนั้นหลอดที่ 1 เติม 0.2% $NaHSO_3$ ปริมาณ 5 ml (Reference solution) หลอดที่ 2 เติม H_2O 5 ml (Sample solution) แสดงดังตารางที่ 1 ผสมแต่ละหลอดให้เข้ากันด้วย Vortex mixer

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนผสมของปริมาตรสารละลายแต่ละหลอด

Additions to test-tube	Reference solution (หลอด 1)	Sample solution (หลอด 2)
Initial honey solution	5.0 ml	5.0 ml
Water	-	5.0 ml
0.2% Sodium bisulphite solution	5.0 ml	-

- 7.6 วัดค่า absorbance ของ Sample solution เทียบกับ Reference solution ด้วย spectrophotometer ที่ wavelength 284 และ 336 nm
- 7.7 กรณีที่ค่า absorbance ที่ wavelength 284 มากกว่า 0.6 ให้ dilute สารละลายในข้อ 7.4 ตามความเหมาะสม (ให้ค่า absorbance อยู่ในช่วง 0.3-0.4) แล้วทำการทดลองตามข้อ 7.5-7.6 ต่อไป

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

คำนวณค่า Hydroxymethylfurfural (HMF) ในน้ำผึ้งได้ดังสมการ

$$\text{HMF (mg/kg)} = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 149.7 \times 5}{W}$$

เมื่อ A_{284} คือ ค่า absorbance ที่ 284 nm

A_{336} คือ ค่า absorbance ที่ 336 nm

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (g)

$$\text{Constant} = 149.7 = (126/16830) (1000/10) (1000/5)$$

เมื่อ 126 = น้ำหนักโมลของ HMF; 16830 = molar absorptivity ของ HMF ที่ 284 nm

1000 = conversion g into mg; 10 = conversion 5 into 50; 1000 = conversion g of honey into kg

5 = theoretical nominal sample weight

หมายเหตุ กรณีที่มีการ dilute สารละลาย (ค่า absorbance > 0.6) ในการคำนวณจะต้องนำ factor ของการ dilute มาคูณกับผลการคำนวณ

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) เกณฑ์การยอมรับ %RPD ≤ 10

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี (method verification)

10.1.1 Repeatability: $S_r = 1.71$; $RSD_r = 3.20\%$

10.1.2 within reproducibility: $S_R = 1.05$; $RSD_R = 1.99\%$

DMSc F 1085: การวิเคราะห์ปริมาณ diastase activity ในน้ำผึ้ง

Determination of diastase activity in honey

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์หาค่า diastase activity ในตัวอย่างน้ำผึ้ง

2. เอกสารอ้างอิง (References)

2.1 AOAC Official Method 958.09 Diastatic Activity of Honey

3. หลักการ (Principle)

เอนไซม์ไดเอสเตสหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเอนไซม์อะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในน้ำผึ้ง เอนไซม์นี้สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล แป้งเมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สารสีน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อน starch-iodine complex ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ไดเอสเตสในตัวอย่างน้ำผึ้งทำได้โดยให้สารละลายน้ำผึ้งทำปฏิกิริยากับน้ำแป้งในสถานะที่กำหนด วัดความเข้มของสีน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งลดลงเมื่อเวลาผ่านไป โดยการวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 660 แล้ว plot กราฟระหว่างเวลากับค่า absorbance เพื่อหาเวลา (T) ที่ทำให้ได้ค่า absorbance เท่ากับ 0.235 คำนวณค่า diastase activity หน่วยโกเต สเกล (Gothé scale) จากสูตร $300/T$

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 Spectrophotometer ซึ่งสามารถวัดค่า absorbance ในช่วง 660 nm

4.1.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.1.3 อ่างน้ำร้อน (water bath) ซึ่งสามารถตั้งค่าและควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 40°C

4.1.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH-meter)

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 Reaction vessel ขนาด 18x175 mm และมีแขนข้างหนึ่งลักษณะเหมือน round bottom ขนาดเล็ก 18x60 mm โดยสูงจากก้นขวด 100 mm และทำมุม 45 องศาับขวด

4.2.2 Cuvette ขนาด 1 cm

4.2.3 Volumetric flask ขนาด 25, 50, 100, 500, 1000 ml

4.2.4 Beaker ขนาด 20, 50, 100, 250, 500 ml

4.2.5 Erlenmeyer flask ขนาด 125, 250 ml

4.2.6 Graduate pipette ขนาด 1, 5, 10 ml

4.2.7 Cylinder ขนาด 50 ml

4.2.8 ขวดน้ำกลั่น

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 M\Omega\cdot cm$

5.1 Iodine stock solution (เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นได้นาน 6 เดือน): ชั่ง Resublimed Iodine 8.80 g ในสารละลาย KI (KI 22.0 g ละลายด้วย H_2O 30-40 ml) ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 1000 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.2 Iodine solution 0.0007 M. (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน): ชั่ง KI 20.0 g ใน beaker ขนาด 100 ml เติม Iodine Stock Solution (ข้อ 5.1) 5 ml คนให้ละลายและถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 500 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.3 Acetate buffer solution 1.59 M. pH 5.3 (เก็บรักษาในตู้เย็นได้นาน 6 เดือน): ชั่ง $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ 87.0 g ละลายด้วย H_2O 400 ml และเติม CH_3COOH 10.5 ml ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 500 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O (ปรับ pH 5.3 ด้วย CH_3COOH หรือ CH_3COONa ถ้าจำเป็น)

5.4 Sodium chloride solution 0.5 M (เก็บรักษาในตู้เย็นได้นาน 6 เดือน): ชั่ง $NaCl$ 14.5 g ละลายด้วย H_2O ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 500 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.5 น้ำแป้ง (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน): ชั่ง soluble starch 2.0 g (starch สำหรับการวัด Diastase activity) ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วย H_2O ประมาณ 90 ml คนให้เข้ากัน

แล้วนำไปตั้งบน hot plate ต้มจนเดือดเบาๆ นาน 3 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวแทนตัวอย่างมาอย่างน้อย 60% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด เปิดภาชนะตัวอย่าง แล้วผสมลงในภาชนะที่สะอาด คนตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างช้าๆ และเบา (ประมาณ 3 นาที) ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ หรือให้เกิดน้อยที่สุด แบ่งตัวอย่างประมาณ 200 ml เก็บใน wide mouth bottle ที่สะอาด ปิดฝาให้แน่นสนิทก่อนนำไปวิเคราะห์ (ห้ามให้ความร้อนกับตัวอย่าง)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 Standardization

7.1.1 ปิเปต H_2O 10 ml ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml แล้วปิเปตน้ำแข็ง ลงไป 5 ml เขย่าให้เข้ากันดี

7.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 7.1.1 มา 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ที่มี iodine solution (ข้อ 5.2) 10 ml และ H_2O 30-40 ml (โดยปรับปริมาตรของ H_2O ตั้งแต่ 30-40 ml) นำไปวัดค่า absorbance ที่ 660 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.76 ± 0.02 บันทึกปริมาตร H_2O ที่ใช้

7.2 การวิเคราะห์หาค่า Diastase Activity

7.2.1 ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 5.0 g ใส่ใน beaker ขนาด 20 ml

7.2.2 เติมสารละลาย Acetate buffer 2.5 ml และละลายด้วย H_2O 10-15 ml ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml ที่มี Sodium chloride solution (ข้อ 5.4) 1.5 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

7.2.3 ปิเปตน้ำแข็งมา 5 ml ใส่ลงใน side arm ของ reaction vessel และปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 10 ml ใส่ลงที่ก้นขวดของ reaction vessel (ระวังอย่าให้ผสมกัน)

7.2.4 แช่ reaction vessel ในข้อ 7.2.3 ลงใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ $40^\circ C$ นาน 15 นาที

7.2.5 เมื่อครบ 15 นาที ผสมน้ำแข็ง และตัวอย่างน้ำผึ้งให้เข้ากันดี นำสารละลายกลับลงไปแช่ใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ $40^\circ C$ จับเวลาต่ออีก 5 นาที

7.2.6 เมื่อครบ 5 นาที ปิเปตสารละลายในข้อ 7.2.5 มา 1 ml อย่างรวดเร็ว ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ที่มี iodine solution (ข้อ 5.2) 10 ml ผสมให้เข้ากัน เจือจางด้วย H_2O ปริมาณเท่ากับที่ใช้ในการ standardize ในข้อ 7.1.2 ผสมให้เข้ากัน

7.2.7 วัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 660 nm

7.2.8 ทำซ้ำขั้นตอนจากข้อ 7.2.6- 7.2.7 (ในทุกๆ 5 นาที หรือตามความเหมาะสม) จนกระทั่งได้ค่า absorbance < 0.235

ข้อแนะนำ การพิจารณาเวลาที่เหมาะสมในการทำซ้ำขั้นตอนข้อ 7.2.6- 7.2.7 สามารถพิจารณาได้จากตารางดังต่อไปนี้

Absorbance ที่ $t = 5$ นาที	ช่วงเวลาที่เหมาะสม (time interval)
$A > 0.658$	10 นาที หรือมากกว่า
$0.658 > A > 0.523$	5-10 นาที
$0.523 > A > 0.456$	2-5 นาที

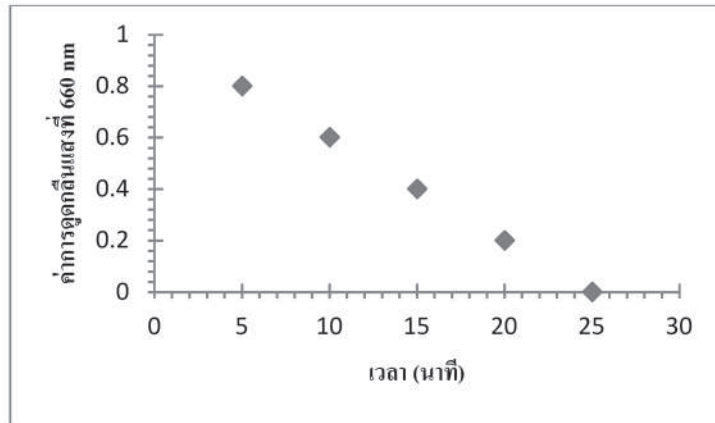
ตัวอย่างเช่น เมื่อวัดค่า $Abs_{660\text{ nm}}$ ของตัวอย่างที่ $t_{(5\text{ นาที})} = 0.600$ การวัดครั้งต่อมาจะวัดนาที่ที่ 10 หรือ 15 เป็นต้น

7.2.9 กรณีที่ค่า absorbance ไม่ลดลงถึง 0.235 ให้ทำซ้ำขั้นตอนจากข้อ 7.2.6- 7.2.7 จนใช้เวลารวม 110 นาที (วัดในทุกๆ 20 นาที)

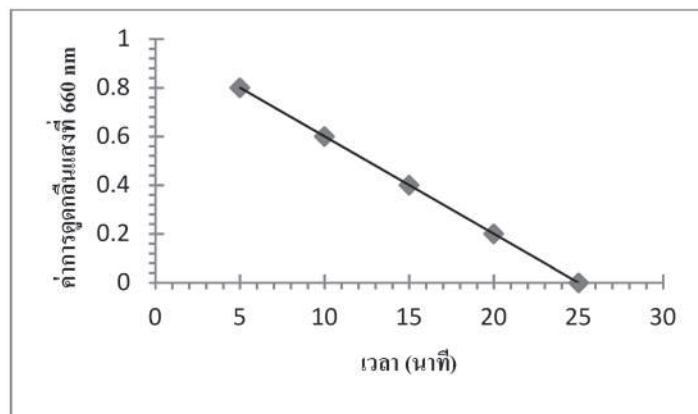
8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การหาค่าเวลา (T) ที่ได้ค่า absorbance เท่ากับ 0.235

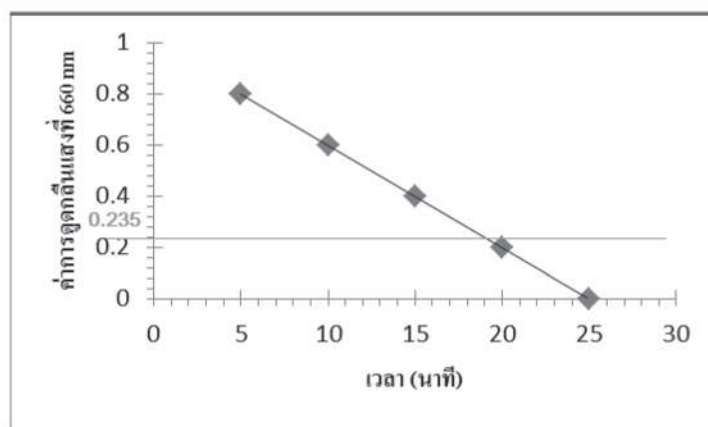
8.1.1 Plot กราฟแสดงความสัมพันธ์จากผลที่ได้การทดลอง โดยกำหนดให้แกน X เป็นเวลา มีหน่วยเป็นนาที และแกน Y เป็นค่า absorbance ที่ 660 nm ดังภาพ



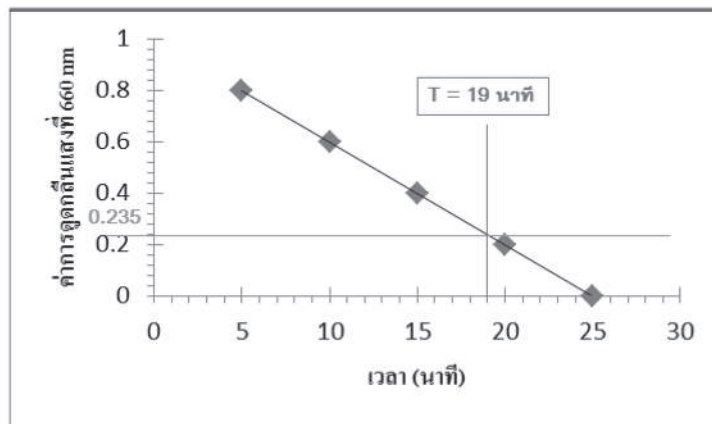
8.1.2 ลากเส้นตรงให้ผ่านจุดต่างๆ บนกราฟ ดังภาพ



8.1.3 ลากเส้นตรงขนานกับแนวแกน X ที่ค่า absorbance = 0.235



8.1.4 หาจุดตัดบนกราฟระหว่างแกน X และ แกน Y บันทึกเวลาที่ได้จากกราฟ (T)



8.2 คำนวณค่า Diastase Activity จากสูตร

$$\text{ค่า Diastase Activity (โกเต สเกล)} = 300/T$$

เมื่อ T คือ เวลา (นาทื) ที่ค่า absorbance = 0.235 ได้จากการอ่านค่าบนกราฟ (ข้อ 8.1.4)

หมายเหตุ 1. กรณีที่ค่า absorbance ลดลงไม่ถึง 0.235 ไม่ต้องแสดงความสัมพันธ์

ระหว่างค่า absorbance กับเวลา

8.3 การรายงานผล

8.3.1 รายงานค่า Diastase activity (โกเต สเกล) เป็นตัวเลขด้วยทศนิยม 1 ตำแหน่ง

8.3.2 ในกรณีที่ไม่สามารถหาค่า T ได้ หรือค่า T มากกว่า 100 นาที รายงานค่า Diastase activity (โกเต สเกล) น้อยกว่า 3

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ในการวิเคราะห์ทำซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate) เกณฑ์การยอมรับ %RPD ≤ 5

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี (method verification)

10.1.1 Repeatability: $S_r = 0.17$, $RSD_r = 1.20\%$

10.1.2 within laboratory reproducibility: $S_R = 0.22$, $RSD_R = 1.66\%$

DMSc F 1086: การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมในเครื่องดื่มเกลือแร่

Determination of sodium in electrolyte drinks

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณโซเดียมในเครื่องดื่มเกลือแร่ ด้วยเทคนิค atomic absorption spectrophotometry มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) 125 mg/L ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) 250 mg/L

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 AOAC Official Method 987.03 Sodium in Beer

3. หลักการ (Principle)

ละลายและเจือจางตัวอย่างให้มีปริมาณโซเดียมที่เหมาะสม เติมนสารละลาย CsCl เพื่อลด interfering anions วัดปริมาณโซเดียมด้วย Flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS) ที่ความยาวคลื่น 589 nm เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 AAS (Atomic Absorption Spectrophotometer) ประกอบด้วย

4.1.1 Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (FAAS)

4.1.2 Sodium Hollow Cathode lamp

4.1.3 Acetylene Gas

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 Autopipette ขนาด 10-100 μ L, 100-1000 μ L และ 1-10 ml

4.2.2 Volumetric flask ขนาด 25, 50, และ 100 ml

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่า AR grade หรือเทียบเท่า และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า Resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

5.1 Cesium stock solution 10,000 mg/L: ชั่ง Cesium chloride (CsCl , MW=168.36 g/mol) 12.67 g ละลายใน H_2O ปริมาตร 1000 ml ใน volumetric flask

5.2 สารมาตรฐาน (Standards)

5.2.1 Stock standard solution for AAS 1000 mg/L

5.2.2 Intermediate standard solution 100 mg/L: ปิ่เปิด Stock standard solution 1000 mg/L (ข้อ 5.2.1) จำนวน 10 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml เติม HNO_3 1 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.2.3 Working standard solution สำหรับกราฟมาตรฐาน 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/L: ปิ่เปิด intermediate standard solution 100 mg/L (ข้อ 5.2.2) จำนวน 100, 200, 300, 400 และ 500 μL ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml เติม 5 ml ของ Cesium stock solution (ข้อ 5.1) ปรับปริมาตรด้วย H_2O

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 เครื่องดื่มเกลือแร่ชนิดผง: ตัวอย่างเครื่องดื่มเกลือแร่ 3-5 ชอง ละลายและปรับปริมาตรด้วย H_2O ใน volumetric flask ตามอัตราส่วนที่ฉลากกำหนด หรือกรณีที่ตัวอย่างบรรจุในถุงขนาดใหญ่ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างและละลายด้วย H_2O ใน volumetric flask ตามอัตราส่วนที่ฉลากกำหนด

6.2 เครื่องดื่มเกลือแร่ชนิดน้ำ: สุ่มตัวอย่างเครื่องดื่มเกลือแร่ 2-3 ขวด เทและผสมให้เข้ากันในภาชนะที่สะอาด

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ปิเปตตัวอย่างเครื่องดื่มเกลือแร่ในข้อ 6 ปริมาตร 1 ml (V_1) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml (V_1) ปรับปริมาตรด้วย H_2O
- 7.2 ปิเปตสารละลายในข้อ 7.1 ปริมาตร 1 ml (V_3) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml (V_2) เติม Cesium stock solution 2.5 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FAAS เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐาน ที่ความยาวคลื่น 589 nm (ปริมาตร V_3 เปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับปริมาณโซเดียมในตัวอย่าง)
- 7.3 วิเคราะห์ Blank ควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่าง
- 7.4 สภาวะเครื่อง FAAS

Wavelength (nm):	589.0
Slit width (nm):	0.5
Lamp current (mA):	10
Flame type:	Air-acetylene
Mode:	Concentration
Instrument mode:	Absorbance
Air flow (L/min):	13.23
Acetylene flow (L/min):	2.43
Background correction:	Off
Sensitivity check (at abs= 0.2)	ตามคู่มือกำหนด

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

$$C \text{ (mg/L)} = (C_s - C_B) \times V_1 \times V_2 / (V_3 \times V)$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของโซเดียมในตัวอย่าง (mg/L)

C_s = ความเข้มข้นของโซเดียมในสารละลายตัวอย่างจาก calibration curve (mg/L)

C_B = ความเข้มข้นของโซเดียมใน Blank จาก calibration curve (mg/L)

V_1 = ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่าง (ml)

V_3 = ปริมาตรของสารละลายโดย micropipette (ml)

V_2 = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างก่อนวัดด้วยเครื่อง AAS (ml)

V = ปริมาตรตัวอย่าง (ml)

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ก่อนทำกราฟมาตรฐานต้องทำ sensitivity check ของเครื่อง โดยใช้ working standard solution ความเข้มข้นตามที่คู่มือเครื่องกำหนด
- 9.2 ตรวจสอบการ drift ของเครื่อง โดยการวัด working standard solution ที่ความเข้มข้นกึ่งกลางกราฟหลังการวัดตัวอย่างทุก 10-12 ตัวอย่าง ค่าที่วัดได้ควรเบี่ยงเบนจากค่าที่วัดครั้งแรกไม่เกิน 10%
- 9.3 เตรียมกราฟมาตรฐานก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง อย่างน้อย 4 จุด โดยกำหนดค่า $r > 0.995$
- 9.4 วิเคราะห์ blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์
- 9.5 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 10% ของจำนวนตัวอย่าง โดยมีเกณฑ์ยอมรับเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างสัมพัทธ์ (%RPD) ≤ 8 (กำหนดโดยประมาณค่าจาก Horwitz's equation)
- 9.6 วิเคราะห์ spiked sample เพื่อประเมิน %Recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ โดยมีเกณฑ์ยอมรับ % Recovery = 80-110

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation)

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	เกณฑ์การยอมรับ
Linearity	$R^2 = 0.998$	$R^2 \geq 0.995$
Limit of detection (LOD)	125 mg/L	-
Limit of quantitation (LOQ)	250 mg/L	
Precision : Spiked sample level 250, 500, 1000 mg/L	%RSD 0.68 - 1.7 HORRAT 0.18-0.38	% RSD < 7 HORRAT < 2
Accuracy: Spiked sample level 250, 500, 1000 mg/L	% Recovery 89.9 - 91.2	% Recovery 70-110

DMSc F 1087: การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมในเครื่องดื่มเกลือแร่ Determination of potassium in electrolyte drinks

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมในเครื่องดื่มเกลือแร่ ด้วยเทคนิค atomic absorption spectrophotometry มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) 6 mg/L ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) 25 mg/L

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 AOAC Official Method 987.02 Potassium in Beer

3. หลักการ (Principle)

ละลายและเจือจางตัวอย่างให้มีปริมาณโพแทสเซียมที่เหมาะสม เติมน้ำละลาย CsCl เพื่อลด interfering anions วัดปริมาณโพแทสเซียมด้วย Flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS) ที่ความยาวคลื่น 766.5 nm เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 AAS (Atomic Absorption Spectrophotometer) ประกอบด้วย

4.1.1 Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (FAAS)

4.1.2 Potassium Hollow Cathode lamp

4.1.3 Acetylene Gas

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 Autopipette ขนาด 10-100 μ L, 100-1000 μ L, และ 1-10 ml

4.2.2 Volumetric flask ขนาด 25, 50, และ 100 ml

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่า AR grade หรือเทียบเท่า และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า Resistivity $\geq 18 M\Omega\cdot cm$

5.1 Cesium stock solution 10,000 mg/L: ชั่ง Cesium chloride ($CsCl$, MW=168.36 g/mol) 12.67 g ละลายใน H_2O ปรับปริมาตร 1000 ml ใน volumetric flask

5.2 สารมาตรฐาน (Standards)

5.2.1 Stock standard solution for AAS 1000 mg/L

5.2.2 Intermediate standard solution 100 mg/L: ปิ่เปิด Stock standard solution 1000 mg/L (ข้อ 5.2.1) จำนวน 10 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml เติม HNO_3 1 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.2.3 Working standard solution สำหรับกราฟมาตรฐาน 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/L: ปิ่เปิด Intermediate standard solution 100 mg/L (ข้อ 5.2.2) จำนวน 100, 200, 300, 400 และ 500 μL ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml เติม 5 ml ของ Cesium stock solution (ข้อ 5.1) ปรับปริมาตรด้วย H_2O

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 เครื่องดื่มเกลือแร่ชนิดผง: ตัวอย่างเครื่องดื่มเกลือแร่ 3-5 ชอง ละลายและปรับปริมาตรด้วย H_2O ใน volumetric flask ตามอัตราส่วนที่ฉลากกำหนด หรือกรณีที่ตัวอย่างบรรจุในถุงขนาดใหญ่ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างและละลายด้วย H_2O ใน volumetric flask ตามอัตราส่วนที่ฉลากกำหนด

6.2 เครื่องดื่มเกลือแร่ชนิดน้ำ: สุ่มตัวอย่างเครื่องดื่มเกลือแร่ 2-3 ขวด เทและผสมให้เข้ากันในภาชนะที่สะอาด

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ปิเปตตัวอย่างเครื่องดื่มเกลือแร่ในข้อ 6 ปริมาตร 1 ml (V_1) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml (V_1) ปรับปริมาตรด้วย H_2O
- 7.2 ปิเปตสารละลายในข้อ 7.1 ปริมาตร 2.5 ml (V_3) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml (V_2) เติม Cesium stock solution 2.5 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FAAS เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐาน ที่ความยาวคลื่น 766.5 nm (ปริมาตร V_3 เปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับปริมาณโพแทสเซียมในตัวอย่าง)
- 7.3 วิเคราะห์ Blank ควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่าง
- 7.4 สภาวะเครื่อง FAAS

Wavelength (nm):	766.5
Slit width (nm):	1.0
Lamp current (mA):	10
Flame type:	Air-acetylene
Mode:	Concentration
Instrument mode:	Absorbance
Air flow (L/min):	12.78
Acetylene flow (L/min):	1.84
Background correction:	Off
Sensitivity check (at abs= 0.2)	ตามคู่มือกำหนด

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

$$C = (C_S - C_B) \times V_1 \times V_2 / (V_3 \times V)$$

- เมื่อ C = ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในตัวอย่าง (mg/L)
- C_S = ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในสารละลายตัวอย่างจาก calibration curve (mg/L)
- C_B = ความเข้มข้นของโพแทสเซียมใน Blank จาก calibration curve (mg/L)
- V_1 = ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่าง (ml)
- V_3 = ปริมาตรของสารละลายโดย autopipette (ml)
- V_2 = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างก่อนวัดด้วยเครื่อง AAS (ml)
- V = ปริมาตรตัวอย่าง (ml)

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ก่อนทำกราฟมาตรฐานต้องทำ sensitivity check ของเครื่อง โดยใช้ working standard Solution ความเข้มข้นตามที่คู่มือเครื่องกำหนด
- 9.2 ตรวจสอบการ drift ของเครื่อง โดยการวัด working standard solution ที่ความเข้มข้นกึ่งกลางกราฟหลังการวัดตัวอย่างทุก 10-12 ตัวอย่าง ค่าที่วัดได้ควรเบี่ยงเบนจากค่าที่วัดครั้งแรกไม่เกิน 10%
- 9.3 เตรียมกราฟมาตรฐานก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง อย่างน้อย 4 จุด โดยกำหนดค่า $r > 0.995$
- 9.4 วิเคราะห์ blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์
- 9.5 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 10% ของจำนวนตัวอย่าง เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างสัมพัทธ์ (%RPD) ของผลวิเคราะห์ มีเกณฑ์การยอมรับ $\%RPD \leq 7$ (กำหนดโดยประมาณค่าจาก Horwitz's equation)
- 9.6 วิเคราะห์ spiked matrix เพื่อประเมิน %Recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ โดยมีเกณฑ์การยอมรับ $\% Recovery = 80-110$

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation)

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	เกณฑ์การยอมรับ
Linearity	$R^2 = 0.999$	$R^2 \geq 0.995$
Limit of detection (LOD)	6 mg/L	-
Limit of quantitation (LOQ)	25 mg/L	-
Precision: Spiked sample level 50, 100, 200 mg/L	%RSD 1.53-2.86 HORRAT 0.26-0.55	% RSD ≤ 10 HORRAT < 2
Accuracy: Spiked sample level 50, 100, 200 mg/L	% Recovery 103-107	% Recovery 70-110

**DMSc F 1088: การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหลายชนิด (multi-elements) ที่แพร่จากพลาสติก
ลงสู่อาหารจำลอง**
**Determination of multi-elements migration from plastics into food
simulant**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณ multi-elements ซึ่งมี 8 ชนิดดังนี้ ตะกั่ว (Pb), แบเรียม (Ba), โคบอลต์ (Co), ทองแดง (Cu), เหล็ก (Fe), ลิเทียม (Li), แมงกานีส (Mn) และสังกะสี (Zn) ที่แพร่ลงสู่ food simulant จากการทดสอบ migration ของพลาสติกที่ใช้ทำขวดนม ภาชนะบรรจุนม และอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrophotometers (ICP-OES) โดยมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ของ Pb เท่ากับ 0.004 mg/kg Ba, Mn, และ Zn เท่ากับ 0.001 mg/kg Co, Cu และ Fe เท่ากับ 0.002 mg/kg และ Li เท่ากับ 0.003 mg/kg ขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ของโลหะทุกชนิด เท่ากับ 0.01 mg/kg

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 BS EN 13130 – 1: 2004 Material and articles in contact with foodstuffs-Plastics substances subject to limitation – Part 1 Guide to test methods for the specific migration of substances from plastics to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants.
- 2.2 Commission regulation (EU) No. 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food.
- 2.3 Commission regulation (EU) 2016/1416 of 24 August 2016 amending and correcting Regulation (EU) No. 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food.
- 2.4 Perkin-Elmer. ICP OPTICAL EMISSION OPTIMA 2000, Hardware Guide; 2001.

3. หลักการ (Principle)

สกัดโลหะที่ตกค้างในตัวอย่างพลาสติก ภายใต้สภาวะการทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 hr โดยมี 3% CH_3COOH (w/v) in aqueous solution เป็นอาหารจำลอง (food simulant) นำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง ICP-OES คำนวณปริมาณโลหะเทียบกับกราฟมาตรฐานของโลหะแต่ละชนิด

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่อง ICP-OES

4.1.2 ตู้อบร้อน (hot air oven) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $70\pm 2^{\circ}\text{C}$

4.1.3 เตาไฟฟ้า (hot plate)

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 อุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ เช่น เทอร์โมมิเตอร์ หรือ เทอร์โมคัปเปิล (thermocouple)

4.2.2 อุปกรณ์สำหรับตัดตัวอย่าง เช่น กรรไกร มีด คัตเตอร์ เป็นต้น

4.2.3 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้บรรทัด หรือ Vernier caliper ที่มีความละเอียด 0.1 mm

4.2.4 ตะแกรงลวดทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel gauze)

4.2.5 Glass tube ชนิด ground glass stopper ความจุไม่น้อยกว่า 100 ml

4.2.6 Measuring cylinder ขนาด 250 ml

4.2.7 Beaker ขนาดต่างๆตามความเหมาะสม

4.2.8 Volumetric flask ขนาด 10 ml และ 50 ml

4.2.9 Micropipette ขนาด 100 μL และ 1,000 μL

4.2.10 Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 ml

4.2.11 ขวดแก้วปากกว้าง พร้อมฝาปิด สามารถบรรจุตัวอย่างทดสอบได้

4.2.12 ขวดแก้วปากเกลียว (glass bottle with screw finish) หรือภาชนะแก้ว ประเภทอื่นที่เหมาะสม

4.2.13 Flask ชนิด ground glass stopper ขนาด 250 ml

- 4.2.14 แท่งแก้ว (glass rods) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 mm
- 4.2.15 แผ่นอะลูมิเนียมเปลว (aluminium foil) หรือวัสดุทนความร้อนอื่น ที่ไม่มีผลรบกวนในการวิเคราะห์
- 4.2.16 ขวดพลาสติกปากเกลียวสำหรับใส่สารละลายตัวอย่าง
- 4.2.17 หลอดทดลองพลาสติก (test tube)
- 4.2.18 ที่วางหลอดทดลองสำหรับเครื่อง ICP-OES

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่า AR grade หรือเทียบเท่า และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 M\Omega\cdot cm$

5.1 CH_3COOH (glacial)

5.2 Food simulant

3% CH_3COOH (w/v) in aqueous solution (food simulant): ละลาย CH_3COOH (glacial) 3 g ใน H_2O 100 ml

5.3 สารมาตรฐาน (standards)

5.3.1 สารละลายมาตรฐานโลหะผสม ซึ่งมีโลหะทั้ง 8 ชนิดที่ต้องการวิเคราะห์คือ Pb, Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn และ Zn ความเข้มข้น 1,000 mg/L สอบกลับได้ถึง NIST

5.3.2 สารละลายมาตรฐานโลหะผสม 100 mg/L: เจือจางสารละลายมาตรฐานโลหะผสม 1,000 mg/L (ข้อ 5.3.1) 10 เท่า ด้วย food simulant

5.3.3 สารละลายมาตรฐานโลหะผสม เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานโลหะแต่ละชนิดความเข้มข้น 0.0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 และ 0.75 mg/L (เตรียมใหม่ทุกครั้งของการวิเคราะห์แต่ละ batch)

: ปิเปตสารละลายมาตรฐานโลหะผสม 100 mg/L (ข้อ 5.3.2) 0.0, 5.00, 12.5, 25, 50, 125, 250 และ 375 μL ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml แยกกันแต่ละขวด ปรับปริมาตรด้วย food simulant

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวได้ เช่น ขวดนม หรือภาชนะบรรจุนมแบบใช้ซ้ำ ใช้ตัวอย่างทดสอบจำนวน 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ migration และจำนวน 2 ชิ้น เพื่อวัดปริมาตรของ food simulant ที่ใช้ทดสอบ วัดปริมาตรโดยใส่ food simulant ลงในตัวอย่างจนถึงระดับสูงสุดที่กำหนดไว้เพื่อการใช้งาน (ถ้ามี) หรือที่ระดับต่ำกว่าขอบบนสุด 5 mm บันทึกปริมาตรและคำนวณค่าเฉลี่ย หน่วยเป็น ml
- 6.2 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ เช่น ฝา และ อุปกรณ์ประกอบอื่น
- 6.2.1 ฝา ใช้ตัวอย่างทดสอบ จำนวน 3 ชิ้น
- 6.2.2 อุปกรณ์ประกอบอื่น
- 6.2.2.1 ตัวอย่างที่มีพื้นที่ประมาณ 0.6 dm^2 หรือ 60 cm^2 ใช้ตัวอย่างทั้งชิ้น ถ้ามีรูปทรงไม่สมมาตร (irregular shape) ตัดให้มีขนาดและรูปร่างที่สมมาตร (ถ้าตัดได้) จำนวนชิ้นทดสอบที่ใช้ 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ และใช้ชิ้นทดสอบ 2 ชิ้น เพื่อคำนวณพื้นที่ผิว (คำนวณพื้นที่ผิวเฉพาะด้านที่สัมผัสอาหารของชิ้นทดสอบแต่ละชิ้นแล้วคำนวณค่าเฉลี่ยพื้นที่ผิวที่ต้องการ 60 cm^2 วัดละเอียดถึง 5 cm^2)
- 6.2.2.2 ตัวอย่างที่มีพื้นที่น้อยกว่า 60 cm^2 ใช้ชิ้นทดสอบหลายชิ้นประกอบกันเป็นชุด จำนวน 3 ชุด เพื่อทดสอบ migration และจำนวน 2 ชุด เพื่อคำนวณพื้นที่ผิว คำนวณพื้นที่ผิวให้ได้รวมกัน 60 cm^2 วัดละเอียดถึง 5 cm^2 คำนวณค่าเฉลี่ยของชิ้นทดสอบแต่ละชุด
- 6.2.2.3 ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ migration ทำความสะอาดด้วยผ้าหรือแปรงขนนุ่ม ต้มในน้ำเดือดเป็น เวลา 10 min ผึ่งให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น หรือปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตสินค้า (ถ้ามี)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 Migration test

7.1.1 ตัวอย่างที่สามารถบรรจุของเหลวได้ ใช้วิธี Article filling ดังนี้

7.1.1.1 ใส่ food simulant ลงใน beaker ปริมาตรให้เพียงพอเพื่อใส่ในตัวอย่างทดสอบตามที่คำนวณไว้ และเพิ่มอีก 100 ml เพื่อเตรียม blank นำไปอุ่นบน hot plate จนได้อุณหภูมิ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เทใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้ ปริมาตรตามที่คำนวณได้ในข้อ 6.1 ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลวหรือวัสดุทนความร้อน หรือนำตัวอย่างใส่ในขวดแก้วปากกว้าง ปิดฝา ส่วนสารละลายที่เหลือใน beaker ให้ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุทนความร้อน เพื่อให้เตรียม blank

7.1.1.2 นำตัวอย่างและ blank ไปวางในตู้อบร้อน ควบคุมอุณหภูมิที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ สังเกตอุณหภูมิของ food simulant เมื่อถึงระดับ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min ต้องนำตัวอย่างและ blank ออกมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง เทสารละลายออกจากตัวอย่าง (test solution) และ blank ใส่ในขวดพลาสติกฝาเกลียวเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย ICP-OES ต่อไป

7.1.1.3 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ตัวอย่างเดิม ล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง และปฏิบัติตามขั้นตอน 7.1.1.1-7.1.1.2

7.1.2 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ ประเภท ฝา ใช้วิธี filling in jar/container ดังนี้

7.1.2.1 ใส่ food simulant ลงใน beaker ปริมาตรให้เพียงพอเพื่อใช้ทดสอบตามที่คำนวณไว้ และเพิ่มอีก 100 ml เพื่อเตรียม blank นำไปอุ่นบน hot plate จนได้อุณหภูมิ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เทลงในขวดปากเกลียว หรือภาชนะแก้วชนิดอื่นที่สวมได้พอดีกับฝา จำนวน 4 ใบ แต่ละใบปริมาตรเท่ากับความจุของภาชนะที่ใช้ประกอบกับฝานั้น ± 1 ml ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลวหรือวัสดุทนความร้อน นำไปวางในตู้อบร้อน ควบคุมอุณหภูมิที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$

7.1.2.2 เมื่อได้ระดับอุณหภูมิตามที่ต้องการแล้วนำวัสดุที่ปิดไว้ ออก สวมฝาตัวอย่างที่เตรียมไว้กับภาชนะบรรจุ food simulant แต่ละฝากับภาชนะแต่ละใบ จำนวน 3 ใบ สารละลายที่เหลือใช้ เป็น blank หมุนเกลียวหรือยึดให้แน่น กรณีฝาชนิดเปิดด้านบนใช้แผ่นอะลูมิเนียมเปลวหรือวัสดุทนความร้อน

ร้อน ปิดทับส่วนที่เปิดไว้เพื่อกันไม่ให้สารละลายไหลออก แล้วคว่ำภาชนะบรรจุ food simulant ลง ให้ตัวอย่างฝาที่สวมไว้อยู่ด้านล่าง และสัมผัสกับ food simulant อาจใช้ beaker รองรับเพื่อป้องกันภาชนะบรรจุ food simulant ล้ม ทุกขั้นตอนควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่

7.1.2.3 นำภาชนะบรรจุ food simulant ไปวางในตู้อบร้อนตามเดิม เมื่ออุณหภูมิถึงระดับ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min ต้องนำภาชนะบรรจุ food simulant ออกมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง เท test solution และ blank ใส่ในขวดพลาสติก ฝาเกลียว นำไปวิเคราะห์ด้วย ICP-OES ต่อไป

7.1.2.4 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ตัวอย่างเดิม ล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง และปฏิบัติตามขั้นตอน 7.1.2.1- 7.1.2.3

7.1.3 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ ประเภท อุปกรณ์ประกอบอื่นๆ ใช้วิธี

Total immersion ดังนี้

7.1.3.1 ใส่ food simulant ลงใน beaker ปริมาตรให้เพียงพอเพื่อใช้ทดสอบตามที่กำหนดไว้ และเพิ่มอีก 100 ml เพื่อเตรียม blank นำไปอุ่นบน hot plate จนได้อุณหภูมิ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ เทลงใน glass tube หรือ ภาชนะแก้วที่มีฝาปิด จำนวน 4 ใบ แต่ละใบปริมาตร 100 ± 1 ml ปิดฝา นำไปวางในตู้อบร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ $70 \pm 2^\circ\text{C}$

7.1.3.2 เมื่อได้ระดับอุณหภูมิตามที่ต้องการแล้ว ใส่ชิ้นทดสอบที่เตรียมไว้ตามข้อ 6.2 แต่ละชิ้นหรือแต่ละชุดลงใน glass tube หรือ ภาชนะแก้วที่มีฝาปิด แต่ละใบ จำนวน 3 ใบ glass tube ที่เหลือไม่ต้องใส่ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็น blank ใช้ glass rod รองชิ้นทดสอบไม่ให้สัมผัสผนัง tube แยกชิ้นทดสอบไม่ให้ซ้อนทับกันด้วย glass rod ชิ้นทดสอบทุกชิ้นต้องจมในสารละลาย ถ้ามีชิ้นทดสอบลอยขึ้นมาใช้ stainless steel gauze กดทับ ปิดฝาให้สนิท ทุกขั้นตอนควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่

7.1.3.3 นำ glass tube หรือภาชนะแก้ว ไปวางในตู้อบร้อนตามเดิม เมื่ออุณหภูมิถึงระดับ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min ต้องนำภาชนะบรรจุ food

simulant ออกมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง ปิเปต test solution และ blank ใส่ในขวดพลาสติกฝาเกลียว เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย ICP-OES ต่อไป

7.1.3.4 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ชั้นทดสอบเดิมล้างน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งและปฏิบัติตามขั้นตอน 7.1.3.1.-7.1.3.3

7.2 การวิเคราะห์

7.2.1 สภาวะเครื่อง ICP-OES

Gas flow: Plasma, Auxiliary และ Nebulizer เท่ากับ 15, 0.2 และ 1 (L/min) ตามลำดับ

RF power: 1400 watts

Pump flow rate: 1.50 ml/min

Heater temperature: 30°C

ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด (nm): Pb = 220.353, Ba = 233.527, Co = 228.616,

Li = 670.784, Mn = 257.610, Zn = 206.200, Cu = 324.752 และ Fe = 239.562

7.2.2 ก่อนการวัดหาปริมาณโลหะ 8 ชนิด ต้องทำการตรวจสอบความพร้อมและความเหมาะสมของเครื่องทั้งระบบ (instrument optimization) เช่น ตรวจสอบ sensitivity ของเครื่องมือ

7.2.3 กราฟมาตรฐาน: เทสารละลายมาตรฐานโลหะผสมเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (ข้อ 5.3.3) ใน test tube ขนาด 50 ml และนำ test tube ไปวางลงในที่วางหลอดทดลองสำหรับเครื่อง ICP-OES วัดสารละลายมาตรฐานแล้วสร้างกราฟมาตรฐานของโลหะทั้ง 8 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นตามข้อ 5.3.3 ค่า R^2 ต้อง ≥ 0.995

7.2.4 วิเคราะห์ตัวอย่าง: เท test solution และ blank ลงใน test tube ขนาด 25 ml และนำ test tube ไปวางลงในที่วางหลอดทดลองสำหรับวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง ICP-OES วัดปริมาณโลหะโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโลหะแต่ละชนิด

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

8.1.1 กรณีใช้วิธี Article filling หรือ Filling in jar/container คำนวณผลวิเคราะห์จากสูตร

$$\text{ปริมาณโลหะในตัวอย่าง (mg/L)} = (A-B) \times F$$

เมื่อ A = ความเข้มข้นของโลหะที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/L)

B = ความเข้มข้นของโลหะในสารละลาย blank ที่อ่านได้จากกราฟ
มาตรฐาน (mg/L)

F = dilution factor (ปริมาตรรวม/ปริมาตรเริ่มต้น)

คำนวณผลวิเคราะห์จากหน่วย mg/L เป็น mg/kg โดยใช้ค่าตัวแปร 1 L เท่ากับ 1 kg

8.1.2 กรณีใช้วิธี Total immersion คำนวณผลวิเคราะห์จากสูตร

$$\text{ปริมาณโลหะหนักในตัวอย่าง (mg/L)} = \frac{(A-B) \times F}{S}$$

เมื่อ A = ความเข้มข้นของโลหะที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/L)

B = ความเข้มข้นของโลหะในสารละลาย blank ที่อ่านได้จากกราฟ
มาตรฐาน (mg/L)

S = พื้นที่ผิวของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (dm²)

คำนวณผลวิเคราะห์จากหน่วย mg/dm² เป็น mg/kg โดยใช้ factor = 6

8.2 การรายงาน

รายงานผลหน่วยเป็น mg/kg ทศนิยมไม่เกิน 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 สร้างกราฟมาตรฐาน ค่า R^2 ต้อง ≥ 0.995

9.2 ในแต่ละชุดของการวิเคราะห์ (batch) ให้ตรวจสอบความถูกต้องของ calibration equation ก่อนและหลังการวัดตัวอย่างและทุกช่วง 10% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด โดยใช้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นสูงสุดและต่ำสุดของ calibration curve ค่าที่ได้ควรอยู่ในช่วง $\pm 5\%$ ของค่าจริง

9.3 ในแต่ละชุดของการวิเคราะห์ (batch) ให้วิเคราะห์ spiked sample อย่างน้อย 1 ครั้ง และทุก 10% ของตัวอย่างทั้งหมด

9.3.1 วิธีวิเคราะห์ spiked sample : เติมสารละลายมาตรฐานโลหะผสมลงใน food simulant ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ แล้วปฏิบัติเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง % recovery ที่คำนวณได้จากการวิเคราะห์ spiked sample ต้องอยู่ในช่วง 80-110% กรณีที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด ให้ทำการวิเคราะห์ batch นั้นซ้ำอีกครั้ง

10. รายละเอียดอื่น

10.1 คุณสมบัติเฉพาะของวิธีที่ได้จากข้อมูล validation

คุณลักษณะเฉพาะของวิธี	ค่า	เกณฑ์กำหนด
ความเป็นเส้นตรง (linearity rang) ในช่วง 0-1.0 mg/L	R^2 0.9989-1.000	$R^2 \geq 0.995$
ความแม่นยำ ที่ระดับ 1. 0.5 ML* 2. ML (maximum limit) 3. 1.5 ML	%recovery =92-108 =97-109 =90-104	80-110%
ความเที่ยง : repeatability ที่ระดับ 1. 0.5 ML 2. ML 3. 1.5 ML	%RSD = 0.93-8.21 =1.31-4.63 =1.45-4.09	Predicted % RSDr = 6.54-18.39 = 5.90-16.57 = 5.55-15.59
LOD mg/kg	Pb=0.004, Fe=0.002 Ba=0.001, Li=0.003 Co=0.002, Mn=0.001 Cu=0.002, Zn=0.001	-
LOQ mg/kg	0.01	-

* ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 369 (พ.ศ.2558) กำหนดค่า ML (mg/kg); Pb = 1, Ba = 1, Co = 0.05, Cu = 5, Fe = 48, Li = 0.6, Mn = 0.6 และ Zn=25

10.2 ขวดนม หมายถึง ภาชนะสำหรับใช้บรรจุนมหรือของเหลวเพื่อการบริโภคของทารกและเด็กเล็ก ซึ่ง ประกอบด้วย ขวด (feeding bottle) ฝาครอบ (protective cover) หัวนมยาง (feeding teat) ฝายึดหัวนมยาง (locking ring) หลอดดูด (straw) จุกหัดดูด (feeding spout) เป็นต้น

- 10.3 ภาชนะบรรจุนมสำหรับทารกและเด็กเล็ก หมายถึง ภาชนะที่ทำขึ้นโดยมีเจตนาสำหรับใช้บรรจุนม หรือของเหลวอื่นเพื่อการบริโภคซึ่งมีทั้งแบบใช้ซ้ำ เช่น ถ้วยหัดดื่มนม เป็นต้น และแบบใช้ครั้งเดียว เช่น ขวดพลาสติกที่ใช้เก็บน้ำนมมารดา และขวดพลาสติกบรรจุนมแบบใช้ครั้งเดียวที่ต้องใช้ร่วมกับขวดนม
- 10.4 การทดสอบ migration (migration test) หมายถึง การดำเนินการเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนย้ายของสารออกมาจากตัวอย่างลงสู่สารละลายที่ใช้ทดสอบซึ่งเป็นตัวแทนอาหารที่จะใช้บรรจุ (อาหารจำลอง, food simulants) ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม
- 10.5 ตามเอกสารอ้างอิง Commission regulation (EU) No 10/2011 และ Commission regulation (EU) 2016/1416 of 24 August 2016 กำหนดให้
- 10.5.1 3% CH_3COOH (w/v) in aqueous solution เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารที่มี $\text{pH} \leq 4.5$
- 10.5.2 กำหนดสภาวะทดสอบ migration ที่ 70°C เป็นเวลา 2 hr สำหรับตัวอย่าง hot-fill (การบรรจุอาหาร ที่อุณหภูมิไม่เกิน 100°C และปล่อยให้เย็นลงจนอุณหภูมิ 50°C หรือต่ำกว่า ภายใน 60 min หรือ เย็นลงจนอุณหภูมิ 30°C หรือต่ำกว่า ภายใน 150 min)

DMSc F 1089: การวิเคราะห์ปริมาณปรอทในน้ำโดยเทคนิค HGAAS

Determination of mercury in Water by HGAAS

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณปรอท (Mercury; Hg) ในน้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำแร่ น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล และน้ำจากแหล่งอื่นๆ ยกเว้นน้ำเสีย โดย hydride generation atomic absorption spectrometer (HGAAS)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 Rice E.W., Baird R.B., Eaton A.D., Clesceri L.S., 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23 RD Edition. American Public Health Association, Washington DC, 3112 B, Cold-vapor atomic absorption spectrometric method, 3: 25-27.
- 2.2 Control and analysis software for atomic absorption spectrometer, Analytik Jena AG, September 2003.
- 2.3 Mercury/Hydride System HS 55, Analytik Jena AG, October 2000.

