การทวนสอบความใช้ได้ของขั้นตอนยืนยันชนิดเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค MALDI-TOF/MS ในวิธีตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบจากสัตว์

ณัฐพล เลี้ยงเพ็ชร, พลิศา มหาชัย, วันทนา จันทรมงคล

บทคัดย่อ

Salmonella spp. เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีความสำคัญต่อความปลอดภัยของอาหารสัตว์และสามารถก่อให้เกิดโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน รวมทั้งส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์และเศรษฐกิจ ดังนั้น การตรวจหาและยืนยันชนิดของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารสัตว์จึงมีความสำคัญ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบความใช้ได้ของขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ตามวิธี ISO 6579:2017(E) และตรวจยืนยันชนิดเชื้อด้วยเทคนิค Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) โดยใช้เครื่อง Bruker MALDI Biotyper ในตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบจากสัตว์ การทดสอบค่า Estimated Level of Detection 50% ($eLOD_{50}$) ใช้เชื้อ *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 เป็นเชื้ออ้างอิง โดยเติมเชื้อลงในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ระดับ High, Intermediate และ Low ซึ่งมีเป้าหมายเท่ากับ 9, 3 และ 1 CFU ตามลำดับ และมีชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ ผลการทวนสอบพบว่าวิธีตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. สามารถใช้ตรวจตัวอย่างอาหารสัตว์ทั้ง 7 กลุ่มได้ โดยค่า $eLOD_{50}$ ของกลุ่มวัตถุดิบจากสัตว์ และ กลุ่มผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบแข็ง เท่ากับ 0.7 กลุ่มวัตถุดิบจากพืช กลุ่มอาหารผสมสำเร็จรูปชนิดเม็ด และ กลุ่มอาหารผสมสำเร็จรูปชนิดผง น้อยกว่า 1.0 กลุ่มผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบนิ่ม และ กลุ่ม ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ชนิดเม็ด เท่ากับ 0.5

สำหรับการตรวจยืนยันด้วย MALDI-TOF/MS (Bruker MALDI Biotyper) ได้ทำการทดสอบเชื้อกลุ่ม Target จำนวน 5 สายพันธุ์และเชื้อกลุ่ม Non-target จำนวน 5 สายพันธุ์ ผลการตรวจสอบพบว่าการจำแนกชนิดเชื้อให้ผลตรงกับผลที่คาดหมายคิดเป็น 100% นอกจากนี้ เมื่อนำเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 ที่เติมในตัวอย่างอาหารสัตว์ในทุกระดับการเติมเชื้อ มาตรวจยืนยันด้วยเครื่อง Bruker MALDI Biotyper พบว่าตัวอย่างทดสอบทั้งหมดให้ผลการจำแนกเป็น *Salmonella* spp. และมีผลสอดคล้องกับผลที่คาดหมาย คิดเป็นร้อยละ 100 ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ตาม ISO 6579:2017(E) ร่วมกับการยืนยันชนิดเชื้อด้วย MALDI-TOF/MS (Bruker MALDI Biotyper) สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบจากสัตว์ทั้ง 7 กลุ่มที่ศึกษาและสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับการตรวจสอบคุณภาพและเฝ้าระวังเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารสัตว์ต่อไป

คำสำคัญ:
Salmonella spp., MALDI-TOF/MS, อาหารสัตว์

Verification of *Salmonella* spp. Identification by MALDI-TOF/MS in the Detection of *Salmonella* spp. in Animal Feed and Animal-Derived Raw Materials

