

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจแยกชนิดและปริมาณ *Clostridium perfringens* ในอาหารสัตว์
พลิศา มหาชัย ญัฐพล เลี้ยงเพชร วันทนา จันทรมงคล สิริพร ดีสงเคราะห์ และสุชาดา กาปน

บทคัดย่อ

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจแยกชนิดและปริมาณ *Clostridium perfringens* โดยปฏิบัติอ้างอิงตามข้อกำหนดของ ISO 15213-2 : 2023 ในการทดสอบครั้งนี้ใช้การเติมเชื้ออ้างอิง *Clostridium perfringens* ATTC 27853 (WDCM 00025) โดยการทำ Implementation verification และการทำ (Food) Item verification กำหนดความเข้มข้นของเชื้อโดยการ spike เชื้อ 3 inoculation level (สูง กลาง ต่ำ) ตามความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงของการปนเปื้อนตามธรรมชาติ (Natural contamination) ที่ระดับความเข้มข้น 10^3 cfu/g, 10^2 cfu/g และ 10^1 cfu/g ตามลำดับ จากการแปล *Clostridium perfringens* ผลค่า S_R ที่ได้จากการคำนวณ มีค่าเท่ากับ 0.03094 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ lowest mean value of S_R พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limit) ของการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ และค่า eBias ที่ได้จากการคำนวณเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ดังนั้นจากผลทวนสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจแยกชนิดและปริมาณ *Clostridium perfringens* ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ สามารถนำวิธีการทดสอบมาใช้ในการตรวจแยกชนิดและปริมาณ *Clostridium perfringens* ในตัวอย่างอาหารสัตว์ได้

คำสำคัญ : *Clostridium perfringens*, อาหารสัตว์, การทวนสอบความใช้ได้ของวิธี

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation for detection and enumeration of *Clostridium perfringens* in livestock feed

Palisa Mahachai, Nattaphol Liangpetch, Wantana Jantaramongkon, Siriporn Deesongkhro and Suchada Kapuan

Abstract

A method validation for the detection and enumeration of *Clostridium perfringens* was performed in accordance with ISO 15213-2:2023. The study employed the reference strain *Clostridium perfringens* ATCC 27853 (WDCM 00025) for both implementation verification and food matrix-specific verification. Artificial contamination (spiking) was carried out at three inoculation levels—high (10^3 cfu/g), medium (10^2 cfu/g), and low (10^1 cfu/g)—to represent the expected range of natural contamination. The calculated Systematic Inter-laboratory Reproducibility (S_R) value was 0.03094, which complied with the acceptability threshold when compared to the lowest mean value of the Standard Deviation of Reproducibility (S_R). Furthermore, the estimated eBias value fell within the established acceptance criteria. These findings confirm that the microbiological method is fit for purpose and can be reliably implemented by the Laboratory of Microbiology, Division of Animal Feed Quality Inspection, Bureau of Livestock Product Quality Inspection, for the detection and enumeration of *Clostridium perfringens* in animal feed matrices.

Keyword: *Clostridium perfringens*, Livestock feed, Method validation

Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products. Department of Livestock Development

บทนำ

โรคติดเชื้อคลอสตริเดียม (Clostridial Disease) นับเป็นโรคที่เกิดจากจุลชีพก่อโรค (pathogen) ที่เก่าแก่ที่สุดที่ทราบกัน โดยมักส่งผลกระทบต่อปศุสัตว์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แตกต่างจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอื่น เพราะไม่ติดต่อหรือส่งผ่านจากสัตว์ไปยังสัตว์ แต่สามารถแพร่เชื้อได้สูงและพบได้ทั่วโลก (MSD Animal Health, 2024) แบคทีเรียในกลุ่มคลอสตริเดียมมีอยู่มากมายหลายชนิด แต่เชื้อ *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) เป็นหนึ่งในเชื้อที่ควรระวังเป็นพิเศษเพราะเป็นสาเหตุที่สำคัญต่อปัญหาสุขภาพลำไส้ของสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ที่มีอายุน้อย เช่น โรคลำไส้เป็นพิษในแกะ โรค Necrotic enteritis ในไก่ โรคลำไส้อักเสบในวัวและโรคท้องร่วงในหมู (Uzal F. A. et al., 2010)