3. หลักการ (Principle)

รีดักชันสารประกอบของปรอทด้วยสารละลาย sodium borohydride (NaBH_4) ในสถานะที่เป็นกรด ปรอท (Hg^{2+}) จะถูกรีดิวซ์ออกมาเป็นปรอท (Hg^0) ไอของปรอท (Hg^0) จะถูกแก๊สอาร์กอนพาไปยัง quartz cell ที่อุณหภูมิห้อง อะตอมเหล่านี้จะดูดกลืนแสงและถูกวัดปริมาณโดยเครื่อง AAS

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometer (HGAAS)

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 Beaker ขนาด 10, 50, 250 ml

4.2.2 Volumetric flask ขนาด 10, 25, 50, 100, 1,000 ml

4.2.3 Cylinder ขนาด 10 ml หรือ มากกว่า (ไม่เกิน 100 ml)

4.2.4 Micropipette ขนาด 2-50, 20-100 μL พร้อม tip

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่า AR grade หรือเทียบเท่า และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

5.1 HNO_3 65% (w/w)

5.2 KMnO_4 1%: ชั่ง KMnO_4 0.1 g ใน beaker ขนาด 25 ml เติมน้ำ 10 ml ละลายให้เข้ากัน

5.3 สารละลายกรด: เติม HNO_3 65% (w/w) 18 ml และ KMnO_4 1% (ข้อ 5.2) 1 ml ใน volumetric flask ขนาด 1,000 ml ที่มีน้ำอยู่ 765 ml ผสมให้เข้ากัน

5.4 sodium borohydride solution (NaBH_4) 3%: ละลาย NaBH_4 3 g ใน 1% NaOH 100 ml

5.5 สารมาตรฐาน (standards)

5.5.1 สารละลายมาตรฐาน Hg 1,000 mg/L

5.5.2 Intermediate standard solution 2 mg/L: เจือจางสารละลายมาตรฐาน Hg 1,000 mg/L (ข้อ 5.5.1) 500 เท่าด้วยสารละลายกรด (ข้อ 5.3)

5.5.3 Working standard solution 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 $\mu\text{g/L}$: ปิเปิด Intermediate standard solution 2 mg/L (ข้อ 5.5.2) ปริมาตร 0, 10, 25, 50, 100 และ 150 μL ตามลำดับ ใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรด (ข้อ 5.3)

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ตัวอย่างน้ำ: สุ่มตัวอย่างและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.2 ตัวอย่างน้ำแข็ง: สุ่มตัวอย่าง ปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้องและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ใส่ตัวอย่าง 10-20 ml ใน volumetric flask ขนาด 25 ml
- 7.2 เติม HNO_3 65% (w/w) 0.6 ml
- 7.3 เติม KMnO_4 1% (ข้อ 5.2) 100 μL ปรับปริมาตรด้วยตัวอย่าง
- 7.4 วัดปริมาณปรอทด้วย เครื่อง HGAAS
- 7.5 วิเคราะห์ blank และ spiked blank ควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

คำนวณปริมาณ Hg จากสูตร

$$C = (C_0 - C_B) * F$$

- เมื่อ
- | | | |
|-------|---|---|
| C | = | ความเข้มข้นของ Hg ในตัวอย่าง ($\mu\text{g/L}$) |
| C_0 | = | ความเข้มข้นของ Hg ในสารละลายตัวอย่าง ($\mu\text{g/L}$) |
| C_B | = | ความเข้มข้นของ Hg ในสารละลาย method blank ($\mu\text{g/L}$) |
| F | = | dilution factor |

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ก่อนทำการฟมาตรฐานต้องทำ sensitivity check ของเครื่อง โดยใช้ working standard solution ตามที่คู่มือของเครื่องกำหนด
- 9.2 ตรวจสอบการ drift ของเครื่อง โดยการวัด working standard solution 1 จุด (check standard) หลังการวัดตัวอย่างทุก 10-12 ตัวอย่าง
- 9.3 วิเคราะห์ blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวนตัวอย่าง
- 9.4 วิเคราะห์ spiked blank เพื่อประเมิน % recovery และ % RPD ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์

9.5 เกณฑ์การยอมรับ

QC ชนิดต่าง ๆ	เกณฑ์การยอมรับ
check standard	90 - 110 %
spiked blank	ใช้ recovery control chart ในการ ควบคุมคุณภาพ
duplicate analysis	% RPD $\leq$ 28

10. รายละเอียดอื่น

เก็บรักษาตัวอย่าง ใช้ HNO_3 ทำให้ตัวอย่างมี pH < 2

DMSc F 1090: การวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรน เมตาโบไลต์ ในอาหาร

โดยวิธี LC-MS/MS

Determination of Nitrofuran metabolites group in Food

by LC-MS/MS

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ สารกลุ่มไนโตรฟูแรน เมตาโบไลต์ ตกค้างในอาหาร โดยวิธี LC-MS/MS ซึ่งประกอบด้วยสาร 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 5-methyl-morfolino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOX), 1-amino hydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของสารกลุ่มไนโตรฟูแรน ดังตาราง

ยากรู่มไนโตรฟูแรน	สารอนุพันธ์
furazolidone	AOZ
furaltadone	AMOX
nitrofurantoin	AHD
nitrofurazone	SEM

โดยมีค่า LOD และ LOQ ดังนี้

matrix	AOZ (µg/kg)		AMOX (µg/kg)		AHD (µg/kg)		SEM (µg/kg)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
เนื้อสัตว์	0.1	0.3	0.1	0.3	0.5	1.0	0.5	1.0
ดัดสัตว์	0.1	0.3	0.1	0.3	0.5	1.0	0.5	1.0
นม	0.1	0.3	0.1	0.3	0.5	1.0	0.5	1.0
ไข่	0.1	0.3	0.1	0.3	0.5	1.0	0.5	1.0
แป้ง	0.1	0.3	0.1	0.3	0.5	1.0	0.5	1.0
น้ำผึ้ง	0.1	0.3	0.1	0.3	0.5	1.0	0.5	1.0

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 McCracken RJ, Kennedy DG. Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland. *Journal of Chromatography B*. 1997; 691: 87-94.

3. หลักการ (Principle)

สาร nitrofurantoin metabolites จะถูก hydrolysed ด้วยกรด hydrochloric เจือจาง จากนั้นเติม 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) เพื่อ derivatized ให้เกิดสาร nitrophenyl (NP) derivative สาร derivatives ที่ได้จะถูกสกัดด้วย ethyl acetate และถูกดึงไขมันออกด้วย hexane ระเหยชั้น organic solvent จนแห้ง ละลาย residue ด้วยสารละลายผสมของ methanol : 0.5mM ammonium acetate (1:4) จากนั้นตรวจวิเคราะห์ชนิด และปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS คำนวณปริมาณที่ตรวจพบ โดยเปรียบเทียบกับ standard curve ที่ plot ระหว่าง peak area ratio ของสารมาตรฐาน และ internal standard กับ concentration ratio ของสารมาตรฐาน และ internal standard ใช้ AOZ-d₄ เป็น internal standard สำหรับทดสอบ AOZ และ AHD ใช้ AMOZ-d₅ เป็น internal standard สำหรับทดสอบ AMOZ และใช้ SEM-¹³C เป็น internal standard สำหรับทดสอบ SEM

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.001g และ 0.00001g
- 4.1.2 เครื่องบดปั่น
- 4.1.3 Centrifuge
- 4.1.4 Shaker
- 4.1.5 Water bath แบบควบคุมอุณหภูมิ
- 4.1.6 Nitrogen evaporator
- 4.1.7 Vortex mixer

4.1.8 LC-MS/MS system, ประกอบด้วย

- Binary pump: Agilent 1100 series
- Autosampler: Agilent 1100 series
- Micro vacuum degasser: Agilent 1100 series
- Thermostatted column compartment: Agilent 1100 series
- Triple quadrupole mass spectrometer: API 4000

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 Screw cap centrifuge tube ขนาด 35 และ 15 ml
- 4.2.2 Test tube ขนาด 15 ml
- 4.2.3 pH paper, 5.5-9.0
- 4.2.4 Membrane filters 47 mm, 0.45 μm . ชนิด cellulose nitrate
- 4.2.5 Filtering device for HPLC eluents
- 4.2.6 Micro-spin filters 0.45 μm ชนิด PVDF
- 4.2.7 HPLC vials สีชาขนาด 1.5 ml

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

- 5.1 Methanol (MeOH) HPLC grade
- 5.2 Ethyl acetate (CH_3COOH) HPLC grade
- 5.3 Hexane (C_6H_{14}) HPLC grade
- 5.4 Ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COOH}\text{N}_4$)
- 5.5 2-nitrobenzaldehyde, 2-NBA ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3$) solution 100 mM in MeOH : ชั่ง 2-NBA 1.51 g ละลายด้วย MeOH 100 ml
- 5.6 Trisodium phosphate dodecahydrate ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) solution 0.3 M: ชั่ง $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 11.4 g ใส่ใน volumetric flask 100 ml เติม H_2O จนครบปริมาตรผสมให้เข้ากัน
- 5.7 Hydrochloric acid (HCl) solution 0.2 M: เจือจาง conc. HCl 17 ml ด้วย H_2O ใน volumetric flask 1L เติม H_2O จนครบปริมาตรผสมให้เข้ากัน

- 5.8 Sodium hydroxide (NaOH) solution 2 M: ชั่ง NaOH 80 g ละลายด้วย H₂O ปรับปริมาตร เป็น 1 L
- 5.9 Mobile phase A, ammonium acetate 0.5mM: ชั่ง CH₃COOHN₄ 38.54 mg ละลายด้วย H₂O ปรับปริมาตร เป็น 1 L แล้วกรองผ่าน membrane filter ชนิด cellulose nitrate
- 5.10 สารมาตรฐาน (Standards)
- 5.10.1 AOZ ความบริสุทธิ์มากกว่า 98%
 - 5.10.2 AMOZ ความบริสุทธิ์มากกว่า 98%
 - 5.10.3 AHD ความบริสุทธิ์มากกว่า 98%
 - 5.10.4 SEM hydrochloride ความบริสุทธิ์มากกว่า 98%
 - 5.10.5 Internal standard AOZ-d4 ความบริสุทธิ์มากกว่า 98%
 - 5.10.6 Internal standard AMOZ-d5 ความบริสุทธิ์มากกว่า 98%
 - 5.10.7 Internal standard SEM-¹³C ความบริสุทธิ์มากกว่า 98%
- 5.11 การเตรียมละลายสารมาตรฐาน
- 5.11.1 Standard solution AOZ, AMOZ, AHD และ SEM
 - 5.11.1.1 Stock standard solution 1 mg/ml: ชั่งสารมาตรฐาน AOZ, AMOZ, AHD และ SEM ประมาณ 10 mg ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย MeOH ใน volumetric flask (โดยแยกเตรียมแต่ละชนิด) เก็บในตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน 1 ปี
 - 5.11.1.2 Mixed standard solution 10 µg/ml: ปิ่เปิด stock standard solution AHD, AOZ, AMOZ และ SEM ความเข้มข้น 1 mg/ml (ข้อ 5.11.1.1) ชนิดละ 100 µl ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตร ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน 3 เดือน
 - 5.11.1.3 Mixed working standard solution 100 ng/ml: ปิ่เปิด mixed standard solution (ข้อ 5.11.1.2) 100 µl ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตร ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน 1 เดือน
 - 5.11.1.4 Mixed working standard solution 10 ng/ml: ปิ่เปิด mixed working standard solution 100 ng/ml (ข้อ 5.9.1.3) 1 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตร ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

5.11.2 Internal standard solution (AOZ- d_4 , AMOZ- d_5 และ SEM- ^{13}C)

- 5.11.2.1 Stock internal standard solution 1 mg/ml: ชั่งสาร AOZ- d_4 , AMOZ- d_5 และ SEM- ^{13}C ประมาณ 10 mg ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย MeOH ใน volumetric flask (โดยแยกเตรียมแต่ละชนิด) เก็บในตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน 1 ปี
- 5.11.2.2 Mixed internal standard solution 10 μ g/ml: ปิเปิด stock internal standard solution (ข้อ 5.11.2.1) ชนิดละ 100 μ l ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตร ด้วย MeOH เก็บใน ตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน 3 เดือน
- 5.11.2.3 Mixed working internal standard solution 100 ng/ml: ปิเปิด mixed internal standard solution (5.11.2.2) 100 μ l ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตร ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน 1 เดือน
- 5.11.2.4 Mixed working internal standard solution 10 ng/ml: ปิเปิด mixed working internal standard solution (5.11.2.3) 1 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตร ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 เนื้อสัตว์ ตับ น้ำหนักประมาณ 300-500 g ตัดส่วนที่เป็นไขมันออก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดปั่น
- 6.2 นมผง ไข่ผง แป้ง และน้ำผึ้ง น้ำหนักประมาณ 300-500 g ผสมให้เข้ากัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัด

7.1.1 ชั่งตัวอย่าง

- เนื้อสัตว์ ตับ น้ำผึ้ง: ชั่ง 1 ± 0.05 g
- นมผง ไข่ผง แป้ง: ชั่ง 0.5 ± 0.05 g

ลงใน screw cap centrifuge tube ขนาด 35 ml แล้วเติม internal standard ให้ได้ความเข้มข้น 2.0 μ g/kg ตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 15 นาที

- 7.1.2 เติม 0.2 M HCl 5 ml เข้าให้ตัวอย่างแตกไม่จับตัวเป็นก้อน
- 7.1.3 เติม 100 mM 2-NBA 50 μ l ปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ $37 \pm 2^\circ\text{C}$ นาน 18 ชั่วโมง
- 7.1.4 นำตัวอย่างออกจาก water bath ตั้งทิ้งไว้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 0.3 M Na_3PO_4 500 μ l
- 7.1.5 ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.5 ด้วย 2 M NaOH (ประมาณ 300 μ l-435 μ l) ปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที ตรวจสอบ pH ด้วย pH paper
- 7.1.6 สกัดด้วย ethyl acetate 2 ครั้งๆละ 10 ml และ 5 ml ตามลำดับ โดยเขย่าด้วย shaker เบาๆ 5 นาที (ระวังการเกิด emulsion)
- 7.1.7 centrifuge ที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 7.1.8 ดูดชั้น organic solvent รวมใส่ ใน test tube ขนาด 15 ml
- 7.1.9 ระเหยชั้น organic solvent ด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ $40-45^\circ\text{C}$ จนแห้ง
- 7.1.10 ละลาย residue
 - ตัวอย่างเนื้อสัตว์ ดับ และน้ำผึ้ง ละลายด้วย hexane 2 ml และสารละลาย ผสมของ MeOH: mobile phase A (1:4) 1 ml
 - ตัวอย่างนมผง ไข่ผง แป้ง ละลายด้วย hexane 2 ml และสารละลายผสมของ MeOH: mobile phase A (1:4) 500 μ l
- 7.1.11 ปั่นด้วย vortex mixer 30 วินาที วางทิ้งให้แยกชั้น
- 7.1.12 ดูดชั้น hexane ทิ้ง
- 7.1.13 สกัดซ้ำโดยเติม hexane 2 ml แล้วทำตามข้อ 7.1.11-7.1.12
- 7.1.14 ถ่ายสารละลายตัวอย่างใส่ micro-spin filters ชนิด PVDF
- 7.1.15 Centrifuge ที่ความเร็ว 5,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 7.1.16 เทสารละลายที่กรองได้ใส่ใน HPLC vials สีชา ขนาด 1.5 ml
- 7.1.17 นำไปวิเคราะห์ต่อโดยเครื่องมือ LC-MS/MS

7.2 การสร้าง standard curve (matrix-matched standard curve)

- 7.2.1 ชั่งตัวอย่าง (matrix blank) ตามข้อ 7.1.1 ใส่ใน screw cap centrifuge tube ขนาด 35 ml จำนวน 5 หลอด จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน AOZ, AMOZ, AHD, SEM และ internal standard, AOZ- d_4 , AMOZ- d_5 และ SEM- ^{13}C ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางข้างล่าง แล้วดำเนินการวิเคราะห์ต่อ ตั้งแต่ข้อ 7.1.2 ถึง 7.1.17

กรณีใช้ตัวอย่าง 1 g

ความเข้มข้น (ng/g)	ปริมาตร (μl) mixed internal std. 100 ng/ml	ปริมาตร standard ที่ใช้ (μl)	
		10 ng/ml	100 ng/ml
0.0	20	-	-
0.3	20	30	-
1.0	20	100	-
3.0	20	-	30
5.0	20	-	50

กรณีใช้ตัวอย่าง 0.5 g

ความเข้มข้น (ng/g)	ปริมาตร (μl) mixed internal std. 100 ng/ml	ปริมาตร standard ที่ใช้ (μl)	
		10 ng/ml	100 ng/ml
0.0	10	-	-
0.3	10	15	-
1.0	10	50	-
3.0	10	150	-
5.0	10	-	25

7.2.2 สร้าง calibration curve ระหว่าง peak area ratio กับ concentration ratio

โดย $\text{peak area ratio} = \frac{\text{peak area of Std.}}{\text{peak area of internal Std.}}$

$\text{Conc. Ratio} = \frac{\text{Conc. of standard}}{\text{Conc. of internal standard}}$

7.3 การหาปริมาณด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS

สภาวะเครื่องมือ LC-MS/MS

7.3.1 LC conditions;

- Column: analytical column; Zorbax SB C-18 (150 mm X 3 mm, 5 μ m)
- Mobile phase A: 0.5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$
- Mobile phase B: MeOH
- Flow rate: 0.6 ml/min
- Injection volume: 20 μ l
- Column temperature: 30°C
- Gradient LC conditions;

time (min)	% mobile phase A	% mobile phase B
0.0	76	24
5.0	48	52
10.0	48	52
10.1	4	96
13.4	4	96
13.5	76	24
15.0	76	24

7.3.2 MS conditions;

- Ionization mode; ESI (turbo spray), positive
- Scan type; MRM
- Ion spray voltage; 5200 eV
- Temperature TEM; 450°C
- Collision gas, CAD; nitrogen ; 5 psig
- Curtain gas (CUR); 13 psig
- Ion spray nebulizer gas (GS-1); 52 psig
- TIS Heater Gas (GS-2); 58 psig
- Entrance potential (EP); 10 V

7.3.3 MS/MS fragmentation conditions;

component	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)
NP-AHD	249.3 ± 0.5	104.0 ± 0.5 (secondary)
		134.1 ± 0.5 (primary)
NP-AOZ	236.3 ± 0.5	104.0 ± 0.5 (secondary)
		134.1 ± 0.5 (primary)
NP-AMTZ	335.2 ± 0.5	262.0 ± 0.5 (secondary)
		291.3 ± 0.5 (primary)
NP-SEM	209.3 ± 0.5	166.2 ± 0.5 (secondary)
		192.2 ± 0.5 (primary)
NP-AOZ-d ₄	240.3 ± 0.5	134.1 ± 0.5
NP-AMTZ-d ₅	340.2 ± 0.5	296.3 ± 0.5
NP-SEM- ¹³ C	212.2 ± 0.5	168.0 ± 0.5

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

คำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก standard curve โดยใช้สมการเส้นตรง

$$Y = aX + b$$

ปริมาณของสารที่ตรวจพบ, C_A (μg/kg) = $(Y - b) \times C_{IS}(\mu\text{g/kg}) / a$

โดย X = concentration ratio, C_A (μg/kg) / $C_{IS}(\mu\text{g/kg})$

Y = peak area ratio

C_A = conc. of analyte (μg/kg)

C_{IS} = conc. of internal standard (μg/kg)

a = slope ของ calibration curve

b = intercept ของ calibration curve

8.2 การรายงานผล

รายงานผลปริมาณที่พบใช้หน่วยไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (μg/kg) ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 สร้าง calibration curve ระหว่าง peak area ratio กับ concentration ratio ทุกครั้งในการวิเคราะห์ โดยมีค่า correlation coefficient, r ของ calibration curve ต้องมากกว่า หรือ เท่ากับ ($\geq$) 0.98
- 9.2 ทดสอบ method blank และ matrix blank ทุกครั้งในการวิเคราะห์
- 9.3 คำนวณ% relative intensities ของ analyte ion intensities ratio เปรียบเทียบกับ standard ion intensities ratio ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ $\pm 20\%$
- 9.4 วิเคราะห์ duplicate sample อย่างน้อย 10% ของตัวอย่าง คำนวณ %RPD ค่า %RPD ต้อง น้อยกว่าหรือเท่ากับ 25%
- 9.5 วิเคราะห์ spiked sample อย่างน้อย 10% ของตัวอย่างที่ระดับ 2 $\mu\text{g/kg}$ (2 เท่าของค่า MRPL) คำนวณ % recovery ค่า % recovery ควรอยู่ในช่วง 60-120%
- 9.6 กรณีตรวจพบสารที่มีปริมาณเท่ากับหรือมากกว่าค่า MRPL ต้องทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ (retest)

10. รายละเอียดอื่น

- 10.1 ประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเรื่องหลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการ ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร ลงวันที่ 24 เมษายน 2546 กำหนด ว่าจะต้องใช้วิธีตรวจและห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการตรวจพบปริมาณสาร ปนเปื้อนสาร AOZ และ AMOZ ได้อย่างน้อยต่ำถึงระดับ 0.3 $\mu\text{g/kg}$, AHD และ SEM ได้ อย่างน้อยต่ำถึงระดับ 1.0 $\mu\text{g/kg}$
- 10.2 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) โดยห้องปฏิบัติการฝ่ายสารกำจัด ศัตรูพืชและยาสัตว์ตกค้าง สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ใน เนื้อหมู เนื้อไก่ ด้ บั ห มู น้ำผึ้ง นมผง ไข่ผง แป้ง ดำเนินการเมื่อ มกราคม-พฤษภาคม 2555 และ พฤษภาคม 2558
 - 10.2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve: matrix matching) ช่วงความเข้มข้น 0.3-5.0 $\mu\text{g/kg}$ ได้กราฟเส้นตรงโดยมีค่า correlation coefficient, r^2 มากกว่า 0.98

10.2.2 การยืนยันค่า Limit of Detection (LOD) ทำการทดสอบโดยเดิมสารมาตรฐาน AOA และ AMOZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/kg, AHD และ SEM ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 µg/kg ลงในตัวอย่างแต่ละชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ผลตรวจพบทุกตัวอย่าง โดยค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) มากกว่า 3 และ % relative intensities น้อยกว่า ± 20%

10.2.3 การยืนยันค่า Limit of Quantitation (LOQ) ทำการทดสอบโดยเดิมสารมาตรฐาน AOA และ AMOZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.3 µg/kg และ AHD และ SEM ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 µg/kg ลงในตัวอย่างแต่ละชนิด ชนิดละ 10 ซ้ำ

matrix	สารมาตรฐาน	Spiked level (µg/kg)	n	% recovery		%RSD
				Min - max	Mean ± SD	
เนื้อไก่	AOZ	0.3	10	72.5 – 87.0	81.2±4.4	5.4
	AOMZ	0.3	10	95.0 – 103.7	99.2±2.7	2.7
	AHD	1.0	10	100.0 – 106.0	103.0±4.1	4.0
	SEM	1.0	10	97.5 – 101.5	100.0±1.1	1.1
เนื้อไก่	AOZ	0.3	10	86.7 – 100.3	96.7±4.4	4.5
	AOMZ	0.3	10	100.0 – 101.0	100.3±0.3	0.3
	AHD	1.0	10	89.6 – 110.1	99.9±4.8	4.8
	SEM	1.0	10	72.2 – 86.1	86.0±4.7	5.8
ไข่แดง	AOZ	0.3	10	80.0 – 103.3	87.8±8.7	9.8
	AOMZ	0.3	10	75.3 – 111.3	91.3±9.8	10.7
	AHD	1.0	10	103.6 – 118.6	112.4±4.3	3.8
	SEM	1.0	10	72.7 – 108.0	88.±9.6	10.9
นมผง	AOZ	0.3	10	85.7 – 98.3	93.4±3.5	3.7
	AOMZ	0.3	10	91.0 – 104.7	99.1±3.8	3.8
	AHD	1.0	10	60.8 – 69.6	65.1±3.0	4.7
	SEM	1.0	10	81.8 – 93.6	86.0±3.8	4.5
น้ำผึ้ง	AOZ	0.3	10	88.3 – 109.7	101.7±7.5	7.4
	AOMZ	0.3	10	98.3 – 111.7	109.4±4.0	3.7
	AHD	1.0	10	110.0 – 120.0	117.3±4.5	3.8
	SEM	1.0	10	74.1 – 93.3	85.5±5.7	6.7

10.2.3 Accuracy และ Precision ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน AOZ

AMOZ AHD และ SEM ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 µg/kg และ 5.0 µg/kg ลงในตัวอย่างแต่ละชนิด ชนิดละ 10 ซ้ำ

matrix	สารมาตรฐาน	Spiked level (µg/kg)	n	% recovery		%RSD
				Min - max	Mean ± SD	
เนื้อไก่	AOZ	2.0	10	88.5 – 100.5	97.0± 5.4	5.6
		5.0	10	84.0 – 95.6	90.4±3.9	4.3
	AOMZ	2.0	10	99.0 – 120.0	102.6±6.2	6.1
		5.0	10	84.4 – 112.6	94.7±8.7	9.2
	AHD	2.0	10	119.5-120.0	120.0±0.2	0.1
		5.0	10	119.6 – 120.0	120±0.1	0.1
	SEM	2.0	10	73.0 – 115.0	96.1±12.7	1.1
		5.0	10	70.4 – 74.6	72.6±1.5	2.1
เนื้อไก่	AOZ	2.0	10	71.0 – 100.0	91.3±8.4	9.2
		5.0	10	92.8 – 112.0	100.2±5.9	5.9
	AOMZ	2.0	10	82.0 – 97.5	89.9±5.4	5.7
		5.0	10	88.4 – 98.4	93.5±3.2	3.4
	AHD	2.0	10	90.0 – 100.5	98.5±3.7	3.7
		5.0	10	98.2 – 100.2	99.4±0.7	0.7
	SEM	2.0	10	85.0 – 100.0	99.5±6.3	6.6
		5.0	10	98.7 – 118.4	100.9±6.2	6.2
ไข่ผง	AOZ	2.0	10	100.0 – 101.0	100.3±0.4	0.4
		5.0	10	79.0 – 100.4	95.4±7.1	7.5
	AOMZ	2.0	10	98.1 – 120.0	107.2±7.1	6.6
		5.0	10	75.8 – 102.8	94.5±8.1	4.5
	AHD	2.0	10	88.5 – 99.5	94.9±3.9	4.2
		5.0	10	76.8 – 99.4	91.0±7.1	4.5
	SEM	2.0	10	70.5 – 120.0	104.4±15.8	15.2
		5.0	10	70.4 – 90.6	77.4±6.8	8.8

matrix	สาร มาตรฐาน	Spiked level (µg/kg)		% recovery		%RSD
				Min - max	Mean ± SD	
นมผง	AOZ	2.0	10	77.5 – 100.0	91.0±7.0	7.7
		5.0	10	85.4 – 100.4	95.6±4.6	4.8
	AOMZ	2.0	10	97.5 – 110.0	102.0±4.3	4.2
		5.0	10	80.0 – 97.4	89.1±5.7	6.4
	AHD	2.0	10	89.0 – 100.5	96.8±1.1	1.2
		5.0	10	100.0 – 120.0	120.0±7.7	6.9
	SEM	2.0	10	89.0 – 101.0	97.5±4.0	4.1
		5.0	10	88.6 – 99.2	96.1±3.6	3.7
น้ำผึ้ง	AOZ	2.0	10	88.0 – 109.0	99.8±7.7	7.7
		5.0	10	94.6 – 108.2	101.0±4.0	3.9
	AOMZ	2.0	10	100.0 – 101.5	100.5±0.5	0.5
		5.0	10	99.8 – 101.5	100.3±0.5	4.5
	AHD	2.0	10	100.0 – 101.0	105.0±0.4	0.4
		5.0	10	89.9 – 98.8	93.9±3.2	3.4
	SEM	2.0	10	89.9 – 101.0	98.3±4.4	4.4
		5.0	10	94.6 – 101.0	99.6±2.2	2.2

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| 1. นางดวงดาว วงศ์สมมาตร | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 2. นางสาวอรุณี สรพรหม | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 3. นางจำเรียง ปุญญะประสิทธิ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 4. นางปิยมาศ แจ่มศรี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 5. นางสาวปัทมา แดงชาติ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 6. นางสาวกรรณา ตีรสมิทธิ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 7. นางสาวมณฑนา พันธุ์บัวหลวง | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 8. นายสมภพ วัฒนมณี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 9. นางสาวณัฐกานต์ ดิยสีวาพร | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 10. นางสาวรัชฎาพร สุวรรณรัตน์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 11. นายอนันต์ดา การุณ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |
| 12. นางสาวสุนันทา เทพคนตรี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |
| 13. นางสาวกานดา เอกเจริญกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |

นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

1. อาหาร หมายถึง อาหารที่คนสามารถบริโภคได้ และให้หมายความรวมถึงเครื่องดื่ม ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีอื่นๆ
2. น้ำ หมายถึง น้ำสำหรับอุปโภคและบริโภค รวมทั้งน้ำในสิ่งแวดล้อมแต่ไม่รวมน้ำเสีย
3. Dilution หมายถึง การเจือจางของตัวอย่าง
4. น้ำกรอง หมายถึง น้ำที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าน้ำกลั่น หรือ deionized water
5. คำย่อที่ใช้ และคำเต็ม แสดงในตาราง

Abbreviation	Word/คำเต็ม
CFU	colony forming unit
MPN	most probable number
H ₂ S	hydrogen sulfide

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method type	หน้า
DMSc F 2030	อาหาร	<i>Cronobacter</i> spp.	I	71
DMSc F 2031	น้ำและน้ำแข็ง	Fecal enterococcus และ Fecal streptococcus	I	87
DMSc F 2032	อาหาร	Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i>	I	105
DMSc F 2033	น้ำและน้ำแข็ง	จำนวนแบคทีเรีย	I	137
DMSc F 2034	อาหาร	<i>Listeria</i> spp. และ <i>Listeria monocytogenes</i>	I	151
DMSc F 2035	อาหาร	<i>Salmonella</i> spp.	I	173
DMSc F 2036	อาหาร	<i>Vibrio cholerae</i>	I	193
DMSc F 2037	อาหาร	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	I	215

DMSc F 2030: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Cronobacter* spp. ในอาหาร

Analytical method of *Cronobacter* spp. in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Cronobacter* spp. ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (references)

- 2.1 ISO/TS 22964: 2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
- 2.2 api 20E Identification system for *Enterobacteriaceae* and other non-fastidious Gram-negative rods. REF 20 100/20 160, 07584E-GB-2004/05

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)

- 3.1 *Cronobacter* spp. = *Cronobacter* species
- 3.2 *E. cloacae* = *Enterobacter cloacae*

4. หลักการ (Principle)

Cronobacter spp. เดิมเรียก *Enterobacter sakazakii* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีมีลักษณะเฉพาะบน Chromogenic *Cronobacter* isolation (CCI) agar การตรวจหา (detection) แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

- 4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (pre-enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะ ชนิดเหลว (non-selective broth) โดยเติม BPW ลงในขวดตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิระหว่าง 34-38°C 18 ± 2 ชั่วโมง
 - กรณีที่ตัวอย่างมีการปนเปื้อน *Cronobacter* spp. ในปริมาณน้อยและปนเปื้อนมากับเชื้อ *Enterobacteriaceae* อื่น ๆ เช่น *E. cloacae* จะทำให้เกิดการรบกวนต่อการตรวจหา *Cronobacter* spp.

- 4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว (selective broth) ซึ่งเติมสารยับยั้งเชื้ออื่น เพื่อให้ *Cronobacter* spp. พื้้นตัวสามารถเพิ่มจำนวนและเชื้ออื่นถูกยับยั้ง โดยถ่ายเชื้อ จากข้อ 4.1 ลงใน CSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 24 ± 2 ชั่วโมง
- 4.3 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง chromogenic agar โดยถ่ายเชื้อจากข้อ 4.2 ขีดแยกเชื้อบน CCI agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 24 ± 2 ชั่วโมง
- 4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะจำเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CCI agar มาทำให้บริสุทธิ์ โดยขีดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดแข็ง (non-selective agar) เช่น TSA และตรวจยืนยันทางชีวเคมี

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Buffered peptone water (BPW)
- 5.1.2 Chromogenic *Cronobacter* isolation (CCI) agar
- 5.1.3 *Cronobacter* selective broth (CSB)
- 5.1.4 L-Lysine decarboxylation medium
- 5.1.5 L-Ornithine decarboxylation medium
- 5.1.6 Media for fermentation of carbohydrates (peptone water with phenol red, D-arabitol, α -Methyl-D-glucoside, D-sorbitol and D-sucrose)
- 5.1.7 Methyl red (MR) and Voges-Proskauer (VP) medium
- 5.1.8 Tryptone soya agar (TSA)
- 5.1.9 α -Glucosidase enzymatic assay solution
 - 5.1.9.1 Phosphate buffer, 0.3 M (pH 7.0)
 - 5.1.9.2 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside substrate
 - 5.1.9.3 Physiological salt solution 0.85% NaCl

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 Gram stain reagents
- 5.2.2 Methyl red (MR) reagent
- 5.2.3 Reagent for detection of oxidase
- 5.2.4 Vancomycin solution

5.2.5 Voges-Proskauer (VP) reagent

5.2.5.1 40% KOH

5.2.5.2 5% 1-naphthol

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave)

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.3 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $34-38^{\circ}\text{C}$, $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$

6.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.5 โกร้งบดสาร (pestle and mortar)

6.1.6 Spectrophotometer

6.1.7 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.8 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $47-50^{\circ}\text{C}$ และ $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$

6.2 เครื่องใช้

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว (screw-cap bottle)

6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.3 หัวและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)

6.2.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.5 ปิเปต (pipette)

6.2.6 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.7 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากันกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวขึ้นหนักเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 10 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือ pipette ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ให้ได้ปริมาตรรวม ไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และสุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 10 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

- สามารถปรับน้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่างลดลงได้โดยให้มีอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 1:9 แต่ถ้าใช้ตัวอย่างมากกว่า 10 กรัม หรือ 10 มิลลิลิตร ต้องมีผลการทดสอบความถูกต้องหรือทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (preparation of test sample)

นำตัวอย่างที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์

7.3 การตรวจหา (detection)

7.3.1 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (pre-enrichment)

เติม BPW 90 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างข้อ 7.1 เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิระหว่าง $34-38^{\circ}\text{C}$ 18 ± 2 ชั่วโมง

- ในกรณีที่ใช้ตัวอย่างปริมาณมากกว่า 10 กรัม ควร pre-warmed BPW ที่อุณหภูมิระหว่าง $34-38^{\circ}\text{C}$ ก่อนนำไปใช้

7.3.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment)

เขย่าให้เข้ากันและถ่ายเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร จากข้อ 7.3.1 ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CSB 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 41.5°C 24 ± 2 ชั่วโมง

7.3.3 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (isolation)

นำเชื้อจากข้อ 7.3.2 ขีดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CCI agar บ่มที่อุณหภูมิ 41.5°C 24 ± 2 ชั่วโมง

- นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ CCI agar มาไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ dry ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้แห้งก่อนนำไปใช้ เพื่อให้โคโลนีของเชื้อแยกกันได้ดี
- โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *Cronobacter* spp. คือโคโลนีมีสีน้ำตาลถึงสีเขียวแกมน้ำเงิน ขนาดเล็กถึงปานกลาง ประมาณ 1-3 มิลลิเมตร สำหรับโคโลนีที่ไม่ใช่ *Cronobacter* spp. มักพบมีสีขาว (หรือสีขาวที่ตรงกลางโคโลนีเป็นสีเขียว) สีเทาหรือสีดำ บางสายพันธุ์อาจมีสีเหลืองหรือสีแดง

7.4 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (confirmation)

7.4.1 กรณีทั่วไป (general) เลือกโคโลนี ที่มีลักษณะเฉพาะ หรือโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Cronobacter* spp. 5 โคโลนี ถ้ามีน้อยกว่า 5 โคโลนีให้เลือกทั้งหมด กรณีที่โคโลนีไม่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ให้นำโคโลนีที่สงสัยมาจัดแยกเชื้อซ้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CCI agar นำเชื้อที่แยกบริสุทธิ์แล้วมาทดสอบยืนยันทางชีวเคมี

7.4.2 กรณีการแยกเชื้อบริสุทธิ์ (purification of colony)

จากโคโลนีที่เลือกไว้ นำมาจัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะ เช่น TSA เพื่อทำให้เชื้อแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ดีขึ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิระหว่าง 34-38°C 21±3 ชั่วโมง กรณีที่โคโลนีไม่แยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ให้นำโคโลนีที่สงสัยมาจัดแยกเชื้อซ้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

- ให้ทดสอบโคโลนีแรกที่มีลักษณะเฉพาะครบถ้วนที่สุดจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะก่อน
 - ถ้าให้ผลบวก ไม่ต้องทดสอบโคโลนีอื่นๆ
 - ถ้าให้ผลลบ นำโคโลนีอื่นๆ มาทดสอบจนกระทั่งพบโคโลนีที่ให้ผลบวกหรือทุกโคโลนีให้ผลลบทั้งหมด
 - สามารถเก็บเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะที่อุณหภูมิ 5°C ได้ไม่เกิน 7 วัน และก่อนนำมาทดสอบยืนยัน ให้ถ่ายเชื้อ (subculture) เพื่อให้ได้ fresh โคโลนี

7.4.3 การยืนยันทางชีวเคมี

เจียเชื้อจากข้อ 7.4.2 ทดสอบทางชีวเคมีตามรายการต่อไปนี้ หรือใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปโดยทำตามที่ผู้ผลิตระบุ

7.4.3.1 Oxidase

นำเชื้อขีดบนกระดาษกรองที่หยด oxidase reagent (ใช้ห่วงหรือเข็มเย็บเชื้อที่ทำด้วย platinum-iridium หรือพลาสติก)

ผลบวก: กระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงซีด ม่วงอมน้ำเงิน หรือน้ำเงินเข้ม ภายใน 10 วินาที

ผลลบ: กระดาษกรองไม่เปลี่ยนสี

Cronobacter spp. ให้ผลลบ

7.4.3.2 Hydrolysis of 4-Nitrophenyl (PNP) α -D-glucopyranoside substrate

ถ่ายเชื้อจากข้อ 7.4.2 ใส่ลงในน้ำเกลือ 0.85% 2 มิลลิลิตร เติมน้ำ α -glucosidase enzymatic assay solution 2 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37°C 4 ชั่วโมง วัดสีเหลืองที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (nm)

ผลบวก: ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.3 ที่ 405 nm หลังจาก 4 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 16 mM PNP

Cronobacter spp. ให้ผลบวก

7.4.3.3 L-Lysine decarboxylase

ถ่ายเชื้อจากข้อ 7.4.2 ใส่ลงใน L-lysine decarboxylation medium ใส่เชื้อต่ำกว่าระดับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ± 2 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นสีม่วง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง

Cronobacter spp. ให้ผลลบ

7.4.3.4 L-Ornithine decarboxylase

ถ่ายเชื้อจากข้อ 7.4.2 ใส่ลงใน L-ornithine decarboxylation medium ใส่เชื้อต่ำกว่าระดับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ± 2 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นสีม่วง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง

Cronobacter spp. ส่วนมากให้ผลบวก

7.4.3.5 Fermentation of various carbohydrates (peptone water with phenol red,

D-Arabitol, α -Methyl-D-glucoside, D-Sorbitol and D-Sucrose)

ถ่ายเชื้อจากข้อ 7.4.2 ใส่ลงใน carbohydrates fermentation medium บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 48 ± 2 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี (สีแดง)

Cronobacter spp. - ส่วนน้อยให้ผลบวกกับ D-Arabitol
- ส่วนมากให้ผลบวกกับ α -Methyl-D-glucoside
- ให้ผลลบกับ D-Sorbitol
- ให้ผลบวกกับ D- Sucrose

7.4.3.6 Methyl red (MR) (วิธีทดสอบทางเลือก)

ถ่ายเชื้อจากข้อ 7.4.2 ใส่ลงใน MR-VP broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 48 ± 2 ชั่วโมง เติม Methyl red solution 5 หยด

ผลบวก: มีสีแดงเกิดขึ้น

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง

Cronobacter spp. ส่วนน้อยให้ผลบวก

7.4.3.7 Voges-Proskauer (VP) (วิธีทดสอบทางเลือก)

ถ่ายเชื้อจากข้อ 7.4.2 ใส่ลงใน MR-VP broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ± 2 ชั่วโมง เติม 40% KOH 0.2 มิลลิลิตร และ 1-naphthol solution 0.6 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ± 0.5 ชั่วโมง

ผลบวก: บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพู-แดง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

Cronobacter spp. ส่วนน้อยให้ผลลบ

ตารางที่ 1 การตรวจยืนยันทางชีวเคมีสำหรับเชื้อ *Cronobacter* spp.