Nattapol Liangpetch, Palisa Mahachai and Wantana Chantaramongkon

Abstract

Salmonella spp. are important foodborne microorganisms that may cause disease in animals and humans and may result in public health and economic impacts. Therefore, reliable detection and identification of *Salmonella* spp. in animal feed are important for animal health, food safety, and feed quality control. This study aimed to verify the detection procedure for Salmonella spp. according to ISO 6579:2017(E) and to confirm the identification of *Salmonella* spp. using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) with the Bruker MALDI Biotyper system in animal feed and animal-derived raw materials. The Estimated Level of Detection 50% (eLOD50) was evaluated using *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 as the reference strain. The reference strain was inoculated into animal feed samples at high, intermediate, and low target levels of 9, 3, and 1 CFU per test portion, respectively, together with uninoculated control samples. The tested materials were classified into seven groups: animal-derived raw materials, plant-derived raw materials, pelleted complete feed, powdered complete feed, soft processed meat products, hard processed meat products, and pelleted processed meat products. The verification results demonstrated that the *Salmonella* spp. Detection procedure could be applied to all seven groups of animal feed samples investigated. The eLOD50 value for animal-derived raw materials was 0.7 CFU per test portion, whereas the values for plant-derived raw materials, pelleted complete feed, and powdered complete feed were less than 1.0 CFU per test portion. The eLOD50 value for soft processed meat products was 0.5 CFU per test portion, while the value for hard processed meat products was 0.7 CFU per test portion. For pelleted processed meat products, the eLOD50 value was 0.5 CFU per test portion. For MALDI-TOF/MS identification verification, five target organisms and five non-target organisms were tested. The identification results were in agreement with the expected results for all tested target and non-target organisms, corresponding to 100% agreement.

In addition, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 inoculated into the seven groupsof animal feed samples at the tested inoculation levels was subjected to

confirmation using the Bruker MALDI Biotyper. All tested samples were identified as *Salmonella* spp., with 100% agreement with the expected results. These findings demonstrate that the *Salmonella* spp. detection procedure according to ISO 6579:2017(E), combined with MALDI-TOF/MS confirmation, can be applied to the seven groups of animal feed and animal-derived materials evaluated in this study. The obtained results can also support quality control, surveillance, and the development of a database for *Salmonella* spp. in animal feed and related materials.

Keyword:
Salmonella spp., MALDI-TOF/MS, Feed

1. ความสำคัญ

เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบว่ามีมากกว่า 2,500 สายพันธุ์ (Charles Davis, 2007) และบางสายพันธุ์เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดต่อจากสัตว์สู่อาหาร ทั้งนี้องค์การอนามัยโลกและองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ ได้ให้ความสำคัญกับเรื่องนี้ เนื่องจากพบข้อมูลการติดเชื้อ *Salmonella* spp. มีจำนวนมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วย การตาย และความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ดังนั้นหน่วยงานด้านปศุสัตว์ อาหาร และสาธารณสุขมีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินงานร่วมกันอย่างใกล้ชิดเพื่อป้องกันโรคติดต่อจากอาหารสู่สัตว์

2.วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อตรวจยืนยันชนิดเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค MALDI-TOF/MS (Bruker MALDI Biotyper) ในตัวอย่างอาหารสัตว์

1.2 เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ได้

3. ขอบข่าย

เพื่อทวนสอบความใช้ได้ของวิธีในการตรวจยืนยันชนิดเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค MALDI-TOF/MS (Bruker MALDI Biotyper) ในวิธีตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบจากสัตว์

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 มีฐานข้อมูลของเชื้อ *Salmonella* spp ในอาหารสัตว์

3.2 ใช้ในการป้องกันและเฝ้าระวังในอาหารสัตว์เลี้ยงที่นำเข้า-ส่งออก เพื่อเป็นการเพิ่มขีดความสามารถของการนำเข้า-ส่งออกอาหารสัตว์ของประเทศไทย