Clostridium perfringens เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน (rod) สร้างสปอร์และเจริญได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) (Ryan et al., 2010) มีคุณสมบัติในการก่อพิษ และการผลิตสารพิษ เชื้อ *Clostridium perfringens* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ดิน น้ำ ทางเดินอาหารของสัตว์และมนุษย์ (Yao P.Y. และ Annamaraju P., 2023) ทั้งนี้สปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* สามารถทนต่อปัจจัยภายนอกต่างๆ ได้ดี เช่น ทนต่อการเปลี่ยนแปลงความร้อน ทนความเย็นแม้ในอุณหภูมิแช่แข็ง ทนต่อสารเคมี และทนต่อความดันได้ (Paredes-Sabja et al., 2007; Li และ McClane, 2006) ดังนั้นอาหารที่ผ่านการแปรรูปแล้วจึงยังคงมีความเสี่ยงในการพบการเจริญของสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* (Murrell และ Warth, 1965; Murrell, 1998) อีกทั้งสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียนี้มีคุณสมบัติที่ไม่ละลายในน้ำ ดังนั้นจึงมีความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวของอุปกรณ์ต่างๆ และมีความเสี่ยงที่จะปนเปื้อนลงในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ได้

สำหรับสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์นั้น ได้มีการตรวจหา *Clostridium perfringens* โดยวิธีการ conventional method ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ นมผงและเกสรผง อาหารกระป๋อง (Canned food & Pouch) (สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์, 2567) แต่ยังไม่มีการตรวจหาในอาหารสัตว์ ด้วยเหตุนี้งานจุลชีววิทยาเล็งเห็นความสำคัญของการเฝ้าระวังและการป้องกัน การตรวจติดตามเชื้อ เพื่อประโยชน์ทั้งต่อสุขภาพของคนและสัตว์ จึงได้เตรียมความพร้อมให้เจ้าหน้าที่ได้มีความรู้ทั้งด้านทฤษฎี และด้านการปฏิบัติ ดังนั้นหน่วยงานปศุสัตว์ มีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินงานในการการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจแยกชนิดและปริมาณ *Clostridium perfringens* ในอาหารสัตว์ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและขีดความสามารถในการตรวจคุณภาพอาหารสัตว์ อีกทั้งเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลและแนวทางในการตรวจวิเคราะห์ *Clostridium perfringens* เพื่อรองรับอาหารสัตว์ที่นำเข้าส่งออกของประเทศไทย

1.วัตถุประสงค์

- 1.1 เพื่อตรวจแยกชนิดและปริมาณ *Clostridium perfringens* ในตัวอย่างอาหารสัตว์
- 1.2 เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ได้

2. ขอบข่าย

เพื่อทวนสอบความใช้ได้ของวิธีในการตรวจแยกชนิดและปริมาณ *Clostridium perfringens* ในตัวอย่างอาหารสัตว์

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 มีฐานข้อมูลของเชื้อ *Clostridium perfringens* ในอาหารสัตว์
- 3.2 ใช้ในการป้องกันและเฝ้าระวังในอาหารสัตว์เลี้ยงที่นำเข้า-ส่งออก เพื่อเป็นการเพิ่มขีดความสามารถของการนำเข้า-ส่งออกอาหารสัตว์ของประเทศไทย