รายการ	ผลการทดสอบ	รายการ	ผลการทดสอบ
Oxidase	ให้ผลลบ	Acid from:	
Hydrolysis of 4- Nitrophenyl α -D-glucopyranoside substrate	ให้ผลบวก	D-Arabitol	ส่วนน้อยให้ผล บวก
L-Lysine decarboxylase	ให้ผลลบ	D- Sorbitol	ให้ผลลบ
L-Ornithine decarboxylase	ส่วนมากให้ผลบวก	D-Sucrose	ให้ผลบวก
Methyl red (MR) (วิธีทดสอบทางเลือก)	ส่วนน้อยให้ผลบวก	α -Methyl- D-glucoside	ส่วนมากให้ ผลบวก
Voges-Proskauer (VP) (วิธีทดสอบทางเลือก)	ส่วนน้อยให้ผลลบ		

8. การคำนวณผล (Calculation of results)

-

9. การรายงานผล (Expression of results)

Cronobacter spp. / น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัมหรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *Cronobacter* spp. ในอาหาร

10.3 ภาคผนวก 3: ตารางที่ 2 Distinction of *Cronobacter* spp. from other genera

ภาคผนวก 1
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Buffered peptone water (BPW)

Enzymatic digest of casein (Peptone)	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร

ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

2. Chromogenic *Cronobacter* isolation (CCI) agar

Tryptic digest of casein	7	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-Glucopyranoside	0.15	กรัม
Sodium desoxycholate ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$)	0.25	กรัม
Ammonium iron (III) citrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{FeNH}_3$)	1	กรัม
Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	1	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

- บด 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-Glucopyranoside ด้วย Sodium chloride ในโกร่งบดสารให้เป็นผงละเอียด

- ละลายส่วนประกอบอื่น ๆ ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด แล้ว
ยกลงเติม salt: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-Glucopyranoside ฆ่าเชื้อที่ 121°C
15 นาที pH 7.3 $\pm$ 0.2 เทใส่จานเพาะเชื้อ 18-20 มิลลิลิตร

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

3. *Cronobacter* selective broth (CSB)

3.1 Base medium

Enzymatic digest of animal tissues	10	กรัม
Meat extract	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Bromocresol purple	0.04	กรัม
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร

ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ

ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 $\pm$ 0.2

3.2 Vancomycin solution

Vancomycin hydrochloride	10	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลาย vancomycin ในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน membrane

เก็บที่อุณหภูมิ 5°C ได้นาน 15 วัน

การใช้งาน

เติมสารละลาย vancomycin (ข้อ 3.2) 0.1 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 3.1)

10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ vancomycin/CSB เป็น

10 มิลลิกรัม/ลิตร เก็บที่ 5°C ได้ 1 วัน

4. L-Lysine decarboxylation medium

L-Lysine monohydrochloride ($C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$)	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร

ถ้าจำเป็นให้ความร้อน ในการละลาย แบ่งใส่หลอดๆ ละ 5 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

5. L-Ornithine decarboxylation medium

L-Ornithine monohydrochloride ($C_5H_{12}N_2O_2 \cdot HCl$)	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร

ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลายแบ่งใส่หลอดๆ ละ 5 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

6. Media for fermentation of carbohydrates (peptone water with phenol red,

D-arabitol, α -Methyl-D-glucoside, D-sorbitol and D-sucrose)

6.1 Basic medium

Enzymatic digest of casein	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Phenol red	0.02	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตาม
ปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2 สามารถเก็บที่ 5°C ได้
นาน 6 เดือน

6.2 Carbohydrate solution (D-arabitol, α -Methyl-D-glucoside, D-sorbitol and D-sucrose)

Carbohydrate	8	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (เตรียมแยกแต่ละชนิด)

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรนขนาดรู (pore size)

0.2 ไมโครเมตร

การใช้งาน

เติมสารละลาย Carbohydrate solution (ข้อ 6.1) 125 มิลลิลิตร ลงใน Basic
medium (ข้อ 6.2) 875 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดตามปริมาตร
ที่ต้องการ

7. Methyl red (MR) and Voges-Proskauer (VP)

MR/VP base medium

Enzymatic digest of animal tissues	7	กรัม
D-glucose	5	กรัม
Potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4)	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร

แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.9 ± 0.2 สามารถ
เก็บที่ 5°C ได้นาน 6 เดือน

8. Tryptone soya agar (TSA)

Enzymatic digest of casein	15	กรัม
Enzymatic digest of soya	5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร

ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

9. α -glucosidase enzymatic assay solution

9.1 Phosphate buffer, 0.3 M (pH 7.0)

Sodium phosphate monobasic monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.75	กรัม
Sodium phosphate dibasic heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4.64	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	90	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร
เก็บที่ 5°C ได้ไม่เกิน 15 วัน

9.2 4- Nitrophenyl α -D-glucopyranoside substrate

4- Nitrophenyl α -D-glucopyranoside ($\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_8$)	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นอุณหภูมิ 50°C

การใช้งาน

เติม 4- Nitrophenyl α -D-glucopyranoside substrate (ข้อ 9.2) 10 มิลลิลิตร ลงใน
Phosphate Buffer (ข้อ 9.1) 90 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ 4- Nitrophenyl
 α -D-glucopyranoside 0.4 กรัม/100 มิลลิลิตร สามารถเก็บที่ 5°C ได้ 1 วัน

9.3 Physiological salt solution 0.85% NaCl

Sodium chloride (NaCl)	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 5°C ได้ไม่เกิน 15 วัน

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

2. Methyl red (MR) reagent

Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)	0.03	กรัม
Ethanol	85.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4.5	มิลลิลิตร

ละลาย methyl red ในสารละลาย Ethanol: น้ำ (ห้ามฆ่าเชื้อ) เก็บที่อุณหภูมิ 20-25°C

3. Oxidase reagent

N, N, N', N' -tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine	1	กรัม
Dihydrochloride ($C_{10}H_{16}N_2 \cdot 2HCl$)		
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำเย็น ก่อนใช้งาน

4. Voges-Proskauer (VP) reagent

4.1 40% KOH

Potassium hydroxide (KOH)	40	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

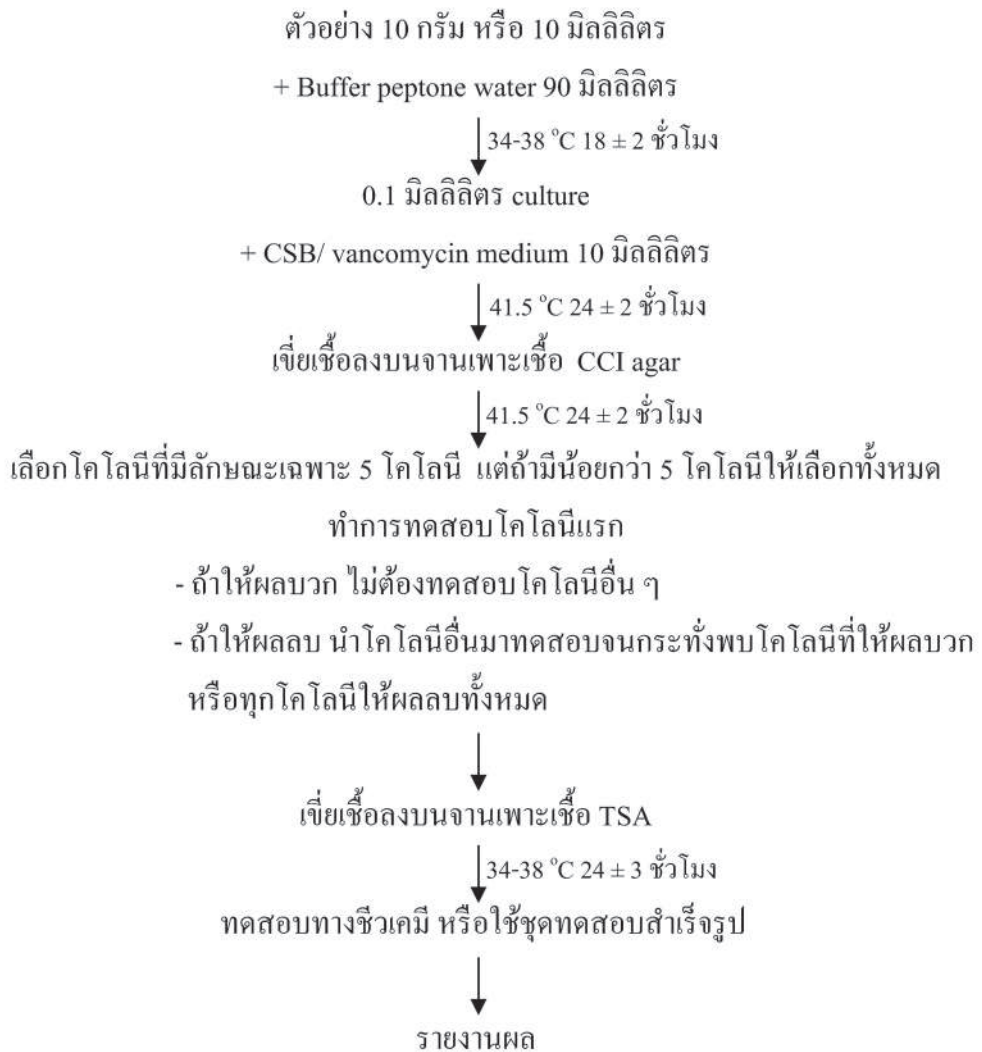
ละลาย KOH ในน้ำกลั่น (ห้ามฆ่าเชื้อ) เก็บที่อุณหภูมิ 20-25°C

4.2 5% 1-naphthol

1-naphthol ($C_{10}H_7OH$)	5	กรัม
Ethanol	100	มิลลิลิตร

ละลาย 1-naphthol ใน ethanol (ห้ามฆ่าเชื้อ) เก็บที่อุณหภูมิ 20-25°C

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *Cronobacter* spp. ในอาหาร

ภาคผนวก 3

ตารางที่ 2 Distinction of *Cronobacter* spp. from other genera

Biochemical test	Cronobacter					Enterobacter and related species								
	C. dultinensis	C. malonaticus	C. muyjensii	C. condimenti/ C. sakazakii	C. universalis	C. turicensis/ C. universalis	E. aerogenes	E. cancerogenes	E. cloacae	E. gergoviae	F. helveticus	E. hormaechei	F. pulveris	S. turicensis
Oxidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hydrolysis 4- Nitrophenyl α-D-glucoside	100	100	100	100	100	0	0	1	0	100	0	100	100	100
Lysine decarboxylase	0	0	0	0	0	98	0	0	90	0	0	0	0	0
Ornithine decarboxylase	100	95	100	94	90	98	100	96	100	0	91	0	0	0
Methyl red	0	0	0	1	0	5	0	5	5	91	57	83	100	100
VP	100	100	100	99	100	98	100	100	100	9	100	17	0	0
Acid from														
D-Arabitol	17	0	0	0	10	100	0	15	97	91	0	83	100	100
α-Methyl-D-glucoside	100	100	0	100	100	95	0	85	2	0	83	0	0	0
D-Sorbitol	0	0	0	0	0	100	0	95	0	0	0	0	0	0
D-Sucrose	100	100	100	100	100	100	0	97	98	0	100	100	0	0

**DMSc F 2031: วิธีตรวจวิเคราะห์ Fecal enterococcus และ Fecal streptococcus
ในน้ำและน้ำแข็ง**

**Analytical method of Fecal enterococcus and Fecal streptococcus
in water and ice**

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่ม fecal enterococci และ fecal streptococci ในน้ำและน้ำแข็ง ครอบคลุมการตรวจหา (detection) และการตรวจปริมาณ (enumeration) ด้วยวิธีกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd ed. Washington DC; 2017. 9230 A, C.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

- | | | |
|------------------------|---|------------------------------|
| 3.1 <i>S. equinus</i> | = | <i>Streptococcus equinus</i> |
| 3.2 <i>S. bovis</i> | = | <i>Streptococcus bovis</i> |
| 3.3 <i>E. columbae</i> | = | <i>Enterococcus columbae</i> |
| 3.4 <i>E. cecorum</i> | = | <i>Enterococcus cecorum</i> |
| 3.5 <i>E. munditii</i> | = | <i>Enterococcus munditii</i> |
| 3.6 <i>E. asini</i> | = | <i>Enterococcus asini</i> |

4. หลักการ (Principle)

แบคทีเรียกลุ่ม fecal enterococci และ fecal streptococci เป็นแบคทีเรียที่พบในลำไส้ของคนและสัตว์เลื้อยคืบ บางสปีชีส์สามารถทนและเจริญในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ โดยไม่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนอุจจาระ enterococci มีความทนมากต่อภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เชื้อใน 2 กลุ่มนี้ ดัดสีแกรมบวก รูปกลม หรือกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่อยู่เป็นคู่ บางครั้งเรียงต่อกันเป็นสายสั้น

ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างเอนไซม์ catalase fecal enterococci และ fecal streptococci เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี sodium azide ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น และสามารถรีดิวส์ 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) ให้โคโลนีสีแดงอ่อนถึงสีแดงเข้ม สามารถแยก enterococci จาก streptococci โดยทดสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีเกลือ (NaCl) 6.5% การเจริญที่อุณหภูมิ 10°C บน BHI agar และ ที่ 45°C ใน BHI broth รวมทั้งบน bile esculin agar ปฏิกริยาการย่อย esculin จะได้ esculentin และ dextrose ซึ่ง esculentin จะไปทำปฏิกิริยากับ ferric citrate ต่อไปเกิดสีน้ำตาลดำหรือสีดำในอาหารเลี้ยงเชื้อ

หมายเหตุ Sodium azide เป็นสารเคมีอันตราย มีความเป็นพิษและเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagens) ควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสสารนี้ azide ยังสามารถสร้างสารประกอบที่ระเบิดได้ ถ้าสัมผัสกับท่อโลหะ

การตรวจ fecal enterococci และ fecal streptococci ในน้ำและน้ำแข็ง แบ่งออกเป็น

4.1 การตรวจหา (detection)

โดยนำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม กรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter) ที่มีรู (pore size) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร หลังกรองน้ำ นำแผ่นกรองไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง หลังจากบ่มเพาะเชื้อ นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะไปตรวจยืนยันโดยทดสอบทางชีวเคมี วิธีนี้ไม่ควรใช้กับตัวอย่างน้ำที่มีความขุ่นมาก

4.2 การตรวจปริมาณ (enumeration)

ปฏิบัติเช่นเดียวกับวิธีการตรวจหา (detection) แต่นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ และนำไปตรวจยืนยันโดยทดสอบทางชีวเคมี วิธีนี้ไม่ควรใช้กับตัวอย่างน้ำที่มีความขุ่นมาก

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Bile esculin agar
- 5.1.2 Brain-heart infusion (BHI) agar
- 5.1.3 Brain-heart infusion (BHI) broth
- 5.1.4 BHI broth ที่มีเกลือ 6.5% NaCl
- 5.1.5 EIA medium
- 5.1.6 mE agar
- 5.1.7 mEI agar
- 5.1.8 mEnterococcus agar
- 5.1.9 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ Buffered water หรือ 0.1% Peptone water

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 Gram stain reagents
- 5.2.2 3% Hydrogen peroxide
- 5.2.3 Indoxyl- β -D-glucoside
- 5.2.4 Nalidixic acid
- 5.2.5 0.1 N NaOH
- 5.2.6 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC)

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave)
- 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
- 6.1.3 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)
- 6.1.4 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ และ $45 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- 6.1.5 ตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิต่ำ (low temperature incubator) อุณหภูมิ $10 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- 6.1.6 ชุดกรองเมมเบรน (membrane filter unit)
- 6.1.7 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 6.1.8 เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) 220 โวลต์ 50 เฮิร์ตซ์

6.2 อุปกรณ์

- 6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว (screw-cap bottle)
- 6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)
- 6.2.3 ปากคีบ (forceps) ชนิดปากแบนผิวเรียบ
- 6.2.4 ห่วงและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)
- 6.2.5 แผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter) ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร, pore size 0.45 ไมโครเมตร
- 6.2.6 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.7 ปิเปต (pipette)
- 6.2.8 หลอดทดลอง (test tube)
- 6.2.9 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (sampling)

- 7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำ เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาณเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)
- 7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำแข็ง สุ่มตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุใส่รวมกันในภาชนะปราศจากเชื้อ ทำตัวอย่างให้ละลายจนหมด สุ่มให้ได้ตัวอย่างไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การตรวจหา (detection) และตรวจปริมาณ (enumeration): ภาควง 2

7.2.1 เตรียมตัวอย่างผ่านชุดกรองเมมเบรน

- ใช้ forceps ที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ 1 แผ่น มาวางบนส่วนที่เป็นฐานรองรับกระดาด วางกรวยกรองรับน้ำครอบบนฐานรองรับกระดาดให้สนิท
- เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง เทตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร หรือ ปริมาตรอื่นที่ต้องการใช้ทดสอบลงในกรวยกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อ แล้วปิดฝาครอบ

- เปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด แล้วปิดเครื่อง
- ล้างรอบ ๆ กรวยกรองด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หรือน้ำกรองปราศจากเชื้อ ที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าประมาณ 150 มิลลิลิตร ปิดฝาครอบ จากนั้น เปิดเครื่องสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด ปิดเครื่อง และนำไป ตรวจวิเคราะห์ต่อไป โดยเลือกปฏิบัติได้ 3 วิธี ตามข้อ 7.2.2 ถึง 7.2.4 ดังนี้

7.2.2 วิธี mE

- 7.2.2.1 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองจากข้อ 7.2.1 วางบนอาหาร เลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง mE agar ระวังอย่าให้มีฟองอากาศแทรกระหว่าง แผ่นกรองและผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ คั่วจนเพาะเชื้อ บ่มที่ $41 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 48 ± 3 ชั่วโมง
- 7.2.2.2 การทดสอบสารตั้งต้น (substrate test) ใช้ forceps ปราศจากเชื้อ คีบแผ่นกรองจากข้อ 7.2.2.1 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง EIA medium บ่มที่ $41 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 20 นาที
- 7.2.2.3 นับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ 20-60 โคโลนี โดยใช้กล้องกำลังขยายต่ำ (10-16 เท่า) หรือกล้องจุลทรรศน์ หรือ อุปกรณ์อื่น และส่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีฟ้าเพื่อช่วย ให้มองเห็นได้ชัดเจน
 - ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ enterococci คือ โคโลนีสีชมพูถึง สีแดง เมื่อยกแผ่นกรอง เมมเบรนขึ้นจะพบตะกอนสีดำ หรือ สีน้ำตาลแดงด้านหลังแผ่นกรอง

7.2.3 วิธี mEI

- 7.2.3.1 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองจากข้อ 7.2.1 วางบนอาหาร เลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง mEI agar ระวังอย่าให้มีฟองอากาศแทรกระหว่าง แผ่นกรองและผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ คั่วจนเพาะเชื้อ บ่มที่ $41 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 24 ชั่วโมง
- 7.2.3.2 นับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ 20-60 โคโลนี โดยใช้กล้องกำลังขยายต่ำ (10-16 เท่า) หรือกล้องจุลทรรศน์ หรือ อุปกรณ์อื่น และส่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีฟ้าเพื่อช่วย ให้มองเห็นได้ชัดเจน
 - ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ enterococci คือ โคโลนีมีโซนสีน้ำเงิน ล้อมรอบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร

7.2.4 วิธี mEnterococcus

7.2.4.1 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อก๊ีบแผ่นกรองจากข้อ 7.2.1 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง mEnterococcus agar ระวางอย่าให้มีฟองอากาศแทรกระหว่างแผ่นกรองและผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ วางจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ 30 นาที คั่วจานเพาะเชื้อ บ่มที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 48 ± 3 ชั่วโมง

7.2.4.2 นับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ 20-60 โคโลนี โดยใช้กล้องกำลังขยายต่ำ (10-16 เท่า) หรือกล้องจุลทรรศน์ หรืออุปกรณ์อื่น และส่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีฟ้าเพื่อช่วยให้มองเห็นได้ชัดเจน

- ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ enterococci คือโคโลนีสีแดงอ่อนและสีแดงเข้ม

7.2.5 การตรวจยืนยัน (verification tests)

เลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะไปตรวจยืนยันโดยใช้ดบนจานเพาะเชื้อ BHI agar เพื่อแยกโคโลนี บ่มที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 24 ± 2 ชั่วโมง ถึง 48 ± 3 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวลงใน BHI broth และลงบนแผ่นกระจก (glass slide) 2 แผ่น นำ BHI broth บ่มที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 24 ± 2 ชั่วโมง นำเชือบนแผ่นกระจกทดสอบต่อไปนี้

- การสร้างเอนไซม์ catalase

เติม 3% hydrogen peroxide 2-3 หยดลงบนเชือบนแผ่นกระจก 1 แผ่น ดูการเกิดฟองก๊าซ

ผลบวก : เกิดฟองก๊าซ

ผลลบ : ไม่เกิดฟองก๊าซ

- ถ้าการทดสอบให้ผลบวก แสดงว่าไม่ใช่เชื้อใน genus *Enterococcus* ไม่ต้องทดสอบต่อ

- ถ้าการทดสอบให้ผลลบ ทำการทดสอบต่อไปนี้

- การย้อมสีแกรม

นำเชื้อบนแผ่นกระจกอีก 1 แผ่น ทำการย้อมสีแกรม

- fecal enterococci และ fecal streptococci ติดสีแกรมบวก รูปกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมครอน ส่วนใหญ่อยู่เป็นคู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสายสั้น นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงใน BHI broth ที่กล่าวมาแล้วมาทดสอบดังนี้

- การย่อย esculin

เจียเชื้อลงบน bile esculin agar บ่มที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 48 $\pm$ 3 ชั่วโมง

ผลบวก: มีเชื้อเจริญและอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีดำนน้ำตาล มีโซนสีน้ำตาล

ผลลบ: ไม่มีเชื้อเจริญและอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

- fecal enterococci ให้ผลบวก

- fecal streptococci ให้ผลลบ ยกเว้น *S. equinus* และ *S. bovis*

- การเจริญที่ 10°C

เจียเชื้อลงใน BHI agar บ่มที่ $10 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 48 $\pm$ 3 ชั่วโมง

ผลบวก: มีเชื้อเจริญ

ผลลบ: ไม่มีเชื้อเจริญ

- fecal enterococci ส่วนใหญ่ให้ผลบวก

- fecal streptococci ส่วนใหญ่ให้ผลลบ

- การเจริญที่ 45°C

เจียเชื้อลงใน BHI broth (pre-warmed ที่อุณหภูมิ 45°C)

บ่มที่ $45 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 48 $\pm$ 3 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น

- fecal enterococci ให้ผลบวก ยกเว้น *E. columbae*, *E. cecorum*, *E. munditii* และ *E. saccharolyticus* ส่วนใหญ่ให้ผลลบ

- fecal streptococci ให้ผลบวก

- การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 6.5%

เชื้อเชื้อลงใน BHI broth ที่มีเกลือ (NaCl) 6.5% บ่มที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
 48 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น

- fecal enterococci : ให้ผลบวก ยกเว้น *E. columbae*, *E. cecorum* และ
E. asini

- fecal streptococci : ให้ผลลบ

7.2.6 การแปลผล: ภาควง 4

7.2.6.1 พบ fecal enterococci เมื่อผลทดสอบ catalase ให้ผลลบ ย้อมติดสี
แกรมบวก รูปกลมหรือกลมรี เจริญบน bile esculin agar และส่วน
ใหญ่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่มีเกลือ (NaCl) 6.5%
รวมทั้งส่วนใหญ่เจริญที่ 10°C บน BHI agar และที่ 45°C ใน BHI
broth

7.2.6.2 พบ fecal streptococci เมื่อผลทดสอบ catalase ให้ผลลบ ย้อมติดสี
แกรมบวก รูปกลมหรือกลมรี ส่วนใหญ่ไม่เจริญบน bile esculin
agar และไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่มีเกลือ (NaCl)
6.5% แต่เจริญได้ที่ 45°C ใน BHI broth และส่วนใหญ่ไม่เจริญที่
 10°C บน BHI agar

หมายเหตุ การใช้วิธี mEI ทดสอบตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมทางทะเล
อาจพบ non-*Enterococcus* species สูงถึง 26% จึงควรเพิ่มรายการ
ทดสอบ เช่น การเจริญใน BHI broth ที่ 45°C การตรวจหาเอนไซม์
pyrrolidonylarylamidase (PYR) และการทดสอบการทำงานของ
เอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAP) โดยใช้ชุดทดสอบเพื่อ
ยืนยัน genus *Enterococcus* โดยมีความแม่นยำในระดับที่
ยอมรับได้ ($\geq 90\%$)

8. การคำนวณผล (Calculation of results)

กรณีนับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและตรวจยืนยันพบว่าเป็น fecal enterococci หรือ fecal streptococci บางโคโลนี ให้นำสัดส่วนที่ยืนยันแล้วว่าเป็น fecal enterococci หรือ fecal streptococci ไปคูณจำนวนที่นับได้ ตัวอย่าง เช่น ผลรวมของโคโลนีที่นับได้เท่ากับ 45 โคโลนี เมื่อสุ่ม 5 โคโลนีไปตรวจยืนยัน แล้วพบว่าเป็น fecal enterococci หรือ fecal streptococci 3 โคโลนี ดังนั้น สัดส่วนเท่ากับ 3/5

$$\begin{aligned}\text{จำนวน fecal enterococci หรือ fecal streptococci CFU/100 มิลลิลิตรหรือ} \\ \text{ปริมาตรที่ทดสอบ} &= \text{จำนวนโคโลนีที่นับได้} \times \text{สัดส่วน} \\ &= 45 \times 3/5 = 27\end{aligned}$$

9. การรายงานผล (Expression of results)

9.1 การตรวจหา (detection)

รายงานผล Fecal enterococci หรือ Fecal streptococci /100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรที่ทดสอบ พบ หรือ ไม่พบ

9.2 การตรวจปริมาณ (enumeration)

9.2.1 กรณีตรวจไม่พบโคโลนี fecal enterococci หรือ fecal streptococci

รายงานผล Fecal enterococci หรือ Fecal streptococci CFU/100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรที่ทดสอบ = น้อยกว่า 1

9.2.2 กรณีตรวจพบโคโลนี fecal enterococci หรือ fecal streptococci

รายงานผล Fecal enterococci หรือ Fecal streptococci CFU/100 มิลลิลิตร หรือ ปริมาตรที่ทดสอบ = จำนวนโคโลนีที่นับได้ x สัดส่วนที่ตรวจยืนยันแล้ว

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

- 10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (culture media and reagents)
- 10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) และตรวจปริมาณ (enumeration) fecal enterococci หรือ fecal streptococci ในน้ำและน้ำแข็งโดยวิธีกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน
- 10.3 ภาคผนวก 3: แผนภูมิที่ 2 การตรวจยืนยัน fecal enterococci หรือ fecal streptococci ในน้ำและน้ำแข็ง
- 10.4 ภาคผนวก 4: ตารางแสดงคุณลักษณะของ *Enterococcus* และ *Streptococcus* sp. ที่แยกจากอุจจาระ

ภาคผนวก 1
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Bile esculin agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Oxgall	40	กรัม
Esculin	1	กรัม
Ferric citrate	0.5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 8-10 มิลลิลิตร
ใส่หลอดหรือปริมาณที่เหมาะสมใส่ขวดสำหรับเทใส่จานเพาะเชื้อ
ฆ่าเชื้อที่ $121^{\circ}\text{C} \pm 15$ นาที pH 6.6 ± 0.2 เติงหลอด หรือเทใส่จานเพาะเชื้อ และปล่อยให้
ให้เย็นแข็ง

2. Brain-heart infusion (BHI) agar

Infusion of calf brain	200	กรัม
Infusion of beef heart	250	กรัม
Proteose peptone	10	กรัม
Glucose	2	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	2.5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที
pH 7.4 ± 0.2

3. Brain-heart infusion (BHI) broth

Infusion of calf brain	200	กรัม
Infusion of beef heart	250	กรัม
Proteose peptone	10	กรัม
Glucose	2	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	2.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2

4. Brain-heart infusion (BHI) broth ที่มีเกลือ 6.5% NaCl

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth สำเร็จรูป หรือเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ตามสูตรข้อ 3 แล้วเติม NaCl 60 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร

5. EIA medium

Esculin	1	กรัม
Ferric citrate	0.5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที
pH 7.1 ± 0.2 เทใส่จานเพาะเชื้อขนาด 9x50 มิลลิเมตร ให้มีความหนา 4-5 มิลลิเมตร
(ประมาณ 4-6 มิลลิลิตร) เก็บในที่มืด 2-10°C ได้ไม่เกิน 14 วัน

6. mE agar

6.1 base medium

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	15	กรัม
Yeast extract	30	กรัม
Esculin	1	กรัม
Cycloheximide	0.05	กรัม
Sodium azide (NaN ₃)	0.15	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.1 ± 0.2

6.2 Nalidixic acid-NaOH solution

ผสม Nalidixic acid 0.24 กรัม ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 5 มิลลิลิตร เติม 0.1 N NaOH 2-3 หยด (ประมาณ 0.2 มิลลิลิตร) เพื่อละลาย Nalidixic acid แล้วกรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่ 2-10°C ได้ไม่เกิน 14 วัน

การใช้งาน

เติมน้ำผสมข้อ 6.2 ลงใน base medium ข้อ 6.1 ที่ทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 44-46°C แล้วเติม 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 0.15 กรัม ผสมกันให้ละลาย เทใส่จานเพาะเชื้อขนาด 9x50 มิลลิเมตร ให้มีความหนา 4-5 มิลลิเมตร (ประมาณ 4-6 มิลลิลิตร) เก็บในที่มืด 2-10°C ได้ไม่เกิน 14 วัน

หมายเหตุ Cycloheximide เป็นสารพิษ เมื่อรับประทานหรือดูดซึมผ่านผิวหนังจะเป็นพิษรุนแรง

7. mEI agar

7.1 base medium

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	15	กรัม
Yeast extract	30	กรัม
Esculin	1	กรัม
Cycloheximide	0.05	กรัม
Sodium azide (NaN_3)	0.15	กรัม
Indoxyl- β -D-glucoside	0.75	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร มาเคือที่ 121°C
15 นาที pH 7.1 ± 0.2

7.2 Nalidixic acid-NaOH solution เหมือนข้อ 6.2

การใช้งาน

เติมส่วนผสมข้อ 7.2 ลงใน base medium ข้อ 7.1 ที่ทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ $44-46^\circ\text{C}$ แล้วเติม 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 0.02 กรัม ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อขนาด 9×50 มิลลิเมตร ให้มีความหนา 4-5 มิลลิเมตร (ประมาณ 4-6 มิลลิลิตร) เก็บในที่มืด $2-10^\circ\text{C}$ ได้ไม่เกิน 14 วัน

8. mEnterococcus agar

Tryptose	20	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	2	กรัม
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	4	กรัม
Sodium azide (NaN_3)	0.4	กรัม
2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride	0.1	กรัม
Agar	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลาย เทใส่จานเพาะเชื้อขนาด 9×50 มิลลิเมตร ให้มีความหนา 4-5 มิลลิเมตร (ประมาณ 4-6 มิลลิลิตร) pH 7.2 ± 0.2

9. Buffered water

9.1 Stock phosphate buffer solution

Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	34	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 ± 0.5 โดยใช้ 1 N NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที หรือใช้การกรอง

9.1.1 Magnesium chloride stock solution

Magnesium chloride (MgCl_2 หรือ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	38 หรือ 81.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ชั่ง magnesium chloride ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที

9.1.2 Working solution

เปิด stock phosphate buffer solution 1.25 มิลลิลิตร และ magnesium chloride stock solution 0.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH 7.2 ± 0.1 แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที

10. 0.1% Peptone water

Peptone	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย peptone ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

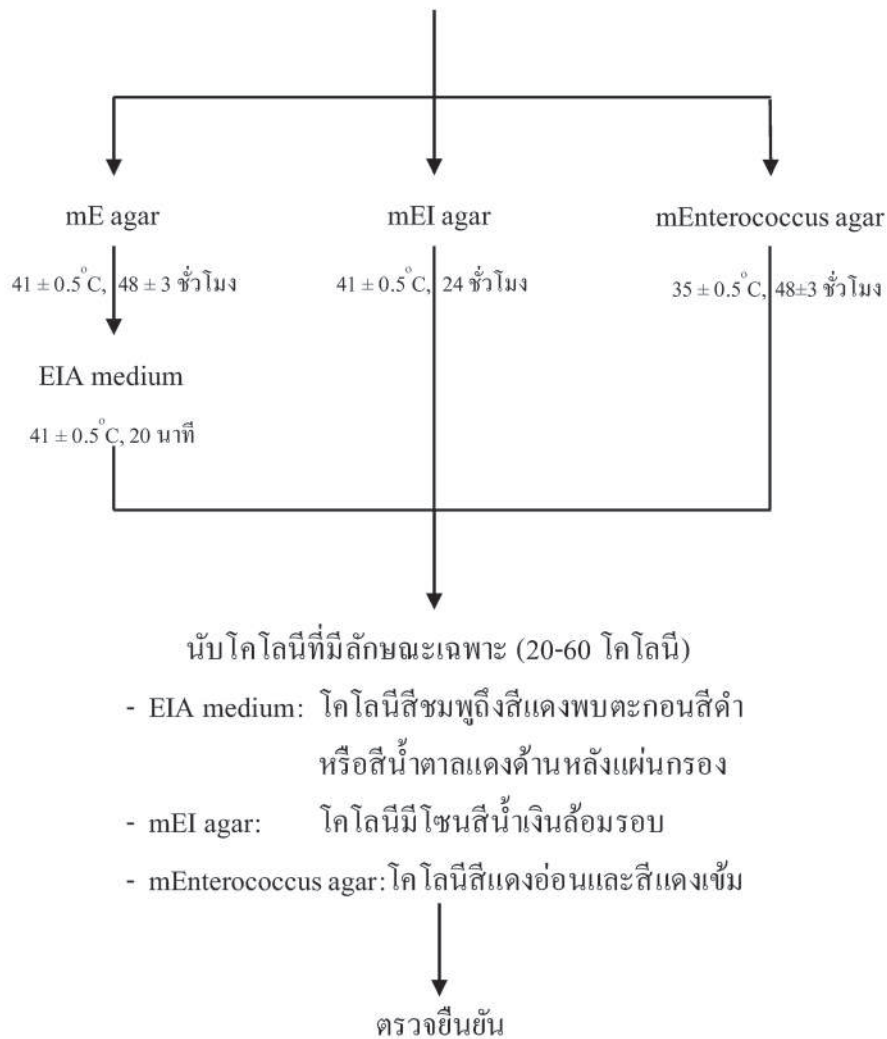
1. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

2. 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2)

นำ 10% hydrogen peroxide ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันหรือเปอร์เซ็นต์อื่น ๆ โดยปรับให้เป็น 3% หรือใช้ชนิดสำเร็จรูป

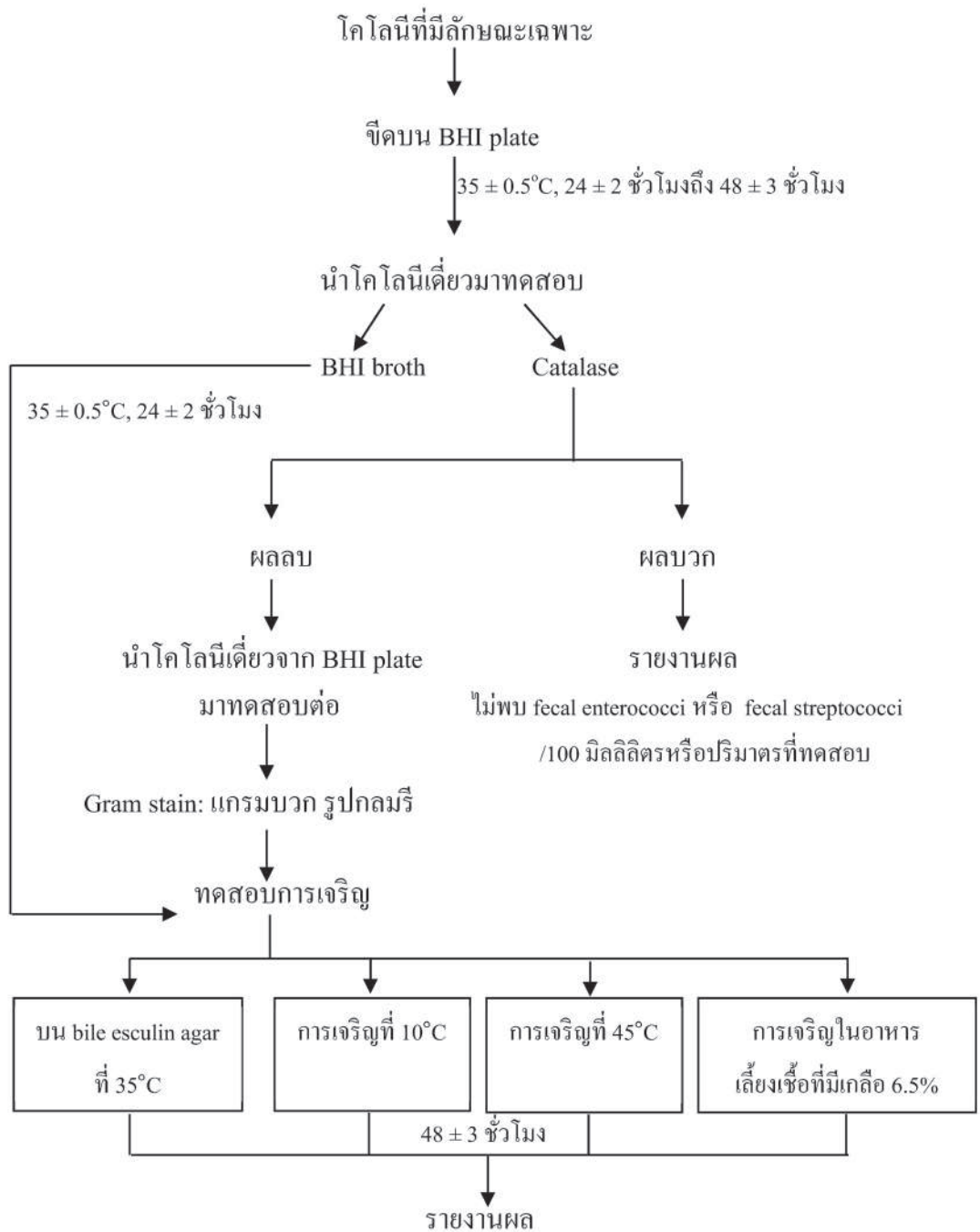
ภาคผนวก 2

กรองตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรที่ต้องการทดสอบ
ผ่านแผ่นกรองเมมเบรนวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ



แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) และตรวจปริมาณ (enumeration) fecal enterococci หรือ fecal streptococci ในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธีกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน

ภาคผนวก 3



แผนภูมิที่ 2 การตรวจยืนยัน fecal enterococci หรือ fecal streptococci ในน้ำและน้ำแข็ง

ภาคผนวก 4

ตาราง แสดงคุณลักษณะของ *Enterococcus* และ *Streptococcus* sp. ที่แยกจากอุจจาระ

สปีชีส์	จาก อุจจาระ	Bile-esculin agar	การเจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีเกลือ 6.5%	การเจริญบน อาหารเลี้ยง เชื้อที่ $10 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$	การเจริญ บนอาหาร เลี้ยงเชื้อที่ $45 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. columbae</i>	+	+	-	-/+	-/+
<i>E. cecorum</i>	+	+	-	-/+	-/+
<i>E. durans</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. avium</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. munditii</i>	+	+	+	+/-	-/+
<i>E. dispar</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	+	+/+	-/+
<i>E. asini</i>	+	+	-	+/+	+
<i>S. hyointestinalis</i>	+	-	-	-/+	+
<i>S. bovis</i>	+	+	-	-/+	+
<i>S. intestinalis</i>	+	-	-	-/+	+
<i>S. suis</i>	+	-	-	-/+	+
<i>S. alactolyticus</i>	+	-	-	-/+	+
<i>S. equinus</i>	+	+	-	-/+	+

DMSc F 2032: วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหาร

Analytical method of Coliforms, Fecal coliforms and *E. coli* in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่ม coliforms กลุ่ม fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection) และการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2002; updated 2017, Chapter 4 “Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria”.

[ออนไลน์]. 2002; [สืบค้น 14 กุมภาพันธ์ 2561]. เข้าถึงได้ที่ <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>.

2.2 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2010; Appendix:2 Most Probable Number from Serial Dilutions. [ออนไลน์]. 2010; [สืบค้น 14 กุมภาพันธ์ 2561]. เข้าถึงได้ที่ <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethod/sucm109656.htm>.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 *E. Coli* = *Escherichia coli*

3.2 IMViC = indole, methyl red, Voges-Proskauer, citrate

3.3 Shellfish = สัตว์ทะเลมีเปลือกที่บริโภคเป็นอาหารได้ เช่น กุ้ง หอย ปู

4. หลักการ (Principle)

แบคทีเรียในกลุ่ม coliforms เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose) เกิดกรดและสร้างก๊าซที่อุณหภูมิ 35°C ภายใน 48 ชั่วโมง พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ใช้เป็นตัวบ่งชี้สุขลักษณะของน้ำและสิ่งแวดล้อมใน

กระบวนการผลิตอาหาร ส่วน fecal coliforms หรือ thermotolerant coliforms เป็นกลุ่มย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม coliforms พบมากในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose) เกิดกรดและสร้างก๊าซที่อุณหภูมิ 44.5°C ภายใน 24-48 ชั่วโมง อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้มาตรฐานสำหรับ shellfish และน้ำเพาะเลี้ยง shellfish สำหรับ *E. coli* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งในกลุ่ม fecal coliforms นิยมใช้เป็นจุลินทรีย์บ่งชี้สู่ลักษณะการผลิตอาหาร การจำแนก *E. coli* อาศัยหลักการทางชีวเคมีของปฏิกิริยา IMViC ตามปกติการตรวจวิเคราะห์ coliforms, fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหาร มักใช้วิธีมาตรฐาน (conventional method) แต่คุณสมบัติที่ *E. coli* มากกว่า 95% สามารถสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase (GUD) ซึ่งย่อย fluorogenic substrate เช่น 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) และให้สารเรืองแสง 4-methylumbelliferone (MU) ซึ่งเห็นเป็นสีน้ำเงิน ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (UV) ความยาวคลื่นประมาณ 365 นาโนเมตร ในที่มีด ดังนั้นจึงอาจใช้หลักการการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในการตรวจสอบเบื้องต้นและการตรวจยืนยันเพื่อจำแนก *E. coli* จากกลุ่ม coliforms เช่น การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LST-MUG broth, EC-MUG broth, VRBA-MUG นอกจากนี้อาจใช้ chromogenic substrates อื่นแทน MUG สำหรับการตรวจวิเคราะห์ coliforms และ *E. coli* ได้เช่นกัน

การตรวจ coliforms, fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหารแบ่งออกเป็น

4.1 การตรวจปริมาณ (enumeration) มี 2 วิธี คือ

4.1.1 วิธี MPN แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

4.1.1.1 การตรวจสอบเบื้องต้น (presumptive phase) นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสมอย่างน้อย 3 ระดับติดต่อกัน ระดับละ 3 หรือ 5 หลอด ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบ เพื่อแยก coliforms ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้

4.1.1.2 การตรวจยืนยัน (confirmed phase) นำหลอดที่ให้ก๊าซไปตรวจยืนยัน coliforms และ fecal coliforms โดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว (selective broth)

4.1.1.3 การตรวจขั้นสมบูรณ์ (completed phase) แยกเชื้อและนำไปตรวจยืนยัน *E. coli* โดยทดสอบทางชีวเคมี

ปัจจุบันการตรวจยืนยัน fecal coliforms ใช้อุณหภูมิในการตรวจวิเคราะห์ที่ 44.5°C เนื่องจาก *E. coli* ATCC 25922 เปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสเป็นกรดและก๊าซได้ไม่ดีที่อุณหภูมิ 45.5°C และเพื่อให้สอดคล้องกับตัวอย่างสัตว์น้ำมีเปลือกที่บริโภคได้ (shellfish) เช่น กุ้ง หอย ปู

4.1.2 วิธี pour plate: coliforms และ *E. coli*

นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม ปิเปตลงบนจานเพาะเชื้อ เทด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง นำไปบ่ม นับจำนวน โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ และนำไปตรวจยืนยันโดยทดสอบทางชีวเคมี

4.2 การตรวจหา (detection): coliforms และ *E. coli*

ตรวจสอบเบื้องต้นโดยนำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบ จำนวน 2 หลอดต่อระดับการเจือจาง และดำเนินการตามขั้นตอนการตรวจยืนยันและการตรวจขั้นสมบูรณ์

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 2% Brilliant green lactose bile (BGLB) broth
- 5.1.2 EC broth
- 5.1.3 EC-MUG broth
- 5.1.4 Koser's citrate broth หรือ Simmons citrate agar
- 5.1.5 Lactose broth
- 5.1.6 Lauryl tryptose (LST) broth
- 5.1.7 Lauryl tryptose MUG (LST-MUG) broth
- 5.1.8 Levine's eosin-methylene blue (L-EMB) agar
- 5.1.9 Methyl red-Voges Proskauer (MR-VP) broth
- 5.1.10 Plate count agar (PCA)
- 5.1.11 Tryptone (tryptophane) broth
- 5.1.12 Violet red bile agar (VRBA)
- 5.1.13 Violet red bile agar-MUG agar (VRBA-MUG)

5.2 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ Butterfield's phosphate-buffered water (BPB) หรือ equivalent diluent เช่น 0.1% peptone water (กรณี shellfish ใช้ BPB หรือ 0.5% peptone water)

5.3 สารเคมี

5.3.1 Gram stain reagents

5.3.2 Kovacs' reagent

5.3.3 Methyl red (MR) reagent

5.3.4 Voges-Proskauer (VP) reagent

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave)

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.3 เครื่องบดปั่น (blender) หรือเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)

6.1.4 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

6.1.5 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
(สำหรับ shellfish)

6.1.6 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.8 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.9 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ และ $47 \pm 2^{\circ}\text{C}$

6.1.10 UV lamp ความยาวคลื่นประมาณ 365 นาโนเมตร ไม่เกิน 6 วัตต์

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 โถปั่น (blender) หรือถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag)

6.2.2 ขวดรูปخمพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว (screw-cap bottle)

6.2.3 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.4 หัวงและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)

6.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.6 ปิเปต (pipette)

6.2.7 หลอดทดลอง (test tube) พร้อมหลอดดักก๊าซ (Durham tube)

6.2.8 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่าง 50 กรัม (กรณีมีตัวอย่างน้อยกว่า 50 กรัม ให้ใช้ตัวอย่างครึ่งหนึ่ง) ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ให้ได้ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.1.3 กรณีที่ตัวอย่างเป็นหอยสองฝา (bivalve molluscan shellfish) สดและแช่แข็ง [ไม่รวม crustaceans (crabs, lobsters, and shrimp) และเนื้อหอยแปรรูป เช่น ชุบเกล็ดขนมปัง (breaded) แกะเปลือก (shucked) และปรุงสุก (pre-cooked and heat-processed)] สุ่มตัวอย่างหอย 10-12 ตัว (ทั้งเนื้อและส่วนของเหลว น้ำหนักรวม 200 กรัม) ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ เทสารละลายสำหรับเจือจาง 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่น นาน 2 นาที จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:2

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (preparation of test sample)

7.2.1 เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ๆ ละ 10 เท่า (serial ten-fold dilutions) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจางดังนี้

กรณี 7.1.1 เทสารละลายสำหรับเจือจาง 450 มิลลิลิตร หรือปริมาตร 9 เท่า ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่น 30-60 วินาที หรือเครื่องตีผสมอาหาร 2 นาที จะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 (initial suspension หรือ primary dilution)

กรณี 7.1.2 ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10

กรณี 7.1.3 หลังจากเตรียมตัวอย่างเจือจาง 1:2 ให้เริ่มทำการตรวจวิเคราะห์ภายใน 2 นาที โดย นับจากการเจือจางเป็น 1:10 ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง (BPB หรือ 0.5% peptone water) ปริมาตร 4 เท่า (เช่น ตัวอย่างเจือจาง 1:2 ปริมาตร 20 กรัม ใส่สารละลายสำหรับเจือจาง 80 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากัน

7.2.2 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ

7.3 การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms, fecal coliforms และ *E. coli*

ในอาหารโดยวิธี MPN: ภาคผนวก 2 แผนภูมิที่ 1

7.3.1 การตรวจสอบเบื้องต้น (presumptive phase)

7.3.1.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ใน LST broth (หรือ lactose broth) อย่างน้อย 3 ระดับติดต่อกัน ระดับการเจือจางละ 3 หลอด

- กรณีตัวอย่าง shellfish ปิเปตตัวอย่างใส่ใน LST broth ระดับการเจือจางละ 5 หลอดโดยใส่ตัวอย่างที่เจือจาง 1:2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เทียบเท่าน้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม) และตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่าตามลำดับ 1 มิลลิลิตร อย่างน้อย 3 ระดับ (1:10, 1:100 และ 1: 1,000 ซึ่งเทียบเท่าน้ำหนักตัวอย่าง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม ตามลำดับ)

7.3.1.2 บ่มที่ 35°C 24 ± 2 ชั่วโมง

7.3.1.3 อ่านและบันทึกผลหลอด LST broth

ผลบวก: เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ หรือเกิดฟองก๊าซเมื่อเขย่าหลอดเบาๆ

ผลลบ: ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ถ้าให้ผลลบ บ่มเพิ่ม 24 ชั่วโมง อ่านและบันทึกผลที่ 48 ± 3 ชั่วโมง

หมายเหตุ กรณีตรวจปริมาณ *E. coli* ในอาหาร อาจใช้ LST-MUG broth แทน LST broth ได้ (ยกเว้นในหอยสองฝา เนื่องจากเนื้อหอยมี natural

GUD activity ซึ่งจะเกิดการเรืองแสง หรือผลบวกปลอม) บ่มที่ 35°C 24 ถึง 48 ± 2 ชั่วโมง อ่านผลเช่นเดียวกับ LST broth พร้อมทั้งสังเกตการเรืองแสง สี น้ำเงิน ภายใต้แสง UV ความยาวคลื่นประมาณ 365 นาโนเมตร หลอดที่ให้ผลบวก (เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ และเรืองแสงสีน้ำเงิน) ให้ดำเนินการตรวจยืนยันต่อตามข้อ 7.3.4

7.3.2 การตรวจยืนยัน (confirmed phase) สำหรับ coliforms

7.3.2.1 นำ 1 loop ของแต่ละหลอด LST broth ที่ให้ผลบวก ถ่ายลงใน BGLB broth หลอดต่อหลอด (อาจถ่ายเชื้อโดยใช้แท่งไม้ปราศจากเชื้อแทน loop และกรณีที่พบฝ้าให้หลีกเลี่ยงส่วนของฝ้า)

7.3.2.2 บ่มที่ 35°C 48 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก: เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ผลลบ: ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

7.3.2.3 อ่านและบันทึกผลจำนวนหลอด BGLB broth ที่ให้ผลบวก

7.3.2.4 นำค่าไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN

7.3.3 การตรวจยืนยัน (confirmed phase) สำหรับ fecal coliforms

7.3.3.1 นำ 1 loop จาก LST broth ที่ให้ผลบวกแต่ละหลอด ถ่ายลงใน EC broth หลอดต่อหลอด