5. ทฤษฎี

Salmonella spp. เป็นเชื้อแบคทีเรีย อยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae มีลักษณะ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีขนาด 0.7-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ดีในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่สร้างแค็ปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ มีบางสายพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ อุณหภูมิที่เจริญได้ 5- 47 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เจริญได้ดีที่สุดคือ 37 องศาเซลเซียส (Julian Michael Cox, 2008) เจริญได้ในช่วง pH 4 -9.0 ความชื้น (a_w) ที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 0.93-0.99 เชื้อ *Salmonella* spp. ไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 - 20 นาที หรือ ที่ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที การใช้ความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำไม่สามารถทำลายเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ เพียงแต่ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้น

Salmonella spp. หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะ typical หรือ less typical colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (solid selective media) และให้ผล biological และ serological ภายใต้ข้อกำหนดที่ใช้ในวิธีทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารสัตว์

อาหารสัตว์ หมายถึง วัตถุที่มุ่งหมายที่ใช้เลี้ยงสัตว์ที่รัฐมนตรีโดยคำแนะนำของคณะกรรมการควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ประกาศเป็นอาหารสัตว์ ใน พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ.2558

6. วิธีดำเนินการ

6.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment & Materials)

- เครื่อง MALDI-TOF/MS (Bruker MALDI Biotyper)
- Computer พร้อม software (MBT Compass / flexControl)
- Target plate (เช่น MBT 96 target plate)
- Pipette และ tip
- Centrifuge
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 34 – 38 องศาเซลเซียส, 35 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 41.5 องศาเซลเซียส
- ตู้เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส และ 5 องศาเซลเซียส
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 47 - 50 องศาเซลเซียส
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า 41.5 □ 1 องศาเซลเซียส
- เครื่องเขย่าหลอดทดลอง
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ
- เครื่องอบฆ่าเชื้อ
- ตู้ปลอดเชื้อ
- เตาอบไมโครเวฟ