4. เครื่องมือ วัสดุวิทยาศาสตร์และเชื้อมาตรฐาน

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่องวัดความเป็นกรด – เบส (pH Meter)
- 4.1.2 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยระบบแรงดันไอน้ำ
- 4.1.3 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 4.1.4 ตู้ปลอดเชื้อ (biosafety cabinet)
- 4.1.5 กล่องพลาสติกใส่พร้อมฝาสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ชนิด Anaerobe
- 4.1.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- 4.1.7 หลอดทดลองพร้อมฝาเกลียว
- 4.1.8 Petri dish ขนาด 20x100 mm
- 4.1.9 Graduate pipette
- 4.1.10 หัวเข็มเชื้อ (loop) หรือ เข็มเข็มเชื้อ (needle)

4.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 4.2.1 Bacteriological agar
- 4.2.2 Buffered Peptone Water (BPW)
- 4.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Typtose sulfite cycloserine agar (TSA)
- 4.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Sulfite indole motility agar (SIM agar)
- 4.2.5 D-cycloserine solution
- 4.2.6 Kovacs reagent

4.3 เชื้อมาตรฐาน

- 4.3.1 *Escherichia coli* ATTC 25922 (WDCM 00013)
- 4.3.2 *Clostridium perfringens* ATTC 27853 (WDCM 00025)

5. วิธีดำเนินการ

5.1 ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างอาหารสัตว์ทุกขอบข่ายที่ส่งตรวจกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ปีงบประมาณ 2568

5.2 การเตรียมตัวอย่างและวิธีการทดสอบแยกชนิดและปริมาณ *Clostridium perfringens*

5.2.1 สุ่มตักตัวอย่าง ผสมตัวอย่างให้ทั่วถึงในถุงตัวอย่างจนเข้ากันดี ชั่งตัวอย่างสำหรับทดสอบ ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ 50 ± 1.25 กรัม

5.2.2 เติม Buffered Peptone Water (BPW) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง แช่ตัวอย่างทิ้งไว้นาน 20 นาที ก่อนนำไปเข้าเครื่องตีผสมตัวอย่างที่ความเร็วระดับต่ำ (Low) นาน 60 วินาที (dilution 10^{-1})

5.2.3 คูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ 2 ซ้ำต่อ dilution (ทำทุก dilution ตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-5} เทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC agar ประมาณ 12 - 15 มิลลิลิตร เขย่าจานเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างกระจายตัวเข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC agar ปิดทับ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เพื่อป้องกันการเกิด Spreading Colonies

5.2.4 บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 20 ± 2 ชั่วโมง

5.2.5 อ่านผลเพื่อนับโคโลนีของ *Clostridium perfringens* โดยเลือกงานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีสีดำหรือสีเทาหรือเหลืองน้ำตาล (yellow-brown) เลือกนับจากงานเพาะเชื้อ dilution ที่มีจำนวนโคโลนี 10-150 โคโลนีทั้งสองงานเพาะเลี้ยงเชื้อ

5.2.6 ทดสอบยืนยันชนิดเชื้อ *Clostridium perfringens* โดยใช้ห่วงเชี่ยเชื้อ (loop) หรือ เข็มเชี่ยเชื้อ (needle) และโคโลนีที่มีลักษณะสงสัยว่าจะเป็นเชื้อ *Clostridium perfringens* แล้ว stab เชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อ Sulfite indole motility (SIM) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 22 ± 2 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ แปลผลทดสอบโดยดูการสร้าง Sulfite, Motility และการทดสอบ Indole เมื่อหยด Kovacs reagent ตามตารางที่ 1

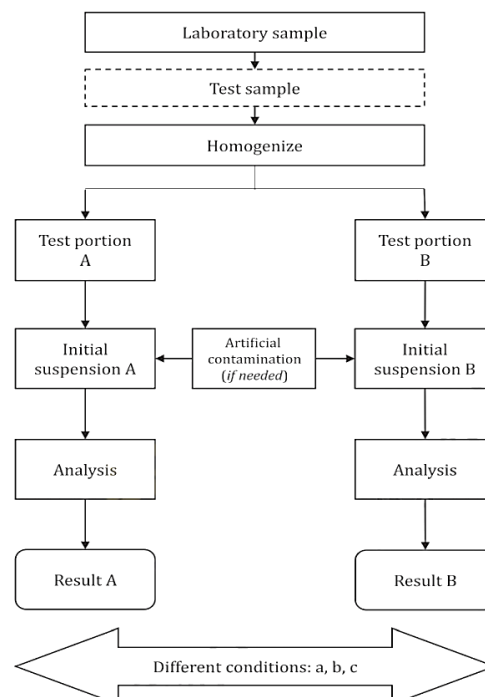
ตารางที่ 1 ตารางผลการทดสอบยืนยันชนิดเชื้อ *Clostridium perfringens*