7.3.3.2 บ่มที่ 44.5°C 24 ± 2 ชั่วโมง

ผลบวก: เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ผลลบ: ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ถ้าให้ผลลบ บ่มเพิ่ม 24 ชั่วโมง อ่านและบันทึกผลที่ 48 ± 2 ชั่วโมง

7.3.3.3 อ่านและบันทึกผลจำนวนหลอด EC broth ที่ให้ผลบวก

7.3.3.4 นำค่าไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN

หมายเหตุ กรณีตรวจปริมาณ *E. coli* ในเนื้อหอย เช่น หอยนางรม อาจใช้ EC-MUG broth แทนการใช้ EC broth ในขั้นตอน confirmed phase บ่มและอ่านผลเช่นเดียวกับ EC broth พร้อมทั้งสังเกตการเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรในที่มืด นำหลอดที่ให้ผลบวก (เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ และเรืองแสงสีน้ำเงิน) ดำเนินการตรวจยืนยันสมบูรณ์ตามข้อ 7.3.4

7.3.4 การตรวจขั้นสมบูรณ์ (completed phase) : *E. coli*

7.3.4.1 นำหลอด EC broth (หรือ EC-MUG broth หรือ LST-MUG broth) ที่ให้ผลบวก จีดแยกเชื้อบน L-EMB agar

7.3.4.2 บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง

7.3.4.3 เลือกโคโลนีลักษณะแบนและมีสีดำตรงกลาง มีหรือไม่มี metallic sheen 1-5 โคโลนี จากแต่ละจานเพาะเชื้อ จีดแยกเชื้อบน PCA slant

7.3.4.4 บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง

7.3.4.5 นำเชื้อจาก PCA slant มาข้อมสีแกรม กรณีที่พบเชื้อแกรมลบ รูปท่อนสั้น ให้นำไปทดสอบ ดังนี้

7.3.4.5.1 ปฏิกริยา IMViC

- การทดสอบ indole

เขี่ยเชื้อลงใน tryptone broth บ่มที่ 35°C 24 ± 2 ชั่วโมง

หยด Kovacs'reagent 0.2-0.3 มิลลิลิตร อ่านผล

ผลบวก: เกิดวงแหวนสีแดงด้านบน

ผลลบ: เกิดวงแหวนสีเหลือง

E. coli (biotype 1) ให้ผลบวก

E. coli (biotype 2) ให้ผลลบ

- การทดสอบ MR-VP reactive compounds

เขี่ยเชื้อลงใน MR-VP broth บ่มที่ 35°C 48 ± 2 ชั่วโมง

ถ่าย broth 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดปราศจากเชื้อ หยด

VP reagents (∞-naphthol solution 0.6 มิลลิลิตร

และ 40% KOH solution 0.2 มิลลิลิตร) เขย่า จากนั้น

เติมเกล็ด creatine เล็กน้อย เขย่าอีกครั้ง แล้วตั้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง อ่านผล

VP ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพู-แดง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

E. coli ให้ผลลบ

สำหรับ MR ให้บ่ม MR-VP broth ต่ออีก 48 ± 2 ชั่วโมง

หยด methyl red indicator 5 หยด เขย่า อ่านผล

MR ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเหลือง

เป็นสีแดง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง

E. coli ให้ผลบวก

- การทดสอบ citrate

เจือเชื้อปริมาณเล็กน้อยลงใน Koser's citrate broth*

หรือนำเชื้อขีดบนผิวหน้าและ stab ลงใน Simmons

citrate agar** บ่มที่ 35°C 96 ชั่วโมง อ่านผล

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นชัดเจน* หรือเชื้อเจริญและ

อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็น

สีน้ำเงิน**

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น* หรือเชื้อไม่เจริญ/

เจริญเล็กน้อยและอาหารเลี้ยงเชื้อไม่

เปลี่ยนสี**

E. coli ให้ผลลบ

7.3.4.5.2 การสร้างก๊าซจากน้ำตาลแลคโตส

เจือเชื้อลงใน LST broth อีกครั้ง เพื่อยืนยันการสร้างก๊าซ

บ่มที่ 35°C 48 ± 2 ชั่วโมง อ่านผลในหลอดดักก๊าซ

ผลบวก: เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซหรือเกิดฟองก๊าซ เมื่อ

เขย่าหลอดเบา ๆ

ผลลบ: ไม่เกิดก๊าซ

E. coli ให้ผลบวก

การสรุปผลว่าพบ *E. coli* ต้องพบเชื้อที่มีคุณสมบัติดังนี้

- 1) ใช้น้ำตาลแลคโตสและสร้างก๊าซ ภายใน 48 ชั่วโมง ที่ 35°C
- 2) พบเชื้อแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์

3) ให้ผลปฏิกิริยา IMViC รูปแบบ +++- (biotype 1) หรือ +-+ (biotype 2)

หมายเหตุ อาจใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูป เช่น API 20E หรือ VITEK เพื่อตรวจจำแนก *E. coli* แทนการทดสอบปฏิกิริยา IMViC

7.3.4.6 บันทึกจำนวนหลอด EC broth ที่ได้ผลการตรวจยืนยันขึ้นสมบูรณ์ว่าเป็น *E. coli*

7.3.4.7 นำค่าไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN

7.4 การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms และ *E. coli* ในอาหาร โดยวิธี pour plate:

7.4.1 coliforms: ภาคผนวก 3 แผนภูมิที่ 2

7.4.1.1 ปิเปิดตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเชื้อระดับการเจือจางละ 2 จาน

7.4.1.1.1 กรณีทั่วไป

- เท VRBA 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นแข็ง
- เททับหน้าด้วย VRBA 5 มิลลิลิตร (เพื่อป้องกันเชื้อเจริญแผ่นผิวหน้าอุ่น) ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นแข็ง

7.4.1.1.2 กรณีที่คาดว่าตัวอย่างมี injured หรือ stressed cell

- เท TSA 8-10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละจานเพาะเชื้อ ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ± 0.5 ชั่วโมง
- เททับหน้าด้วย VRBA 8-10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นแข็ง

7.4.1.2 บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง (กรณีตัวอย่างผลิตภัณฑ์นม บ่มที่ 32°C)

7.4.1.3 เลือกลานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ 25-250 โคโลนี นับโคโลนีสีแดง-ม่วงที่มีโซนล้อมรอบ (โซนเกิดจาก precipitated bile acids) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ≥ 0.5 มิลลิเมตร

7.4.1.4 ตรวจยืนยันโดยส้อมโคโลนีลักษณะเฉพาะอย่างน้อย 10 โคโลนี ใส่ในหลอด BGLB broth (1 โคโลนีต่อหลอด)

7.4.1.5 บ่มที่ 35°C อ่านผลการเกิดก๊าซที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

7.4.1.6 บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก

(กรณีหลอด BGLB broth ที่ให้ผลบวกพบฝ้า ให้ย้อมสีแกรมจาก broth เพื่อให้แน่ใจว่าก๊าซที่เกิดขึ้นมิได้เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้)

7.4.2 *E. coli*: ภาคนว 4 แผนภูมิที่ 3

7.4.2.2 เหมือนข้อ 7.4.1.1–7.4.1.2 เว้นแต่เทตัทหน้าด้วย VRBA-MUG แทน VRBA

7.4.2.3 นำจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ 25-250 โคโลนี ไปส่องภายใต้แสง UV ความยาวคลื่นประมาณ 365 นาโนเมตรในที่มืด และนับจำนวน โคโลนีที่มีการเรืองแสงสีน้ำเงินรอบโคโลนี

7.4.2.4 สุ่มโคโลนีที่ให้ผลบวกจากข้อ 7.4.2.2 อย่างน้อย 10 โคโลนี ไปทดสอบทางชีวเคมีตามวิธีการตรวจขั้นสมบูรณ์ในข้อ 7.3.4.5

7.5 การตรวจหา (detection) coliforms และ *E. coli* ในอาหาร: ภาคนว 5 แผนภูมิที่ 4

7.5.1 นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม (เช่น 1:10 และ 1:100) ใส่ลง LST broth (หรือ lactose broth) จำนวน 2 หลอดต่อระดับการเจือจาง

7.5.2 เหมือนข้อ 7.3.1.2-7.3.1.3 และต่อด้วยข้อ 7.3.2.1-7.3.2.3 สำหรับการตรวจหา coliforms

7.5.3 เหมือนข้อ 7.3.1.2-7.3.1.3 ต่อด้วยข้อ 7.3.3.1-7.3.3.3 และข้อ 7.3.4.1-7.3.4.6 สำหรับการตรวจหา *E. coli*

8. การคำนวณผล (Calculation of results)

8.1 การคำนวณกรณีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี MPN

8.1.1 นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก เปรียบเทียบกับตาราง MPN (ภาคนว 6) จะได้ค่า MPN/กรัม และช่วงความเชื่อมั่นที่ระดับ 95% (95% confidence intervals)

8.1.2 กรณีจำนวนหลอดบวกไม่เป็นไปตามตาราง MPN ให้ใช้สูตรคำนวณ

(Thomas, 1942) ดังนี้

$$\text{MPN/ กรัม} = (\Sigma g_j) / (\Sigma t_j m_j \Sigma (t_j - g_j) m_j)^{(1/2)}$$

$$\Sigma g_j = \text{จำนวนหลอดทั้งหมดที่ให้ผลบวก}$$

$$\Sigma (t_j - g_j) m_j = \text{น้ำหนักรวมเป็นกรัมของตัวอย่างในหลอดที่ให้ผลลบ}$$

$$\Sigma t_j m_j = \text{น้ำหนักรวมเป็นกรัมของตัวอย่างในหลอดทั้งหมด}$$

ให้เลือกระดับการเจือจางสำหรับการคำนวณ โดยเลือกระดับการเจือจางต่ำสุดที่ให้ผลบวกไม่ครบทุกหลอด แล้วเลือกระดับการเจือจางสูงสุดที่มีผลบวกอย่างน้อย 1 หลอด จากนั้นเลือกทุกระดับการเจือจางที่อยู่ระหว่างสองระดับที่เลือกไว้แล้ว ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่างที่ 1 ระดับการเจือจาง	1:1	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000
จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	5/5	10/10	<u>4/10</u>	<u>2/10</u>	0/5

ในที่นี้ เลือกสองระดับการเจือจาง 1:100 และ 1:1,000 จะได้

$$\Sigma g_j = 6$$

$$\Sigma (t_j - g_j) m_j = (6 \times 0.01) + (8 \times 0.001)$$

$$= 0.068$$

$$\Sigma t_j m_j = (10 \times 0.01) + (10 \times 0.001)$$

$$= 0.11$$

แทนค่าในสูตร

$$\text{MPN/ กรัม} = 6 / \sqrt{(0.068) (0.11)}$$

$$= 6 / 0.086$$

$$= 70$$

ตัวอย่างที่ 2 ระดับการเจือจาง 1:10 1:100 1:1,000
จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก 2/3 0/3 3/3
ในที่นี้ เลือกทั้งสามระดับการเจือจาง จะได้

$$\begin{aligned}\Sigma g_j &= 5 \\ \Sigma(t_j - g_j)m_j &= (1 \times 0.1) + (3 \times 0.01) + (0 \times 0.001) \\ &= 0.13 \\ \Sigma t_j m_j &= (3 \times 0.1) + (3 \times 0.01) + (3 \times 0.001) \\ &= 0.333 \\ \text{แทนค่าในสูตร} \\ \text{MPN/ กรัม} &= 5/\sqrt{(0.13)(0.333)} \\ &= 5/0.208 \\ &= 24\end{aligned}$$

8.1.3 การประมาณค่าขีดความเชื่อมั่น (95% confidence limits) ของผล MPN
คำนวณจากค่า standard error ของ $\log_{10}(\text{MPN})$ ด้วยวิธีของ Haldane โดยใช้
สูตรคำนวณ ดังนี้

95% confidence intervals = Log MPN/กรัม $\pm$ (1.96) (standard error)
standard error คำนวณได้จาก Excel spreadsheet ตามเอกสารอ้างอิงข้อ 2.2

ตัวอย่าง ระดับการเจือจาง 1:10 1:100 1:1,000
จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก 2/3 0/3 3/3

$$\begin{aligned}\therefore \text{MPN/ กรัม} &= 5/\sqrt{(0.1+0.03+0.000)(0.0333)(0.3+0.03+0.003)} \\ &= 5/\sqrt{(0.13)(0.333)} = 24 \\ 95\% \text{ confidence intervals} &= \log 24 \pm (1.96)(0.1973) \\ &= 1.3802 \pm 0.3867 \\ &= 0.9935 \text{ ถึง } 1.7669 \\ \text{Lower limit} &= \text{antilog } 0.9935 = 9.9 \\ \text{Upper limit} &= \text{antilog } 1.7669 = 58.5\end{aligned}$$

ในกรณีที่ระดับการเจือจางเริ่มต้นไม่ใช่ 1:10 (เท่ากับน้ำหนักตัวอย่าง 0.1 กรัม) สามารถหาค่า MPN ได้ดังนี้

$$\text{MPN/กรัม} = \frac{\text{ค่าที่อ่านได้จากตาราง} \times \text{ระดับการเจือจางกลาง (middle dilution)}}{100}$$

ตัวอย่าง	ระดับการเจือจาง	1:1,000	1:10,000	1:100,000
จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก		3/3	2/3	1/3
ดังนั้น ค่าที่อ่านได้จากตาราง		=	150	
ระดับการเจือจางกลาง		=	10,000	
∴ MPN/ กรัม		=	$\frac{(150 \times 10,000)}{100}$	
		=	15,000	

8.2 การคำนวณกรณีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี pour plate

กรณีนับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและนำไปตรวจยืนยันปรากฏว่าเป็น coliforms หรือ *E. coli* บางโคโลนีให้นำสัดส่วนที่ยืนยันแล้วว่าเป็น coliforms หรือ *E. coli* ไปคูณจำนวนที่นับได้ และคูณด้วย dilution factor

ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ = 65 โคโลนี ที่ระดับการเจือจาง

1:10,000 ตรวจยืนยันพบว่าเป็น coliforms 4 จาก 5 โคโลนี ดังนั้น

$$\begin{aligned} \text{coliforms CFU/ กรัมหรือมิลลิลิตร} &= 65 \times (4/5) \times 10,000 \\ &= 520,000 \end{aligned}$$

9. การรายงานผล (Expression of results)

9.1 การตรวจหา (detection) รายงานเป็น

พบ/ไม่พบต่อน้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่าง (เช่น กรัม หรือ มิลลิลิตร)

9.2 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี MPN รายงานเป็น Coliforms หรือ

Fecal coliforms หรือ *E. coli* MPN/กรัม หรือ มิลลิลิตร ยกเว้น shellfish

รายงาน MPN/100 กรัม

9.2.1 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี pour plate รายงานเป็นจำนวน Coliforms หรือ *E. coli* CFU/น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัมหรือมิลลิลิตร)

9.2.2 กรณีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี pour plate ถ้าไม่พบโคโลนี ลักษณะเฉพาะของ coliforms หรือ *E. coli* หรือกรณีที่ยืนยันแล้วพบว่า ไม่ใช่ coliforms ให้รายงานดังนี้

- ตัวอย่างของแข็งหรือของเหลวชั้นหนืดที่ระดับการเจือจางแรก ให้รายงานน้อยกว่า 10
- ตัวอย่างของเหลวที่ตัวอย่างเริ่มต้น ให้รายงานน้อยกว่า 1 หรือไม่พบ

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary note)

- 10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)
- 10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิที่ 1 การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms, fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหารโดยวิธี MPN
- 10.3 ภาคผนวก 3: แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms ในอาหาร โดยวิธี pour plate
- 10.4 ภาคผนวก 4: แผนภูมิที่ 3 การตรวจปริมาณ (enumeration) *E. coli* ในอาหาร โดยวิธี pour plate
- 10.5 ภาคผนวก 5: แผนภูมิที่ 4 การตรวจหา (detection) coliforms และ *E. coli* ในอาหาร
- 10.6 ภาคผนวก 6: ภาคผนวก 6:
- ตารางที่ 1 ค่า MPN และ Confidence limits สำหรับผลบวกและผลลบ เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01, 0.001 กรัม จำนวน 3 หลอดต่อระดับการเจือจาง
- ตารางที่ 2 ค่า MPN และ Confidence limits สำหรับผลบวกและผลลบ เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01, 0.001 กรัม จำนวน 5 หลอดต่อระดับการเจือจาง

ภาคผนวก 1
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. 2% Brilliant green lactose bile (BGLB) broth

Peptone	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
Oxgall	20	กรัม
Brilliant green	0.0133	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 1 มิลลิลิตรใส่หลอด
ทดลองที่มีหลอดดัดกักอากาศว่าอยู่ หม่าเชื้อที่ 121°C 12-15 นาที pH 7.2 ± 0.2

2. EC broth

Tryptose หรือ trypticase	20	กรัม
Lactose	5	กรัม
Bile salts mixture or bile salts No. 3	1.5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	4	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 10 มิลลิลิตรใส่หลอด
ทดลองที่มีหลอดดัดกักอากาศว่าอยู่ หม่าเชื้อที่ 121°C 12-15 นาที pH 6.9 ± 0.2

3. EC-MUG broth

Tryptose หรือ trypticase	20	กรัม
Lactose	5	กรัม
Bile salts mixture or bile salts No. 3	1.5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	4	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)	0.05	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 10 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซคว่ำอยู่ (หลอดที่ใช้ต้องไม่เรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 365 นาโนเมตร) ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.9 ± 0.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 สัปดาห์ หรือเก็บในตู้เย็น ได้นาน 1 เดือน

4. Koser's citrate broth

Sodium ammonium hydrogen phosphate ($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$)	1.5	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (monobasic)	1	กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
Sodium citrate. $2H_2O$	3	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.7 ± 0.2

5. Lactose broth

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Lactose	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 10 มิลลิลิตร
ใส่หลอด หม่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.9 ± 0.2

6. Lauryl sulphate tryptose broth (LST broth)

Tryptose	20	กรัม
Lactose	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2.75	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2.75	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Sodium lauryl sulfate	0.1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 10 มิลลิลิตร
ใส่หลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซคว่ำอยู่ หม่าเชื้อที่ 121°C 12-15 นาที pH 6.8 ± 0.2

7. Lauryl tryptose MUG (LST-MUG) broth

Tryptose	20	กรัม
Lactose	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2.75	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2.75	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Sodium lauryl sulfate	0.1	กรัม
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)	0.05	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอ่อนๆ (ถ้าจำเป็น) แบ่ง 10 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซคว่ำอยู่ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8±0.2

8. Levine eosin methylene blue (L-EMB) agar

Peptone	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2	กรัม
Agar	15	กรัม
Eosin Y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย แบ่งใส่ขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.1 ± 0.2 เทใส่จานเพาะเชื้อตามปริมาตรที่ต้องการ

9. Methyl red-Voges Proskauer (MR-VP) broth

สูตร 1

Buffered peptone-water powder(Difco or BBL)	7	กรัม
Glucose	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอ่อน ๆ (ถ้าจำเป็น) แบ่ง 10 มิลลิลิตร ใส่หลอด หม่าเชื้อที่ $118-121^{\circ}C$ 15 นาที pH 6.9 ± 0.2

สูตร 2

Pancreatic digest of casein	3.5	กรัม
Peptic digest of animal tissue	3.5	กรัม
Dextrose	5	กรัม
Potassium phosphate (K_3PO_4)	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอ่อน ๆ (ถ้าจำเป็น) แบ่ง 10 มิลลิลิตร ใส่หลอด หม่าเชื้อที่ $118-121^{\circ}C$ 15 นาที pH 6.9 ± 0.2

สูตร 3

Peptone	5	กรัม
Glucose	5	กรัม
Phosphate buffer	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 10 มิลลิลิตร ใส่หลอด หม่าเชื้อที่ $121^{\circ}C$ 15 นาที pH 7.5 ± 0.2

10. Plate count agar

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย
ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

11. Simmons citrate agar

Ammonium dihydrogen phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	1	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Sodium citrate dehydrate	2	กรัม
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2	กรัม
Agar	15	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอ่อน ๆ
พร้อมเขย่าเป็นครั้งคราว ต้มเดือดนาน 1-2 นาที จนอุ่นละลาย แบ่งใส่หลอดตาม
ปริมาณที่ต้องการฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที เย็นหลอดและปล่อยให้เย็นแข็ง pH 6.8 ± 0.2

12. Tryptone broth

Tryptone or trypticase	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Tryptone หรือ trypticase ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 5 มิลลิลิตร ใส่หลอด ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.9 ± 0.2

13. Violet red bile agar (VRBA)

Peptone or gelysate	7	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Bile salts or bile salts No. 3	1.5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.002	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH 7.4 ± 0.2 ต้มให้เดือดนาน 2 นาที ทำให้เย็นลงที่ 45°C ก่อนนำไปใช้

14. Violet red bile-MUG (VRBA-MUG) agar

Peptone or gelysate	7	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Bile salts or bile salts No. 3	1.5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.002	กรัม
4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)	0.1	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH 7.4 ± 0.2 ต้มให้เดือดนาน 2 นาที ทำให้เย็นลงที่ 45°C ก่อนนำไปใช้

15. Butterfield's phosphate-buffered dilution water (BPB)

15.1 Stock solution

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	34	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 โดยใช้ 1 N NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร หมั่นที่ 121°C 15 นาที

15.2 Dilution blanks

ปิเปต stock solution 1.25 มิลลิลิตร นำมาปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ หมั่นที่ 121°C 15 นาที

16. 0.1% peptone water

Peptone	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย peptone ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปรับ pH 7.0 ± 0.2 แบ่งใส่หลอดหรือขวดตาม
ปริมาณที่ต้องการ มาเชื้อที่ 121°C 15 นาที

17. 0.5% peptone water

Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย peptone ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปรับ pH 7.0 ± 0.2 แบ่งใส่หลอดหรือขวดตาม
ปริมาณที่ต้องการ มาเชื้อที่ 121°C 15 นาที

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

2. Kovacs' reagent

p-Dimethylaminobenzaldehyde	5	กรัม
Amyl alcohol (normal only)	75	มิลลิลิตร
Hydrochloric acid (HCl)	25	มิลลิลิตร

ละลาย p-dimethylaminobenzaldehyde ใน normal amyl alcohol ค่อย ๆ เติม HCl เก็บที่
อุณหภูมิ 4°C

3. Methyl red (MR) reagent

Methyl red	0.1	กรัม
Ethyl alcohol 95%	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (ปริมาณเพียงพอเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย)	500	มิลลิลิตร

ละลาย methyl red ใน 95% ethyl alcohol ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
หรือน้ำกรอง

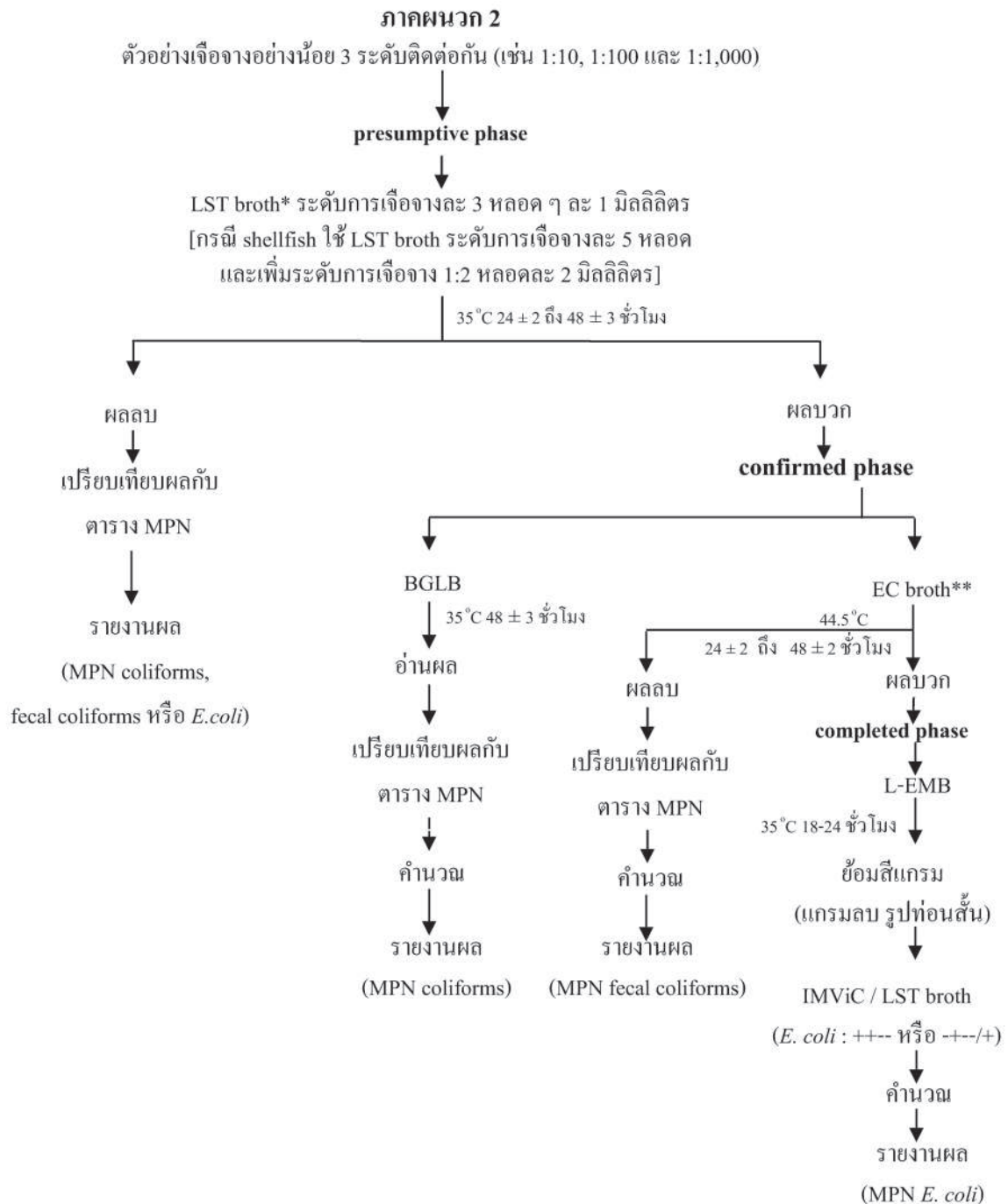
4. Voges-Proskauer (VP) reagents

4.1 Solution 1

α -Naphthol	5	กรัม
Alcohol (absolute)	100	มิลลิลิตร
ละลาย α -Naphthol ใน alcohol		

4.2 Solution 2

Potassium hydroxide (KOH)	40	กรัม
น้ำกลั่น (ปริมาณเพียงพอเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย)	100	มิลลิลิตร
ละลาย Potassium hydroxide ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร		

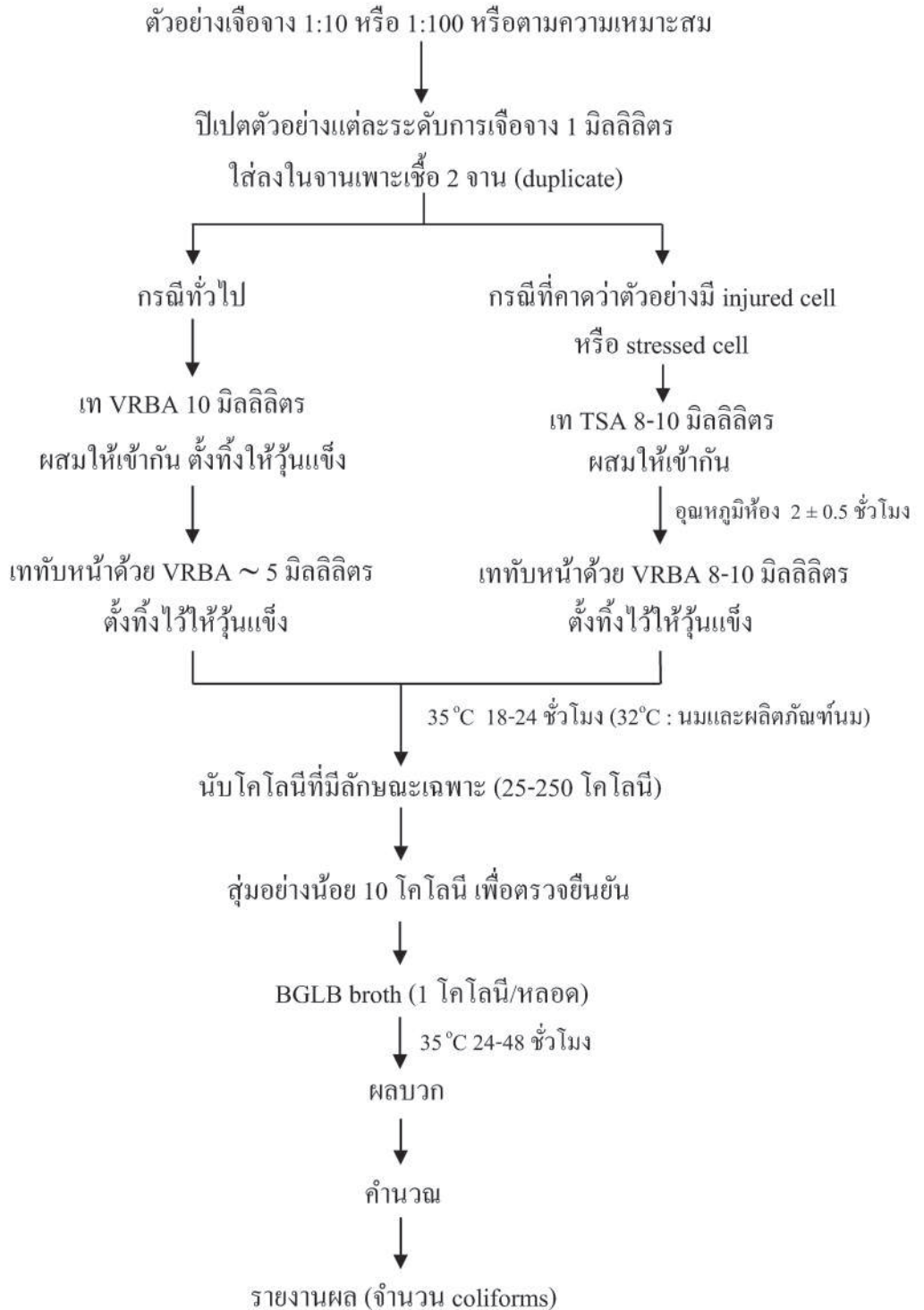


* กรณีตรวจ *E. coli* ในอาหาร (ไม่รวมหอยสองฝา) อาจใช้ LST-MUG broth แทน LST-broth

** กรณีตรวจ *E. coli* ในเนื้อหอย อาจใช้ EC-MUG broth แทน EC broth

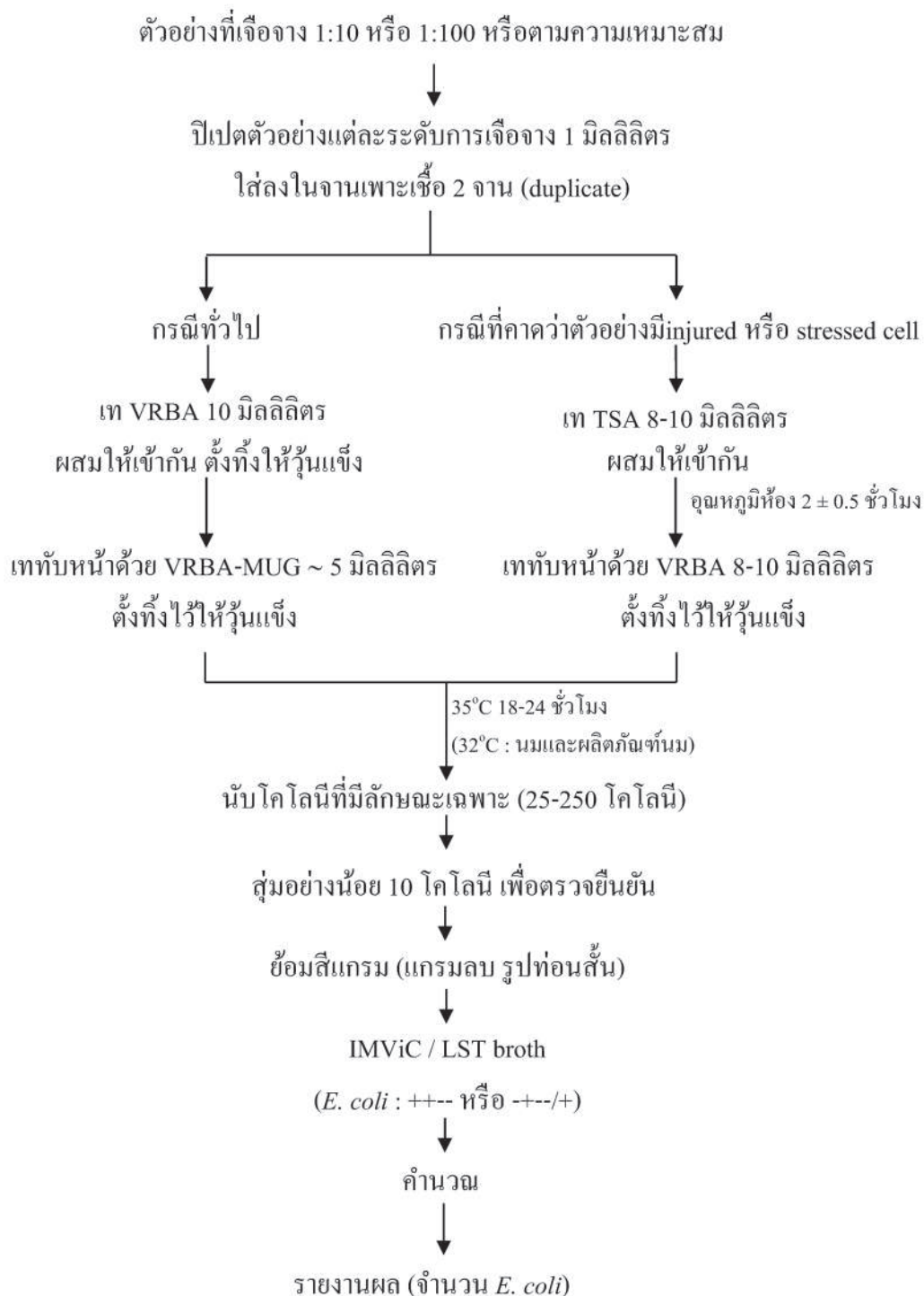
แผนภูมิที่ 1 การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms, fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหาร
โดยวิธี MPN

ภาคผนวก 3



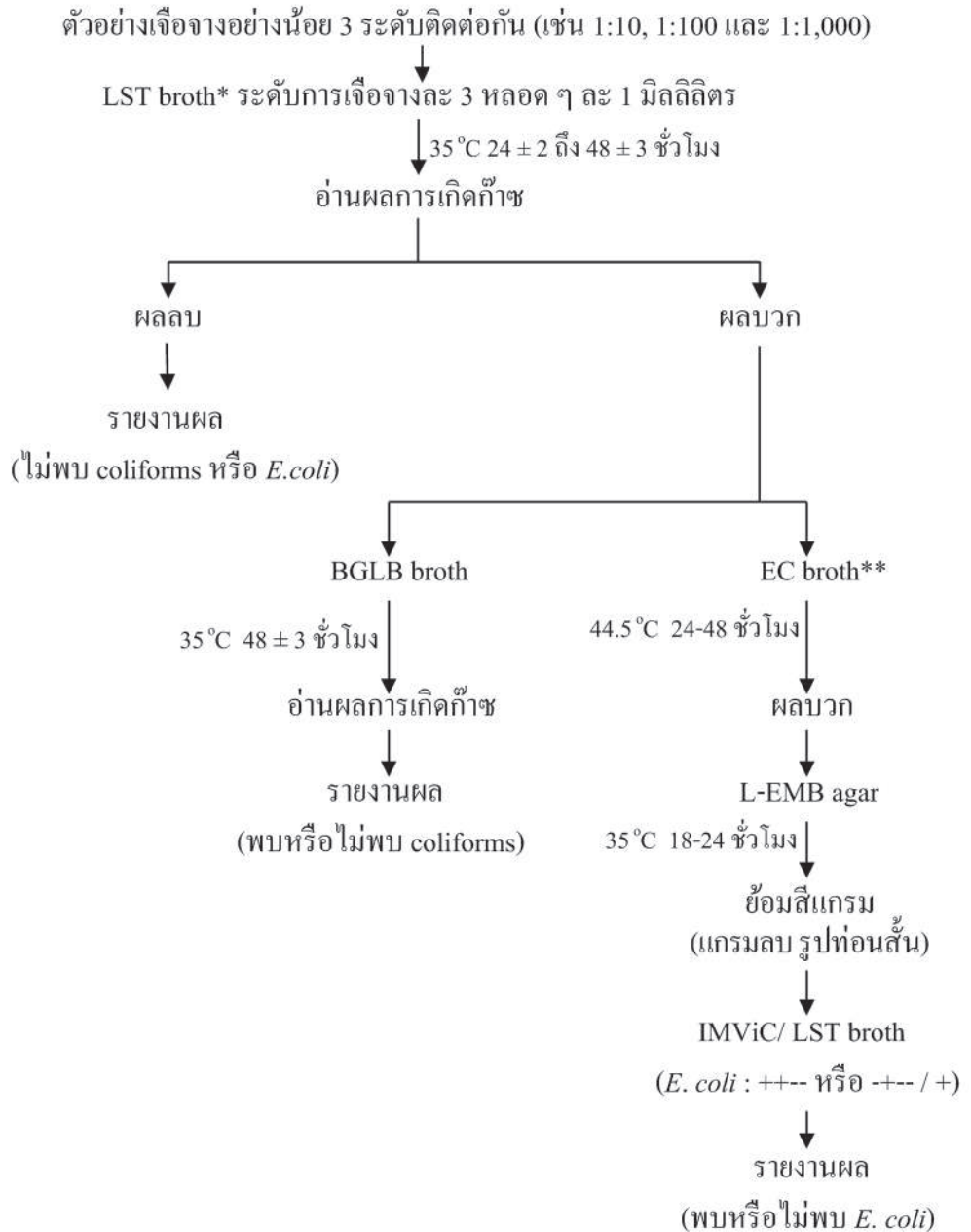
แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms ในอาหารโดยวิธี pour plate

ภาคผนวก 4



แผนภูมิที่ 3 การตรวจปริมาณ (enumeration) *E. coli* ในอาหารโดยวิธี pour plate

ภาคผนวก 5



* กรณีตรวจ *E. coli* ในอาหารแช่เย็น/แช่แข็ง (ไม่รวมหอย 2 ฟา) ใช้ LST - MUG broth ได้

** กรณีตรวจ *E. coli* ในเนื้อหอย เริ่มต้นวิเคราะห์ โดยใช้ EC-MUG broth ได้

ทั้ง 2 กรณีต้องตรวจขั้นสมบูรณ์ (completed phase)

แผนภูมิที่ 4 การตรวจหา (detection) coliforms และ *E. coli* ในอาหาร

ภาคผนวก 6

ตาราง MPN

ตารางที่ 1 ค่า MPN และ Confidence limits สำหรับผลบวกและผลลบ

เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01, 0.001 กรัม จำนวน 3 หลอดต่อระดับการเจือจาง

Positive tubes			MPN/g	Confidence limits		Positive tubes			MPN/g	Confidence limits	
0.1	0.01	0.001		Low	High	0.1	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

ตาราง MPN

ตารางที่ 2 ค่า MPN และ Confidence limits สำหรับผลบวกและผลลบ

เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01, 0.001 กรัม จำนวน 5 หลอดต่อระดับการเจือจาง

Positive tubes			MPN/g	Confidence limits		Positive tubes			MPN/g	Confidence limits	
0.1	0.01	0.001		Low	High	0.1	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<1.8	--	6.8	2	3	0	12	4.1	26
0	0	1	1.8	0.09	6.8	2	3	1	14	5.9	36
0	1	0	1.8	0.09	6.9	2	4	0	15	5.9	36
0	1	1	3.6	0.7	10	3	0	0	7.8	2.1	22
0	2	0	3.7	0.7	10	3	0	1	11	3.5	23
0	2	1	5.5	1.8	15	3	0	2	13	5.6	35
0	3	0	5.6	1.8	15	3	1	0	11	3.5	26
1	0	0	2	0.1	10	3	1	1	14	5.6	36
1	0	1	4	0.7	10	3	1	2	17	6	36
1	0	2	6	1.8	15	3	2	0	14	5.7	36
1	1	0	4	0.7	12	3	2	1	17	6.8	40
1	1	1	6.1	1.8	15	3	2	2	220	6.8	40
1	1	2	8.1	3.4	22	3	3	0	17	6.8	40
1	2	0	6.1	1.8	15	3	3	1	21	6.8	40
1	2	1	8.2	3.4	22	3	3	2	24	9.8	70
1	3	0	8.3	3.4	22	3	4	0	21	6.8	40
1	3	1	10	3.5	22	3	4	1	24	9.8	70
1	4	0	11	3.5	22	3	5	0	25	9.8	70
2	0	0	4.5	0.79	15	4	0	0	13	4.1	35
2	0	1	6.8	1.8	15	4	0	1	17	5.9	36
2	0	2	9.1	3.4	22	4	0	2	21	6.8	40
2	1	0	6.8	1.8	17	4	0	3	25	9.8	70
2	1	1	9.2	3.4	22	4	1	0	17	6	40
2	1	2	12	4.1	26	4	1	1	21	6.8	42

ตาราง MPN (ต่อ)

ตารางที่ 2 ค่า MPN และ Confidence limits สำหรับผลบวกและผลลบ

เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01, 0.001 กรัม จำนวน 5 หลอดต่อระดับการเจือจาง

Positive tubes			MPN/g	Confidence limits		Positive tubes			MPN/g	Confidence limits	
0.1	0.01	0.001		Low	High	0.1	0.01	0.001		Low	High
4	2	0	22	6.8	50	5	2	1	70	22	170
4	2	1	26	9.8	70	5	2	2	94	34	230
4	2	2	32	10	70	5	2	3	120	36	250
4	2	3	38	14	100	5	2	4	150	58	400
4	3	0	27	9.9	70	5	3	0	79	22	220
4	3	1	33	10	70	5	3	1	110	34	250
4	3	2	39	14	100	5	3	2	140	52	400
4	4	0	34	14	100	5	3	3	180	70	400
4	4	1	40	14	100	5	3	4	210	70	400
4	4	2	47	15	120	5	4	0	130	36	400
4	5	0	41	14	100	5	4	1	170	58	400
4	5	1	48	15	120	5	4	2	220	70	440
5	0	0	23	6.8	70	5	4	3	280	100	710
5	0	1	31	10	70	5	4	4	350	100	710
5	0	2	43	14	100	5	4	5	430	150	1100
5	0	3	58	22	150	5	5	0	240	70	710
5	1	0	33	10	100	5	5	1	350	100	1100
5	1	1	46	14	120	5	5	2	540	150	1700
5	1	2	63	22	150	5	5	3	920	220	2600
5	1	3	84	34	220	5	5	4	1600	400	4600
5	2	0	49	15	150	5	5	5	>1600	700	--

DMSc F 2033: วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียในน้ำและน้ำแข็ง

โดยวิธี Pour plate และ Spread plate

**Analytical method of heterotrophic plate count in water and ice
by pour plate and spread plate**

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียในน้ำ และน้ำแข็ง ครอบคลุมการตรวจ
ปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of
Water and Wastewater. 23rd ed. Washington, D.C.; 2017. 9215 A-C, p. 9-53 – 9-58.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)

จำนวนแบคทีเรีย หมายถึง จำนวน “live culturable heterotrophic bacteria”

4. หลักการ (Principle)

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ในตัวอย่าง ทำได้โดยการเจือจางตัวอย่าง
ให้อยู่ในช่วงที่สามารถนับจำนวนของแบคทีเรียได้ แบคทีเรียในตัวอย่างจะเจริญเป็น
โคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า “colony forming unit (CFU)” จำนวนโคโลนีบน
อาหารเลี้ยงเชื้อที่นับได้นำไปคำนวณเป็นจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่าง (heterotrophic
plate count) และรายงานผลเป็น CFU ต่อหน่วยของตัวอย่าง ซึ่งสามารถตรวจสอบด้วย
วิธี pour plate และ spread plate

4.1 วิธี pour plate

นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม ปิเปตลงบนจานเพาะเชื้อ เท
ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดแข็ง ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นแข็ง นำไป
บ่ม และนับจำนวนโคโลนี

4.2 วิธี spread plate

นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม ปิเปิดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่จำเพาะชนิดแข็ง ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้ง นำไปบ่ม และนับจำนวนโคโลนี

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Plate count agar (PCA) หรือ

5.1.2 R2A agar หรือ

5.1.3 NWRI agar (HPCA)

5.1.4 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ buffered water หรือ 0.1% peptone water

5.2 สารเคมี

-

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave)

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.3 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

6.1.4 ตู้เพาะเชื้อ (incubator) 35°C, 20°C, 28°C และ 20-28°C

6.1.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.6 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.7 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 44-46°C

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว (screw-cap bottle)

6.2.2 แท่งแก้วอ (glass spreader)

6.2.3 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.4 ปิเปิด (pipette)

6.2.5 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.6 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำ เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำแข็ง สุ่มตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุใส่รวมกันในภาชนะปราศจากเชื้อ ทำตัวอย่างให้ละลายจนหมด สุ่มให้ได้ตัวอย่างไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (preparation of test sample)

7.2.1 วิธี pour plate

เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ๆ ละ 100 เท่า (serial 100-fold dilutions) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง (ภาคผนวก 2) ดังนี้

7.2.1.1 ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 99

มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100

7.2.1.2 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ในสารละลาย

สำหรับเจือจาง 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างเจือจาง

1:10,000 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ

7.2.2 วิธี spread plate

เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ๆ ละ 10 เท่า (serial 10-fold dilutions) ด้วย

สารละลายสำหรับเจือจางตามความเหมาะสม เช่น ปิเปตตัวอย่าง

1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้ต่อไปจน

ได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ

7.3 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี pour plate: ภาคผนวก 3

- 7.3.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ
ระดับการเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ (duplicate)
- 7.3.2 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 0.1
มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อระดับการเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ ทำเช่นนี้
ต่อไปที่ระดับเจือจางอื่น
- 7.3.3 เทอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 10-12 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ ผสมให้เข้ากัน
ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง แล้วพลิกจานเพาะเชื้ออีกด้านหนึ่งขึ้น (invert plates)
หมายเหตุ ขั้นตอนตั้งแต่เจือจางตัวอย่างจนถึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงใน
จานเพาะเชื้อสุดท้ายไม่เกิน 20 นาที
- 7.3.4 บ่มที่อุณหภูมิและเวลาตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้
- PCA บ่มที่ 35°C 48 ชั่วโมง
 - NWRI agar บ่มที่ 20°C 7 วัน
 - R2A agar บ่มที่ 20-28°C 5-7 วัน
- 7.3.5 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี ถ้าไม่สามารถ
นับโคโลนีหลังการบ่มได้ ให้เก็บจานเพาะเชื้อในตู้เย็นไม่เกิน 24 ชั่วโมง

7.4 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี spread plate: ภาคผนวก 4