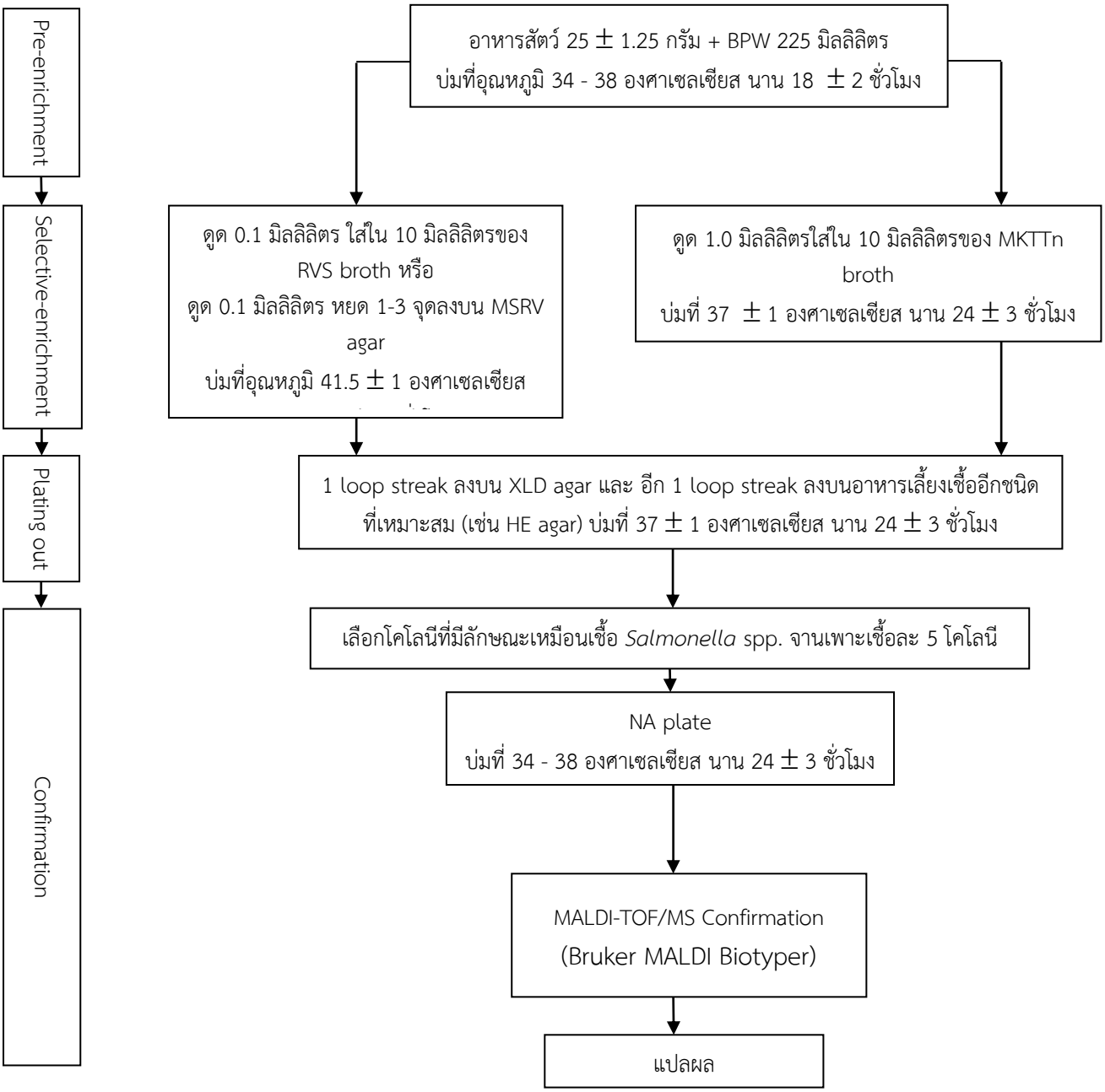
- ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ ขนาด 7 x 11 เซนติเมตร
- ขวดทดลองพร้อมฝาเกลียว ขนาด 100 มิลลิลิตร, 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองพร้อมฝาเกลียว ขนาด 16 x 125 มิลลิเมตร, 16 x 150 มิลลิเมตร และ 20 x 150 มิลลิเมตร
- หลอดทดลองพร้อมจุกยาง
- จานเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 x 15 มิลลิเมตร
- จานเพาะเลี้ยงเชื้อแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 55 มิลลิเมตร
- ช้อนตักตัวอย่าง
- ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ขนาดห่วง 3 มิลลิเมตร หรือ 10 ไมโครลิตร และ ขนาดห่วง 1 ไมโครลิตร
- ไม้เขี่ยเชื้อ หรือลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ที่ทำจากพลาสติก
- Pasteur pipette
- ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
- กระบอกตวง
- กระจกสไลด์
- กระดาษกรองความละเอียด 0.22 ไมโครเมตร

6.2 สารเคมี (Reagents)

- Matrix solution (HCCA)
- 70% Formic acid
- Acetonitrile
- Ethanol (absolute)
- Bacterial Test Standard (BTS)
- Ethanol 70% และ 95%
- Buffered peptone water (BPW)
- Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth with 2% Iodine-Iodide solution and 0.5% Novobiocin solution (MKTTn broth)
- Rappaport-Vassiliadis medium with Soya (RVS broth)
- Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis agar (MSRV agar)
- Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD agar)
- Hektoen Enteric agar (HE agar)
- Brain Heart Infusion (BHI)
- Triple Sugar Iron agar (TSI agar)
- Nutrient Agar (NA)

- Tryptone Soya Agar (TSA)
- Swarm agar media

ขั้นตอนการทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. (ISO 6579:2017(E) ในอาหารสัตว์ และยืนยันด้วย MALDI-TOF/MS



6.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับยืนยันด้วย MALDI-TOF/MS (Sample Preparation)

6.3.1 Direct Smear Method

4.3.1.1 ใช้ sterile loop แตะ colony (18–24 ชม.)