เชื้อ	การทดสอบยืนยันชนิดเชื้อ		
	การสร้าง sulfite	Motility	Indole
<i>Clostridium perfringens</i>	เกิดสีเหลืองในหลอด SIM agar (+)	อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (+)	เกิดวงแหวนสีแดง (+)

5.3 การทวนสอบความใช้ได้ของวิธี

5.3.1 การทำ Implementation verification

5.3.1.1 เติมเชื้ออ้างอิง *Clostridium perfringens* ลงในตัวอย่างทดสอบ ตามระดับความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงของการปนเปื้อนตามธรรมชาติ (Natural contamination) และนำมาเก็บข้อมูลอย่างน้อย 10 ตัวอย่าง แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 test portion ภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทดสอบเพื่อหาค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation (SIR)

5.3.1.2 เติมเชื้ออ้างอิง ลงในตัวอย่างทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ควบคุมไปกับตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้ออ้างอิง (Negative control) เพื่อให้อยู่ในระดับความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 10^3 cfu/g, 10^2 cfu/g และ 10^1 cfu/g

5.3.1.3 ทดสอบตามขั้นตอนข้อ 5.2 เพื่อหาค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR})

5.3.1.4 เปลี่ยนผลการทดสอบเป็นค่า log 10 เพื่อให้เป็น Normal distribution และนำไปคำนวณหาค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR}) จากสูตร

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

เมื่อ S_{IR} = Intralaboratory reproducibility standard deviation (SIR)

i = จำนวนของตัวอย่าง i = 1 ถึง n ($n \geq 10$)

n = จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมด

($y_{iA} - y_{iB}$) = ผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากการทดสอบแต่ละคู่ (log ฐาน 10)

5.3.1.5 เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limit) จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบปริมาณ *Clostridium perfringens* ในตัวอย่างอาหารสัตว์ (ISO 15213-2 : 2023) พบว่า ค่า S_R ที่ได้จากการศึกษาคือ 0.626 ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Summary of S_R values from the validation study for ISO 15213-2 : 2023

Food Item	S_R values from the validation study			
	Low level	Medium level	High level	Mean value of three level
Multi-component foods or meal component	0.621	0.654	0.688	0.654
Processed fruits and vegetables	0.453	0.637	0.797	0.629
Environmental samples (food or feed production)	0.457	0.475	0.629	0.520
Pet food and animal feed	0.626	0.606	0.793	0.675
Ready-to-eat, ready-to-re-heat fishery products	0.356	0.543	0.309	0.403
Ready-to-eat, ready-to-re-heat meat products	0.408	0.653	0.383	0.481
Infant formula and infant cereals	0.396	0.403	0.356	0.385

การศึกษา Verification study ถูกออกแบบมาเพื่อไม่ให้คำนึงถึงผลกระทบของ (food) Item ค่า S_{IR} ที่คำนวณได้ จะนำมาใช้เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยต่ำสุด ของ S_R ของ Item ใดๆ ที่ทดสอบใน Validation study เพราะฉะนั้นจากตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของ S_R จะมีค่าเท่ากับ 0.675 (Pet food and animal feed)