- 7.4.1 เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ หมุนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายทั่ว
ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง แล้วทำให้ผิวหน้าวุ้นแห้ง
- 7.4.2 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับการเจือจางอื่น ๆ ตามต้องการ
0.1 ถึง 0.5 มิลลิลิตรลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อระดับการเจือจางละ
2 จานเพาะเชื้อ (duplicate) ใช้แท่งแก้วเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจนกระทั่ง
ผิวหน้าของวุ้นแห้ง
- 7.4.3 บ่มที่อุณหภูมิและเวลาตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้
- PCA บ่มที่ 35°C 48 ชั่วโมง
 - NWRI agar บ่มที่ 20°C 7 วัน
 - R2A agar บ่มที่ 28°C 5-7 วัน
- 7.4.4 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี ถ้าไม่สามารถ
นับโคโลนีหลังการบ่มได้ ให้เก็บจานเพาะเชื้อในตู้เย็นไม่เกิน 24 ชั่วโมง

8. การคำนวณ (Calculation of results)

8.1 นับจานเพาะเชื้อที่มี 30-300 โคโลนี โดยใช้เครื่องนับโคโลนีแล้วนำมาคำนวณตามสูตร

$$\text{CFU/มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวน โคโลนีที่นับได้}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างในจานเพาะเชื้อ (มิลลิลิตร)}}$$

8.2 ถ้าไม่มีจานเพาะเชื้อใดมีโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี แต่มี 1 จานเพาะเชื้อหรือมากกว่า มีจำนวนโคโลนีมากกว่า 300 โคโลนี ให้นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนใกล้เคียง 300 มากที่สุด แล้วคำนวณตามสูตรในข้อ 8.1

8.3 ถ้าทุกจานเพาะเชื้อจากทุกระดับการเจือจางไม่มีโคโลนีขึ้นเลย ให้รายงานเป็นน้อยกว่า 1 หน่วยด้วยปริมาตรตัวอย่างสูงสุดที่ใช้วิเคราะห์ เช่น ถ้าไม่มีโคโลนีขึ้นเลยจากตัวอย่างปริมาตรสูงสุด 0.01 มิลลิลิตร ให้รายงานว่า น้อยกว่า 100 CFU/มิลลิลิตร

8.4 ถ้าทุกจานเพาะเชื้อมีมากกว่า 300 โคโลนี ให้นับจำนวนโคโลนีดังนี้

8.4.1 ถ้ามีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้นับ 13 ช่อง (ของเครื่องนับโคโลนี) เป็นตัวแทนโคโลนี ถ้าเป็นไปได้ให้นับในแนวนอน 7 ช่อง แนวตั้ง 6 ช่อง ระวางอย่าอ่านช่องซ้ำ

- สำหรับจานเพาะเชื้อแก้ว ขนาด 65 ตารางเซนติเมตร ให้นำจำนวนโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดจาก 13 ช่องบวกกัน แล้วคูณด้วย 5

- สำหรับจานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาด 57 ตารางเซนติเมตร ให้นับ 19 ช่อง จากนั้นนำจำนวนโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดจาก 19 ช่องบวกกัน แล้วคูณด้วย 3

8.4.2 ถ้าจำนวนโคโลนีมีมากกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้สุ่มนับโคโลนีทั้งหมด 4 ช่อง จากนั้นหาค่าเฉลี่ยโคโลนีต่อตารางเซนติเมตร แล้วคูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ เช่น จานเพาะเชื้อพลาสติกคูณด้วย 57 จานเพาะเชื้อแก้วคูณด้วย 65

8.4.3 ถ้ามีจำนวนโคโลนีมีมากกว่า 100 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร สำหรับจานเพาะเชื้อแก้วให้รายงานมากกว่า 6,500 หน่วยด้วยปริมาตรตัวอย่างที่น้อยที่สุดในจานเพาะเชื้อที่ใช้วิเคราะห์ และสำหรับจานเพาะเชื้อพลาสติกให้รายงานมากกว่า 5,700 หน่วยด้วยปริมาตรตัวอย่างที่น้อยที่สุด

- 8.5 ถ้าจานเพาะเชื้อที่เลือกพบโคโลนีที่แผ่กระจายในจานเพาะเชื้อ (spreading colony) ให้นับเฉพาะโคโลนีที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวในบริเวณที่ไม่มีการแผ่กระจาย และบริเวณที่โคโลนีแผ่กระจายต้องครอบคลุมพื้นที่ไม่เกินครึ่งจานเพาะเชื้อ ถ้ามากเกินไปให้รายงานผลเป็น Spreaders (Spr.)
- 8.6 การนับโคโลนีที่แผ่กระจาย (spreader) ให้นับแต่ละลักษณะต่อไปนี้เป็น 1 โคโลนี
- 8.6.1 สายโคโลนีที่เรียงต่อเนื่องกัน ซึ่งเกิดจากกลุ่มเซลล์แบคทีเรียที่ไม่แยกจากกัน ขณะที่เทอาหารวุ้นผสมกับตัวอย่าง
- 8.6.2 โคโลนีที่แผ่กระจายเป็นแผ่นฟิล์ม (film) อยู่ระหว่างวุ้น และก้นจานเพาะเชื้อ
- 8.6.3 โคโลนีที่แผ่กระจายเป็นแผ่นฟิล์มอยู่บริเวณขอบจานเพาะเชื้อ หรือบนผิวหน้าวุ้น
- 8.7 นับแยกโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายกันและอยู่ใกล้กันมากแต่ไม่ติดกัน โดยมีระยะห่างกันอย่างน้อยเท่ากับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เล็กที่สุดที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ
- 8.8 นับแยกโคโลนีที่อยู่ติดกันแต่มีลักษณะ โคโลนีหรือสีที่แตกต่างกัน

9. การรายงานผล (Expression of results)

- 9.1 รายงานผลการนับทั้งหมดเป็น CFU รวมทั้งรายงานวิธีที่ใช้ อุณหภูมิและเวลาที่บ่ม และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ เช่น CFU/ มิลลิลิตร pour plate method, 35°C 48 ชั่วโมง plate count agar
- 9.2 รายงานผลเป็นตัวเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง ตัวเลขตั้งแต่ตำแหน่งที่สามขึ้นไปให้ปรับเป็นเลขศูนย์ และเพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับเมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 5, 6, 7, 8, 9 และคงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม เมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 1, 2, 3, 4

ตัวอย่าง :	35	รายงานเป็น	35
	142	รายงานเป็น	140
	155	รายงานเป็น	160

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

- 10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (culture media and reagents)
- 10.2 ภาคผนวก 2: รูปการเจือจางตัวอย่างสำหรับวิธี pour plate
- 10.3 ภาคผนวก 3: แผนภูมิที่ 1 การตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนแบคทีเรียในน้ำและน้ำแข็งโดยวิธี pour plate
- 10.4 ภาคผนวก 4: แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนแบคทีเรียในน้ำและน้ำแข็งโดยวิธี spread plate

ภาคผนวก 1
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Plate count agar (PCA)

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร

ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

2. R2A agar

Yeast extract	0.5	กรัม
Proteose peptone No. 3	0.5	กรัม
หรือ polypeptone		
Casamino acids	0.5	กรัม
Glucose	0.5	กรัม
Soluble starch	0.5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.3	กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.05	กรัม
Sodium pyruvate	0.3	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ยกเว้น agar ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย K_2HPO_4 หรือ KH_2HPO_4 เติม agar และให้ความร้อนจนอุ่นละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2 (ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปไม่ควรปรับ pH หลังฆ่าเชื้อ)

3. NWRI agar (HPCA)

Peptone	3	กรัม
Soluble casein	0.5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.2	กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	0.05	กรัม
Ferric chloride ($FeCl_3$)	0.001	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร

ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย มาเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

4. Buffered water

4.1 Stock phosphate buffer solution

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	34	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ละลาย KH_2PO_4 ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับเป็น pH 7.2 ± 0.5 ด้วย 1 N

NaOH (NaOH 40 กรัม ละลายน้ำ และเติมน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร)

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร มาเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที แล้วเก็บแช่เย็น

4.2 Magnesium chloride stock solution

Magnesium chloride ($MgCl_2$)	38	กรัม
หรือ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	81.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย $MgCl_2$ หรือ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ในน้ำกลั่น มาเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที

แล้วเก็บแช่เย็น

การใช้งาน

ปิเปต Stock phosphate buffer solution (ข้อ 4.1) 1.25 มิลลิลิตร และ

Magnesium chloride stock solution (ข้อ 4.2) 5 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นหรือ

น้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด หรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ

มาเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 7.2 ± 0.1

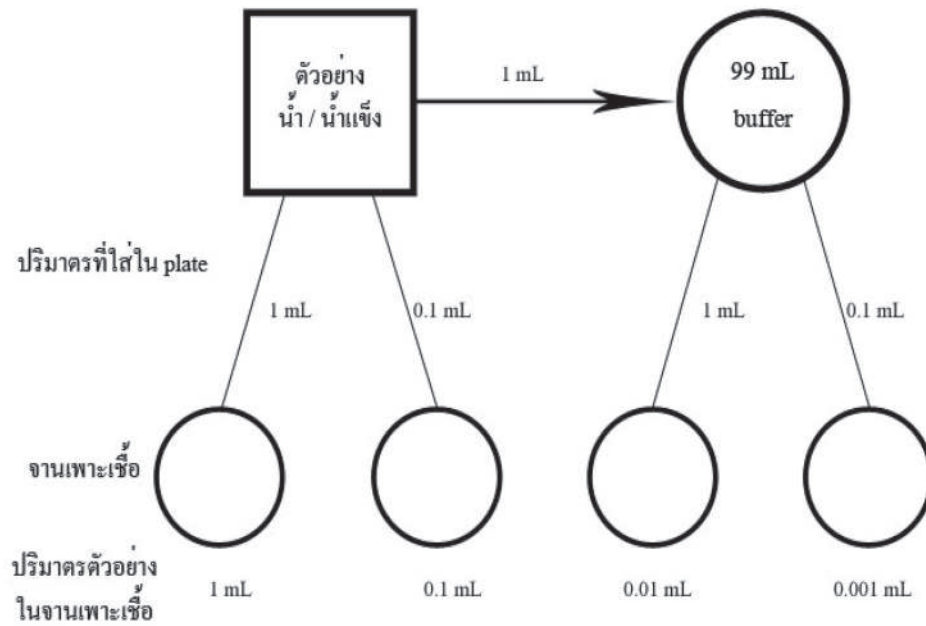


5. 0.1% Peptone water

Peptone	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

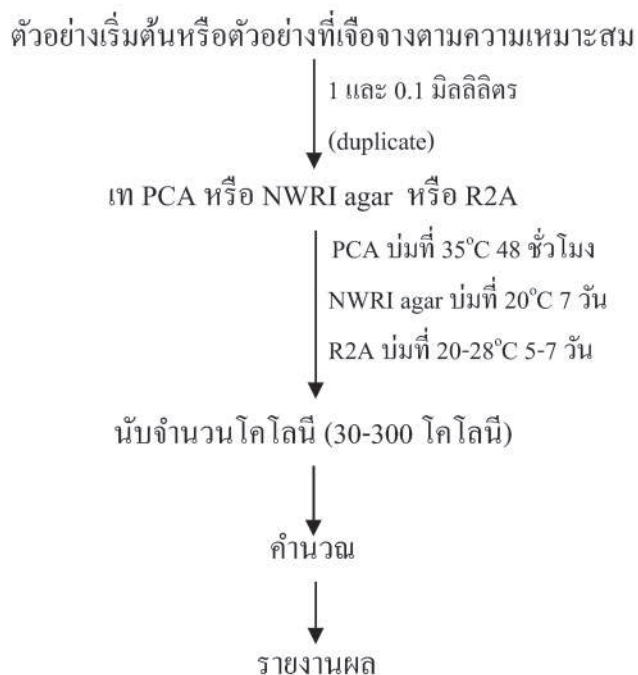
ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหรือ
ขวดตามปริมาตรที่ต้องการ นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

ภาคผนวก 2



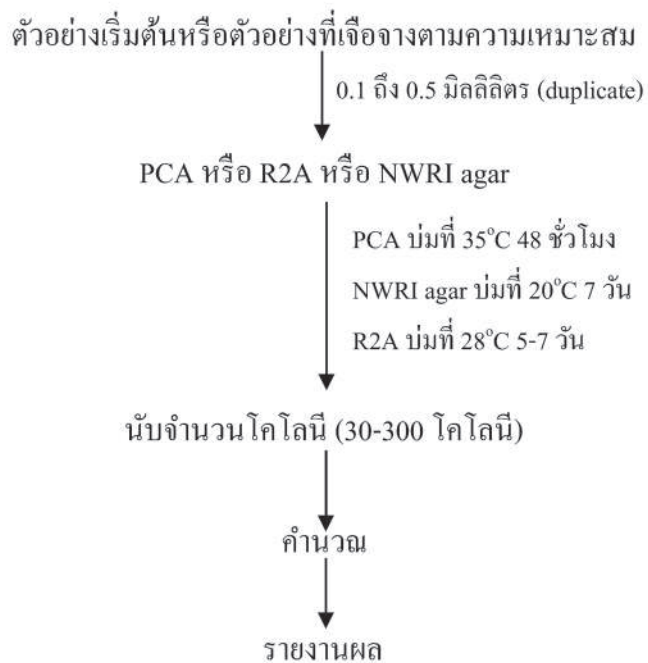
รูป การเจือจางตัวอย่างสำหรับวิธี pour plate

ภาคผนวก 3



แผนภูมิที่ 1 การตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนแบคทีเรียในน้ำและน้ำแข็ง
โดยวิธี pour plate

ภาคผนวก 4



แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนแบคทีเรียในน้ำและน้ำแข็ง
โดยวิธี spread plate

DMSc F 2034: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Listeria* spp. และ *Listeria monocytogenes* ในอาหาร

Analytical method of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Listeria* spp. และ *Listeria monocytogenes* ในอาหาร
ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 ISO 11290-1: 2017 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the
detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part
1: Detection method

2.2 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2011;
updated 2013, Chapter 10 “*Listeria monocytogenes*”. [ออนไลน์]. 2011; [สืบค้น
14 กุมภาพันธ์ 2561]. เข้าถึงได้ที่
[http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/
ucm071400.htm](http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm).

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 CAMP	=	Christie, Atkins, Munch-Peterson
3.2 <i>L. innocua</i>	=	<i>Listeria innocua</i>
3.3 <i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	=	<i>Listeria grayi</i> subspecies <i>grayi</i>
3.4 <i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	=	<i>Listeria grayi</i> subspecies <i>murrayi</i>
3.5 <i>L. ivanovii</i>	=	<i>Listeria ivanovii</i>
3.6 <i>L. monocytogenes</i>	=	<i>Listeria monocytogenes</i>
3.7 <i>L. seeligeri</i>	=	<i>Listeria seeligeri</i>
3.8 <i>L. welshimeri</i>	=	<i>Listeria welshimeri</i>
3.9 <i>R. equi</i>	=	<i>Rhodococcus equi</i>
3.10 <i>S. aureus</i>	=	<i>Staphylococcus aureus</i>

4. หลักการ (Principle)

Listeria spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถย่อย lecithin ในพืชได้ การตรวจหา (detection) แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

- 4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (primary enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดปริมาณ สารยับยั้งเชื้ออื่นลงครึ่งหนึ่งเพื่อให้ *Listeria* spp. ที่มีจำนวนน้อยหรือที่บาดเจ็บฟื้น
- 4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (secondary enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว (selective broth) ซึ่งเติมสารยับยั้งเชื้ออื่นในปริมาณสูงขึ้นเพื่อให้ *Listeria* spp. ที่ฟื้นตัวสามารถเพิ่มจำนวนและเชื้ออื่นถูกยับยั้ง
- 4.3 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agar) 2 ชนิด
- 4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะมาตรวจยืนยันทางชีวเคมี

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA) และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอีกหนึ่งชนิด
- 5.1.2 Blood agar
- 5.1.3 CAMP medium
- 5.1.4 Carbohydrate utilization broth (L-Rhamnose และ D-Xylose)
- 5.1.5 Fraser broth
- 5.1.6 half Fraser broth
- 5.1.7 Motility agar
- 5.1.8 Non-selective agar เช่น blood agar, nutrient agar (NA) หรือ tryptone soya yeast extract agar (TSYEA)
- 5.1.9 Voges-Proskauer (VP) medium

5.2 สารเคมี

5.2.1 Defibrinated blood (sheep, calf หรือ bovine)

5.2.2 Gram stain reagents

5.2.3 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2) solution

5.2.4 Voges-Proskauer (VP) reagents

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave)

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.3 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $25 \pm 1^\circ C$, $30 \pm 1^\circ C$, $35 \pm 1^\circ C$ และ $37 \pm 1^\circ C$

6.1.4 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.6 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.7 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $47-50^\circ C$

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว (screw-cap bottle)

6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide) และแผ่นกระจกทับหน้า (cover slip)

6.2.3 หัวงและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)

6.2.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.5 ปิเปต (pipette)

6.2.6 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.7 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนึ่ง เหย้าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ให้ได้ปริมาตรรวม ไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และสุมตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการ เช่น 25 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (preparation of test sample)

นำตัวอย่างที่ได้จากการสุมตัวอย่างผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์

7.3 การตรวจหา (detection): ภาควิทยา 2

7.3.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (primary enrichment)

เติม half Fraser broth 225 มิลลิลิตร ลงในขวดตัวอย่าง ข้อ 7.1 เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 30°C 25 ± 1 ชั่วโมง (กรณีสุมตัวอย่างน้อยกว่า 25 กรัมหรือ มิลลิลิตร เติม half Fraser broth ให้ได้สัดส่วนของตัวอย่าง : half Fraser broth = 1: 9)

หมายเหตุ ตัวอย่างที่เติม half Fraser broth เมื่อบ่มครบเวลาแล้วสามารถเก็บไว้ที่ 5°C ได้ไม่เกิน 72 ชั่วโมง ก่อนถ่ายเชื้อลงใน Fraser broth (ข้อ 7.3.2)

7.3.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (secondary enrichment)

ปิเปต 0.1 มิลลิลิตร จากข้อ 7.3.1 ใส่ใน Fraser broth 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°C 24 ± 2 ชั่วโมง

หมายเหตุ 1 กรณีตรวจหา *Listeria* spp. สามารถบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มโอกาสการตรวจพบจำนวน species ได้มากขึ้น

2 half Fraser broth จากข้อ 7.3.1 และ Fraser broth จากข้อ 7.3.2 สามารถเก็บไว้ที่ 5°C ได้ไม่เกิน 72 ชั่วโมง ก่อนนำไปแยกเชื้อในข้อ 7.3.3

7.3.3 การแยกเชื้อ (isolation)

7.3.3.1 นำเชื้อ (จากข้อ 7.3.1 และ 7.3.2) ขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ALOA และอาหารเลี้ยง เชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด ชนิดละ 1 จานเพาะเชื้อ

7.3.3.2 ALOA บ่มที่ 37°C ได้ถึง 48 ± 2 ชั่วโมง แต่ถ้าพบโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *L. monocytogenes* หรือ *Listeria* spp. หลังบ่ม 24 ± 2 ชั่วโมงสามารถนำไปตรวจยืนยันในข้อ 7.4 โดยไม่ต้องรอให้ครบ 48 ชั่วโมง (อาหารเลี้ยงเชื้ออื่นบ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต)

- ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *Listeria* spp.
 - ALOA โคโลนีสีเขียวอมฟ้า
 - อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่น เป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิต
 - ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *L. monocytogenes*
 - ALOA โคโลนีสีเขียวอมฟ้า มี zone ขุ่นทึบแสง
- หมายเหตุ *L. monocytogenes* บางสายพันธุ์เมื่อสัมผัสสภาวะเครียด (stress) โดยเฉพาะที่เกิดจากความเครียด อาจให้โคโลนีที่มี zone ขนาดเล็กหรือไม่มี zone
- อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่น เป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิต

7.4 การตรวจยืนยัน (confirmation): ภาคผนวก 3

7.4.1 การตรวจยืนยัน *Listeria* spp.

เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *Listeria* spp. อย่างน้อย 1 โคโลนี มาตรวจยืนยัน โดยขีดแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวบน TSYEA plate บ่มที่ 37°C 18-24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเชื้อเจริญดี เลือกโคโลนีขนาด 1-2 มิลลิเมตร nun ไม่มีสี ขุ่น และขอบเรียบ ไปตรวจยืนยันกรณีได้ผลทดสอบเป็นบวก สามารถสรุปผลว่าตรวจพบเชื้อกลุ่มนี้ หากได้ผลทดสอบเป็นลบ ให้เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Listeria* spp. เพิ่มอีกไม่เกิน 4 โคโลนี จากแต่ละ plate ของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ไปตรวจยืนยัน โดยมีวิธีการตรวจ ดังนี้

- Catalase reaction

นำเชื้อตะบนแผ่นกระจก หยด 3% H_2O_2 สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

ผลบวก: มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

ผลลบ: ไม่มีฟองก๊าซ

- *Listeria* spp. ให้ผลบวก เนื่องจากสร้างเอนไซม์ catalase ได้

หมายเหตุ ถ้าใช้เชื้อจาก blood agar บางครั้งอาจเกิดผลบวกปลอม

- Microscopic aspect

นำเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาย้อมสีแกรม หรือทำ wet mount

- *Listeria* spp. ติดสีแกรมบวก (สีม่วง) รูปท่อนสั้น บาง หรือกลมรี และเคลื่อนที่แบบ tumbling เมื่อเชื้ออยู่ในสภาพ fresh culture

- Motility test (วิธีทดสอบทางเลือก) มี 3 วิธี

1. นำโคโลนีเดี่ยวใส่ใน non-selective broth บ่มที่ $25^{\circ}C$ 8-24 ชั่วโมง จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น ถ่ายเชื้อลงบนแผ่นกระจกที่สะอาด ปิดด้วยแผ่นกระจก ทับหน้า แล้วดูใต้กล้องจุลทรรศน์

- *Listeria* spp. มีรูปร่าง ท่อนสั้น บาง และเคลื่อนที่แบบ tumbling

หมายเหตุ หากเชื้อเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า $25^{\circ}C$ อาจไม่แสดงการเคลื่อนที่แบบ tumbling ควรทำการเปรียบเทียบกับ control *Listeria*

2. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก non-selective agar ใส่ในน้ำปราศจากเชื้อหรือสารละลาย จีอ้างที่เหมาะสม ถ่ายเชื้อลงบนแผ่นกระจกที่สะอาด ปิดด้วยแผ่นกระจก ทับหน้า แล้วดูใต้กล้องจุลทรรศน์

- *Listeria* spp. มีรูปร่าง ท่อนสั้น บาง และเคลื่อนที่แบบ tumbling

3. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ stab เชื้อลงใน motility agar บ่มที่ $25^{\circ}C$ 48 ± 2 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่มีพบการเจริญแบบร่มกางให้บ่มและสังเกตต่อจนครบ 5 วัน

ผลบวก: เชื้อเจริญแผ่ออกจากแนว stab เป็นแบบร่มกาง (umbrella-like)

ผลลบ: เชื้อเจริญเฉพาะแนว stab

- *Listeria* spp. ให้ผลบวก

หมายเหตุ *Listeria* species ที่เพิ่งค้นพบใหม่ ส่วนใหญ่ไม่ เคลื่อนที่ใน motility agar

- Voges-Proskauer (VP) reaction (วิธีทดสอบทางเลือก)

ตะเชื้อที่สงสัยลงใน VP medium บ่มที่ 37°C 24 ± 2 ชั่วโมง แล้วเติม 5% α-naphthol solution 0.6 มิลลิลิตร และ 40% potassium hydroxide solution 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอด (เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวให้อาหารเลี้ยงเชื้อสัมผัสอากาศได้มากขึ้น) ตรวจสอบผลที่ 15 นาที และ 1 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

- *Listeria* spp. ให้ผล VP เป็นบวก ยกเว้นสายพันธุ์ที่เพิ่งค้นพบใหม่ ส่วนใหญ่ให้ผล VP เป็นลบ

7.4.2 การตรวจยืนยัน *L. monocytogenes*

เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ หรือ โคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *L. monocytogenes* อย่างน้อย 1 โคโลนี มาตรวจยืนยัน โดยขีดแยกเชื้อให้ได้ โคโลนีเดี่ยวบน non-selective agar เช่น TSYEA, blood agar หรือ NA บ่มที่ 37°C 18-24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเชื้อเจริญดี แล้วนำไปตรวจยืนยัน กรณีได้ผลทดสอบเป็นบวก สามารถสรุปผลว่า ตรวจพบเชื้อนี้ หากได้ผลทดสอบเป็นลบ ให้เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *L. monocytogenes* เพิ่มอีกไม่เกิน 4 โคโลนี จากแต่ละ plate ของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดไปตรวจยืนยัน โดยมีวิธีการตรวจ ดังนี้

- Microscopic aspect

นำเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาข้อมสีแกรม หรือทำ wet mount

- *L. monocytogenes* ติดสีแกรมบวก (สีม่วง) รูปท่อนสั้น บาง หรือกลมรี และเคลื่อนที่ แบบ tumbling เมื่อเชื้ออยู่ในสภาพ fresh culture

หมายเหตุ อาจไม่ต้องทดสอบในข้อนี้ เมื่อใช้ selective agar ที่แยกความแตกต่างระหว่าง *Listeria* spp. ชนิดที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคได้ เช่น ALOA

- Haemolysis test

ใช้เข็มเจาะเชื้อที่สงสัยและเชื้อ positive control คือ *L. monocytogenes* และ negative control คือ *L. innocua* ไป stab บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar หรือ CAMP medium บ่มที่ 37°C 24 ± 2 ชั่วโมง

ผลบวก: เกิดโซนใสรอบโคโลนี (β-haemolysis)

ผลลบ: ไม่เกิดโซนใสรอบโคโลนี

การอ่านผล: เปรียบเทียบเชื้อที่ทดสอบกับเชื้อ control

- *L. monocytogenes* เกิดโซนใสรอบโคโลนี

- *L. innocua* ไม่เกิดโซนใสรอบโคโลนี

หมายเหตุ ถ้า typical colony จาก ALOA ให้ผล haemolysis เป็นลบ ควรทดสอบเพิ่มเติม เช่น Gram stain, catalase, motility, CAMP test และ PCR เพื่อหาว่าเชื้อนี้เป็น *L. monocytogenes* ชนิด non-haemolytic

- Carbohydrate utilization

ทดสอบการใช้น้ำตาล L-Rhamnose และ D-Xylose โดยเชื้อจาก TSYEA, blood agar หรือ NA ถ้ายกลงใน carbohydrate utilization broth ที่มีน้ำตาลแต่ละชนิด บ่มที่ 37°C 24-48 ชั่วโมง ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลง ให้บ่มต่อได้ถึง 5 วัน

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นเหลือง (มีการสร้างกรด)

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

- *L. monocytogenes* ใช้น้ำตาล L-Rhamnose ได้ (ให้ผลบวก) แต่ไม่ใช้น้ำตาล D-Xylose (ให้ผลลบ)

หมายเหตุ มีสายพันธุ์ของ *L. monocytogenes* จำนวนน้อยมาก ที่ไม่ใช้น้ำตาล L-Rhamnose

- Catalase reaction (วิธีทดสอบทางเลือก)

นำเชื้อแต่ละบนแผ่นกระจก หยด 3% H₂O₂ สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

ผลบวก: มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

ผลลบ: ไม่มีฟองก๊าซ

- *L. monocytogenes* ให้ผลบวก เนื่องจากสร้างเอนไซม์ catalase ได้
 หมายเหตุ ถ้าใช้เชื้อจาก blood agar บางครั้งอาจเกิดผลบวกปลอม

● Motility test (วิธีทดสอบทางเลือก) มี 3 วิธี

1. นำโคโลนีเดี่ยวใส่ใน non-selective broth บ่มที่ 25°C 8-24 ชั่วโมง
 จนกระทั่ง อาหารเลี้ยงเชื้อข้น ถ่ายเชื้อลงบนแผ่นกระจกที่สะอาด ปิด
 ด้วยแผ่นกระจก ทับหน้า แล้วดูได้กล้องจุลทรรศน์

- *L. monocytogenes* มีรูปร่าง ท่อนสั้น บาง และเคลื่อนที่แบบ
 tumbling

หมายเหตุ หากเชื้อเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 25°C อาจไม่แสดงการ
 เคลื่อนที่ แบบ tumbling ควรทำการเปรียบเทียบกับ control *Listeria*

2. ใช้เข็มเย็บเชื้อจาก non-selective agar ใส่ในน้ำปราศจากเชื้อหรือ
 สารละลายเจือจางที่เหมาะสม ถ่ายเชื้อลงบนแผ่นกระจกที่สะอาด ปิด
 ด้วยแผ่นกระจกทับหน้า แล้วดูได้กล้องจุลทรรศน์

- *L. monocytogenes* มีรูปร่าง ท่อนสั้น บาง และเคลื่อนที่แบบ
 tumbling

3. ใช้เข็มเย็บเชื้อ stab เชื้อลงใน motility agar บ่มที่ 25°C 48 ± 2 ชั่วโมง
 ในกรณีที่ไม่พบการเจริญแบบรุ่มกาง ให้บ่มและสังเกตต่อจนครบ
 5 วัน

ผลบวก: เชื้อเจริญแผ่ออกจากแนว stab เป็นแบบรุ่มกาง (umbrella-
 like)

ผลลบ: เชื้อเจริญเฉพาะแนว stab

- *L. monocytogenes* ให้ผลบวก

หมายเหตุ *Listeria* species ที่เพิ่งค้นพบใหม่ ส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่
 ใน motility agar

● CAMP test (วิธีทดสอบทางเลือก): ภาคผนวก 4

ให้ทำ CAMP test เมื่อ haemolysis test แปลผลได้ยาก ขั้นตอนการทำ
 CAMP test ให้นำ *S. aureus* และ *R. equi* จีดเป็นเส้นยาวบางบน blood
 agar โดยให้แนวเชื้อทั้งสองขนานและอยู่ฝั่งตรงกันข้าม (วิธีจีดให้ได้

เชือกบาง ให้จับห่วงหรือเข็มเย็บเชือก ตัดฉากกับผิวหน้าวุ้น) และนำเชือกที่ต้องการทดสอบขีดตั้งฉาก กับ *S. aureus* และ *R. equi* อย่าให้ขนแนวของเชือกทั้งสองแต่ให้ใกล้กันได้อย่างมากที่สุด ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ขณะเดียวกันให้ขีดเชือก control (*L. monocytogenes*, *L. innocua* และ *L. ivanovii*) ควบคู่ไปด้วย บ่มที่ 37°C 18-24 ชั่วโมง กรณีที่ใช้ CAMP medium (double-layer) บ่ม 12-18 ชั่วโมง อ่านผล โดยดูการเสริมฤทธิ์การย่อยสลายเมื่อดัดแดง (β -haemolysis) ในกรณีเสริมฤทธิ์กับเชือกใด (*S. aureus* และ *R. equi*) จะปรากฏโซนใสขนาดกว้างขึ้นด้านบน

L. monocytogenes: ส่วนใหญ่จะเสริมฤทธิ์การย่อยเมื่อดัดแดงกับ *S. aureus* (ส่วนน้อยอาจเสริมฤทธิ์กับ *R. equi*) คือจะเห็นส่วนใสกว้างขึ้นด้านบน *S. aureus*

L. ivanovii: จะเสริมฤทธิ์การย่อยเมื่อดัดแดงกับ *R. equi* คือจะเห็นส่วนใสคล้ายหัวลูกศร (arrow-head) ขนาดกว้าง (5-10 มิลลิเมตร) ด้าน *R. equi*

L. innocua: ไม่เกิดการย่อยเมื่อดัดแดง

8. การคำนวณผล (Calculation of results)

-

9. การรายงานผล (Expression of results)

การตรวจหา (detection) รายงานเป็น

Listeria spp. / น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัมหรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

L. monocytogenes / น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัมหรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *Listeria* spp. และ

L. monocytogenes ในอาหาร

10.3 ภาคผนวก 3: ตารางปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่ใช้ยืนยันเชื้อ *Listeria* spp. และ

L. monocytogenes

10.4 ภาคผนวก 4: รูปปฏิกิริยา CAMP test ของเชื้อ *Listeria* spp.

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA)

1.1 Base medium

Enzymatic digest of animal tissues	18	กรัม
Enzymatic digest of casein	6	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Sodium pyruvate	2	กรัม
Glucose	2	กรัม
Magnesium glycerophosphate	1	กรัม
Magnesium sulfate (anhydrous)	0.5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Lithium chloride	10	กรัม
Disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	2.5	กรัม
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside	0.05	กรัม
Agar	12-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	930**	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 930 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่น

ละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

** 925 มิลลิลิตร กรณีใช้ amphotericin B solution เป็น antibiotic supplement

1.2 Nalidixic acid solution

Nalidixic acid sodium salt	0.02	กรัม
Sodium hydroxide (0.05 mol/l)	5	มิลลิลิตร

ละลาย nalidixic acid sodium salt ใน sodium hydroxide ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน

1.3 Ceftazidime solution

Ceftazidime	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร

ละลาย ceftazidime ในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน

1.4 Polymyxin B solution

Polymyxin B sulfate	76700	IU
น้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร

ละลาย polymyxin B sulfate ในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน

1.5 Antibiotic supplement เลือกใช้เพียง 1 ชนิด

1.5.1 Cycloheximide solution

Cycloheximide	0.05	กรัม
Ethanol	2.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.5	มิลลิลิตร

ละลาย cycloheximide ใน ethanol ก่อน แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไป ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน

1.5.2 Amphotericin B solution

Amphotericin B	0.01	กรัม
HCl (1 mol/l)	2.5	มิลลิลิตร
Dimethylformamide (DMF)	7.5	มิลลิลิตร

ละลาย amphotericin B ใน HCl/DMF solution ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน

หมายเหตุ HCl/DMF solution เป็นสารพิษต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง

1.6 Supplement

L- α -phosphatidylinositol (Sigma P6636 [®])*	2	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	50	มิลลิลิตร

ละลาย L- α -phosphatidylinositol ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง คนส่วนผสม
นานประมาณ 30 นาที จนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที
ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ 47-50°C

* อาจใช้ soy lecithin ที่มี unfractionated phosphatidylinositol อย่างน้อย 9-15%

แทน

การใช้งาน

Base medium (ข้อ 1.1)	930	มิลลิลิตร
Nalidixic acid solution (ข้อ 1.2)	5	มิลลิลิตร
Ceftazidime solution (ข้อ 1.3)	5	มิลลิลิตร
Polymyxin B solution (ข้อ 1.4)	5	มิลลิลิตร
Cycloheximide solution (ข้อ 1.5.1)	5	มิลลิลิตร
หรือ Amphotericin B solution (ข้อ 1.5.2)	10	มิลลิลิตร
Supplement (ข้อ 1.6)	50	มิลลิลิตร

เติมข้อ 1.2-1.6 ตามปริมาณข้างต้นใน base medium (ข้อ 1.1) 930 มิลลิลิตร (หรือ
925 มิลลิลิตร กรณีที่ใช้ amphotericin B solution) ผสมให้เข้ากัน pH 7.2 $\pm$ 0.2
เทใส่จานเพาะเชื้อตามปริมาณที่ต้องการ

2. Blood agar

2.1 Base medium

Enzymatic digest of animal tissues	15	กรัม
Liver digest	2.5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน
วุ้นละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 $\pm$ 0.2

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

2.2 Defibrinated blood (sheep, calf หรือ bovine)

การใช้งาน

เติม defibrinated blood (ข้อ 2.2) 5-7 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 2.1) 100 มิลลิลิตร ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ 47-50°C ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อตามปริมาตรที่ต้องการ

3. CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) medium

การใช้งาน

เท base medium (ข้อ 2.1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ รอสักครู่ จนอุ่นแข็งตัว แล้วเททับด้วย blood agar (ข้อ 2) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร (ถ้าได้เท base medium เสร็จเรียบร้อยแล้ว จะต้องนำจานเพาะเชื้อบ่มในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C นาน 20 นาที ก่อนที่จะเททับหน้า)

4. Carbohydrate utilization broth (L-Rhamnose และ D-Xylose)

4.1 Base

Enzymatic digest of animal tissues	10	กรัม
Meat extract	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Bromocresol purple	0.02	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร
ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2		

4.2 Carbohydrate solutions

Carbohydrate (L-Rhamnose หรือ D-Xylose)	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
ละลายน้ำตาลแต่ละชนิดในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน		

การใช้งาน

ผสมน้ำตาลแต่ละชนิด (L-Rhamnose หรือ D-Xylose) ลงใน base (ข้อ 4.1) ในอัตราส่วน 1:9

5. Fraser broth

5.1 Base medium

Enzymatic digest of animal tissues	5	กรัม
Enzymatic digest of casein	5	กรัม
Meat extract	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	20	กรัม
Disodium hydrogen phosphate dihydrate	12	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.35	กรัม
Aesculin	1	กรัม
Lithium chloride	3	กรัม
Sodium salt of nalidixic acid	0.02	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร
ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย มาเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2		

5.2 Acriflavine hydrochloride solution

Acriflavine hydrochloride	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
ละลาย acriflavine hydrochloride ในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน		

5.3 Ammonium iron (III) citrate solution

Ammonium iron (III) citrate	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
ละลาย ammonium iron (III) citrate ในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน		

การใช้งาน

เติม acriflavine hydrochloride solution (ข้อ 5.2) และ ammonium iron (III) citrate solution (ข้อ 5.3) อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 5.1) 10 มิลลิลิตร ใช้งานทันที

6. half Fraser broth

6.1 Base medium

Enzymatic digest of animal tissues	5	กรัม
Enzymatic digest of casein	5	กรัม
Meat extract	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	20	กรัม
Disodium hydrogen phosphate dihydrate	12	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.35	กรัม
Aesculin	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร
ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2		

6.2 Lithium chloride solution

Lithium chloride	3	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร
ละลาย lithium chloride ในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน		
หมายเหตุ ให้ระมัดระวังขณะทำการละลายเนื่องจากจะเกิดความร้อนสูง และสารละลายนี้ยังก่อให้เกิดการระคายเคืองกับเยื่อต่างๆ		

6.3 Sodium salt of nalidixic acid solution

Sodium salt of nalidixic acid	0.1	กรัม
Sodium hydroxide, 0.05 mol/l solution	10	มิลลิลิตร
ละลาย sodium salt of nalidixic acid ใน sodium hydroxide ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน		

การใช้งาน

Base medium (ข้อ 6.1)	100	มิลลิลิตร
Lithium chloride solution (ข้อ 6.2)	1	มิลลิลิตร
Sodium salt of nalidixic acid solution (ข้อ 6.3)	0.1	มิลลิลิตร
Acriflavine hydrochloride solution (ข้อ 5.2)	0.5	มิลลิลิตร
Ammonium iron (III) citrate solution (ข้อ 5.3)	1	มิลลิลิตร

เติมข้อ 6.2-6.3 และข้อ 5.2-5.3 ตามปริมาณข้างต้นใน base medium (ข้อ 6.1)

100 มิลลิลิตร ใช้งานทันที

7. Motility agar

Enzymatic digest of casein	20	กรัม
Enzymatic digest of animal tissues	6.1	กรัม
Agar	3.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน
วุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที
pH 7.3 ± 0.2

8. Tryptone soya yeast extract agar (TSYEA)

Enzymatic digest of casein	17	กรัม
Papaic digest of soyabean meal	3	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
Agar	12-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อน
จนวุ้นละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2 ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแบบควบคุม
อุณหภูมิ 47-50°C เทใส่จานเพาะเชื้อ 18-20 มิลลิลิตร ทิ้งให้วุ้นแข็งตัว

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

9. Voges – Proskauer (VP) medium

Enzymatic digest of animal tissues	7	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Glucose	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร

ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย แบ่งใส่หลอด ๆ ละ 3 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.9 ± 0.2

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

2. 3% Hydrogen peroxide solution ใช้ชนิดสำเร็จรูป

3. Voges-Proskauer (VP) reagents

3.1 5% α - Naphthol, ethanolic solution

α - Naphthol	5	กรัม
Ethanol, 96% (volume fraction)	100	มิลลิลิตร

ละลาย α - naphthol ใน ethanol

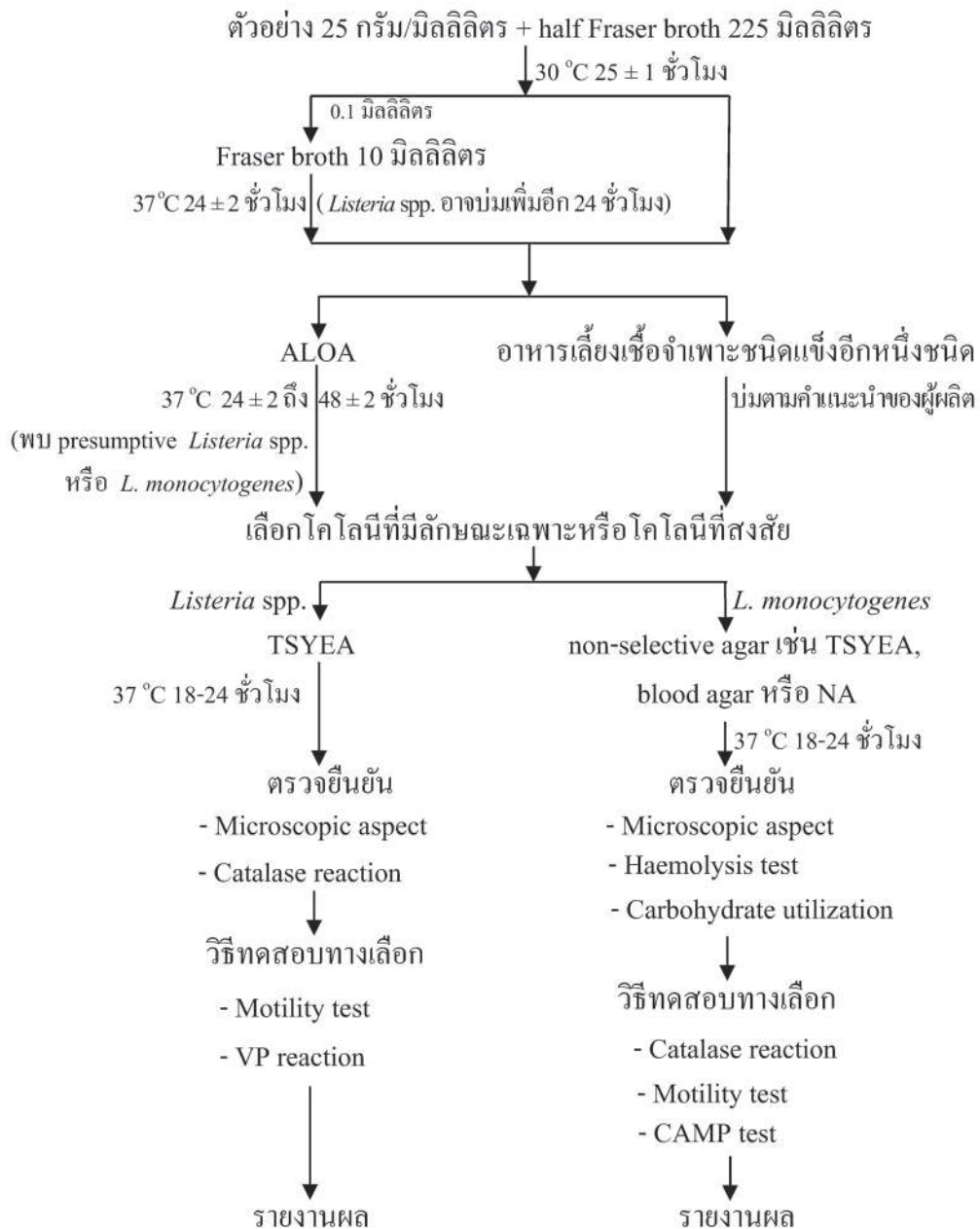
หมายเหตุ α - naphthol เป็นสารอันตรายจึงควรใช้อย่างระมัดระวัง

3.2 40% Potassium hydroxide solution

Potassium hydroxide	40	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย potassium hydroxide ในน้ำกลั่น

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *Listeria* spp. และ *L. monocytogenes* ในอาหาร

ภาคผนวก 3

ตาราง ปฏิกริยาต่าง ๆ ที่ใช้ยืนยันเชื้อ *Listeria* spp. และ *L. monocytogenes*

Species	PI-PLC	β -haemolysis test	Carbohydrate utilization			CAMP test	
			L-Rhamnose	D-Xylose	Mannitol	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+ (24 h)	+	+	-	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	-	V	-	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+ (24 -48 h)	+	-	+	-	-	+
<i>L. seeligeri</i>	-	(+)	-	+	-	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V	+	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	V	-	+	-	-
<i>L. fleischmanii</i>	-	-	+	+	+	-	-
<i>L. marthii</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. rocourtiae</i>	-	-	+	+	+	-	-
<i>L. weihenstephanensis</i>	-	-	+	+	-	-	-

PI-PLC: phosphatidylinositol phospholipase C

V: ปฏิกริยาผันแปร (variable reaction)

(+): ปฏิกริยาบวกละเอียดอ่อน (weak reaction)

+: ปฏิกริยาบวก (มากกว่า 90 %)

-: ไม่เกิดปฏิกริยา

หมายเหตุ 1. มี *L. monocytogenes* บางสายพันธุ์ (น้อยมาก) ที่ไม่มีคุณสมบัติ β -haemolysis หรือไม่ให้ผลทดสอบ CAMP test เป็นบวก

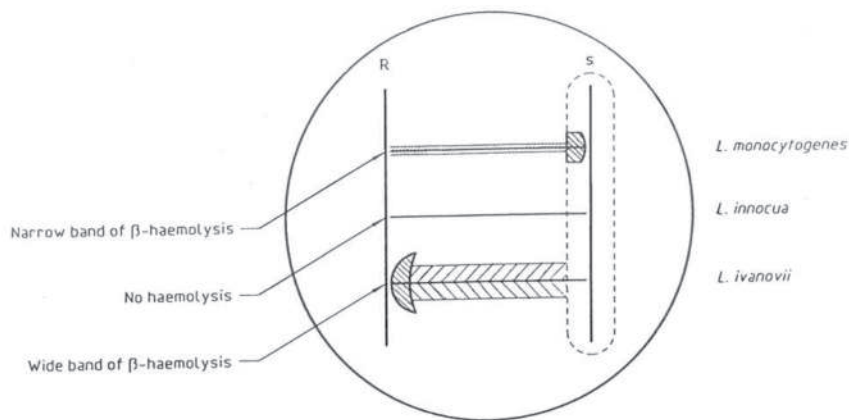
2. *L. seeligeri* บางสายพันธุ์ อาจให้ผล haemolysis เหมือนกับ *L. monocytogenes*

3. ในการยืนยันเพื่อจำแนก *Listeria* species สายพันธุ์ใหม่ที่เพิ่งคัดแยกได้ อาจจำเป็นต้องทำการทดสอบเพิ่มบางอย่าง

4. การแยกแยะ *L. innocua* บางสายพันธุ์ที่ต่างไปจากปกติ (atypical) และแสดงลักษณะทาง Phenotype เหมือนกับ *L. monocytogenes* ต้องทำโดยห้องปฏิบัติการอ้างอิงเท่านั้น

5. มี *L. monocytogenes* บางสายพันธุ์ (น้อยมาก) ไม่สามารถใช้น้ำตาล L-Rhamnose ได้

ภาคผนวก 4



รูป ปฏิกริยา CAMP test ของเชื้อ *Listeria* spp.