4.3.1.2 ป้ายลงบน target plate

4.3.1.3 ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

4.3.1.4 เติม matrix solution 1 µL

4.3.1.5 ปล่อยให้แห้งก่อนวิเคราะห์

6.3.2 Extraction Method (สำหรับ Gram-positive/Yeast)

4.3.2.1 เก็บ colony ลง microtube

4.3.2.2 เติม ethanol 300 µL ⟶ vortex

4.3.2.3 centrifuge 13,000 rpm 2 นาที

4.3.2.4 ทิ้ง supernatant

4.3.2.5 เติม formic acid 50 µL ⟶ vortex

4.3.2.6 เติม acetonitrile 50 µL ⟶ vortex

4.3.2.7 centrifuge

4.3.2.8 หยด supernatant 1 µL ลง plate

4.3.2.9 เติม matrix ⟶ ปล่อยแห้ง

6.4 การเตรียม Target Plate สำหรับยืนยันด้วย MALDI-TOF/MS

6.4.1 ระบุ sample ID

6.4.2 จัดตำแหน่งตัวอย่าง

6.4.3 ใส่ BTS สำหรับ calibration

6.4.4 ตรวจสอบความสะอาดของ plate

6.5 การ Calibration เครื่อง MALDI-TOF/MS

6.5.1 เปิด software MBT Compass

6.5.2 เลือก calibration method

6.5.3 ยิง BTS standard

6.5.4 ตรวจสอบ mass accuracy

6.5.5 หากไม่ผ่าน ⟶ ทำ calibration ใหม่

6.6 การวิเคราะห์ตัวอย่าง (Measurement) ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/MS

6.6.1 ใส่ plate เข้าเครื่อง

6.6.2 เลือก method: Linear positive mode

6.6.3 เริ่มยิง laser

6.6.4 ตรวจสอบ spectrum

6.7 การวิเคราะห์ผล (Data Analysis)

6.7.1 Software เปรียบเทียบ spectrum กับ database

6.7.2 แสดง score value

เกณฑ์การแปลผล:

≥ 2.0 ⟶ species level

1.7–1.99 ⟶ genus level

< 1.7 ⟶ ไม่สามารถระบุได้

7. ผลการทดลอง

7.1 การหาค่า $eLOD_{50}$

จากการทวนสอบวิธีทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารสัตว์ (ISO 6579:2017(E)) โดยการเติมเชื้อมาตรฐาน 1 ชนิด คือ เชื้อ *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 ในระดับเชื้อ Low (1 cfu) Medium (3 cfu) และ Hight (9 cfu) ลงในทุกๆตัวอย่างอาหารสัตว์ สามารถแบ่งตัวอย่างอาหารสัตว์ได้ 7 กลุ่ม ดังนี้ 1. กลุ่มวัตถุดิบจากสัตว์ 2.กลุ่มวัตถุดิบจากพืช 3. กลุ่มอาหารผสมสำเร็จรูปชนิดเม็ด 4. กลุ่มอาหารผสมสำเร็จรูปชนิดผง 5. ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบนิ่ม 6. ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบแข็ง 7.ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ชนิดเม็ด โดยทำการเติมเชื้อทั้ง 3 ระดับในตัวอย่างอาหารทดสอบ ทำการใส่เชื้อที่เป็นเชื้ออ้างอิงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เติมเชื้อที่ระดับความเข้มข้นสูง 9 cfu จำนวน 1ชุด เติมเชื้อที่ระดับความ
เข้มข้นกลาง 3 cfu จำนวน 4 ชุด เติมเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่ำ1 cfu จำนวน 4 ชุด ไม่เติมเชื้อ (Control blank) จำนวน 1 ชุด ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตารางผลทวนสอบวิธีทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp.ด้วยวิธี ISO 6579:2017(E) โดยการเติมเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