ดังนั้นขีดจำกัดในการยอมรับ (Acceptability limit) ของการศึกษา Verification study คือ

$$S_{IR} \leq 2 \times \text{the lowest mean value of } S_R$$

$$S_{IR} \leq 2 \times 0.675$$

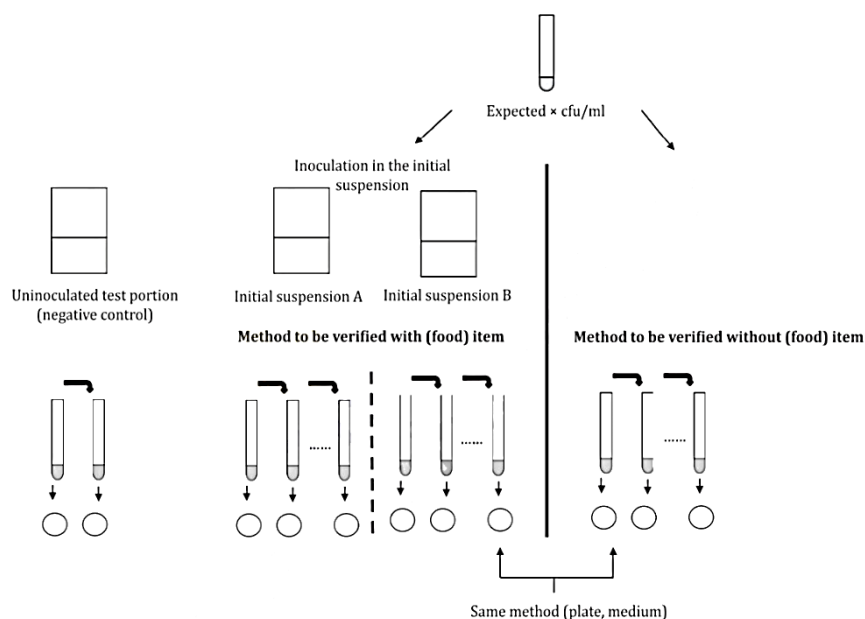
$$S_{IR} \leq 1.35$$

5.3.2 การทำ (Food) Item verification

5.3.2.1 คัดเลือกตัวอย่าง non-challenging sample และ challenging sample เพื่อทำ artificial contaminate จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น ในแต่ละระดับความเข้มข้นจะใช้ตัวอย่างคนละ Code number กัน โดย non-challenging sample ที่ห้องปฏิบัติการเลือกใช้ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ แบบ نیم ส่วน challenging sample เลือกใช้วัตถุดิบจากสัตว์

5.3.2.2 เตรียม artificial contaminate จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น ให้ครอบคลุมช่วงของการปนเปื้อนตามธรรมชาติ (Natural contamination) นำเชื้อมาเพาะเลี้ยง ให้อยู่ในระดับความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 10^3 cfu/g, 10^2 cfu/g และ 10^1 cfu/g

5.3.2.3 ทดสอบตัวอย่างในแต่ละระดับการปนเปื้อน โดยทดสอบแบบ Duplicate (ผู้ทดสอบ A และ B) พร้อมกับการทำ inoculum suspension without (food) item จากหลอดของเชื้อตั้งต้นควบคู่กันไป ทดสอบตามวิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการ ตามภาพที่ 2



ภาพที่ 2 Example of quantitative method verification (eBias) using artificial contamination

5.3.2.4 ทดสอบตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเชื้อ artificial contaminate (Uninoculated test portion) เพื่อนำมาใช้หา Root cause analysis ในกรณีที่ผลการหาค่า (Food) Item verification ไม่เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limit)

5.3.2.5 คำนวณหาค่า eBias จากสูตร

$$eBias = |\log_{10} \text{cfu/ml (inoculum)} - \text{mean } \log_{10} \text{cfu/test portion (artificially contaminated (food) item)}|$$

5.3.2.6 เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limit)

$|\log_{10} \text{cfu/ml (inoculum)} - \text{mean } \log_{10} \text{cfu/test portion (artificially contaminated (food) item)}| \leq 0.5 \log_{10}$ for each of the inoculation levels