หมายเหตุ 1. รูปภาพแสดงการเพาะเชื้อลงใน CAMP test plates

- แนวตั้ง แสดงรอยขีดของเชื้อ *S. aureus* (S) และ *R. equi* (R)
- แนวขวาง แสดงรอยขีดของเชื้อที่ต้องการทดสอบ
- พื้นที่แฉะ แสดงการย่อยสลายของเม็ดเลือดแดง

2. พื้นที่เส้นประเป็นบริเวณอิทธิพล (influence) *S. aureus* ในการเสริมฤทธิ์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

DMSc F 2035: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหาร

Analytical method of *Salmonella* spp. in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* –Part 1:Detection of *Salmonella* spp.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

- 3.1 *E. coli* = *Escherichia coli*
3.2 H₂S = Hydrogen sulphide

4. หลักการ (Principle)

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถใช้น้ำตาล glucose ได้
การตรวจหา (detection) แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

- 4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (pre-enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่เติมสารยับยั้ง แล้วบ่มข้ามคืนเพื่อให้ *Salmonella* spp. ที่มีจำนวนน้อยหรือที่บาดเจ็บฟื้นตัว
4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (selective enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว (selective broth) 2 ชนิดซึ่งเติมสารยับยั้งเชื้ออื่นในปริมาณที่

ต่างกัน เพื่อให้ *Salmonella* spp. ที่พื้นผิวสามารถเพิ่มจำนวนและยับยั้งเชื้ออื่น โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทั้ง 2 ชนิด จะสนับสนุนหรือยับยั้งเชื้อต่างกัน

- 4.3 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agar) 2 ชนิด
- 4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยันทางชีวเคมี และน้ำเหลืองวิทยา

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Buffered peptone water (BPW)
- 5.1.2 L-Lysine decarboxylation medium (LDC)
- 5.1.3 Muller-Kauffmann tetrathionate- novobiocin (MKTn) broth
- 5.1.4 Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) agar
- 5.1.5 Non-selective agar เช่น Nutrient agar (NA)
- 5.1.6 Rappaport-Vassiliadis medium with soya (RVS) broth
- 5.1.7 Triple sugar iron (TSI) agar
- 5.1.8 Tryptone/tryptophan medium
- 5.1.9 Urea agar
- 5.1.10 Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอีกหนึ่งชนิด

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 β -galactosidase reagent
- 5.2.2 Kovacs reagent
- 5.2.3 *Salmonella* polyvalent anti-O-sera
- 5.2.4 *Salmonella* monovalent anti-O-sera
- 5.2.5 *Salmonella* monovalent anti-H-sera
- 5.2.6 *Salmonella* anti-Vi-sera
- 5.2.7 Toluene
- 5.2.8 น้ำเกลือ 0.85%

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งฆ่าสายเชื้อ (autoclave)
- 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
- 6.1.3 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)
- 6.1.5 ตู้เย็น (refrigerator) $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.1.6 เครื่องผสม (vortex mixer)
- 6.1.7 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $47-50^{\circ}\text{C}$

6.2 อุปกรณ์

- 6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว (screw-cap bottle)
- 6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)
- 6.2.3 หัวและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)
- 6.2.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.5 ปิเปต (pipette)
- 6.2.6 หลอดทดลอง (test tube)
- 6.2.7 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (sampling)

- 7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างของเหลวขึ้นหีบให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
- 7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น) และสุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 25 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (preparation of test sample)

นำตัวอย่างที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์

7.3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (pre-enrichment)

7.3.1 เติม BPW 225 มิลลิลิตร ลงในขวดตัวอย่าง ข้อ 7.1 เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ $34-38^{\circ}\text{C}$ 18 ± 2 ชั่วโมง (กรณีเตรียมตัวอย่างนอกเหนือจาก 25 กรัม หรือ 25 มิลลิลิตร เติม BPW ให้ได้สัดส่วนของตัวอย่าง: BPW = 1:9) แต่ถ้าจะใช้ตัวอย่างน้ำหนักมากกว่า 25 กรัม หรือ มิลลิลิตร ต้องมีการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี

7.3.2 กรณีอาหารเฉพาะ ปฏิบัติตาม ISO 6887

7.3.3 เมื่อบ่มครบเวลาแล้วสามารถเก็บ ไว้ที่ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ได้ไม่เกิน 72 ชั่วโมง ก่อนถ่ายเชื้อลงใน (ข้อ 7.4)

7.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (selective enrichment)

7.4.1 ปิเปต 1 มิลลิลิตร จากข้อ 7.3.1 หรือ ข้อ 7.3.2 ใส่ใน MKTTn broth 10 มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน RVS broth 10 มิลลิลิตร หรือปิเปต 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้า MSRV agar จำนวน 1-3 หยด

7.4.2 บ่ม RVS broth หรือ MSRV agar (โดยไม่ต้องกลับจานเพาะเชื้อ) ที่ 41.5°C 24 ± 3 ชั่วโมง และ MKTTn broth ที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

หมายเหตุ - สามารถเก็บตัวอย่างใน MKTTn และ RVS broth ที่ผ่านการบ่มแล้วไว้ที่ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ได้ไม่เกิน 72 ชั่วโมง

- MSRV agar ใช้สำหรับตรวจ *Salmonella* ที่เคลื่อนที่ได้เท่านั้น
- กรณีผลิตภัณฑ์ประเภทนมผงและเนยแข็ง เชื้อ *Salmonella* อาจบดเจือปนแรงให้บ่ม selective enrichment เพิ่มอีก 24 ± 3 ชั่วโมง
- กรณีตัวอย่างที่สอบสวนหาสาเหตุของโรคระบาด อาจเพิ่มระยะเวลาบ่มได้

7.5 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (isolation)

7.5.1 นำเชื้อ จากข้อ 7.4.2 (ในกรณีใช้ MSRV agar และพบโซนขุนขาวแผ่จากจุดที่หยดเชื้อใช้ loop 1 ไมโครลิตร เทลงด้านขอบโซนขุนที่ไกลที่สุด) จัดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด

7.5.2 บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง (อาหารเลี้ยงเชื้ออื่นบ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต)
ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *Salmonella*

- XLD agar โคโลนีใสสีแดง มีหรือไม่มีจุดดำตรงกลางโคโลนี

หมายเหตุ *Salmonella* บางสายพันธุ์ไม่สร้าง H_2S เช่น *S. Paratyphi A*
บน XLD agar โคโลนีมีสีชมพูและจุดตรงกลางมีสีชมพูเข้ม ส่วนโคโลนีของ *Salmonella* ที่เป็น lactose-positive บน XLD มีสีเหลืองและมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลาง

- กรณีที่ไม่มีโคโลนีลักษณะเฉพาะ ให้เลือกโคโลนีบน XLD agar ที่มีสีเหลือง มีหรือไม่มีจุดดำ หรือโคโลนีสีชมพูที่มีจุดสีชมพูตรงกลางโคโลนี
- อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่น เป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิต

7.5.3 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยอย่างน้อย 1 โคโลนี เพื่อนำมาตรวจยืนยันโดยขีดบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ non-selective agar เช่น NA นำไปบ่มที่ $34-38^{\circ}\text{C}$ 24 ± 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจยืนยันทางชีวเคมีต่อไป (กรณีที่แยกเชื้อได้โคโลนีเดี่ยวสามารถนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีได้โดยตรง และตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยถ่ายเชื้อลงบน non-selective agar พร้อมไปกับการทดสอบทางชีวเคมี) ถ้าผลเป็นลบ เลือกโคโลนีที่สงสัยมาตรวจยืนยันเพิ่มอีกไม่เกิน 4 โคโลนี โดยให้เลือกโคโลนีที่สงสัยจาก selective enrichment broth และ selective agar ต่างชนิด (อาจเลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยมาตรวจยืนยันพร้อมกัน 5 โคโลนีในครั้งเดียวก็ได้)

หมายเหตุ กรณีสอบสวนหาสาเหตุของโรคระบาด ให้ตรวจยืนยันจำนวน
โคโลนีเพิ่มมากขึ้นเช่น โคโลนีที่สงสัย 5 โคโลนี ของแต่ละ
selective enrichment broth และ selective agar ต่างชนิด

7.6 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (confirmation)

7.6.1 การยืนยันทางชีวเคมี

เจียเชื้อจากข้อ 7.5.3 นำไปทดสอบดังนี้

- TSI agar

นำเชื้อขีดบนผิวหน้า (slant) และ stab ในส่วน butt บ่มที่ 37°C

24 ± 3 ชั่วโมง

Butt: - สีเหลือง (ใช้น้ำตาล glucose)

- สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้น้ำตาล glucose)

- สีดำ (สร้าง H₂S)

- มีฟองอากาศหรือรอยแตกของวุ้น (สร้าง gas จากน้ำตาล
glucose)

Slant: - สีเหลือง (ใช้น้ำตาล lactose และหรือ sucrose)

- สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้ทั้งน้ำตาล lactose และ sucrose)

- *Salmonella* spp. ที่มีลักษณะเฉพาะให้ผล slant สีแดง

และ butt สีเหลือง สร้าง gas และประมาณ 90% สร้าง H₂S (วุ้น
เปลี่ยนเป็นสีดำ)

- Urea agar

นำเชื้อขีดบนผิวหน้า (slant) บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

ปฏิกิริยามักเกิดภายใน 2 - 4 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

- *Salmonella* spp. ให้ผลลบ

- L-Lysine decarboxylation medium
บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง ใช้อ่านผลปฏิกิริยา lysine decarboxylation
ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วง
ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
- *Salmonella* spp. ให้ผลบวก
- β-galactosidase test (วิธีทดสอบทางเลือก)
เขี่ยเชื้อลงในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร
หยด toluene 1 หยด เขย่าหลอดบ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C ประมาณ 5 นาที เติม β-galactosidase reagent 0.25 มิลลิลิตร เขย่าหลอด บ่มต่อที่ 37°C 24 ชั่วโมง
ผลบวก: น้ำเกลือ 0.85% เปลี่ยนเป็นสีเหลือง
ผลลบ: น้ำเกลือ 0.85% ไม่เปลี่ยนสี
- *Salmonella* spp. ให้ผลลบ
กรณีใช้แผ่น ONPG disc สำเร็จรูป ให้ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต
- Tryptone/tryptophan medium (วิธีทดสอบทางเลือก)
เขี่ยเชื้อลงใน Tryptone/tryptophan medium 5 มิลลิลิตร เพื่อทดสอบ indole บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง
ภายหลังบ่ม เติม Kovacs reagent 1 มิลลิลิตร
ผลบวก: เกิดวงแหวนสีแดงบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ
ผลลบ: เกิดวงแหวนสีเหลืองบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ
- *Salmonella* spp. ให้ผลลบ

หมายเหตุ การทดสอบ Indole จะทำในกรณีที่ต้องการจำแนกเชื้อ

Salmonella จาก *E. coli* และ *Citrobacter* (เชื้อทั้งสองให้ผลการทดสอบ Indole เป็นบวก)

การแปลผลการทดสอบทางชีวเคมีของ *Salmonella* spp. ดูตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแปลผลการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนก *Salmonella* spp.

Test	<i>Salmonella</i> strain													
	<i>S. Typhi</i>		<i>S. Paratyphi A</i>		<i>S. Paratyphi B</i>		<i>S. Paratyphi C</i>		<i>S. Gallinarum</i> biovar gallinarum		<i>S. Gallinarum</i> biovar pullorum		Other strains ⁵	
	Reaction	%+ ¹	Reaction	%+ ¹	Reaction	%+ ²	Reaction	%+ ²	Reaction	%+ ¹	Reaction	%+ ¹	Reaction	%+ ¹
TSI acid form glucose	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100
TSI gas form glucose	- ³	0	+	96.1	+	96.1	+	96.1	-	0	+	95.1	+	92
TSI acid form lactose	-	2	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1 ⁶
TSI acid form sucrose	-	0	-	0.6	-	0.6	-	0.6	-	0.6	-	0.6	-	1
TSI hydrogen sulfide produce	+	97	-	10	+	100	+	100	V ⁴		V ⁴		+	92
Urea hydrolysis	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1
Lysine decarboxylation	+	98	-	0	+	95	+	100	+	95	+	95	+	95
β -galactosidase reaction	-	0	-	0	-		-		-	<10	-	<10	-	2 ⁶
Production of indole	-	0	-	1.2	-	1.2	-	1.2	-	1.2	-	1.2	-	1

¹ Percentages indicate that not all isolates of *Salmonella* serovars show the reactions marked + or -.

Reactions may also vary between and within serovars.

² Empty cells: Percentages are not known from available literature.

³ *Salmonella* Typhi is anaerogenic.

⁴ V = Variable results.

⁵ For further distinction between *Salmonella* species and subspecies, see ISO/TR 6579-3

⁶ *Salmonella enterica* subspecies *arizonae* and *diarizonae* always give a positive β -galactosidase reaction. Some strains of subspecies *arizonae* and *diarizonae* can ferment lactose.

7.6.2 การยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยา

7.6.2.1 เชื้อเชื้อมาแตะบนแผ่นกระจกที่สะอาด หยดน้ำเกลือ 0.85% 1 หยด ใช้ loop ผสมให้เข้ากัน สังเกตการจับกันเป็นตะกอน (agglutination) ถ้ามีตะกอน แสดงว่าเป็น auto-agglutination

7.6.2.2 การทดสอบ O-antigens

- ทดสอบเชื้อที่ไม่เกิด auto-agglutination หยด polyvalent anti-O-sera 1 หยด ใช้ loop ผสมให้เข้ากันโดยเอียงแผ่นกระจกไป-มา เบา ๆ 5 - 60 วินาที (ขึ้นกับคำแนะนำของผู้ผลิต) สังเกตการจับกันเป็นตะกอน ถ้ามีตะกอนแสดงว่าให้ผลบวก จากนั้นให้ทดสอบต่อด้วย monovalent anti-O-sera ถ้ามีตะกอนกับ monovalent anti-O-serum ใด แสดงว่า ให้ผลบวกกับ antiserum นั้น

7.6.2.3 การทดสอบ H-antigens

- ทดสอบเชื้อที่ไม่เกิด auto-agglutination หยด polyvalent anti-H sera 1 หยด ใช้ loop ผสมให้เข้ากันโดยเอียงแผ่นกระจกไป-มา เบา ๆ 5 - 60 วินาที (ขึ้นกับคำแนะนำของผู้ผลิต) สังเกตการจับกันเป็นตะกอน ถ้ามีตะกอนแสดงว่าให้ผลบวก

7.6.2.4 การทดสอบ Vi-antigens (วิธีทดสอบทางเลือก ซึ่งอาจทดสอบในพื้นที่ที่คาดว่าจะมี *S. Typhi* ในการผลิตอาหาร)

- ทดสอบเชื้อที่ไม่เกิด auto-agglutination หยด anti-Vi sera 1 หยด ใช้ loop ผสมให้เข้ากันโดยเอียงแผ่นกระจกไป-มา เบา ๆ 5 - 60 วินาที (ขึ้นกับคำแนะนำของผู้ผลิต) สังเกตการจับกันเป็นตะกอน ถ้ามีตะกอนแสดงว่าให้ผลบวก

7.6.3 การแปลผล

การแปลผลการตรวจยืนยันเชื้อ *Salmonella* แสดงในตารางที่ 2 โคโลนีที่เกิด auto-agglutination หรือสงสัยว่าเป็น *Salmonella* spp. ส่งตรวจยืนยัน *Salmonella* ที่ WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้ ส่วนโคโลนีที่ผลการทดสอบทั้งทางชีวเคมีและ/หรือทางน้ำเหลืองวิทยา สรุปได้ว่าเป็น *Salmonella* อาจส่งตรวจต่อเพื่อจำแนกถึงระดับ serovars หรือห้องปฏิบัติการดำเนินการ serotyping ตามแนวปฏิบัติใน ISO/TR 6579-3

ตารางที่ 2 การแปลผลการตรวจยืนยันเชื้อ *Salmonella*

ผลการทดสอบทางชีวเคมี	Auto-agglutination	ผลการทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา	การแปลผล
Typical	-	O- และ H-antigens ให้ผลบวก [และ Vi ให้ผลบวก (ถ้าทดสอบ)]	<i>Salmonella</i>
Typical	-	O- และ/หรือ H-antigens ให้ผลลบ	Presumptive <i>Salmonella</i>
Typical	+	ไม่ทดสอบ	Presumptive <i>Salmonella</i>
No Typical	ไม่ทดสอบ	ไม่ทดสอบ	ไม่ใช่ <i>Salmonella</i>

8. การคำนวณผล (Calculation of results)

-

9. การรายงานผล (Expression of results)

การตรวจหา (detection) รายงานเป็น *Salmonella* spp. / น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *Salmonella* spp. ในอาหาร

ภาคผนวก 1
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Buffered peptone water

Enzymatic digest of casein	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

2. L-Lysine decarboxylation medium

L-Lysine monohydrochloride	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

3. Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin (MKTn) broth

3.1 Base medium

Meat extract	4.3	กรัม
Enzymatic digest of casein	8.6	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	2.6	กรัม
Calcium carbonate (CaCO ₃)	38.7	กรัม
Sodium thiosulfate pentahydrate (Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O)	47.8	กรัม
Ox bile for bacteriological use	4.78	กรัม
Brilliant green	9.6	มิลลิกรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ต้มเดือด 5 นาที

pH 8.0 ± 0.2

3.2 Iodine-iodide solution

Iodine	20	กรัม
Potassium iodide (KI)	25	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย KI ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 10 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ iodine และเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้องได้นาน 1 ปี

3.3 Novobiocin solution

Novobiocin sodium salt	0.04	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	5	มิลลิลิตร

ละลาย Novobiocin sodium salt ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง เก็บที่ 5 ± 3°C ได้นาน 4 สัปดาห์

การใช้งาน

เติม Novobiocin solution (ข้อ 3.3) 5 มิลลิลิตร ใน base medium (ข้อ 3.1) 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Iodine-iodide solution (ข้อ 3.2) 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง complete medium ควรเตรียมเมื่อใช้งาน

4. Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) agar

4.1 Solution A

Enzymatic digest of animal and plant tissue	4.6	กรัม
Acid hydrolysate of casein	4.6	กรัม
Sodium chloride	7.3	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	890	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำ ถ้าจำเป็นอาจให้ความร้อนที่ 70°C เตรียมวันที่ใช้งาน

4.2 Solution B

Magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เก็บในขวดทึบแสงฝาปิดสนิทที่อุณหภูมิห้องได้อย่างน้อย 2 ปี

4.3 Solution C

Malachite green oxalate	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เก็บในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 8 เดือน

4.4 Base medium

Solution A (ข้อ 4.1)	890	มิลลิลิตร
Solution B (ข้อ 4.2)	100	มิลลิลิตร
Solution C (ข้อ 4.3)	10	มิลลิลิตร
Agar*	2.7	กรัม

* ควรทำการทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการเคลื่อนที่ของ *Salmonella* ต้มจนเดือด pH 5.1 - 5.4 อย่าทิ้งไว้ที่อุณหภูมิสูงนานเกินไป
ทำให้เย็นลงถึงอุณหภูมิ $47-50^\circ\text{C}$

4.5 Novobiocin solution

Novobiocin sodium salt	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรอง pore size 0.22 ไมโครเมตร
เก็บที่ 5°C นาน 4 สัปดาห์ หรือแบ่งใส่ภาชนะ เช่น 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20°C
ได้นาน 1 ปี

4.6 Complete medium

Base medium (ข้อ 4.4)	1	ลิตร
Novobiocin solution (ข้อ 4.5)	2	มิลลิลิตร

เติม Novobiocin solution ลงใน base medium ที่มีอุณหภูมิ 47-50°C ผสมให้เข้า
กัน pH 5.1 - 5.4 เทใส่จานเพาะเชื้อ เก็บที่ 5°C นาน 2 สัปดาห์ โดยไม่ต้องกลับ
จานก่อนใช้งานถ้ามีความชื้นทำให้ผิวหน้าอาหารแห้งด้วยการเปิดฝา
ในตู้ปราศจากเชื้อ ระวังอย่าให้ผิวหน้าแห้งเกินไป

5. Nutrient agar (NA)

Meat extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย นำเชื้อที่
121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

6. Rappaport-Vassiliadis medium with soya (RVS) broth

6.1 Solution A

Enzymatic digest of soya	5	กรัม
Sodium chloride	8	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	1.4	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	0.2	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ถ้าจำเป็นให้ความร้อน ประมาณ
70°C เตรียมสารละลายนี้ในวันที่เตรียม complete medium

6.2 Solution B

Magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Magnesium chloride ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร

เก็บในขวดแก้วสีชาฟลิปคสนิทที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2 ปี

6.3 Solution C

Malachite green oxalate	0.4	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย Malachite green oxalate ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร

เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง ได้นาน 8 เดือน

การใช้งาน

Solution A (ข้อ 6.1)	1,000	มิลลิลิตร
Solution B (ข้อ 6.2)	100	มิลลิลิตร
Solution C (ข้อ 6.3)	10	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน มาเชื้อที่ 115°C 15 นาที pH 5.2 ± 0.2

เก็บที่ $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ได้นาน 3 เดือน

7. Triple sugar iron (TSI) agar

Meat extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	20	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Glucose	1	กรัม
Iron (III) citrate	0.3	กรัม
Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนวุ้น

ละลาย มาเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2 ปล่อยให้วุ้นแข็งโดยการเย็นหลอด

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

8. Tryptone/tryptophan medium

Tryptone	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
DL-Tryptophan	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตาม
ปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.5 ± 0.2

9. Urea agar (Christensen)

9.1 Base medium

Peptone	1	กรัม
Glucose	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	2	กรัม
Phenol red	0.012	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน
วุ้นละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

9.2 Urea solution

Urea	400	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Urea ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้
ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน

การใช้งาน

เติม Urea solution (ข้อ 9.2) 50 มิลลิลิตร ใน base medium (ข้อ 9.1)
950 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ aseptic technique แล้วปล่อยให้แข็งโดยการ
เย็นลง

10. Xylose lysine deoxycholate (XLD) Agar

Yeast extract powder	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Xylose	3.75	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
L-Lysine hydrochloride	5	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Iron (III) ammonium citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Sodium deoxycholate	1	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน
อุ่นละลาย ไม่ให้ร้อนเกินไป pH 7.4 ± 0.2

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

สารเคมี กรณีสื่อสารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. β -galactosidase reagent

1.1 Buffer solution

Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	6.9	กรัม
Sodium hydroxide, 10 mol/l solution	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ละลาย Sodium dihydrogen phosphate ในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร

ปรับ pH 7.0 ± 0.2 ด้วย Sodium hydroxide ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร
เก็บที่ $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ได้นาน 6 เดือน

1.2 ONPG solution

<i>o</i> -Nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG)	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร

ละลาย ONPG ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิประมาณ 50°C แล้วทำให้สารละลายเย็นลง
การใช้งาน

Buffer solution (ข้อ 1.1) 5 มิลลิลิตร กับ ONPG solution (ข้อ 1.2) 15 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน เก็บที่ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ได้นาน 3 เดือน

2. Kovacs reagent

4-Dimethylaminobenzaldehyde	5	กรัม
Hydrochloric acid	25	มิลลิลิตร
2-Methyl-2-butanol	75	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากัน เก็บที่ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ได้นาน 6 เดือน

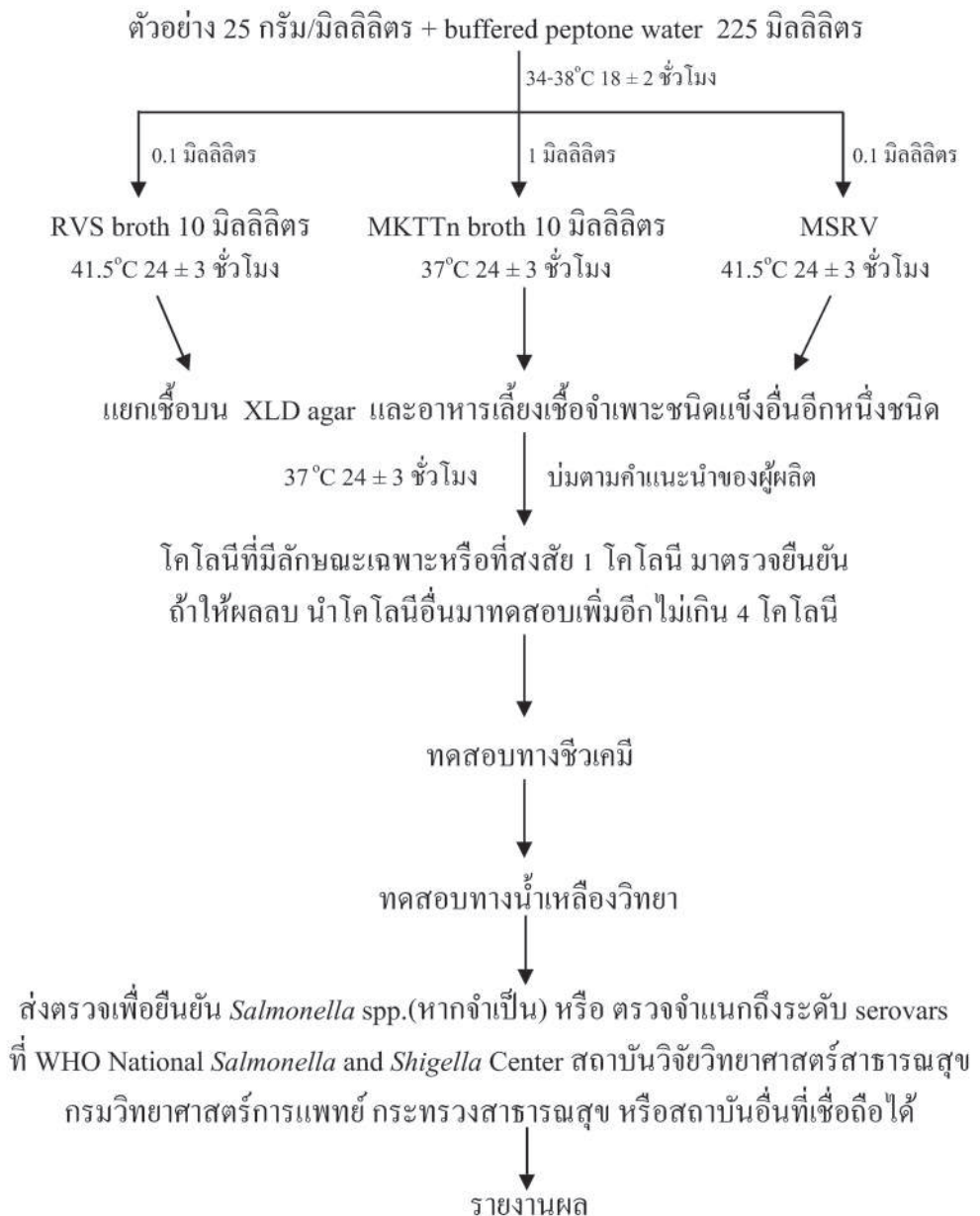
3. น้ำเกลือ 0.85%

Sodium chloride (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

4. *Salmonella* anti-sera ใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *Salmonella* spp. ในอาหาร

DMSc F 2036: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Vibrio cholerae* ในอาหาร

Analytical method of *Vibrio cholerae* in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio cholerae* ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO/TS 21872-1:2017. Microbiology of food chain - Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. – Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)

DNA	=	Deoxyribonucleic acid
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
<i>V. cholerae</i>	=	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>	=	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>V. vulnificus</i>	=	<i>Vibrio vulnificus</i>

4. หลักการ (Principle)

การฟื้นตัวของเชื้อ *Vibrio* spp. บางชนิดที่ปนเปื้อนในอาหาร อาจดีขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่แตกต่าง โดยอุณหภูมิขึ้นกับชนิดของเชื้อ (species) และสถานะของผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น การฟื้นตัวในขั้นตอน enrichment ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในอาหารสดจะดีขึ้น เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 41.5°C ขณะที่เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในอาหารแช่แข็ง (deep frozen) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า -18°C อาหารแห้ง หรืออาหารดองเกลือ รวมทั้งเชื้อ *V. vulnificus* ใน food matrix ต่าง ๆ จะฟื้นตัวดีขึ้น เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37°C

หมายเหตุ เชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* และ *V. vulnificus* ที่เป็นเชื้อ *Vibrio* ชนิดก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (enteropathogenic *Vibrio* spp.) อาจพบในปริมาณที่น้อยและมักอยู่ร่วมกับเชื้ออื่นที่มีปริมาณมาก เช่น พวก *Vibrionaceae* family หรือเชื้อ family อื่น ๆ

การตรวจหา (detection) *V. cholerae* แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

- 4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (Primary enrichment in a liquid selective medium) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ASPW บ่มที่ 37°C หรือ 41.5°C นาน 6 ชั่วโมง เพื่อให้ *V. cholerae* ที่บาดเจ็บพื้นผิวขณะที่เชื้ออื่นถูกยับยั้ง
- 4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นที่สอง (Second enrichment in a liquid selective medium) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ASPW บ่มที่อุณหภูมิ 41.5°C นาน 18 ชั่วโมง ทำให้ *V. cholerae* ที่พื้นผิวสามารถเจริญเพิ่มจำนวน ขณะที่เชื้ออื่นถูกยับยั้ง
- 4.3 การแยกและจำแนกเชื้อ (Isolation and identification) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง 2 ชนิด คือ TCBS และเลือกอาหารเลี้ยงเชื้ออีกชนิดหนึ่ง เช่น Chromogenic agar นำไปบ่มและแยกเชื้อที่ให้ลักษณะเฉพาะเพื่อทดสอบต่อไป
- 4.4 การตรวจยืนยัน (Confirmation) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีหรือทดสอบด้วยวิธี PCR ซึ่งเป็นการตรวจยืนยันระดับ species ในการตรวจหาเชื้อ *V. cholerae* สามารถตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี PCR โดยการตรวจหายีน *ctx* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ASPW ที่ผ่านขั้นตอนเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นที่สอง (Second enrichment)

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Alkaline saline peptone water (ASPW)
- 5.1.2 Arginine dihydrolase saline medium (ADH)
- 5.1.3 L-lysine decarboxylase saline medium (LDC)
- 5.1.4 Saline medium for detection of indole (tryptophan saline medium)
- 5.1.5 Saline nutrient agar (SNA)
- 5.1.6 0%, 6% และ 10% saline peptone waters
- 5.1.7 Thiosulfate citrate bile and sucrose agar medium (TCBS)
- 5.1.8 อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอีกชนิดหนึ่ง

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 Agarose
- 5.2.2 β -galactosidase reagent (หรืออาจใช้ ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside disc (ONPG disc))
- 5.2.3 DNA ladder 100 bp
- 5.2.4 dNTPs solution
- 5.2.5 Ethidium bromide
- 5.2.6 Gram stain reagents
- 5.2.7 Kovacs reagent
- 5.2.8 $MgCl_2$ solution
- 5.2.9 Oxidase reagent
- 5.2.10 Oligonucleotides
- 5.2.11 Polyvalent *V. cholerae* O1 antiserum
- 5.2.12 Polyvalent *V. cholerae* O139 antiserum
- 5.2.13 Sterile mineral oil
- 5.2.14 Taq polymerase
- 5.2.15 Toluene
- 5.2.16 Tris acetate EDTA (TAE) buffer (หรือ buffer ที่เทียบเท่า)
- 5.2.17 *V. cholerae* Inaba antiserum
- 5.2.18 *V. cholerae* Ogawa antiserum
- 5.2.19 น้ำเกลือ 0.85%

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 6.1 เครื่องมือ
 - 6.1.1 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
 - 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
 - 6.1.3 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (conventional PCR machine)

- 6.1.4 ตู้แช่แข็ง (freezer) น้อยกว่า -15°C
- 6.1.5 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแนวนอน (gel electrophoresis chamber, horizontal)
- 6.1.6 เตาหลอมไฟฟ้า (heating block) $95 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$
- 6.1.7 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.1.8 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง (micro-centrifuge) สำหรับหลอดขนาด 1.5 ml และ 2.0 ml ที่สามารถทำความเร็วได้ 10000 g
- 6.1.9 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 6.1.10 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)
- 6.1.11 กล้องแสงยูวี (UV transilluminator)
- 6.1.12 เครื่องผสม (vortex mixer)
- 6.1.13 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.2 อุปกรณ์
 - 6.2.1 แผ่นกระจกทับหน้า (coverslip)
 - 6.2.2 กระดาษกรอง (filter paper)
 - 6.2.3 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว (screw-cap bottle)
 - 6.2.4 แท่งแก้ว (glass rod) หรือไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อ
 - 6.2.5 แผ่นกระจก (glass slide)
 - 6.2.6 ห่วงและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)
 - 6.2.7 ไมโครปิเปต (micropipette) และ pipette filter tips ขนาด 1-1000 ไมโครลิตร
 - 6.2.8 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
 - 6.2.9 ปิเปต (pipette)
 - 6.2.10 หลอดทดสอบ (test tube)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures): ภาคผนวก 2

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และสุ่มตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการ เช่น 25 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

หมายเหตุ สามารถปรับน้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่างลดลงได้โดยให้มีอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 1:9 แต่ถ้าใช้ตัวอย่างมากกว่า 25 กรัมหรือ 25 มิลลิลิตร ต้องมีผลการทดสอบความถูกต้องหรือทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

7.2 การตรวจหา (detection)

7.2.1 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (Primary selective enrichment)

เติม ASPW 225 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ข้อ 7.1 เขย่าให้เข้ากัน กรณีตัวอย่าง เป็นอาหารแช่แข็ง อาหารแห้ง หรืออาหารดองเกลือ บ่มที่ 37°C 6 ± 1 ชั่วโมง ส่วนอาหารสด บ่มที่ 41.5°C 6 ± 1 ชั่วโมง

หมายเหตุ

- กรณีตรวจตัวอย่างปริมาณมาก (มากกว่า 25 กรัม หรือ 25 มิลลิลิตร) ควรอุ่น ASPW ให้ได้อุณหภูมิที่ $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ/หรือ $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ก่อนใช้งาน
- กรณีที่ต้องการลดปริมาณงานสำหรับตัวอย่างรุ่นเดียวกัน (same batch) สามารถนำตัวอย่างทดสอบมารวมกัน เช่น การตรวจวิเคราะห์ 10 ตัวอย่าง ให้สุ่มตัวอย่างละ 25 กรัม รวมเป็น 250 กรัม และเติม ASPW 2.25 ลิตร
- เนื่องจากเชื้อ *Vibrio* spp. จะมีจำนวนปริมาณลดลง หากเก็บตัวอย่าง หรือ suspension ไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) ดังนั้นถ้าทำได้ควรหลีกเลี่ยงการเก็บที่ช่วงอุณหภูมินี้

7.2.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นที่สอง (Secondary selective enrichment)

ถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากบริเวณผิวหน้า ASPW (ข้อ 7.2.1) (โดยไม่ต้องเขย่าขวด) ลงในหลอด ASPW ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 41.5°C 18 ± 1 ชั่วโมง
หมายเหตุ สามารถใช้เชื้อจากข้อ 7.2.2 มาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *V. cholerae* ได้

7.2.3 การแยกและจำแนกเชื้อ (Isolation and identification)

7.2.3.1 ใช้ loop ขนาด 1 ไมโครลิตร ถ่ายเชื้อจากบริเวณผิวหน้า ASPW ที่บ่มครบ 6 ± 1 ชั่วโมง (ข้อ 7.2.1) และ 18 ± 1 ชั่วโมง (ข้อ 7.2.2) โดยขีดบนผิวหน้า TCBS agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด ชนิดละ 1 จานเพาะเชื้อ

7.2.3.2 บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง (อาหารเลี้ยงเชื้ออื่น บ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต) ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *V. cholerae*

- TCBS agar โคโลนีสีเหลือง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร ผิวมันเรียบ (smooth)
- อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่น เป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิต

7.2.4 การตรวจยืนยัน (Confirmation)

7.2.4.1 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ หรือโคโลนีที่สงสัย อย่างน้อย 1 โคโลนี จากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมาตรวจยืนยัน (ถ้าผลเป็นลบ ควรทดสอบเพิ่มอีก 4 โคโลนี)

7.2.4.2 ถ่ายเชื้อลงบน SNA plate หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่เหมาะสม บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

หมายเหตุ

- สามารถตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR หรือทางชีวเคมี และอาจใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมี หรือทางชีวโมเลกุลที่เชื่อถือได้ ในการจำแนกเชื้อ *Vibrio* ระดับ species
- อาหาร โดยเฉพาะอาหารทะเล อาจปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจำนวนมาก รวมทั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ไม่ก่อโรค ซึ่งอาจเจริญได้เช่นกันใน

กระบวนการคัดแยกเชื้อ ดังนั้นหากเลือกโคโลนีจำนวนน้อยมาทดสอบ ยืนยัน อาจทำให้ตรวจไม่พบเชื้อ *Vibrio* ชนิดก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS มีข้อจำกัดที่ว่า เชื้อกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่ *Vibrio* spp. หรือ *Vibrio* spp. ชนิดที่ไม่ก่อโรค อาจให้ลักษณะโคโลนี ที่คล้ายคลึงกับชนิดก่อโรค

7.2.4.3 นำเชื้อจาก SNA plate ข้อ 7.2.4.2 ทดสอบยืนยันเบื้องต้น (presumptive identification) ดังนี้

- Oxidase test

นำเชื้อขูดบนกระดษกรองที่หยด oxidase reagent หรือ กระดษทดสอบสำเร็จรูป โดยใช้หว่ง หรือเข็มเขี่ยเชื้อที่ทำ ด้วย platinum iridium หรือแท่งแก้ว (ไม่ใช่หว่ง หรือเข็มที่ทำ จากนิเกิล-โครเมียม เพราะอาจทำให้เกิดผลบวกปลอม)

ผลบวก: กระดษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อน ม่วง หรือม่วง เข้ม ภายใน 10 วินาที

ผลลบ: กระดษกรองไม่เปลี่ยนสี

- *V. cholerae* ให้ผลบวก

- Microscopic examination (วิธีทดสอบทางเลือก)

- Gram stain

ย้อมเชื้อ ด้วยวิธี gram stain แล้วตรวจสอบรูปร่างและการ ติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- *V. cholerae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (สีแดง) รูปร่างตรง หรือท่อนโค้ง ไม่สร้างสปอร์

- Motility test

ถ่ายเชื้อลงใน ASPW บ่ม 37°C 1-6 ชั่วโมง

หยดเชื้อ 1 หยดลงบนแผ่นกระจก ปิดด้วยแผ่นกระจกทับหน้า ตรวจสอบการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลบวก: เชื้อเคลื่อนที่ได้

ผลลบ: เชื้อไม่เคลื่อนที่

- *V. cholerae* ให้ผลบวก

หมายเหตุ เลือกโคโลนีของเชื้อที่ให้ผลการทดสอบยืนยันเบื้องต้น oxidase เป็นบวก และโคโลนีดิสแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้ ไปตรวจยืนยันต่อ

7.2.4.4 การตรวจยืนยันทางชีวเคมี : ภาควง 3

เจียเชื้อจาก SNA plate ในข้อ 7.2.4.2 ที่ให้ผลตรวจยืนยันเบื้องต้น ที่สงสัยว่าเป็น *V. cholerae* นำไปทดสอบ ดังนี้

- การตรวจหา L-lysine decarboxylase

เจียเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LDC บริเวณใต้ผิวหน้า แล้วทาบหน้าด้วย sterile mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วงอมน้ำเงิน

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

- *V. cholerae* ให้ผลบวก

- การตรวจหา arginine dihydrolase

เจียเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ADH บริเวณใต้ผิวหน้า แล้วทาบหน้าด้วย sterile mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วงอมน้ำเงิน

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

- *V. cholerae* ให้ผลลบ

- การตรวจหา β-galactosidase

เจียเชื้อลงในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร หยด toluene 1 หยด เขย่าหลอด วางหลอดในตู้บ่ม 37°C ประมาณ 5 นาที เติม β- galactosidase reagent 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางหลอดในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง ดูผลเป็นระยะ ๆ

ผลบวก: เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (มักมองเห็นการเปลี่ยนสี

ภายหลังบ่ม 20 นาที)

ผลลบ: ไม่เปลี่ยนสี (ภายหลังบ่ม 24 ชั่วโมง)

- *V. cholerae* ให้ผลบวก

หมายเหตุ กรณีใช้แผ่น ONPG disc สำเร็จรูป ให้ปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต

- การตรวจหา indole

เชื้อเชื้อลงใน tryptophan saline medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง เติมน Kovacs reagent 1 มิลลิลิตร

ผลบวก: เกิดวงแหวนสีแดง

ผลลบ: เกิดวงแหวนสีน้ำตาลอมเหลือง

- *V. cholerae* ให้ผลบวก

- การทดสอบ halotolerance

เชื้อเชื้อลงใน saline peptone water ความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 0%, 6% และ 10% บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (มีการเจริญของเชื้อ)

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น (ไม่มีการเจริญของเชื้อ)

- *V. cholerae* ให้ผลบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือที่ 0%

หมายเหตุ

- ปฏิกริยาชีวเคมี (ภาคผนวก 3) เป็นแนวทางในการยืนยันเชื้อ *Vibrio* ตาม species ที่ระบุ แต่สามารถทดสอบทาง Phenotype (Phenotypic tests) เพิ่มเติมเพื่อช่วยจำแนก species ของ *Vibrio* และแยกความแตกต่างจาก non-pathogenic *Vibrio* spp.
- อาจนำโคโลนีที่เลือกไว้จากการทดสอบยืนยันเบื้องต้น (oxidase บวกแกรมลบ และเคลื่อนที่ได้) มาทดสอบยืนยันการเจริญใน saline peptone water ความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 10% และ arginine dihydrolase ก่อน หากพบว่าให้ผลลบในรายการทั้งสอง จึงทำ

การตรวจยืนยันทางชีวเคมีต่อในรายการที่เหลือน้ำเกลือแช่เชื้อลงบน SNA พร้อมกับการทดสอบ halotolerance เพื่อให้มั่นใจว่า การที่เชื้อไม่เจริญใน 10 % saline peptone water ไม่ได้เกิดจากเชื้อตายตั้งแต่ก่อนนำมาทดสอบ

7.2.4.5 การตรวจยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยา

ควรตรวจยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยา สำหรับจำแนก serogroup O1 หรือ O139 เป็นอย่างน้อย (หรือใช้วิธี PCR ที่เหมาะสมในการตรวจยืนยันสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (toxigenic strains) เช่น สายพันธุ์ที่มี cholera toxin gene : *ctx*)

การตรวจยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยา มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

7.2.4.5.1 เชื้อเชื้อที่ให้ผลการตรวจยืนยันทางชีวเคมี แล้วแตะบนแผ่นกระจกที่สะอาด หยดน้ำเกลือ 0.85% 1 หยด ใช้ loop ผสมให้เข้ากัน สังเกตการจับกันเป็นตะกอน (agglutination) ถ้ามีตะกอนแสดงว่าเป็น auto-agglutination

7.2.4.5.2 ถ้าไม่เกิด auto-agglutination ให้ทดสอบต่อโดยเชื้อเชื้อแตะบนแผ่นกระจกที่สะอาด หยด polyvalent *V. cholerae* O1 antiserum 1 หยด ผสมให้เข้ากันเอียงแผ่นกระจกไปมา 30 - 60 วินาที สังเกตการจับกันเป็นตะกอน และทำเช่นเดียวกับ polyvalent *V. cholerae* O139 antiserum ถ้ามีการจับกันเป็นตะกอน แสดงว่าให้ผลบวก

7.2.4.5.3 กรณีการทดสอบ polyvalent *V. cholerae* O1 antiserum ให้ผลบวก อาจทดสอบเชื้อกับ *V. cholerae* Inaba antiserum และ *V. cholerae* Ogawa antiserum

7.2.4.6 การตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR: ภาคผนวก 4

การทำ PCR แบบ Conventional PCR เพื่อตรวจยืนยัน *V. cholerae*

7.2.4.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

1. เชื้อเชื้อจากข้อ 7.2.4.2 จำนวน 1 โคโลนีใส่ลงในหลอด micro-centrifuges tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเกลือ 0.85% หรือ nuclease free water ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
2. อุณหภูมิใน heating block 95°C 5 ± 1 นาที
- 3.ปั่นเหวี่ยงที่ 10000 g นาน 1 นาที เก็บส่วนใสเพื่อทำ PCR

หมายเหตุ - หากใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป ต้องทำตามที่ผู้ผลิตระบุ

- ต้องมี negative extraction control โดยใช้ น้ำเกลือ 0.85% หรือ nuclease free water ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทุกครั้งที่สกัด DNA
- เก็บดีเอ็นเอได้เป็นเวลานานที่ $<-15^{\circ}\text{C}$ แต่เก็บได้ไม่เกิน 1 เดือน ในตู้เย็น ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$)

7.2.4.6.2 Conventional PCR

1. เตรียม master mix ตามภาคผนวก 4 ปรับปริมาตรตามจำนวนปฏิกิริยา
2. ปิเปิด master mix y ไมโครลิตร ใส่หลอด PCR ตามด้วย DNA ที่สกัดแล้ว x ไมโครลิตร
3. นำหลอด PCR ใส่เครื่อง thermocycler ตั้ง PCR condition ตาม primer ที่ใช้ ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้แต่ละขั้น (denaturation, annealing และ extension) ขึ้นกับน้ำยาที่ใช้ (primer และ PCR condition ที่ใช้ดูภาคผนวก 4)
4. เตรียม agarose gel 2% ที่เติม ethidium bromide หรือสีย้อมอื่น เพื่อให้มองเห็น PCR product

5. หยอด DNA ladder (100 bp) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรก และหยอด PCR product 20 ไมโครลิตรลงในหลุมถัดๆไป (ผสมกับ loading dye แล้วตามความเหมาะสม) (อาจใช้ปริมาณ PCR product ตามวิธีของแต่ละห้องปฏิบัติการ และปริมาณ DNA ladder ตามคำแนะนำของผู้ผลิต)
6. run gel electrophoresis ที่ 130 โวลต์ นาน 25 - 30 นาที
7. อ่านผล gel electrophoresis ด้วยเครื่อง ultraviolet transilluminator ขนาดของ PCR product ขึ้นอยู่กับ primer ที่ใช้ (ดูภาคผนวก 4)

หมายเหตุ

- อาจใช้วิธี PCR ในการตรวจสอบเบื้องต้นว่ามี *V. parahaemolyticus* ใน primary หรือ secondary enrichment broth ที่ผ่านการบ่มแล้วหรือไม่
- ตัวอย่างที่มีความสำคัญ เช่น ควบคุมตามกฎหมาย และ/หรือสอบสวนโรคระบาด ควรแยกเชื้อและตรวจยืนยันตามเอกสารนี้

7.3 การแปลผล

โคโลนีที่เกิด auto-agglutination หรือโคโลนีที่ทดสอบทางชีวเคมี และ/หรือทางน้ำเหลืองวิทยาแล้วว่าเป็น หรือสงสัยว่าเป็น *V. cholerae* ให้ส่งตรวจยืนยันที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้ โดยเก็บเชื้อบนผิวหน้าของ SNA slant เพื่อส่งตรวจ