ลำดับที่	กลุ่มอาหาร	High inoculation level targeted 9 x LOD_{50} / test portion	Intermediate inoculation targeted 3 x LOD_{50} / test portion level	Low inoculation level targeted 1 x LOD_{50} / test portion	Blank level	$eLOD_{50}$ cfu / test portion
1.1	วัตถุดิบจากสัตว์	1/1	3/4	4/4	0/1	=0.7 x 1 **$eLOD_{50}$** = 0.7
1.2		1/1	3/4	4/4	0/1	=0.7 x 1 **$eLOD_{50}$** = 0.7
1.3		1/1	3/4	4/4	0/1	=0.7 x 1 **$eLOD_{50}$** = 0.7
2.1	วัตถุดิบจากพืช	1/1	4/4	4/4	0/1	‹1.0 x 1 **$eLOD_{50}$** ‹1.0
2.2		1/1	4/4	4/4	0/1	‹1.0 x 1 **$eLOD_{50}$** ‹1.0
2.3		1/1	4/4	4/4	0/1	‹1.0 x 1 **$eLOD_{50}$** = ‹1.0

ตารางที่ 1 ตารางผลทวนสอบวิธีทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp.ด้วยวิธี ISO 6579:2017(E) โดยการเติมเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (ต่อ)

ลำดับที่	กลุ่มอาหาร	High inoculation level targeted 9 x LOD_{50} / test portion	Intermediate inoculation targeted 3 x LOD_{50} / test portion level	Low inoculation level targeted 1 x LOD_{50} / test portion	Blank level	$eLOD_{50}$ cfu / test portion
3.1	อาหารผสมสำเร็จรูปชนิดเม็ด	1/1	4/4	4/4	0/1	‹1.0 x 1 $eLOD_{50}$ ‹1.0
3.2		1/1	4/4	4/4	0/1	‹1.0 x 1 $eLOD_{50}$ ‹1.0
3.3		1/1	4/4	4/4	0/1	‹1.0 x 1 $eLOD_{50}$ ‹1.0
4.1	อาหารผสมสำเร็จรูปชนิดผง	1/1	4/4	4/4	0/1	‹1.0 x 1 $eLOD_{50}$ ‹1.0
4.2		1/1	4/4	4/4	0/1	‹1.0 x 1 $eLOD_{50}$ ‹1.0
4.3		1/1	4/4	4/4	0/1	‹1.0 x 1 $eLOD_{50}$ ‹1.0
5.1	ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบนิ่ม	1/1	4/4	3/4	0/1	0.5 x 1 $eLOD_{50}$ 0.5
5.2		1/1	4/4	3/4	0/1	0.5 x 1 $eLOD_{50}$ 0.5
5.3		1/1	4/4	3/4	0/1	0.5 x 1 $eLOD_{50}$ 0.5
6.1	ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบแข็ง	1/1	4/4	2/4	0/1	0.7 x 1 $eLOD_{50}$ 0.7
6.2		1/1	4/4	2/4	0/1	0.7 x 1 $eLOD_{50}$ 0.7
6.3		1/1	4/4	2/4	0/1	0.7 x 1 $eLOD_{50}$ 0.7
7.1	ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ชนิดเม็ด	1/1	4/4	3/4	0/1	0.5 x 1 $eLOD_{50}$ 0.5
7.2		1/1	4/4	3/4	0/1	0.5 x 1 $eLOD_{50}$ 0.5
7.3		1/1	4/4	3/4	0/1	0.5 x 1 $eLOD_{50}$ 0.5

จากผลการทวนสอบทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารสัตว์ (ISO 6579:2017(E)) สามารถใช้ได้ในการตรวจ ตัวอย่างอาหารสัตว์ทั้ง 7 กลุ่ม ของห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ โดยมีค่า Estimated Level Of Detection ($eLOD_{50}$) กลุ่มวัตถุดิบจากสัตว์ และ กลุ่มผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบแข็ง เท่ากับ 0.7 กลุ่มวัตถุดิบจากพืช กลุ่มอาหารผสมสำเร็จรูปชนิดเม็ด และ กลุ่มอาหารผสมสำเร็จรูปชนิดผง น้อยกว่า 1.0 กลุ่มผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบนิ่ม และ กลุ่ม ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ชนิดเม็ด เท่ากับ 0.5