6. ผลการทดลอง

6.1 การทำ Implementation verification

การคำนวณค่า S_{IR} ของห้องปฏิบัติการเลือกใช้ตัวอย่างทุกข้อข่ายในการทดสอบใช้เชื้ออ้างอิงในกลุ่ม *Clostridium perfringens* และเติมลงในตัวอย่างให้ครอบคลุมช่วงของการปนเปื้อนตามธรรมชาติ ผลการทดสอบดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบปริมาณ *Clostridium perfringens* ในอาหารสัตว์

Sample	ชนิดตัวอย่าง	Analyst 1	Analyst 2	Log ₁₀ Analyst 1 (Y _{IA})	Log ₁₀ Analyst 2 (Y _{IB})	Y _{IA} - Y _{IB}	(Y _{IA} - Y _{IB}) ²
1	วัตถุดิบจากสัตว์	23	24	1.36173	1.38021	-0.01848	0.00034
2	วัตถุดิบจากพืช	28	21	1.44716	1.32222	0.12494	0.01561
3	อสร.ชนิดเม็ด	21	25	1.32222	1.39794	-0.07572	0.00573
4	อสร.ชนิดผง	25	22	1.39794	1.34242	0.05552	0.00308
5	ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบนึ่ง	23	21	1.36173	1.32222	0.03951	0.00156
6	อาหารขบเคี้ยว	279	281	2.44560	2.44871	-0.00310	0.00001
7	ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ชนิดเม็ด	246	250	2.39094	2.39794	-0.00700	0.00005
8	วัตถุดิบจากสัตว์	281	283	2.44871	2.45179	-0.00308	0.00001
9	วัตถุดิบจากพืช	289	291	2.46090	2.46389	-0.00300	0.00001
10	อสร.ชนิดเม็ด	243	233	2.38561	2.36736	0.01825	0.00033
11	อสร.ชนิดผง	1543	1559	3.18837	3.19285	-0.00448	0.00002
12	ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบนึ่ง	1650	1672	3.21748	3.22324	-0.00575	0.00003
13	อาหารขบเคี้ยว	1540	1552	3.18752	3.19089	-0.00337	0.00001
14	ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ชนิดเม็ด	1596	1607	3.20303	3.20602	-0.00298	0.00001
						Sum (Y _{IA} - Y _{IB}) ²	0.02681
						n	14
						2n	28

แทนค่าในสูตรจะได้

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (Y_{IA} - Y_{IB})^2} = \sqrt{\frac{1}{28} \times (0.02681)} = \sqrt{0.0009575} = 0.03094$$

ค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR}) เท่ากับ 0.03094

6.2 การทำ (Food) Item verification

6.2.1 ผลการทวนสอบการหาค่า (Food) Item verification ในตัวอย่าง Non-challenging sample ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทวนสอบการหาค่า (Food) Item verification ในตัวอย่าง Non-challenging sample

Inoculum level/test portion	Mean result artificial contamination (food) Item ($\log_{10}$ cfu/g)	For comparison		eBias	Result
		Result artificial contamination (food) Item ($\log_{10}$ cfu/test portion)	Result inoculum suspension [without (food) Item] ($\log_{10}$ cfu/g)		
10^3 cfu/g	3.388 (average of 3.3502 and 3.4232)	5.0872 (122,250 cfu)	4.8439 (69,800cfu)	0.2434	Acceptable
10^2 cfu/g	2.3892 (average of 2.3729 and 2.4048)	4.0881 (12,250 cfu)	3.8129 (6,500 cfu)	0.2752	Acceptable
10^1 cfu/g	1.4232 (average of 1.3802 and 1.4624)	3.1222 (1325 cfu)	2.9504 (892 cfu)	0.1719	Acceptable

ผลการทวนสอบการหาค่า (Food) Item verification ในตัวอย่าง non-challenging sample ได้ค่า $eBias \leq 0.5 \log_{10}$ for each of the inoculation levels สรุปได้ว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Acceptable)