8. การคำนวณ (Calculation of results)

-

9. รายงานผลการทดสอบ (Expression of results)

V. cholerae/ น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือ ไม่พบ

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *V. cholerae* ในอาหาร

10.3 ภาคผนวก 3: ตารางแสดงปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus*,

V. cholerae, *V. vulnificus*, *V. mimicus* และ *V. alginolyticus*

10.4 ภาคผนวก 4: วิธี Conventional PCR สำหรับการตรวจยืนยัน *V. cholerae*

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Alkaline saline peptone water (ASPW)

Peptone	20	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	20	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121 °C 15 นาที pH 8.6 ± 0.2

2. Arginine dihydrolase saline medium (ADH)

Arginine monohydrochloride	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121 °C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

3. Saline medium for detection of indole (tryptone-tryptophan saline medium)

Enzymatic digest of casein	10	กรัม
DL-tryptophan	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121 °C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

4. L- lysine decarboxylase saline medium (LDC)

L- lysine monohydrochloride	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121 °C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

5. Saline nutrient agar (SNA)

Meat extract	5	กรัม
Peptone	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
Agar	8-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน
วุ้นละลาย แบ่งใส่ขวด หรือหลอดตามปริมาณที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121 °C 15 นาที
pH 7.2 ± 0.2 เติงหลอดและปล่อยให้วุ้นแข็ง

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

6. Saline peptone waters (0%, 6% และ 10%)

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	0, 60 หรือ 100	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตาม
ปริมาณที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121 °C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

7. Thiosulfate citrate bile and sucrose agar (TCBS)

Peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium citrate	10	กรัม
Sodium thiosulfate	10	กรัม
Iron (III) citrate	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
Dried bovine bile	8	กรัม
Sucrose	20	กรัม
Bromothymol blue	0.04	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Agar	8-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ต้มเดือดจน

วุ้นละลาย pH 8.6 ± 0.2

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. β -galactosidase reagent

1.1 Buffer solution

Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	6.9	กรัม
Sodium hydroxide (NaOH), 10 mol/l solution	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (ปริมาณเพียงพอเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย)	50	มิลลิลิตร

ละลาย NaH_2PO_4 ในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 ± 0.2 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2 ONPG solution

2-ortho-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG)	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร

ละลาย ONPG ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิประมาณ 50 °C

การใช้งาน

Buffer solution (ข้อ 1.1) 5 มิลลิลิตร กับ ONPG solution (ข้อ 1.2) 15 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน

2. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

3. Kovacs reagent

Dimethylamino-4 benzaldehyde	5	กรัม
Hydrochloric acid	25	มิลลิลิตร
$p = 1.18 \text{ g/ml to } 1.19 \text{ g/ml}$		
Methy-2 butan-2-ol	75	มิลลิลิตร
ผสมส่วนประกอบให้เข้ากัน		

4. Sterile mineral oil ใช้ชนิดสำเร็จรูป

5. Oxidase reagent

N, N, N', N' - tetramethyl- p -phenylenediamine dihydrochloride ($C_{10}H_{16}N_2 \cdot 2HCl$)	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำเย็น ก่อนใช้งาน

6. น้ำเกลือ 0.85% และ 1%

Sodium chloride (NaCl)	8.5 หรือ 10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121 °C 15 นาที pH 7.0 $\pm$ 0.2

7. Tris acetate EDTA (TAE) buffer

50x TAE buffer	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย 50x TAE buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร

และเก็บที่อุณหภูมิ $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$

8. Agarose gel 2%

Agarose	2	กรัม
1x TAE buffer หรือเทียบเท่า	100	มิลลิลิตร

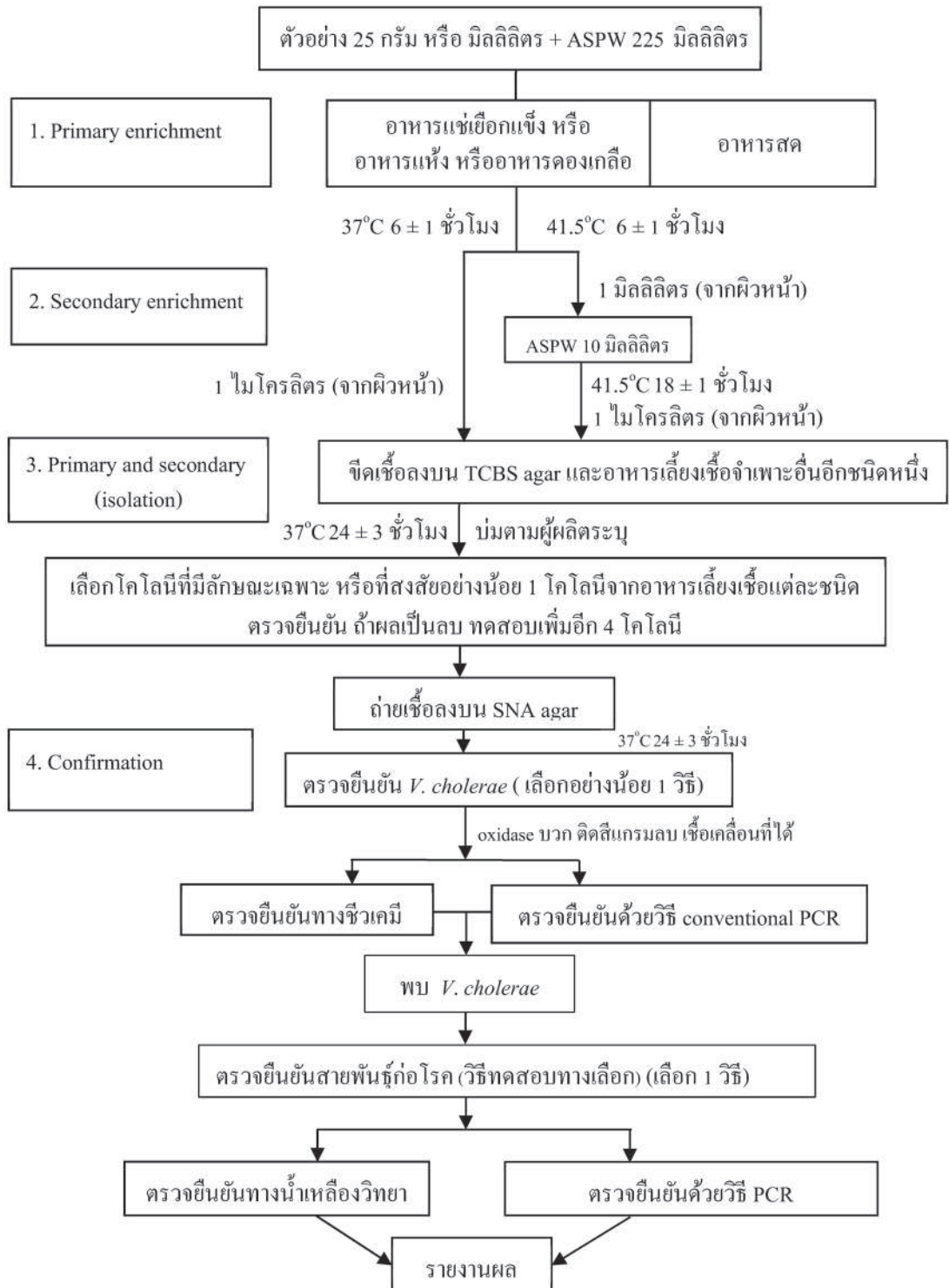
ละลายใน agarose ใน 1xTAE buffer หรือเทียบเท่า หยด ethidium bromide

2-3 หยด หรือสีย้อมอื่น เท gel ลง ในถาดเตรียม gel โดยใช้หัวเตรียม gel

ตามขนาดที่ต้องการ เมื่อ gel แข็ง จึงดึงหัวออก

9. *V. cholerae* anti-sera ใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *V. cholerae* ในอาหาร

ภาคผนวก 3

ตาราง แสดงปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*,
V. mimicus และ *V. alginolyticus*

การทดสอบ	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
Oxidase	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-
ONPG hydrolysis	-	+	+	+	-
Production of indole	+	+	+	+	+
Growth in peptone water with					
0% NaCl	-	+	-	+	-
6% NaCl	+	-	+	-	+
10% NaCl	-	-	-	-	+
+ หมายถึง ให้ผลบวก 76% ถึง 89%					

ภาคผนวก 4

วิธี Conventional PCR สำหรับการตรวจยืนยัน *Vibrio cholerae*

1. ส่วนประกอบของ mastermix

เตรียม mastermix ในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR

โดยให้มีปริมาตรรวม 47.5 ไมโครลิตร ดังตาราง

Reagents	Volume per reaction (ไมโครลิตร)
Reaction buffer (5x) ^a	10
MgCl ₂ (25 mM)	5
dNTPs (20 mM)	0.625
Forward primer (nM) (100 μM)	0.5
Reverse primer (nM) (100 μM)	0.5
น้ำ	30.625
Taq polymerase	0.25
ปริมาตรรวม	47.5

^a ขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของ reaction buffer

2. Primers สำหรับการตรวจยืนยัน *V. cholerae*

<i>prVC</i> (FW)	TTA AGC STT TTC RCT GAG AAT G
<i>prVC</i> (REV)	AGT CAC TTA ACC ATA CAA CCC G

(Chun J., Huq-A., ColWell R.R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65 pp. 2202-8.)

3. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (Cycling parameters) สำหรับ *prVC*

Stage		Temperature	Time	No. of cycles
Pre-heating		94°C	2 นาที	1
Amplification	Denaturation	94°C	1 นาที	30
	Annealing	50°C	1 นาที	
	Extension	72°C	1.5 นาที	
Post amplification		72°C	10 นาที	1

4. การควบคุมคุณภาพของวิธี conventional PCR (PCR Controls)

- สกัด DNA เป้าหมาย จากแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงตามตาราง ดังนี้

Function	Target	WDCM ^a control strains	Identification	Product size (bp)
Specificity	<i>prVC</i>	<i>Vibrio cholerae</i> WDCM 00136	<i>Vibrio cholerae</i> ^b	295 to 310

^a World Data Centre for Microorganisms (WDCM) strain catalogue available at <http://refs.wdcm.org>

^b Denotes species identification

- DNA ที่ได้จากแบคทีเรีย สามารถเตรียมได้โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียบน saline nutrient agar จากนั้นเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1-3 โคโลนี ลงใน micro-centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเกลือ 0.85% นำไปใส่ใน heating block ที่ $95 \pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 5 ± 1 นาที เมื่อครบเวลาให้นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10000 g นาน 1 นาที จากนั้นเก็บรักษาสวนใส่ที่อุณหภูมิ $< -15^{\circ}\text{C}$ จนกระทั่งใช้งาน

DMSc F 2037: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร

Analytical method of *Vibrio parahaemolyticus* in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

ISO 21872-1:2017 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. – Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)

DNA	=	Deoxyribonucleic acid
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
<i>tdh</i>	=	thermostable direct haemolysin
<i>trh</i>	=	thermostable direct related haemolysin
<i>V. cholerae</i>	=	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>	=	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>V. vulnificus</i>	=	<i>Vibrio vulnificus</i>

4. หลักการ (Principle)

การฟุ้งตัวของเชื้อ *Vibrio* spp. บางชนิดที่ปนเปื้อนในอาหาร อาจดีขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิ บ่มเพาะเชื้อที่แตกต่าง โดยอุณหภูมิบ่มขึ้นกับชนิดของเชื้อ (species) และสถานะของ ผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น การฟุ้งตัวในขั้นตอน enrichment ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในอาหารสดจะดีขึ้น เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 41.5°C ขณะที่เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในอาหารแช่แข็ง (deep frozen) ที่เก็บรักษาที่

อุณหภูมิต่ำกว่า -18°C อาหารแห้ง หรืออาหารดองเกลือ รวมทั้งเชื้อ *V. vulnificus* ใน food matrix ต่าง ๆ จะฟื้นตัวดีขึ้น เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37°C

หมายเหตุ เชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* และ *V. vulnificus* ที่เป็นเชื้อ *Vibrio* ชนิดก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (enteropathogenic *Vibrio* spp.) อาจพบในปริมาณที่น้อยและมักอยู่ร่วมกับเชื้ออื่นที่มีปริมาณมาก เช่น พวก *Vibrionaceae* family หรือเชื้อ family อื่น ๆ

การตรวจหา (detection) *V. parahaemolyticus* แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

- 4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (Primary enrichment in a liquid selective medium)
เป็นขั้นตอนที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ ASPW บ่มที่ 37°C หรือ 41.5°C นาน 6 ชั่วโมง เพื่อให้ *V. parahaemolyticus* ที่บาดเจ็บฟื้นตัวขณะที่เชื้ออื่นถูกยับยั้ง
- 4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นที่สอง (Secondary enrichment in a liquid selective medium) เป็นขั้นตอนที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ ASPW บ่มที่อุณหภูมิ 41.5°C นาน 18 ชั่วโมง ทำให้ *V. parahaemolyticus* ที่ฟื้นตัวสามารถเจริญเพิ่มจำนวน ขณะที่เชื้ออื่นถูกยับยั้ง
- 4.3 การแยกและจำแนกเชื้อ (Isolation and identification) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง 2 ชนิด คือ TCBS และเลือกอาหารเลี้ยงเชื้ออีกชนิดหนึ่ง เช่น Chromogenic agar นำไปบ่มและแยกเชื้อที่ให้ลักษณะเฉพาะเพื่อทดสอบต่อไป
- 4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี หรือทดสอบด้วยวิธี PCR เป็นการตรวจยืนยันระดับ species แต่ถ้าต้องการทราบว่าเชื้อสายพันธุ์ก่อโรค (enteropathogenic *V. parahaemolyticus*) หรือไม่ให้ตรวจหายีนก่อโรค *tdh* และ *trh* ด้วยวิธี PCR ในการตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี PCR โดยการตรวจหายีน *Vp-toxR* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ASPW ที่ผ่านขั้นตอนเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นที่สอง (secondary enrichment)

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Alkaline saline peptone water (ASPW)
- 5.1.2 Arginine dihydrolase saline medium (ADH)
- 5.1.3 L- lysine decarboxylase saline medium (LDC)
- 5.1.4 Saline medium for detection of indole (Tryptophan saline medium)
- 5.1.5 Saline nutrient agar (SNA)
- 5.1.6 0%, 6% และ 10 % saline peptone waters
- 5.1.7 Thiosulfate citrate bile and sucrose agar medium (TCBS)
- 5.1.8 อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอีกชนิดหนึ่ง

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 Agarose
- 5.2.2 β -galactosidase reagent (หรืออาจใช้ ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside disc (ONPG disc))
- 5.2.3 DNA ladder 100 bp
- 5.2.4 dNTPs solution
- 5.2.5 Ethidium bromide
- 5.2.6 Gram stain reagents
- 5.2.7 Kovacs reagent
- 5.2.8 $MgCl_2$ solution
- 5.2.9 Oligonucleotides
- 5.2.10 Oxidase reagent
- 5.2.11 Sterile mineral oil
- 5.2.12 Taq polymerase
- 5.2.13 Toluene
- 5.2.14 Tris acetate EDTA (TAE) buffer (หรือ buffer ที่เทียบเท่า)
- 5.2.15 น้ำเกลือ 0.85%

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave)
- 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
- 6.1.3 ตู้แช่แข็ง (freezer) น้อยกว่า -15°C
- 6.1.4 ตู้เย็น (refrigerator) $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.1.5 ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ (incubator) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.1.6 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.1.7 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 6.1.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)
- 6.1.9 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง (micro-centrifuge) สำหรับหลอดขนาด 1.5 ml และ 2.0 ml ที่สามารถทำความเร็วได้ 10000 g
- 6.1.10 เตาหลุมไฟฟ้า (heating block) $95 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$
- 6.1.11 เครื่องผสม (vortex mixer)
- 6.1.12 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (conventional PCR machine)
- 6.1.13 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (real-time PCR machine)
- 6.1.14 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแนวนอน (electrophoresis chamber, horizontal)
- 6.1.15 กล้องแสงยูวี (UV transilluminator)

6.2 อุปกรณ์

- 6.2.1 แผ่นกระจก (glass slide)
- 6.2.2 แผ่นกระจกทาบหน้า (coverslip)
- 6.2.3 หัวและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)
- 6.2.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.5 หลอดทดลอง (test tube)
- 6.2.6 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)
- 6.2.7 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว (screw-cap bottle)
- 6.2.8 แท่งแก้ว (glass rod) หรือไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อ
- 6.2.9 กระดาษกรอง (filter paper)

6.2.10 Micro-centrifuges tube ขนาด 1.5-2.0 มิลลิลิตร สำหรับใช้ความเร็วที่ 10000 รอบ/นาที

6.2.11 Graduated pipette และ pipette filter tip ขนาด 1-1000 ไมโครลิตร

6.2.12 อุปกรณ์ที่ใช้กับเครื่อง conventional PCR หรือ real-time PCR เช่น optical plate และ ฝา, optical plate holder

7 ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures): ภาคผนวก 2

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลายๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และสุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 25 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
หมายเหตุ สามารถปรับน้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่างลดลงได้โดยให้มีอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 1 : 9 แต่ถ้าใช้ตัวอย่างมากกว่า 25 กรัม หรือ 25 มิลลิลิตร ต้องมีผลการทดสอบความถูกต้องหรือทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

7.2 การตรวจหา (detection)

7.2.1 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (Primary selective enrichment)

เติม ASPW 225 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ข้อ 7.1 เขย่าให้เข้ากัน กรณีตัวอย่างเป็นอาหารแช่แข็ง อาหารแห้ง หรืออาหารดองเกลือ บ่มที่ 37°C 6 ± 1 ชั่วโมง ส่วนอาหารสด บ่มที่ 41.5°C 6 ± 1 ชั่วโมง

หมายเหตุ

- กรณีตรวจตัวอย่างปริมาณมาก (มากกว่า 25 กรัม หรือ 25 มิลลิลิตร) ควรอุ่น ASPW ให้ได้อุณหภูมิที่ $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ/หรือ $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ก่อนใช้งาน
- กรณีที่ต้องการลดปริมาณงานสำหรับตัวอย่างรุ่นเดียวกัน (same batch) สามารถนำตัวอย่างทดสอบมารวมกัน เช่น การตรวจวิเคราะห์ 10 ตัวอย่าง ให้สุ่มตัวอย่างละ 25 กรัม รวมเป็น 250 กรัม และเติม ASPW 2.25 ลิตร
- เนื่องจากเชื้อ *Vibrio* spp. จะมีจำนวนปริมาณลดลง หากเก็บตัวอย่าง หรือ suspension ไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) ดังนั้นถ้าทำได้ควรหลีกเลี่ยงการเก็บที่ช่วงอุณหภูมินี้

7.2.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นที่สอง (Secondary selective enrichment)

ถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากบริเวณผิวหน้า ASPW (ข้อ 7.2.1) (โดยไม่ต้องเขย่าขวด) ลงในหลอด ASPW ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 41.5°C 18 ± 1 ชั่วโมง
หมายเหตุ สามารถใช้เชื้อจากข้อ 7.2.2 มาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้

7.2.3 การแยกและจำแนกเชื้อ (Isolation and identification)

7.2.3.1 ใช้ loop ขนาด 1 ไมโครลิตร ถ่ายเชื้อจากบริเวณผิวหน้า ASPW ที่บ่มครบ 6 ± 1 ชั่วโมง (ข้อ 7.2.1) และ 18 ± 1 ชั่วโมง (ข้อ 7.2.2) โดยขีดบนผิวหน้า TCBS agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด ชนิดละ 1 จานเพาะเชื้อ

7.2.3.2 บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง (อาหารเลี้ยงเชื้ออื่น บ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต) ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *V. parahaemolyticus*

- TCBS agar โคโลนีผิวเรียบสีเขียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร
- อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่น เป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิต

7.2.4 การตรวจยืนยัน (Confirmation)

7.2.4.1 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ หรือโคโลนีที่สงสัย อย่างน้อย 1

โคโลนี จากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมาตรวจยืนยัน (ถ้าผลเป็นลบ ควรทดสอบเพิ่มอีก 4 โคโลนี)

7.2.4.2 ถ่ายเชื้อลงบน SNA plate หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่เหมาะสม บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

หมายเหตุ

- สามารถตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR หรือทางชีวเคมี และอาจใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมี หรือทางชีวโมเลกุลที่เชื่อถือได้ ในการจำแนกเชื้อ *Vibrio* ระดับ species
- อาหาร โดยเฉพาะอาหารทะเล อาจปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจำนวนมาก รวมทั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ไม่ก่อโรค ซึ่งอาจเจริญได้เช่นกันในกระบวนการคัดแยกเชื้อ ดังนั้นหากเลือกโคโลนีจำนวนน้อยมาทดสอบยืนยัน อาจทำให้ตรวจไม่พบเชื้อ *Vibrio* ชนิดก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS มีข้อจำกัดที่ว่า เชื้อกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่ *Vibrio* spp. หรือ *Vibrio* spp. ชนิดที่ไม่ก่อโรค อาจให้ลักษณะโคโลนีที่คล้ายคลึงกับชนิดก่อโรค
- สำหรับตัวอย่างที่มีความจำเป็นต้องตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค โดยตรวจหาอินทรีย์ก่อโรค *tdh* และ *trh* ด้วยวิธี PCR ให้เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัย อย่างน้อย 5 โคโลนี (มากที่สุดเท่าที่จะทำได้) และถ้าเป็นไปได้ ให้เลือกทุกโคโลนี เพราะตามปกติสัดส่วนการตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคในตัวอย่างอาหารและสิ่งแวดล้อมมีจำนวนน้อยกว่า 5% ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง ดังนั้นโอกาสตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค จะต่ำมาก หากเลือกเชื้อจำนวนน้อยมาทดสอบ

7.2.4.3 นำเชื้อจาก SNA plate ข้อ 7.2.4.2 ทดสอบยืนยันเบื้องต้น (presumptive identification) ดังนี้

- Oxidase test

นำเชื้อขูดบนกระดาศกรองที่หยด oxidase reagent หรือกระดาศทดสอบสำเร็จรูป โดยใช้ห่วง หรือเข็มเย็บเย็บที่ทำด้วย platinum iridium หรือแท่งแก้ว (ไม่ใช่ห่วง หรือเข็มที่ทำจากนิกเกิล-โครเมียม เพราะอาจทำให้เกิดผลบวกปลอม)

ผลบวก: กระดาศกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อน ม่วงหรือม่วงเข้ม ภายใน 10 วินาที

ผลลบ: กระดาศกรองไม่เปลี่ยนสี

- *V. parahaemolyticus* ให้ผลบวก

- Microscopic examination (วิธีทดสอบทางเลือก)

- Gram stain

ย้อมเชื้อ ด้วยวิธี gram stain แล้วตรวจสอบรูปร่าง และการติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (สีแดง) รูปท่อนตรงหรือท่อนโค้ง ไม่สร้างสปอร์

- Motility test

ถ่ายเชื้อลงใน ASPW บ่ม 37 °C 1-6 ชั่วโมง

หยดเชื้อ 1 หยดลงบนแผ่นกระจก

ปิดด้วยแผ่นกระจกทับหน้า

ตรวจสอบการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลบวก: เชื้อเคลื่อนที่ได้

ผลลบ: เชื้อไม่เคลื่อนที่

- *V. parahaemolyticus* ให้ผลบวก

หมายเหตุ เลือกลโคไลนีของเชื้อที่ให้ผลการทดสอบยืนยันเบื้องต้น oxidase เป็นบวก โคไลนิตติดสีแกรมลบ และเคลื่อนที่ได้ ไปตรวจยืนยันต่อ

7.2.4.4 การตรวจยืนยันทางชีวเคมี: ภาควง 3

เจียเชื้อจาก SNA plate ในข้อ 7.2.4.2 ที่ให้ผลตรวจยืนยันเบื้องต้นที่สงสัยว่าเป็น *V. parahaemolyticus* นำไปทดสอบ ดังนี้

- การตรวจหา L-lysine decarboxylase
เจียเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LDC บริเวณใต้ผิวหน้า
แล้วทาบหน้าด้วย sterile mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร
บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง
ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นสีม่วงอมน้ำเงิน
ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง
- *V. parahaemolyticus* ให้ผลบวก
- การตรวจหา arginine dihydrolase
เจียเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ADH บริเวณใต้ผิวหน้า
แล้วทาบหน้าด้วย sterile mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร
บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง
ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นสีม่วงอมน้ำเงิน
ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง
- *V. parahaemolyticus* ให้ผลลบ
- การตรวจหา β-galactosidase
เจียเชื้อลงในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร
หยด toluene 1 หยด เขย่าหลอด วางหลอดในตู้บ่ม 37°C ประมาณ 5 นาที เติม β- galactosidase reagent 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางหลอดในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง ดูผลเป็นระยะ ๆ
ผลบวก: เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (มักมองเห็นการเปลี่ยนสีภายหลังบ่ม 20 นาที)
ผลลบ: ไม่เปลี่ยนสี (ภายหลังบ่ม 24 ชั่วโมง)
- *V. parahaemolyticus* ให้ผลลบ

หมายเหตุ กรณีใช้แผ่น ONPG disc สำเร็จรูป ให้ปฏิบัติตาม คำแนะนำของผู้ผลิต

- การตรวจหา indole
 เชื้อเชื้อลงใน tryptophan saline medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
 บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง เติม kovacs reagent 1 มิลลิลิตร
 ผลบวก: เกิดวงแหวนสีแดง
 ผลลบ: เกิดวงแหวนสีน้ำตาลอมเหลือง
 - *V. parahaemolyticus* ให้ผลบวก
- การทดสอบ halotolerance
 เชื้อเชื้อลงใน saline peptone water ความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 0%, 6% และ 10% บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง
 ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (มีการเจริญของเชื้อ)
 ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น (ไม่มีการเจริญของเชื้อ)
 - *V. parahaemolyticus* ให้ผลบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 6%

หมายเหตุ

- ปฏิกริยาชีวเคมี (ภาคผนวก 3) เป็นแนวทางในการยืนยันเชื้อ *Vibrio* ตาม species ที่ระบุ แต่สามารถทดสอบทาง Phenotype (Phenotypic tests) เพิ่มเติม เพื่อช่วยจำแนก species ของ *Vibrio* และแยกความแตกต่างจาก non-pathogenic *Vibrio* spp.
- *V. parahaemolyticus* ที่ให้ผล ONPG เป็นบวก พบได้บ้าง ดังนั้นอาจต้องทดสอบทาง Phenotype (Phenotypic tests) หรือ ทางอณูชีววิทยา (molecular tests) เพิ่มเติม เพื่อช่วยจำแนกสายพันธุ์เหล่านี้ และแยกความแตกต่างจาก non-pathogenic *Vibrio* spp.
- อาจนำโคโลนีที่เลือกไว้จากการทดสอบยืนยันเบื้องต้น (oxidase บวก แกรมลบ และเคลื่อนที่ได้) มาทดสอบยืนยันการเจริญใน saline peptone water ความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 10% และ arginine dihydrolase ก่อน หากพบว่า ให้ผลลบในรายการทั้งสอง จึงทำการตรวจยืนยันทางชีวเคมีต่อในรายการที่เหลือ

- อาจถ่ายเชื้อลงบน SNA พร้อมกับการทดสอบ halotolerance เพื่อให้มั่นใจว่า การที่เชื้อไม่เจริญใน 10 % saline peptone water ไม่ได้เกิดจากเชื้อตายตั้งแต่ก่อนนำมาทดสอบ (VC)

7.2.4.5 การตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR: ภาคผนวก 4 และ 5

การทำ PCR สามารถทำได้ทั้งแบบ Conventional PCR หรือ real-time PCR

7.2.4.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

1. เชื้อเชื้อจากข้อ 7.2.4.2 จำนวน 1 โคโลนีใส่ลงในหลอด micro-centrifuges tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีน้ำเกลือ 0.85% หรือ nuclease free water ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
2. อุณหภูมิใน heating block 95°C 5 ± 1 นาที
- 3.ปั่นเหวี่ยงที่ 10000 g นาน 1 นาที เก็บส่วนใสเพื่อทดสอบด้วยวิธี PCR

หมายเหตุ - หากใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป ต้องปฏิบัติตามที่ผู้ผลิตระบุ

- ต้องมี negative extraction control โดยใช้ น้ำเกลือ 0.85% หรือ nuclease free water ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทุกครั้งที่สกัด DNA
- เก็บดีเอ็นเอได้เป็นเวลานานที่ $<-15^{\circ}\text{C}$ แต่เก็บได้ไม่เกิน 1 เดือนในตู้เย็น ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$)

7.2.4.5.2 Conventional PCR

1. เตรียม master mix ตามภาคผนวก 4 ปรับปริมาตรตามจำนวนปฏิกิริยา
2. ปิเปิด master mix y ไมโครลิตร ใส่หลอด PCR ตามด้วย DNA ที่สกัดแล้ว x ไมโครลิตร
3. นำหลอด PCR ใส่เครื่อง thermocycler ตั้ง PCR condition ตาม primer ที่ใช้ ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้

แต่ละขั้น (denaturation, annealing และ extension)
ขึ้นกับน้ำยาที่ใช้ (primer และ PCR condition ที่ใช้
ดูภาคผนวก 4)

4. เตรียม agarose gel 2% ที่เติม ethidium bromide หรือ
สีย้อมอื่น เพื่อให้มองเห็น PCR product
5. หยอด DNA ladder (100 bp) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
ลงในหลุมแรก และหยอด PCR product 20 ไมโครลิตร
ลงในหลุมถัด ๆ ไป (ผสมกับ loading dye แล้ว ตาม
ความเหมาะสม) (อาจใช้ปริมาณ PCR product ตามวิธี
ของแต่ละห้องปฏิบัติการ และปริมาณ DNA ladder
ตามคำแนะนำของผู้ผลิต)
6. run gel electrophoresis ที่ 130 โวลต์ นาน 25 - 30 นาที
7. อ่านผล gel electrophoresis ด้วยเครื่อง ultraviolet
transilluminator ขนาดของ PCR product ขึ้นอยู่กับ
primer ที่ใช้ (ดูภาคผนวก 4)

หมายเหตุ

- อาจใช้วิธี PCR ในการตรวจสอบเบื้องต้นว่ามี
V. parahaemolyticus ใน primary หรือ secondary
enrichment broth ที่ผ่านการบ่มแล้วหรือไม่
- ตัวอย่างที่มีความสำคัญ เช่น ควบคุมตามกฎหมาย
และ/หรือสอบสวนโรคระบาด ควรแยกเชื้อและ
ตรวจยืนยันตามเอกสารนี้

7.2.4.5.3 Real-time PCR

1. เตรียม master mix (ตามภาคผนวก 5) โดยใส่ master
mix 20 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แต่อาจปรับเปลี่ยน
ปริมาตรน้ำยา PCR ตามวิธีของแต่ละห้องปฏิบัติการ
หรือตามวิธีการที่มีการตีพิมพ์เผยแพร่

2. ทุกส่วนของตัวอย่าง และทุกครั้งที่ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง (1 cycler run) ให้เตรียม optical plate ที่ประกอบด้วย
 - undiluted sample DNA 5 ไมโครลิตร อย่างน้อย 1 หลุม
 - negative extraction control 5 ไมโครลิตร อย่างน้อย 1 หลุม
 - control DNA สำหรับแต่ละ target assay 5 ไมโครลิตร อย่างน้อย 1 หลุม
 - nuclease free water 5 ไมโครลิตร อย่างน้อย 1 หลุม
3. ตั้ง PCR condition อย่างน้อย 45 cycles โดยการตั้งเวลาและอุณหภูมิของแต่ละขั้นตอน (denaturation, annealing และ extension) ขึ้นกับน้ำยาที่ใช้ ควรปฏิบัติตามผู้ผลิตราย

หมายเหตุ

- สำหรับเครื่อง Real-time PCR ที่ผู้ใช้สามารถตั้งจุดวัด fluorescence ต้องตั้งเมื่อจบขั้นตอน extension
- การวิเคราะห์ amplification plots ให้ทำตามวิธีการที่ผู้ผลิตเครื่องแนะนำ ควรตั้ง threshold ให้ตัดผ่านพื้นที่ที่ amplification plots (logarithmic view) ขนานกัน (exponential phase)
- Negative controls (nuclease free water และ negative extraction control) ต้องให้ผลลบเสมอ ถ้า Negative controls ให้ผลบวก ต้องนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกมาตรวจวิเคราะห์ซ้ำ
- รายละเอียดวิธี amplification ตามภาคผนวก 5
- ตัวอย่างที่มีความสำคัญ เช่น ควบคุมตามกฎหมาย และ/หรือสอบสวนโรคระบาด ควรแยกเชื้อและตรวจยืนยันตามเอกสารนี้

8. การคำนวณผล (Calculation of results)

-

9. การรายงานผล (Expression of results)

V. parahaemolyticus/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ ถ้ามีการทดสอบ DNA ของยีนก่อโรค ให้ระบุยืนยันด้วย

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *V. parahaemolyticus* ในอาหาร

10.3 ภาคผนวก 3: ตารางแสดงปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus*,
V. cholerae, *V. vulnificus*, *V. mimicus* และ *V. alginolyticus*

10.4 ภาคผนวก 4: วิธี Conventional PCR สำหรับการตรวจหา *Vibrio*
parahaemolyticus, thermostable direct haemolysin (*tdh*) และ
thermostable direct related haemolysin (*trh*) genes

10.5 ภาคผนวก 5: วิธี Real-time PCR สำหรับการตรวจหา *Vibrio parahaemolyticus*
และ thermostable direct haemolysin gene (*tdh*)

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Alkaline saline peptone water (ASPW)

Peptone	20	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	20	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 8.6 ± 0.2

2. Arginine dihydrolase saline medium (ADH)

Arginine monohydrochloride	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร
แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 8.6 ± 0.2

3. Saline medium for detection of indole (tryptophan saline medium)

Enzymatic digest of casein	10	กรัม
DL-tryptophan	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร
แบ่งใส่หลอด 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

4. L-lysine decarboxylase saline medium (LDC)

L-lysine monohydrochloride	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด
2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 8.6 ± 0.2

5. Saline nutrient agar (SNA)

Meat extract	5	กรัม
Peptone	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
Agar	8-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสม ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน
วุ้นละลาย แบ่งใส่ขวด หรือหลอดตามปริมาณที่ต้องการ
ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2 เติงหลอดและปล่อยให้วุ้นแข็ง
* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

6. Saline peptone waters (0%, 6% และ 10%)

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	0, 60 หรือ 100	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสม ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด
ตามปริมาณที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

7. Thiosulfate citrate bile and sucrose agar (TCBS)

Peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium citrate	10	กรัม
Sodium thiosulfate	10	กรัม
Iron (III) citrate	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
Dried bovine bile	8	กรัม
Sucrose	20	กรัม
Bromothymol blue	0.04	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Agar	8-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบ ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ต้มเดือดจนวุ้นละลาย

pH 8.6 ± 0.2

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. β -galactosidase reagent

1.1 Buffer solution

Sodium dihydrogen-orthophosphate (NaH_2PO_4)	6.9	กรัม
Sodium hydroxide (NaOH), 0.1 mol/l solution	~ 3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (ปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้าย)	50	มิลลิลิตร
ละลาย NaH_2PO_4 ในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 ± 0.2 ด้วย NaOH แล้ว ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น		

1.2 ONPG solution

2-ortho-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG)	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร
ละลาย ONPG ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิประมาณ 50°C		

การใช้งาน

Buffer solution (ข้อ 1.1) 5 มิลลิลิตร กับ ONPG solution (ข้อ 1.2) 15
มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บที่อุณหภูมิ $3 \pm 2^\circ\text{C}$

2. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

3. Kovacs reagent

Dimethylamino-4 benzaldehyde	5	กรัม
Hydrochloric acid, $p = 1.18 \text{ g/ml to } 1.19 \text{ g/ml}$	25	มิลลิลิตร
Methyl-2 butan-2-ol	75	มิลลิลิตร
ผสมส่วนประกอบให้เข้ากัน		

4. Sterile mineral oil ใช้ชนิดสำเร็จรูป

5. Oxidase reagent

<i>N, N, N', N'</i> - tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine dihydrochloride ($C_{10}H_{16}N_2 \cdot 2HCl$)	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
ละลายส่วนประกอบในน้ำเย็น ก่อนใช้งาน		

6. น้ำเกลือ 0.85%

Sodium chloride (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.5 ± 0.2		

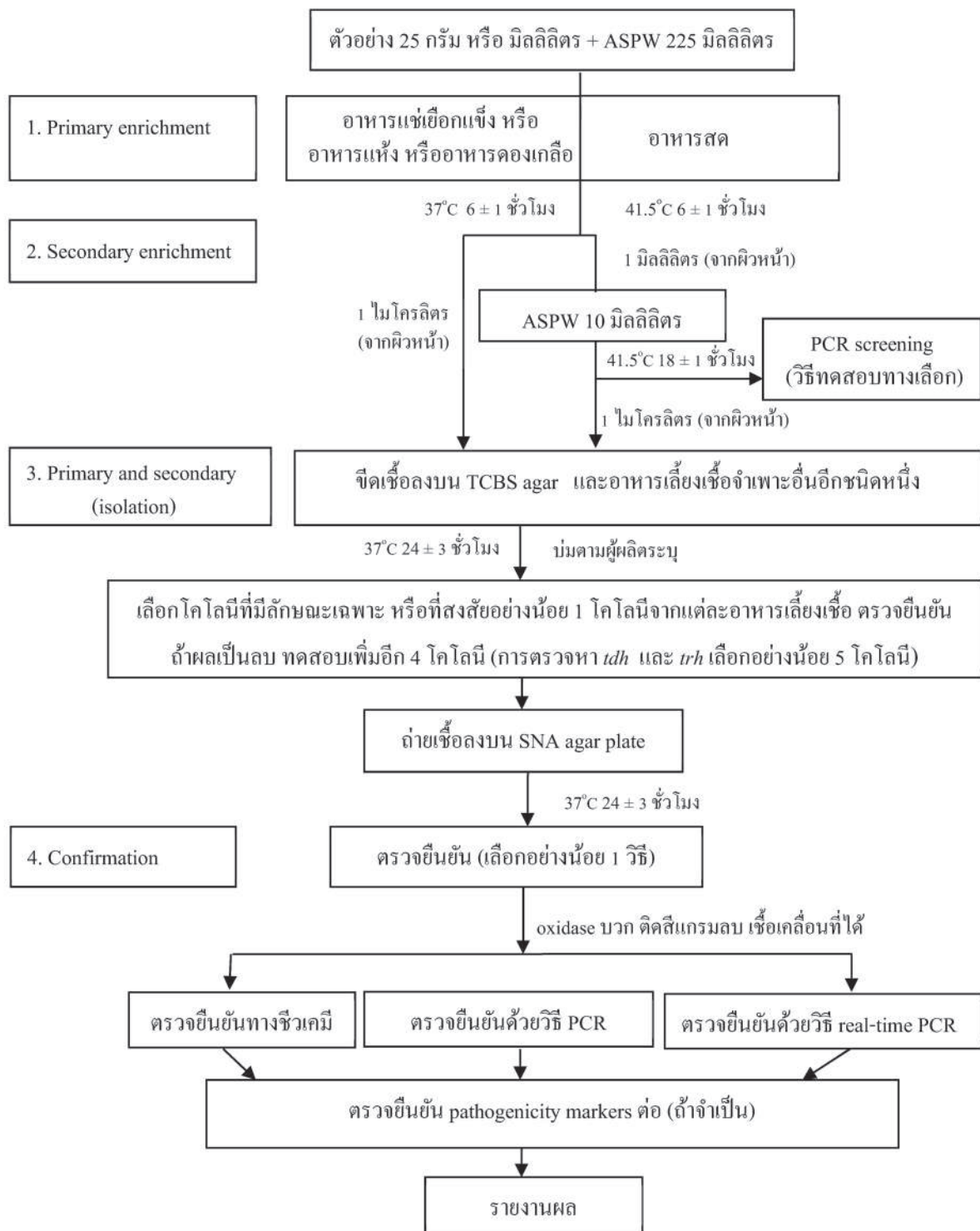
7. Tris acetate EDTA (TAE) buffer

50x TAE buffer	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ผสมสารละลาย 50x TAE buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 3 ± 2°C		

8. Agarose gel 2%

Agarose	2	กรัม
1x TAE buffer หรือเทียบเท่า	100	มิลลิลิตร
ละลายใน agarose ใน 1xTAE buffer หรือเทียบเท่า		
หยด ethidium bromide 2-3 หยด หรือสีย้อมอื่น เท gel ลง ในถาดเตรียม gel โดยใช้หัวเตรียม gel ตามขนาดที่ต้องการ เมื่อ gel แข็ง จึงดึงหัวออก		

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *V. parahaemolyticus* ในอาหาร

ภาคผนวก 3

ตาราง แสดงปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*,
V. mimicus และ *V. alginolyticus*

การทดสอบ	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
Oxidase	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-
ONPG hydrolysis	-	+	+	+	-
Production of indole	+	+	+	+	+
Growth in peptone water with					
0% NaCl	-	+	-	+	-
6% NaCl	+	-	+	-	+
10% NaCl	-	-	-	-	+
+ หมายถึง ให้ผลบวก 76% ถึง 89%					

ภาคผนวก 4

วิธี Conventional PCR สำหรับการตรวจยืนยัน *Vibrio parahaemolyticus*, thermostable direct haemolysin (*tdh*) และ thermostable direct related haemolysin (*trh*) genes

1. ส่วนประกอบของ mastermix

เตรียม mastermix ในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR

โดยให้มีปริมาตรรวม 47.5 ไมโครลิตร ดังตาราง

Reagents	Volume per reaction (ไมโครลิตร)
Reaction buffer (5x) ^a	10
MgCl ₂ (25 mM)	5
dNTPs (20 mM)	0.625
Forward primer (nM) (100 μM)	0.5
Reverse primer (nM) (100 μM)	0.5
น้ำ	30.625
Taq polymerase	0.25
ปริมาตรรวม	47.5

^a ขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของ reaction buffer

2. Primers สำหรับการตรวจยืนยัน *V. parahaemolyticus*

<i>VpToxR</i> (FW)	GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG
<i>VpToxR</i> (REV)	ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG

Kim Y.B., Okuda J., Matsumoto C., Takahashi N., Hashimoto S., Nishibuchi M.

Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR
targeted to the *toxR* gene. J. Clin. Microbiol. 1999, 37 pp. 1173-7.

3. Primers สำหรับการตรวจหาชิ้น *tdh* และ *trh* ของ *V. parahaemolyticus*

L- <i>tdh</i> (FW)	GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC
R- <i>tdh</i> (REV)	TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC
L- <i>trh</i> (FW)	TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT
R- <i>trh</i> (REV)	CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G

Bej A.K., Patterson D.P., Brasher C.W., Vickery M.C.L., Jones D.D., Kaysner C.A. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. J. Microbiol. Methods.1999, 36 pp. 215-25

4. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (Cycling parameters) สำหรับ *VptoxR*

Stage		Temperature	Time	No. of cycles
Pre-heating		96°C	5 นาที	1
Amplification	Denaturation	94°C	1 นาที	30
	Annealing	63°C	1.5 นาที	
	Extension	72°C	1.5 นาที	
Post amplification		72°C	7 นาที	1

5. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (Cycling parameters) สำหรับ *tdh* และ *trh*

Stage		Temperature	Time	No. of cycles
Pre-heating		94°C	3 นาที	1
Amplification	Denaturation	94°C	1 นาที	30
	Annealing	58°C	1 นาที	
	Extension	72°C	1 นาที	
Post amplification		72°C	5 นาที	1

6. การควบคุมคุณภาพของวิธี conventional PCR (PCR Controls)

- สกัด DNA เป้าหมายจากแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงตามตาราง ดังนี้

Function	Target	WDCM ^a control strains	Identification	Product size (bp)
Specificity	<i>toxR</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> WDCM 00185	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ^b	368
	<i>tdh</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10884 (WDCM number claimed)	thermostable direct haemolysin ^c	269
	<i>trh</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> WDCM 00037	thermostable direct related haemolysin ^c	500

^a World Data Centre for Microorganisms (WDCM) strain catalogue available at <http://refs.wdcm.org>
^b Denotes species identification
^c Indicates pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus*

- DNA ที่ได้จากแบคทีเรีย สามารถเตรียมได้โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียบน saline nutrient agar จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1-3 โคโลนี ลงใน micro-centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี น้ำเกลือ 0.85% นำไปใส่ใน heating block ที่ $95 \pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 5 ± 1 นาที เมื่อครบเวลาให้นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10000 *g* นาน 1 นาที จากนั้นเก็บรักษาสวนใส่ที่อุณหภูมิ $< -15^{\circ}\text{C}$ จนกระทั่งใช้งาน

ภาคผนวก 5

วิธี Real-time PCR สำหรับการตรวจหา *Vibrio parahaemolyticus* และ thermostable direct haemolysin gene (*tdh*)

1. ส่วนประกอบของ mastermix

เตรียม mastermix ในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยให้มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ดังตาราง

น้ำยา	ปริมาตรต่อ reaction (ไมโครลิตร)
2x TaqMan universal mastermix (1x) ^a	12.5
Forward primer (100 nM) ^a	0.45
Reverse primer (100 nM) ^a	0.45
Probe (500 nM) ^a	1
น้ำ	5.6
DNA sample	5
ปริมาตรรวม	25

^a ความเข้มข้นสุดท้าย

2. *Vibrio parahaemolyticus* – primers และ hydrolysis probes

<i>VpToxR</i> (FW)	GAA CCA GAA GCG CCA GTA GT
<i>VpToxR</i> (REV)	AAA CAG CAG TAC GCA AAT CG
<i>VpToxR</i> (PROBE)	TCA CAG CAG AAG CCA CAG GTGC

Probes ติดฉลาก 5' 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA) Taiwom., Baker-Austin C., Powell A., Hodgson E., Natas O.B., Walker D.I. Comparison of *toxR* and *tlh* based PCR assays for *Vibrio parahaemolyticus*. Food Control. 2017, 77 pp. 116-20.

3. Thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene: *Vibrio parahaemolyticus* - primers และ hydrolysis probes

<i>tdh</i> (FW)	TCC CTT TTC CTG CCC CC
<i>tdh</i> (FW)	CGC TGC CAT TGT ATA GTC TTT ATC
<i>tdh</i> (PROBE)	TGA CAT CCT ACA TGA CTG TG

Probes ที่ใช้ คัดเลือก 5' 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA) Nordstrom J.L., Vickery M.C.L., Blackstone G.M., Murray S.L., Depaula A. Development of a multiplex Real-Time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73 pp.5840-47.

4. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (Cycling parameters)

Stage		Temperature	Time	No. of cycles
Pre-heating	Initial denaturation	95°C	10 นาที	1
	Denaturation	95°C	15 วินาที	45
Amplification	Annealing - extension	60°C	1 นาที	

5. การควบคุมคุณภาพของวิธี Real-time PCR (PCR controls)

เตรียม PCR control โดยสกัด DNA ของยีนเป้าหมายจากแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงตามตารางดังนี้

Function	Target	WDCM ^a control strains	Identification
Specificity	<i>toxR</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> WDCM 00185	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ^b
	<i>tdh</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10884	thermostable direct haemolysin ^c

^a World Data Centre for Microorganisms (WDCM) strain catalogue available at <http://refs.wdcm.org>

^b Denotes species identification.