7.2 การตรวจสอบยืนยันวิธีการจำแนกชนิดจุลินทรีย์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/MS

ในการตรวจสอบยืนยันวิธีการจำแนกชนิดจุลินทรีย์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/MS นั้นใช้ได้กับเฉพาะเครื่อง MALDI-TOF/MS ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง (Validaiton) ตามมาตรฐานและวิธีการ ISO 16140-7:2024 ซึ่งต้องการการยืนยันชนิดเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ มาทำการทดสอบแบบ Inclusivity จำนวนไม่น้อยกว่า 150 สายพันธุ์ และแบบ Exclusivity จำนวนไม่น้อยกว่า 100 สายพันธุ์

สำหรับเครื่อง MALDI-TOF/MS ที่ผ่านการการตรวจสอบความถูกต้อง (Validaiton) นั้น เช่นเครื่อง **Bruker MALDI Biotyper** ซึ่งตาม ISO 16140-3:2021/Amd 1:2025 กำหนดให้ใช้การตรวจสอบยืนยันวิธีการจำแนกชนิดจุลินทรีย์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/MS ขั้นต่ำ 5 target + 5 non-target ซึ่งได้ผลทดสอบตามตารางที่ 2-3 พบว่าผลการตรวจสอบยืนยันวิธีการจำแนกชนิดจุลินทรีย์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/MS ให้ผลการจำแนกชนิดจุลินทรีย์ตรง 100% myh’ 5 target และ 5 non-target

ตารางที่ 2 การตรวจสอบยืนยันวิธีการจำแนกชนิดจุลินทรีย์ชนิด Target organisms ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/MS (Bruker MALDI Biotyper)

No.	Target organism	Expected result	Actual result	Conclusion
1	*Salmonella enterica* Typhimurium	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	agree
2	*Salmonella enterica* Typhi	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	agree
3	*Salmonella enterica* Paratyphi A	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	agree
4	*Salmonella enterica* Paratyphi B	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	agree
5	*Salmonella enterica* Paratyphi C	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	agree

ตารางที่ 3 การตรวจสอบยืนยันวิธีการจำแนกชนิดจุลินทรีย์ชนิด non-Target organisms ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/MS (Bruker MALDI Biotyper)

No.	Non-target organism	Expected result	Actual result	Conclusion
1	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*	agree
2	*Enterobacter aerogenes*	*Enterobacter aerogenes*	*Enterobacter aerogenes*	agree
3	*Pseudomonas aeruginosa*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Pseudomonas aeruginosa*	agree
4	*Morganella morganii*	*Morganella morganii*	*Morganella morganii*	agree
5	*Enterococcus feacalis*	*Enterococcus feacalis*	*Enterococcus feacalis*	agree

7.3 ผลการยืนยันการจำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง MAlDI-TOF/MS (Bruker MALDI Biotyper)

นำเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 ที่เติมลงในตัวอย่างอาหารสัตว์เพื่อทำการทดสอบหาค่า $eLOD_{50}$ มาทำการยืนยันชนิดเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง **Bruker MALDI Biotyper** ผลทดสอบพบว่าทุกตัวอย่างทดสอบให้ผลการจำแนกชนิดเชื้อเป็น *Salmonella* spp. ทุกตัวอย่าง คิดเป็น 100% ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการยืนยันการจำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง MAlDI-TOF/MS (Bruker MALDI Biotyper)