6.2.2 ผลการทวนสอบการหาค่า (Food) Item verification ในตัวอย่าง Challenging sample ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทวนสอบการหาค่า (Food) Item verification ในตัวอย่าง Challenging sample

Inoculum level/test portion	Mean result artificial contamination (food) Item ($\log_{10}$ cfu/g)	For comparison		eBias	Result
		Result artificial contamination (food) Item ($\log_{10}$ cfu/test portion)	Result inoculum suspension [without (food) Item] ($\log_{10}$ cfu/ml)		
10^3 cfu/g	3.8296 (average of 3.8182 and 3.8406)	5.5285 (337,700 cfu)	5.2780 (190,000 cfu)	0.2498	Acceptable
10^2 cfu/g	2.8398 (average of 2.8338 and 2.8457)	4.5388 (34,575 cfu)	4.2553 (18,000 cfu)	0.2835	Acceptable
10^1 cfu/g	1.8837 (average of 1.8573 and 1.9085)	3.3900 (1,950 cfu)	3.5826 (3,825 cfu)	0.2926	Acceptable

ผลการทวนสอบการหาค่า (Food) Item verification ในตัวอย่าง Challenging sample ได้ค่า $eBias \leq 0.5 \log_{10}$ for each of the inoculation levels สรุปได้ว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Acceptable)

7. สรุปผลการทดลอง

จากผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจแยกชนิดและปริมาณ *Clostridium perfringens* ในอาหารสัตว์ (ISO 15213-2 : 2023) ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ โดยการทำ Implementation verification และการทำ (Food) Item verification จากการแปลผลค่า S_R ที่ได้จากการคำนวณ มีค่าเท่ากับ 0.03094 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ lowest mean value of S_R (1.35) จากตารางที่ 2 พบว่า $S_R < 2 \times \text{lowest } S_R \text{ mean value determined in the validation study}$ [$0.03094 < 1.35 (2 \times 0.675)$] แสดงว่าเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limit) ของการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ส่วนการแปลผล eBias ที่ได้จากการคำนวณตามตารางที่ 4 และ 5 พบว่าค่า eBias $< 0.5 \log_{10}$ for each of the inoculation levels แสดงว่าเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจแยกชนิดและปริมาณ *Clostridium perfringens* ในตัวอย่างอาหารสัตว์ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้

8. ข้อเสนอแนะ

-

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน และบุคลากรงานจุลชีววิทยาสำหรับความร่วมมือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

10.เอกสารอ้างอิง

- กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558. พิมพ์ที่ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด สาขา 4
- ISO 15213-2 : 2023 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. — Part 2: Enumeration of *Clostridium perfringens* by colony-count technique
- ISO16140-3 : 2021. Microbiology of the food chain-Method validation part 3 : Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory.
- Li, J., McClane, B.A. 2006. Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. Applied and Environmental Microbiology, 72: 7620–7625
- MSD Animal Health. 2024. Clostridial disease. [Online]. Available: <http://www.msd-animal-health.ie/diseases/cattle/clostridial-disease/information.aspx>. Accessed March 8, 2025
- Murrell, W.G. 1988. Bacterial spores-nature's ultimate survival package, W.G. Murrell, I.R. Kennedy (Eds.), Microbiology in action, John Wiley & Sons, Inc, New York, pp. 311–346

- Murrell, W.G., Warth, A.D. 1965. Composition and heat resistance of bacterial spores. L.L. Campbell, H.O. Halvorson (Eds.), Spores III, American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 1–24
- Paredes-Sabja, D., Gonzalez, M., Sarker, M.R., Torres, J.A. 2007. Combined effects of hydrostatic pressure, temperature and pH on the inactivation of spores of *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium sporogenes* in buffer solutions. Journal of Food Science, 72: M202–M206
- Uzal, F. A., Vidal, J. E., McClane, B. A., & Gurjar, A. A. 2010. *Clostridium Perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. The open toxinology journal, 2, 24–42.
- Yao, P.Y., Annamaraju, P. 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559049/>. Accessed March 8, 2025