^c Indicates pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus*

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| 1. นางสาวชนทอง เพ็ชรนอก | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 2. นางกนกวรรณ ดุ้นสกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |

วิธีมาตรฐานทางกายภาพสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 3004	แป้งข้าวเจ้า	สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา	I	243
DMSc F 3005	ผลิตภัณฑ์ข้าวเจ้า	สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา	I	249

DMSc F 3004: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา ในแป้งข้าวเจ้า

Determination of Light Filth in Rice Flours (powder)

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา ในแป้งข้าวเจ้า

2. เอกสารอ้างอิง (references)

2.1 AOAC Official Method 982.32 A. (a) B. (a): Light Filth in Rice Flours (powders)

2.2 AOAC Official Method 945.75: Extraneous Materials (Foreign Matter) in Products

3. หลักการ (Principle)

แยกสิ่งแปลกปลอมชนิดเบา เช่น แมลงทั้งตัว ชิ้นส่วนแมลง และขนสัตว์ ออกจากตัวอย่างแป้งข้าวเจ้า โดยย่อย (digest) ตัวอย่างด้วยกรด HCl พร้อมกับให้ความร้อนด้วยการต้มให้เดือด จากนั้นนำมา wet sieve และเติม paraffin oil เพื่อดักจับสิ่งแปลกปลอมที่ลอยขึ้นมารวมในชั้นน้ำมัน และสามารถแยกออกโดยใช้ percolator เก็บชั้นน้ำมันมากรองแล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

4.1.2 Widefield zoom stereoscopic microscope

4.1.3 Compound microscope

4.1.4 เครื่องทำน้ำร้อนพร้อมสายฉีด

4.1.5 Stirrer - hot plate ที่สามารถปรับระดับความร้อนและความเร็วได้อย่างต่อเนื่อง

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 ชุดเครื่องกรอง ประกอบด้วย filtering flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร

Hirsch funnel ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร และเครื่องปั๊มสุญญากาศ

4.2.2 glass funnel เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร

4.2.3 Magnetic stirring bar เป็นแท่งแม่เหล็กที่เคลือบด้วย teflon ขนาดยาว

โดยประมาณ 47 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 9 มิลลิเมตร

4.2.4 percolator ขนาด 2,000 มิลลิลิตร

4.2.5 beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และ 2,000 มิลลิลิตร

4.2.6 petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

4.2.7 forceps

4.2.8 glass rod

4.2.9 wash bottle

4.2.10 sieve no. 230 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ควรทำจาก stainless steel และ

เป็นชนิด plain weave ที่มีเส้นลวดสานกันแบบขึ้น 1 ลง 1

4.2.11 เข็มเย็บ ซึ่งปลายที่ใช้เย็บเป็นลวดเส้นเล็กที่มีขนาดเหมาะสมกับการใช้งาน

4.2.12 กระดาษกรอง Whatman No. 8 หรือเทียบเท่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง
90 มิลลิเมตร

4.2.13 clamp

4.2.14 นาฬิกาจับเวลา

4.2.15 แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์

5. สารเคมี (Reagents)

5.1 40% isopropanol (isopropanol จำนวน 40 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกรอง 60 มิลลิลิตร)

5.2 hydrochloric acid (HCl)

5.3 paraffin oil สีขาว

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 เปิด hot plate ที่ความร้อนสูงสุด
- 6.2 ใส่ magnetic stirring bar ลงใน beaker ขนาด 2,000 มิลลิลิตร และนำไปวางบนเครื่องชั่งแล้วกดปุ่ม tare
- 6.3 ชั่งตัวอย่างแป้งข้าวเจ้า 100 กรัม ลงใน beaker นิดน้ำร้อนจากเครื่องทำน้ำร้อนลงไปประมาณ 100 มิลลิลิตร
- 6.4 เติม HCl 75 มิลลิลิตร และเติมน้ำร้อนให้ได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร
- 6.5 นำไปต้มบน hot plate และกวนด้วย magnetic stirring bar ต้มจนเดือดอย่างแรง จับเวลาต่ออีก 5 นาที
- 6.6 ถ่ายส่วนผสมที่ร้อน ลงใน sieve no. 230 นิดน้ำร้อนล้างส่วนที่เหลือบน sieve จนกระทั่งฟองอากาศลดลงและน้ำล้างใส
- 6.7 ถ่ายส่วนที่เหลือบน sieve ลงใน beaker ใบเดิม ด้วย 40 % isopropanol
- 6.8 ใส่ magnetic stirring bar และเติม 40 % isopropanol ให้ได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร
- 6.9 นำไปต้มบน hot plate เติม paraffin oil 95 มิลลิลิตร ต้มและกวนนาน 3 นาที

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ใช้ clampหนีบท่อสายยางที่ percolator จากนั้นเติม 40 % isopropanol 300 มิลลิลิตร ลงใน percolator
- 7.2 ถ่ายส่วนผสมใน beaker (ข้อ 6.9) ลงใน percolator ล้าง beaker ด้วย 40 % isopropanol แล้วเทลงใน percolator
- 7.3 เติม 40 % isopropanol ประมาณ 1 ลิตร ใน beaker ใบเดิม (ข้อ 7.2) แล้วถ่ายลงใน percolator ให้ได้ปริมาตรห่างจากขอบด้านบน percolator 3 เซนติเมตร
- 7.4 ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ถ่าย (drain) ของเหลวออกทางด้านล่างของ percolator ให้ชั้นน้ำมันสูงจากก้น percolator 5 เซนติเมตร
- 7.5 เติมน้ำร้อนลงใน percolator ให้ห่างจากขอบด้านบน percolator 3 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที และ drain ของเหลวออกให้ชั้นน้ำมันสูงจากก้น percolator 5 เซนติเมตร
- 7.6 ทำซ้ำในข้อ 7.5 จนกระทั่งชั้นของเหลวใส

- 7.7 drain ของเหลวออกให้ชั้นน้ำมันสูงจากกัน percolator 5 เซนติเมตร ถ่ายชั้นน้ำมันลงใน beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- 7.8 ล้างด้านข้าง percolator ด้วย น้ำ สลับกับ 40 % isopropanol และ isopropanol ลงใน beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ใบเดิม
- 7.9 นำชั้นน้ำมันไปกรองบนกระดาษกรองโดยใช้ชุดเครื่องกรอง นำกระดาษกรองไปตรวจหาสิ่งแปลกปลอมภายใต้ widefield zoom stereoscopic microscope ที่กำลังขยาย 30 เท่า หากสิ่งแปลกปลอมมีขนาดเล็กมากไม่สามารถจำแนกชนิดได้ให้นำสิ่งแปลกปลอมนั้นวางลงบนแผ่นสไลด์ และติด (mount) ด้วย glycerine jelly ปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ ตรวจภายใต้ compound microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

การรายงานสิ่งแปลกปลอมที่พบในแต่ละ subsamples จะแบ่งชนิดสิ่งแปลกปลอมเป็นกลุ่มๆ เช่น แมลงทั้งตัว ชิ้นส่วนแมลง ขนหนู และขนนก ระบุจำนวนและขนาดที่พบในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมที่พบมีจำนวนมากจนไม่สามารถนับได้ทั้งหมด ให้รายงานจำนวนโดยประมาณหรือขึ้นต่ำที่สามารถตรวจสอบได้และให้ใส่เครื่องหมายมากกว่า

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอย่างน้อย 2 subsamples
- 9.2 ตรวจสอบน้ำประปาและน้ำกรองที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และทุกครั้งที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยเก็บน้ำประปาและน้ำกรองจำนวนอย่างละ 1 ลิตร นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า
- 9.3 ตรวจสอบอากาศภายในห้องปฏิบัติการ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยใช้กระดาษกรองวางลงใน petri dish หยดน้ำยาผสมกลีเซอรอล กับ 95% ethyl alcohol ในอัตรา 3:2 ตั้งทิ้งไว้ไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง นำมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า
- 9.4 ตรวจสอบ sieve โดยล้างทำความสะอาดทุกครั้งก่อนใช้งาน จากนั้นทำ blank control โดยเก็บน้ำที่ได้นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า

9.5 ทำ Assuring the Quality of Test Results ทุกๆ 6 เดือน โดยวิเคราะห์ 6 subsamples ซึ่ง Spiked material ใช้ชิ้นส่วนแมลง (*Sitophilus* spp.) ขนาด 0.25 x 0.25 มิลลิเมตร จำนวนชนิดละอย่างน้อย 10 ชิ้นและ ขนหนู (fur hair) ขนาดยาว 1 มิลลิเมตร จำนวนชนิดละอย่างน้อย 10 เส้นต่อการตรวจวิเคราะห์ 1 subsamples โดยต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ % recovery ขนหนูต้องพบ ไม่น้อยกว่า 80% ชิ้นส่วนแมลงต้องพบ ไม่น้อยกว่า 85% และ % RSD (relative standard deviation) ต้องมีค่าน้อยกว่า 15%

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ (Method Validation) ของวิธีวิเคราะห์ Light Filth in Rice Flours (powders) มีผู้ร่วมทดสอบจำนวน 4 คน วิเคราะห์แต่ละ 6 subsamples โดยใช้ spiked materials คือ ชิ้นส่วนแมลง (*Sitophilus* spp.) ขนาด 0.25 x 0.25 มิลลิเมตร และขนหนู (fur hair) ขนาดยาว 1 มิลลิเมตร ชนิดละ 10, 15 และ 20 ชิ้น/เส้น ต่อการตรวจวิเคราะห์ 2 subsamples โดยผลการทดสอบรวมพบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด คือ % recovery ขนหนูและชิ้นส่วนแมลงพบมากกว่า 80% และ %RSD (relative standard deviation) มีค่าน้อยกว่า 15%

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผู้ทดสอบแต่ละคนในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Light Flith in Rice Flours (Powder)

ผู้ทดสอบ	Mean/rat hairs			Mean/elytral squares		
	10	15	20	10	15	20
คนที่ 1	9.50	14.50	19.00	10.00	14.00	19.50
คนที่ 2	8.50	13.00	18.00	8.00	13.50	17.50
คนที่ 3	8.50	13.50	18.00	8.00	14.00	18.00
คนที่ 4	8.00	12.50	17.00	8.00	13.00	17.00

ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของผู้ทดสอบรวมทั้ง 4 คน

Statistical analysis	rat hairs (1 mm.)			elytral squares (0.25x0.25 mm.)		
	10	15	20	10	15	20
Mean	8.63	13.38	18.00	8.50	13.63	18.00
Min.	8.00	12.50	17.00	8.00	13.00	17.00
Max.	9.50	14.50	19.00	10.00	14.00	19.50
SD	0.63	0.85	0.82	1.00	0.48	1.08
% Recovery	88.47			88.61		
% RSD _R	6.07			7.09		

DMSc F 3005: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา ในผลิตภัณฑ์ข้าวเจ้า

Determination of Light Filth in Extruded Rice Products, and Rice Paper

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา ในผลิตภัณฑ์ข้าวเจ้า ได้แก่ เส้นก๋วยเตี๋ยว เส้นหมี่ ก๋วยจั๊บ ขนมจีน ขนมหวาน ขนมขบเคี้ยว และแผ่นแป้ง เป็นต้น

2. เอกสารอ้างอิง (references)

- 2.1 AOAC Official Methods 982.32 A. (b) B. (b): Light Filth in Extruded Rice Products, and Rice Paper
- 2.2 AOAC Official Method 945.75: Extraneous Materials (Foreign Matter) in Products

3. หลักการ (Principle)

แยกสิ่งแปลกปลอมชนิดเบา เช่น แมลงทั้งตัว ชิ้นส่วนแมลง และขนสัตว์ ออกจากตัวอย่าง โดยย่อย (digest) ตัวอย่างด้วยกรด HCl พร้อมกับให้ความร้อนด้วยการต้มให้เดือด จากนั้นนำมา wet sieve และเติม paraffin oil เพื่อดักจับสิ่งแปลกปลอมที่ลอยขึ้นมารวมในชั้นน้ำมัน และสามารถแยกออกโดยใช้ percolator เก็บชั้นน้ำมันมากรองแล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

4.1.2 Widefield zoom stereoscopic microscope

4.1.3 Compound microscope

4.1.4 Stirrer - hot plate ที่สามารถปรับระดับความร้อนและความเร็วได้อย่างต่อเนื่อง

4.1.5 เครื่องทำน้ำร้อนพร้อมสายฉีด

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 ชุดเครื่องกรอง ประกอบด้วย filtering flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร Hirsch funnel ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร และเครื่องปั๊มสุญญากาศ
- 4.2.2 Glass funnel เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร
- 4.2.3 Magnetic stirring bar เป็นแท่งแม่เหล็กที่เคลือบด้วย teflon ขนาดยาวโดยประมาณ 47 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 9 มิลลิเมตร
- 4.2.4 Beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และ 2,000 มิลลิลิตร
- 4.2.5 Petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
- 4.2.6 Forceps
- 4.2.7 Glass rod
- 4.2.8 Wash bottle
- 4.2.9 Sieve no. 230 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ควรทำจาก stainless steel และเป็นชนิด plain weave ที่มีเส้นลวดสานกันแบบขึ้น 1 ลง 1
- 4.2.10 เข็มเย็บ ซึ่งปลายที่ใช้เย็บเป็นลวดเส้นเล็กที่มีขนาดเหมาะสมกับการใช้งาน
- 4.2.1 กระดาษกรอง Whatman No. 8 หรือเทียบเท่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร
- 4.2.12 Clamp
- 4.2.13 นาฬิกาจับเวลา
- 4.2.14 แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์
- 4.2.15 Percolator ขนาด 2,000 มิลลิลิตร

5. สารเคมี (Reagents)

- 5.1 40% isopropanol: isopropanol ความเข้มข้น 99.9% จำนวน 40 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกรอง 60 มิลลิลิตร
- 5.2 20% isopropanol: isopropanol ความเข้มข้น 99.9% จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกรอง 80 มิลลิลิตร
- 5.3 กรด HCl ความเข้มข้น 36.5-38.0%
- 5.4 paraffin oil สีขาว ใส มีค่า 125/135 Saybolt Universal Viscosity และมีความถ่วงจำเพาะ 0.840-0.860

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 เปิด hot plate ที่ความร้อนสูงสุด
- 6.2 ใส่ magnetic stirring bar ลงใน beaker ขนาด 2,000 มิลลิลิตร และนำไปวางบนเครื่องชั่งแล้วกดปุ่ม tare
- 6.3 ตัดหรือหักตัวอย่างให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก ชั่งตัวอย่าง 225 กรัม ลงใน beaker
- 6.4 เติมน้ำร้อนประมาณ 1450 มิลลิลิตร และเติมกรด HCl ปริมาตร 150 มิลลิลิตร
- 6.5 นำไปต้มบน hot plate และกวนด้วย glass rod ขณะที่ต้มจนเดือดอย่างแรง เมื่อตัวอย่างเป็นของเหลวให้กวนด้วย magnetic stirring bar จับเวลาต่ออีก 10 นาที
- 6.6 ถ่ายส่วนผสมที่ร้อน ลงใน sieve no. 230 ฝึคน้ำร้อนล้างส่วนที่เหลือบน sieve จนกระทั่งฟองอากาศลดลงและน้ำล้างใส
- 6.7 ถ่ายส่วนที่เหลือบน sieve ลงใน beaker ใบเดิม ด้วย 40 % isopropanol
- 6.8 ใส่ magnetic stirring bar และเติม 40 % isopropanol ให้ได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร
- 6.9 นำไปต้มบน hot plate เติม paraffin oil 95 มิลลิลิตร ต้มและกวนนาน 3 นาที

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ใช้ clampหนีบท่อสายยางที่ percolator จากนั้นเติม 40 % isopropanol 300 มิลลิลิตร ลงใน percolator
- 7.2 ถ่ายส่วนผสมใน beaker (ข้อ 6.9) ลงใน percolator ล้าง beaker ด้วย 40 % isopropanol แล้วเทลงใน percolator
- 7.3 เติม 40 % isopropanol (ประมาณ 1 ลิตร) ใน beaker ใบเดิม (ข้อ 7.2) แล้วถ่ายลงใน percolator ให้ได้ปริมาตรห่างจากขอบด้านบน percolator 3 เซนติเมตร
- 7.4 ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ถ่าย (drain) ของเหลวออกทางด้านล่างของ percolator ให้ชั้นน้ำมันสูงจากก้น percolator 5 เซนติเมตร
- 7.5 เติม 20% isopropanol ลงใน percolator ให้ห่างจากขอบด้านบน percolator 3 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที และ drain ของเหลวออกให้ชั้นน้ำมันสูงจากก้น percolator 5 เซนติเมตร
- 7.6 ทำซ้ำในข้อ 7.5 จนกระทั่งชั้นของเหลวใส
- 7.7 drain ของเหลวออกให้ชั้นน้ำมันสูงจากก้น percolator 5 เซนติเมตร ถ่ายชั้นน้ำมันลงใน beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- 7.8 ล้างด้านข้าง percolator ด้วย น้ำ สลับกับ 40 % isopropanol และ 99.5% isopropanol ลงใน beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ใบเดิม

7.9 นำชิ้นน้ำมันไปกรองบนกระดาษกรองโดยใช้ชุดเครื่องกรอง นำกระดาษกรองไปตรวจหาสิ่งแปลกปลอมภายใต้ widefield zoom stereoscopic microscope ที่กำลังขยาย 30 เท่า หากสิ่งแปลกปลอมมีขนาดเล็กมากไม่สามารถจำแนกชนิดได้ให้นำสิ่งแปลกปลอมนั้นวางลงบนแผ่นสไลด์ และติด (mount) ด้วย glycerine jelly ปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ ตรวจภายใต้ compound microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

รายงานสิ่งแปลกปลอมที่พบ โดยจัดแบ่งชนิดสิ่งแปลกปลอมเป็นกลุ่มๆ เช่น แมลงทั้งตัว ชิ้นส่วนแมลง ขนสัตว์พื้นเพาะ ขนคน และขนนก ให้ระบุจำนวน ขนาดและรายละเอียดอื่นๆ ให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ในกรณี que สิ่งแปลกปลอมที่พบมีจำนวนมาก และไม่สามารถนับได้ทั้งหมด ให้รายงานจำนวนโดยประมาณหรือขั้นต่ำที่สามารถตรวจสอบได้และให้ใส่เครื่องหมายมากกว่า

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอย่างน้อย 2 subsamples

9.2 ตรวจสอบน้ำประปาและน้ำกรองที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และทุกครั้งที่ใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยเก็บน้ำประปาและน้ำกรองจำนวนอย่างละ 1 ลิตร นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า

9.3 ตรวจสอบอากาศภายในห้องปฏิบัติการ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยใช้กระดาษกรองวางลงใน petri dish หยดน้ำยาผสมกลีเซอรอล กับ 95% ethyl alcohol ในอัตรา 3:2 ตั้งทิ้งไว้ไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง นำมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า

9.4 ตรวจสอบ sieve โดยล้างทำความสะอาดทุกครั้งก่อนใช้งาน จากนั้นทำ blank control โดยเก็บน้ำที่ได้นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า

10. รายละเอียดอื่น

-

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| 1. นางนิตยา พันธุ์บัว | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 2. นางปวีณา พานิชกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 3. นางสาวสุพัฒดา ท้าวมา | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ |

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุลสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 4018	ข้าวโพดตัดแปรรูป พันธุ์กรรมชนิด DAS-59122-7	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event DAS-59122-7	-	255
DMSc F 4019	ข้าวโพดตัดแปรรูป พันธุ์กรรมชนิด TC1507	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event TC1507	-	261
DMSc F 4020	ข้าวโพดตัดแปรรูป พันธุ์กรรมชนิด T25	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event T25	-	267

**DMSc F 4018: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of
maize event DAS-59122-7**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด 59122-7 (ที่ตัดแปรพันธุ์กรรมใส่ยีน *cry34Ab1* and *cry35Ab1* เพื่อทนหนอนเจาะราก (*Diabrotica spp.*) และมี *pat* ยีนที่ทำให้ทนต่อยาปราบวัชพืช glufosinate-ammonium herbicide) โดยวิธี Real-time Polymerase Chain Reaction (RTi-PCR)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276: 2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569: 2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W.; *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- 2.4 JRC Reference Reports: Compendium of reference methods for GMO analysis, EURL-GMFF/ ENGL, 2011
- 2.5 Mazzara M., Grazioli E., Larcher S., Savini C., Van Den Eede G.; "Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line DAS-59122-7 Using Real-Time PCR - Validation Report and Protocol" Online Publication (2007)

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

RTi-PCR: Real-time Polymerase Chain Reaction
dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

4. หลักการ (Principle)

- 4.1 ทัวไป: การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ
- 4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำให้ในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อน คือในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ
 - 4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน
 - 4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย
 - 4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม
- 4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล
RTi-PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน
- 4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบชุดยีนที่มีลำดับเบสบริเวณ 5' integration border region (IBR) ที่เชื่อมต่อกันระหว่างยีนที่มีการใส่เข้าไปต่อกับตำแหน่งของยีนที่มีในข้าวโพดตามธรรมชาติ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเฉพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด DAS-59122-7
- 4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด DAS-59122-7 และข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง DAS-59122-7 และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยวๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, RTi-PCR grade

5.2 RTi-PCR buffer ความเข้มข้น 2 เท่า

5.3 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M ให้ PCR-product ขนาด 86 bp

5.5.1 Forward primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสที่อยู่บนจีโนมของข้าวโพด

DAS-59122-7-rb1f: 5' – GGG ATA AGC AAG TAA AAG CGC TC – 3'

5.5.2 Reverse primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสของยีนตัดแปรที่มีการใส่เข้าไปในข้าวโพด

DAS-59122-7-rb1r: 5' – CCT TAA TTC TCC GCT CAT GAT CAG – 3'

5.4 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ RTi-PCR)

5.7 RT-PCR probe:

DAS-59122-rb1s: 5'-FAM-TTT AAA CTG AAG GCG GGA AAC GAC
AA-TAMRA-3'

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

Real-time PCR machine

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7. 1 การเตรียมปฏิกิริยา RTi-PCR (setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะ ให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้าย ดังตารางที่ 59122_1

ตาราง 59122_1

Reagent	Final concentration
PCR buffer II (10x)	1x
Rox TM reference dye	0.7x
Tween-20	0.01%
Glycerol	0.8%
dNTPa (dATP, dCTP, dGTP)	200 μ mol/L each
dUTP	400 μ mol/L
MgCl ₂	5.0 mmol/L
Primer DAS-59122-7-rb1f, 10 μ mol/L	0.25 μ mol/L
Primer DAS-59122-7-rb1r, 10 μ mol/L	0.25 μ mol/L
Probe: DAS-59122-rb1s, 10 μ mol/L	0.20 μ mol/L
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	0.04 U/ μ L
Nuclease-free water	-
Template DNA	Maximum 200 ng
Final Volume	25 μ L

7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM DAS-59122-7 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme): ตามระบุในตาราง 59122_2

ตาราง 59122_2

Stage	Temperature	Time	No. of Cycles
Activation/ Initial Denaturation	95°C	600 s	1
Denaturation	95°C	15 s	
Annealing & Extension	60°C	60 s	
Denaturation, Annealing & Extension			50

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 กำหนดค่า threshold line

กำหนดค่า threshold line ในช่วงที่ amplification curve profile ของ positive control เริ่มมีค่า CT เกิดขึ้น และไม่มี fork effect ระหว่างตัวอย่างที่ทำซ้ำ

8.2 การกำหนดค่า baseline

กำหนดให้น้อยกว่าค่า threshold line

8.3 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้ามี amplification curve เกิดขึ้น และสามารถอ่านค่า CT ได้ ในกรณีไม่มีค่า CT แสดงว่าผลเป็นลบ

8.4 การสรุปผล:

8.4.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 subsamples และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.4.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 subsamples ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.5 การรายงาน

8.5.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด DAS-59122-7 (DAS-59122-7 maize) พบ/detected

8.5.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด DAS-59122-7 (DAS-59122-7 maize) ไม่พบ/not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้เป็นสารควบคุม โดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้ว ผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

9.1 positive extraction controls ต้องให้ผลบวก

9.2 extraction blank controls ต้องให้ผลเป็นลบ

9.3 positive DNA target controls ต้องให้ผลบวก

9.4 negative DNA target controls ต้องให้ผลลบ

9.5 amplification reagent controls ต้องให้ผลลบ

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีโดยฝ่ายชีวโมเลกุล สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารใน ground maize เมื่อใช้ปริมาณ 100 ng/Reaction พบว่าวิธีนี้ให้ค่า limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.1% GM ground maize และมีค่าของ specificity และ sensitivity 100% ทั้ง 2 ค่าเมื่อทดสอบค่าที่ระดับ LOD

**DMSc F 4019: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of
maize event TC1507**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด TC1507 (ที่ตัดแปรพันธุ์กรรมใส่ยีน *cry1F* เพื่อทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช และยีน *pat* ยีนที่ทำให้ทนต่อยาปราบวัชพืช glufosinate-ammonium herbicide) โดยวิธี Real-time Polymerase Chain Reaction (RTi-PCR)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W.; Molecular cloning: a *laboratory manual*. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- 2.4 JRC Reference Reports: Compendium of reference methods for GMO analysis, EURL-GMFF/ ENGL, 2010
- 2.5 Mazzara M., Foti N., Price S., Paoletti C., Van Den Eede G.; "Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line TC1507 Using Real-Time PCR - Validation Report and Protocol - Sampling and DNA Extraction of Maize TC1507" Online Publication (2005)

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

RTi-PCR: Real-time Polymerase Chain Reaction

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทัวไป: การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำซ้ำในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อน คือในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้น โดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล RTi-PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน

4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบชุดยีนที่มีลำดับเบสบริเวณ 5' integration border region (IBR) ที่เชื่อมต่อกันระหว่างยีนที่มีการใส่เข้าไปต่อกับตำแหน่งของยีนที่มีในข้าวโพดตามธรรมชาติ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเฉพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด TC1507

- 4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด TC1507 และข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง TC1507 และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยวๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, RTi-PCR grade

5.2 RTi-PCR buffer ความเข้มข้น 2 เท่า

5.3 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M ให้ PCR-product ขนาด 58 bp

5.3.1 Forward primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสที่อยู่บนจีโนมของข้าวโพด

MaiY-F1: 5' – TAG TCT TCG GCC AGA ATG G – 3'

5.3.2 Reverse primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสของยีนดัดแปรที่มีการใส่เข้าไปในข้าวโพด

MaiY-R3: 5' – CTT TGC CAA GAT CAA GCG – 3'

5.4 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ RTi-PCR)

5.5 RT-PCR probe:

MaiY-S1: 5'-FAM – TAA CTC AAG GCC CTC ACT CCG – TAMRA-3'

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

Real-time PCR machine

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมปฏิกิริยา RTi-PCR (setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะ ให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ TC1507_1

ตาราง TC1507_1

Reagent	Final concentration
PCR buffer 10x (including Rox TM)	1x
Primer MaiY-F1, 10 $\mu\text{mol/L}$	0.30 $\mu\text{mol/L}$
Primer MaiY-R3, 10 $\mu\text{mol/L}$	0.30 $\mu\text{mol/L}$
Probe: MaiY-S1, 10 $\mu\text{mol/L}$	0.15 $\mu\text{mol/L}$
MgCl ₂	5.5 mmol/L
dNTPa (dATP, dCTP, dGTP)	200 $\mu\text{mol/L}$ each
dUTP	400 $\mu\text{mol/L}$
AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase	1.0 U/ μL
Nuclease-free water	-
Template DNA	Maximum 200 ng
Final Volume	25 μL

7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM TC1507 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme): ตามระบุในตาราง

TC1507_2

ตาราง TC1507_2

Stage	Temperature	Time	No. of Cycles
Activation/ Initial Denaturation	95°C	600 s	1
Denaturation	95°C	15 s	
Annealing & Extension	60°C	60 s	
Denaturation, Annealing & Extension			45

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 กำหนดค่า threshold line

กำหนดค่า threshold line ในช่วงที่ amplification curve profile ของ positive control เริ่มมีค่า CT เกิดขึ้น และไม่มี fork effect ระหว่างตัวอย่างที่ทำซ้ำ

8.2 การกำหนดค่า baseline

กำหนดให้น้อยกว่าค่า threshold line

8.3 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้ามี amplification curve เกิดขึ้น และสามารถอ่านค่า CT ได้ ในกรณีไม่มีค่า CT แสดงว่าผลเป็นลบ

8.4 การสรุปผล:

8.4.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 subsample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.4.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 subsample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.5 การรายงาน

8.5.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด TC1507 (TC1507 maize) พบ/ detected

8.5.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด TC1507 (TC1507 maize) ไม่พบ/ not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้สารควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

9.1 positive extraction controls ต้องให้ผลบวก

9.2 extraction blank controls ต้องให้ผลเป็นลบ

9.3 positive DNA target controls ต้องให้ผลบวก

9.4 negative DNA target controls ต้องให้ผลลบ

9.5 amplification reagent controls ต้องให้ผลลบ

10. รายละเอียดอื่น

- 10.1 ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีโดยฝ่ายชีวโมเลกุล สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารใน ground maize เมื่อใช้ปริมาณ 100 ng/Reaction พบว่าวิธีนี้ให้ค่า limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.1% GM ground maize และมีค่าของ specificity และ sensitivity 100% ทั้ง 2 ค่าเมื่อทดสอบค่าที่ระดับ LOD

**DMSc F 4020: Qualitative Polymerase Chain Reaction method
for detection of maize event T25**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาลำดับเบสดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด T25 ที่ตัดแปรพันธุ์กรรมใส่ยีน *pat* ที่ทำให้ทนต่อยาปราบวัชพืช ชนิด glufosinate-ammonium herbicide โดยวิธี Real-time Polymerase Chain Reaction (RTi-PCR)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276: 2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569: 2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W.; *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- 2.4 JRC Reference Reports: Compendium of reference methods for GMO analysis, EURL-GMFF/ ENGL, 2010
- 2.5 Mazzara M., Grazioli E., Savini C., Van Den Eede G.; "Event-specific Method for the Quantification of Maize Line T25 Using Real-time PCR v. 1.01 - Validation Report and Validated Method" Online Publication (2013)

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

RTi-PCR: Real-time Polymerase Chain Reaction

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

4. หลักการ (Principle)

- 4.1 ทัวไป: การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ
- 4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำให้ในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อน คือในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ
 - 4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน
 - 4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้ primers สามารถจับเข้ากับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย
 - 4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม
- 4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล RTi-PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน
- 4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบชุดยีนที่มีลำดับเบสบริเวณ 5' integration border region (IBR) ที่เชื่อมต่อกันระหว่างยีนที่มีการใส่เข้าไปต่อกับตำแหน่งของยีนที่มีในข้าวโพดตามธรรมชาติ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเฉพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด T25
- 4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด T25 และข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง T25 และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยวๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, RTi-PCR grade

5.2 RTi-PCR buffer ความเข้มข้น 2 เท่า

5.3 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M ให้ PCR-product ขนาด 102 bp

5.3.1 Forward primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสที่อยู่บนจีโนมของข้าวโพด

MLD143: 5' – ACA AGC GTG TCG TGC TCC AC – 3'

5.3.2 Reverse primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสของยีนคัดแปรที่มีการใส่เข้าไปในข้าวโพด

MDB551: 5' – GAC ATG ATA CTC CTT CCA CCG – 3'

5.4 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ RTi-PCR)

5.7 RT-PCR probe:

TM016: 5'–FAM–TCA TTG AGT CGT TCC GCC ATT GTC G–TAMRA–3'

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

Real-time PCR machine

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมปฏิกิริยา RTi-PCR (setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะ ให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ T25_1

ตาราง T25_1

Reagent	Final concentration
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	1x
Primer MLD143, 10 $\mu\text{mol/L}$	0.40 $\mu\text{mol/L}$
Primer MDB551, 10 $\mu\text{mol/L}$	0.40 $\mu\text{mol/L}$
Probe TM016, 10 $\mu\text{mol/L}$	0.20 $\mu\text{mol/L}$
Nuclease-free Water	-
Template DNA	Maximum 200 ng
Final Volume	25 μL

7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM T25 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme): ตามระบุในตาราง T25_2

ตาราง T25_2

Stage	Temperature	Time	No. of Cycles
Decontamination (UNG)	50°C	120 s	1
Activation/ Initial Denaturation	95°C	600 s	1
Denaturation	95°C	15 s	
Annealing & Extension	60°C	60 s	
Denaturation, Annealing & Extension			45

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 กำหนดค่า threshold line

กำหนดค่า threshold line ในช่วงที่ amplification curve profile ของ positive control เริ่มมีค่า CT เกิดขึ้น และไม่มี fork effect ระหว่างตัวอย่างที่ทำซ้ำ

8.2 การกำหนดค่า baseline

กำหนดให้น้อยกว่าค่า threshold line

8.3 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้ามี amplification curve เกิดขึ้น และสามารถอ่านค่า CT ได้ ในกรณีไม่มีค่า CT แสดงว่าผลเป็นลบ

8.4 การสรุปผล:

8.4.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวก ทั้ง 2 subsample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.4.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.5 การรายงาน

8.5.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด T25 (T25 maize) พบ/ detected

8.5.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด T25 (T25 maize) ไม่พบ/ not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้ควบคุม โดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้ว ผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

9.1 positive extraction controls ต้องให้ผลบวก

9.2 extraction blank controls ต้องให้ผลเป็นลบ

9.3 positive DNA target controls ต้องให้ผลบวก

9.4 negative DNA target controls ต้องให้ผลลบ

9.5 amplification reagent controls ต้องให้ผลลบ

10. รายละเอียดอื่น

- 10.1 ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีโดยฝ่ายชีวโมเลกุล สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารใน ground maize เมื่อใช้ปริมาณ 100 ng/Reaction พบว่าวิธีนี้ให้ค่า limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.1% GM ground maize และมีค่าของ specificity และ sensitivity 100% ทั้ง 2 ค่าเมื่อทดสอบค่าที่ระดับ LOD

ภาคผนวก

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1

วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1001	การวิเคราะห์ไนโตรเจนโดย Kjeldahl method
2	DMSc F 1002	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนม
3	DMSc F 1003	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนมผงและผลิตภัณฑ์นมชนิดผง
4	DMSc F 1004	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนมข้นจืดและนมข้นหวาน
5	DMSc F 1005	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเนยแข็ง
6	DMSc F 1006	การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในนมและผลิตภัณฑ์นม
7	DMSc F 1007	การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในนมข้นหวาน
8	DMSc F 1008	การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในเนยแข็ง
9	DMSc F 1009	การวิเคราะห์เนื้อมักรวมไขมันในนมพร้อมดื่มและนมแปลงไขมัน
10	DMSc F 1010	การวิเคราะห์เนื้อมักรวมไขมันในนมข้นไม่หวานและนมข้นแปลงไขมันไม่หวาน
11	DMSc F 1011	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชา
12	DMSc F 1012	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในกาแฟ
13	DMSc F 1013	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในโกโก้ผง
14	DMSc F 1014	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชาสมุนไพร
15	DMSc F 1015	การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมดและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในชา
16	DMSc F 1016	การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในกาแฟคั่ว
17	DMSc F 1017	การวิเคราะห์ปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อนในชา
18	DMSc F 1018	การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเครื่องดื่มพร้อมบริโภคจากพืชผักผลไม้
19	DMSc F 1019	การวิเคราะห์ปริมาณอะซีซัลเฟม-เค, แอสพาแตม และซัคคาริน ในอาหาร
20	DMSc F 1020	การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมซัคคาเมตในอาหาร
21	DMSc F 1021	การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วแคดเมียม ทองแดง เหล็ก และสังกะสี ในอาหาร
22	DMSc F 1022	การวิเคราะห์ปริมาณดีบุกในอาหารกระป๋อง
23	DMSc F 1023	การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูทั้งหมดในอาหาร
24	DMSc F 1024	การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในข้าวโพดและถั่วลิสง

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2001	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร
2	DMSc F 2002	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Clostridium perfringens</i> ในอาหาร
3	DMSc F 2003	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Listeria</i> spp. และ <i>Listeria monocytogenes</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2004	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. ในอาหาร
5	DMSc F 2005	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. ในน้ำและน้ำแข็ง
6	DMSc F 2006	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในอาหาร
7	DMSc F 2007	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในน้ำและน้ำแข็ง
8	DMSc F 2008	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Cronobacter sakazakii</i> ในนม และผลิตภัณฑ์นม

ยกเลิกวิธีมาตรฐานจำนวน 5 วิธี คือ

1	DMSc F 2003	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Listeria</i> spp. และ <i>Listeria monocytogenes</i> ในอาหาร
2	DMSc F 2004	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. ในอาหาร
3	DMSc F 2006	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2007	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในน้ำและน้ำแข็ง
5	DMSc F 2008	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Cronobacter sakazakii</i> ในนม และผลิตภัณฑ์นม

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2

วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1025	การวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งหมดในน้ำ
2	DMSc F 1026	การวิเคราะห์ปริมาณความกระด้างทั้งหมดในน้ำ
3	DMSc F 1027	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในไอศกรีม
4	DMSc F 1028	การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในไอศกรีมโดย Kjeldahl method
5	DMSc F 1029	การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในไอศกรีม
6	DMSc F 1030	การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกในเครื่องดื่ม
7	DMSc F 1031	การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์และไนเตรตในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์
8	DMSc F 1032	การวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างที่เหลือจากการระเหยอาหารจำลอง
9	DMSc F 1033	การวิเคราะห์ปริมาณบิสฟีนอล เอ (Bisphenol A; 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane) ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง
10	DMSc F 1034	การวิเคราะห์ปริมาณ 4,4'-Dichlorodiphenyl sulfone ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง
11	DMSc F 1035	การวิเคราะห์ปริมาณ 4,4'-Dihydroxydiphenyl sulfone ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง
12	DMSc F 1036	การวิเคราะห์ปริมาณฟอรัมาลดีไฮด์ (Formaldehyde) ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง
13	DMSc F 1037	การวิเคราะห์ปริมาณสังกะสี ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง
14	DMSc F 1038	การวิเคราะห์ปริมาณ N-Nitrosamines และ N-Nitrosatable substances ที่แพร่จากห้วนมยาง
15	DMSc F 1039	การวิเคราะห์ปริมาณสารที่ระเหยได้ในห้วนมยางสังเคราะห์
16	DMSc F 1040	การวิเคราะห์ปริมาณ 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber
17	DMSc F 1041	การวิเคราะห์ปริมาณ 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (Antioxidant BHT) และ 2,2'-Methylethylenebis (6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol) (Antioxidant 2246) ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2009	วิธีตรวจวิเคราะห์ยีสต์และราในอาหาร โดยวิธี pour plate และ spread plate
2	DMSc F 2010	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในอาหาร
3	DMSc F 2011	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2012	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร โดยวิธี MPN
5	DMSc F 2013	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร โดยวิธี pour plate
6	DMSc F 2014	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี pour plate และ spread plate

ยกเลิกวิธีมาตรฐานจำนวน 3 วิธี คือ

1	DMSc F 2010	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในอาหาร
2	DMSc F 2011	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร
3	DMSc F 2014	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี pour plate และ spread plate

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 3001	การวิเคราะห์น้ำหนักสุทธิและน้ำหนักเนื้อในผักกระป๋อง
2	DMSc F 3002	การวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระในผักกระป๋อง

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3

วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1042	การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ
2	DMSc F 1043	การวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ คลอไรด์ ในเตรทและซัลเฟต ในน้ำ
3	DMSc F 1044	การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในน้ำ
4	DMSc F 1045	การวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก แคดเมียม โครเมียม ทองแดง แมงกานีส นิเกิล สังกะสี และเงินในน้ำ
5	DMSc F 1046	การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูในน้ำ
6	DMSc F 1047	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดในอาหาร โดย Enzymatic-Gravimetric Method
7	DMSc F 1048	การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำส้มในน้ำส้มสายชู โดยวิธี Titration
8	DMSc F 1049	การตรวจวิเคราะห์ความเป็นกรดในซอสบางชนิด โดยวิธี Titration
9	DMSc F 1050	การวิเคราะห์ค่าของกรดในน้ำมันและไขมัน
10	DMSc F 1051	การวิเคราะห์ Phenolic Antioxidants ในน้ำมัน, ไขมันและเนย
11	DMSc F 1052	การวิเคราะห์สารโพลาร์ในน้ำมันและไขมัน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี
12	DMSc F 1053	การวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช กลุ่มคาร์บาเมตในผักผลไม้
13	DMSc F 1054	การวิเคราะห์ปริมาณ 3-chloro-1, 2- propanediol (3-MCPD) ในอาหารและส่วนผสมอาหาร

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2015	วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i> ในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี MPN
2	DMSc F 2016	วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i> ในอาหาร
3	DMSc F 2017	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Clostridium botulinum</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2018	วิธีตรวจวิเคราะห์อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ชนิดที่มีความเป็นกรดต่ำ
5	DMSc F 2019	วิธีตรวจวิเคราะห์อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทชนิดที่มีความเป็นกรด

ยกเลิกวิธีมาตรฐานจำนวน 1 วิธี คือ

1	DMSc F 2016	วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i> ในอาหาร
---	-------------	---

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 4001	การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในอาหารที่มีส่วนประกอบของพืช ดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี CTAB พื้นฐาน
2	DMSc F 4002	การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในอาหารที่มีส่วนประกอบ ของ พืชดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Basic silica method
3	DMSc F 4003	Qualitative endogenous gene testing: <i>lectin</i> (by means of Polymerase Chain Reaction)
4	DMSc F 4004	Qualitative endogenous gene testing: the chloroplast <i>trnL</i> intron (by means of Polymerase Chain Reaction)
5	DMSc F 4005	Qualitative endogenous gene testing: <i>Invertase</i> (by means of Polymerase Chain Reaction)
6	DMSc F 4006	Qualitative endogenous gene testing: <i>hmgA</i> (by means of real-time Polymerase Chain Reaction)
7	DMSc F 4007	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA: CaMV-35S promoter (by means of Polymerase Chain Reaction)
8	DMSc F 4008	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA : NOS-terminator (by means of Polymerase Chain Reaction)
9	DMSc F 4009	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA : nptII (by means of Polymerase Chain Reaction)

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 4
วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1055	การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปฐุรที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองโดย Kjeldahl method
2	DMSc F 1056	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในเนย
3	DMSc F 1057	การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันในเนย
4	DMSc F 1058	การตรวจวิเคราะห์ไขมันในเนยโดยการคำนวณ
5	DMSc F 1059	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในครีม
6	DMSc F 1060	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในกะทิและผลิตภัณฑ์
7	DMSc F 1061	การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในกะทิและผลิตภัณฑ์
8	DMSc F 1062	การทดสอบน้ำมันแร่ในน้ำมันและไขมัน
9	DMSc F 1063	การวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนในเกลือบริโภทที่เสริมไอโอดีนโดยวิธีไตเตรชัน
10	DMSc F 1064	การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในเนื้อสัตว์และดัดโดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
11	DMSc F 1065	การตรวจวิเคราะห์เรคโตพามีนในเนื้อสัตว์และดัดโดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
12	DMSc F 1066	การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลลก้างในอาหาร โดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
13	DMSc F 1067	การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol) ในเนื้อสัตว์และดัดโดยเทคนิค LC-MS/MS
14	DMSc F 1068	การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2020	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Shigella</i> spp. ในอาหาร
2	DMSc F 2021	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Escherichia coli</i> O157 ในอาหาร
3	DMSc F 2022	วิธีตรวจวิเคราะห์ Enterobacteriaceae ในอาหาร
4	DMSc F 2023	วิธีตรวจวิเคราะห์ Enterococci ในอาหาร
5	DMSc F 2024	วิธีตรวจวิเคราะห์ mesophilic lactic acid bacteria ในอาหาร โดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ 30 °C
6	DMSc F 2025	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในน้ำและน้ำแข็ง

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 3003	การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบ้า (ภายนอก) ในเมล็ดข้าวโพดและเมล็ดพืช

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 4010	Construct-specific method for detection of DNA Sequences from Genetically modified GTS 40-3-2 (Roundup Ready® soya beans) by means of Polymerase Chain Reaction
2	DMSc F 4011	Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified Bt11 maize by means of Polymerase Chain Reaction
3	DMSc F 4012	Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified Event176 (Bt176) maize by means of Polymerase Chain Reaction
4	DMSc F 4013	Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified T25 maize by means of Polymerase Chain Reaction
5	DMSc F 4014	Event-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified MON810 maize by means of Polymerase Chain Reaction

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 5
วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1069	การวิเคราะห์ปริมาณโบรมีนในน้ำโดย Ion Chromatograph
2	DMSc F 1070	การวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลในอาหารโดย GC
3	DMSc F 1071	การวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในเครื่องดื่มโดย HPLC
4	DMSc F 1072	การวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในอาหารโดย HPLC
5	DMSc F 1073	การวิเคราะห์ฟลาโวกซิน เอ็ม 1 ในนม โดย HPLC
6	DMSc F 1074	การวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหาร โดย LC/MS-MS
7	DMSc F 1075	การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผัก ผลไม้ โดย GC: กลุ่มออร์กาโนคลอรีน กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส และกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์
8	DMSc F 1076	การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผัก ผลไม้ โดย HPLC: กลุ่มคาร์บาเมต
9	DMSc F 1077	การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราตกค้างในผัก ผลไม้ โดย HPLC
10	DMSc F 1078	การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วและแคดเมียมในพลาสติกและยาง โดย AAS
11	DMSc F 1079	การตรวจเอกลักษณ์ชนิดพลาสติกโดย Fourier Transform Infrared Spectrometer
12	DMSc F 1080	การวิเคราะห์ปริมาณสารระเหยได้ใน Polystyrene
13	DMSc F 1081	การวิเคราะห์ปริมาณ Vinyl chloride monomer ใน Poly (vinyl chloride)
14	DMSc F 1082	การวิเคราะห์ปริมาณ Tricresyl phosphates ใน Poly(vinyl chloride)

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2026	การวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในอาหาร
2	DMSc F 2027	การวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในน้ำและน้ำแข็ง
3	DMSc F 2028	การวิเคราะห์ Fecal enterococcus และ Fecal streptococcus ในน้ำและน้ำแข็ง
4	DMSc F 2029	การวิเคราะห์ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> และ <i>Streptococcus thermophilus</i> ในนมเปรี้ยว โดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ 37°C

ยกเลิกวิธีมาตรฐานจำนวน 1 วิธี คือ

1	DMSc F 2028	การวิเคราะห์ Fecal enterococcus และ Fecal streptococcus ในน้ำและน้ำแข็ง
---	-------------	---

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 4015	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MIR604
2	DMSc F 4016	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MON863
3	DMSc F 4017	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event NK603



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

กรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข

www.dmsc.moph.go.th