ลำดับที่	**กลุ่มอาหาร**	**level targeted**	**Actual result**	**Conclusion**
1.1	วัตถุดิบจากสัตว์	High inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
1.2		Intermediate inoculation targeted	*Salmonella* spp.	agree
1.3		Low inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
2.1	วัตถุดิบจากพืช	High inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
2.2		Intermediate inoculation targeted	*Salmonella* spp.	agree
2.3		Low inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
3.1	อาหารผสมสำเร็จรูปชนิดเม็ด	High inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
3.2		Intermediate inoculation targeted	*Salmonella* spp.	agree
3.3		Low inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree

ตารางที่ 4 ผลการยืนยันการจำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง MAlDI-TOF/MS (Bruker MALDI Biotyper) (ต่อ)

ลำดับที่	กลุ่มอาหาร	level targeted	Actual result	Conclusion
4.1	อาหารผสมสำเร็จรูปชนิดผง	High inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
4.2		Intermediate inoculation targeted	*Salmonella* spp.	agree
4.3		Low inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
5.1	ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบนิ่ม	High inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
5.2		Intermediate inoculation targeted	*Salmonella* spp.	agree
5.3		Low inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
6.1	ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์แบบแข็ง	High inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
6.2		Intermediate inoculation targeted	*Salmonella* spp.	agree
6.3		Low inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
7.1	ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ชนิดเม็ด	High inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree
7.2		Intermediate inoculation targeted	*Salmonella* spp.	agree
7.3		Low inoculation level targeted	*Salmonella* spp.	agree

8. สรุปผลการทดลอง

การทวนสอบความใช้ได้ของขั้นตอนตรวจหา Salmonella spp. ตาม ISO 6579:2017(E) ร่วมกับการยืนยันชนิดเชื้อด้วย MALDI-TOF/MS โดยใช้เครื่อง Bruker MALDI Biotyper สามารถนำมาใช้กับตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบจากสัตว์ทั้ง 7 กลุ่มที่ศึกษาได้ โดยผลการทดสอบ eLOD50 มีค่า 0.5–<1.0 CFU/test portion ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง การตรวจสอบการจำแนกชนิดด้วย MALDI-TOF/MS ในกลุ่ม Target จำนวน 5 สายพันธุ์ และ Non-target จำนวน 5 สายพันธุ์ ให้ผลสอดคล้องกับผลที่คาดหมาย 100% และการตรวจยืนยัน Salmonella spp. ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่เติมเชื้อ Salmonella Typhimurium ATCC 14028 ในทุกระดับการเติมเชื้อ พบผล

การจำแนกเป็น Salmonella spp. สอดคล้องกับผลที่คาดหมาย 100% จึงสรุปได้ว่าวิธีที่ทำการทวนสอบสามารถใช้สำหรับการตรวจหาและยืนยัน Salmonella spp. ในตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบจากสัตว์ทั้ง 7 กลุ่มที่ศึกษาได้

9. ข้อเสนอแนะ

-

10. กิตติกรรมประกาศ

-

11. เอกสารอ้างอิง

กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558. พิมพ์ที่ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด สาขา 4

ธวัชชัย รอดสม. (2545). อาหารสัตว์ตามกฎหมายควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ คู่มือเจ้าหน้าที่ เรื่อง การควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์. กรุงเทพฯ : สำนักพัฒนาการปศุสัตว์และถ่ายทอดเทคโนโลยีกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ISO 6579-1: 2017 (E). Microbiology of food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part1 : Detection of *Salmonella* spp.

ISO / TR 6579-3: 2014 (E). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection. Enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 3: Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp.

ISO 6887-1: 2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

ISO 6887-2: 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.

ISO 6887-3: 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.

ISO 6887-4: 2017. Microbiology of food chain Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.

ISO 7218: 2007 /Amd. 1:2013 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations. AMENDMENT1.

ISO 11133: 2014 (E). Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.

ISO 16140-3: 2021/Amd 1: 2025. Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Amendment 1 : Protocol for verification of validated identification methods of microorganisms

ISO 16140-7: 2024. Microbiology of the food chain — Method validation— Part 7: Protocol for the validation of identification methods of microorganisms