การพัฒนาวิธีและทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยเทคนิค Real-time PCR ในสินค้าปศุสัตว์

นายพิเชษฐ์ กุมภาว์ นางสาวสุภาพร วงศ์ศรีไชย นางกลอยใจ พลเสนา
นายธารินทร์ ศรีวิโรจน์ นางสาวกิติลักษณ์ ไม้เลี้ยง นางสาวศรัญญา โกตะคาร

บทคัดย่อ

การทวนสอบความใช้ได้ (Verification) สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาในอาหารถือว่ามีความสำคัญตามแนวทาง ISO/IEC 17025 เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในความสามารถของห้องปฏิบัติการ ในการศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อการทวนสอบความใช้ได้ เชิงคุณภาพของวิธีทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้เทคนิค Real-time PCR ในสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ในเวลาอันสั้นเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน และยังคงให้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำ โดยใช้การคำนวณค่าขอบเขตการตรวจพบที่ 50% ($eLOD_{50}$) ตาม ISO 16140-3 สำหรับการทำ Implement verification โดยใช้ เนื้อหมู เป็นตัวแทน และค่า $eLOD_{50}$ อยู่ที่ < 3.7 CFU/test portion ส่วนการทำ (food) item verification ซึ่งประกอบด้วย 5 items ได้แก่ เนื้อโค ตับโค เนื้อไก่ ไข่สด และไส้กรอกแปรรูป พบว่ามีค่า $eLOD_{50}$ อยู่ที่ < 3.7 < 2.77 < 2.49 < 1.48 และ < 2.77 CFU/test portion ตามลำดับ เมื่อนำทุกค่าของ $eLOD_{50}$ ที่คำนวณได้มาเปรียบเทียบกับเกณฑ์การยอมรับ (acceptability limit) พบว่าค่า $eLOD_{50}$ ที่คำนวณได้จากวิธีเชิงคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิค Real-time PCR มาใช้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. สำหรับตัวอย่างที่ส่งมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการได้

คำสำคัญ : การทวนสอบความใช้ได้, การทดสอบความใช้ได้, การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Development and verification for detection of *Salmonella* spp. in livestock products by Real-time PCR technique

Pichet Koompa Supaporn Wongsrichai Kloyjai Ponsena
Tarin Srewiroj Kitilak Mailieng Sarunya Kotakharn

Abstract

Verification of methods for the microbiological examination of foods is vital according to ISO/IEC 17025. Microbiological reference methods increase the reliability of food quality control laboratory results. This study aimed to verify qualitative for detection of *Salmonella* spp. by Real-time PCR methods by calculating the limit of detection at 50% ($eLOD_{50}$) according to ISO 16140-3 and to address the related challenges for food microbiology laboratories. We determined the $eLOD_{50}$ for detecting *Salmonella* spp. in different food items. For method implementation verification, the selected food items were pork. For food items verification, the $eLOD_{50}$ values of five other food items (Beef, Beef liver, Chicken meat, egg yolk and sausage) were also assessed. The $eLOD_{50}$ values were < 3.7 CFU/test portion of pork for implementation verification. For other food items verification $eLOD_{50}$ values were < 3.7, < 2.77, < 2.49, < 1.48 and < 2.77 CFU/test portion, respectively. All calculated $eLOD_{50}$ values were compared with acceptance limits. The calculated $eLOD_{50}$ values of the qualitative methods complied with the acceptance criteria and were approved for all the selected food items.

Keywords: Verification, Validation, Amplification

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products,
Department of Livestock Development

รายงานความก้าวหน้าการพัฒนาวิธีและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

รอบ 12 เดือน (ตุลาคม 2568 – กันยายน 2569)

1. ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การพัฒนาวิธีและทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยเทคนิค Real-time PCR ในสินค้าปศุสัตว์

(ภาษาอังกฤษ) Development and verification for detection of *Salmonella* spp. in livestock products by Real-time PCR technique.

ผู้รับผิดชอบโครงการ

1. นายพิเชษฐ์	กุมภาว์	ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ
2. นางสาวสุภาพร	วงศ์ศรีไชย	ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ
3. นางกลอยใจ	พลเสนา	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
4. นายธารินทร์	ศรีวิโรจน์	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
5. นางสาวกิติลักษณ์	ไม้เลี้ยง	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
6. นางสาวศรัญญา	โกตะคาร	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ

หลักการ และความสำคัญ

เทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ที่ได้พัฒนาขึ้นมาเพื่อแก้ปัญหาข้อจำกัดของเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม โดยนำเอาเทคโนโลยีของสีฟลูออเรสเซนต์มาประยุกต์ใช้ ร่วมกับการทำ Thermal cycling ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ผลและคำนวณปริมาณของ PCR products ที่เกิดขึ้นจริงในเวลานั้นๆ (real-time) ได้ทันทีทันใด ในเวลาที่รวดเร็วขึ้น ซึ่งถือว่าเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญและเกิดความก้าวหน้าในงานวิจัย สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางด้านการแพทย์ การตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค การตรวจวิเคราะห์เชื้อดื้อยา

การทวนสอบความใช้ได้ (Verification) ของการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี Real-time PCR ได้จัดทำขึ้นเพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในความสามารถของห้องปฏิบัติการ ในการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ในเวลาอันสั้นเมื่อเทียบกับใช้วิธีมาตรฐานและยังคงให้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำ

2. วัตถุประสงค์

เพื่อทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในสินค้าปศุสัตว์ โดยใช้เทคนิค Real-time PCR

3. ขอบข่าย

ทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้เทคนิค Real-time PCR ในตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู เนื้อโค ตับโค ไส้กรอกแปรรูป และไข่สด ด้วยชุดตรวจ Kylt® *Salmonella* spp. 2.0 เป็นกระบวนการยืนยันความสามารถในการทดสอบของห้องปฏิบัติการโดยใช้หลักการการทวนสอบวิธีทดสอบตาม ISO 16140-3

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยเทคนิค Real-time PCR ในสินค้าปศุสัตว์

2. นำผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยเทคนิค Real-time PCR ในสินค้าปศุสัตว์ไปใช้ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการขอรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ต่อไป

5. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

5.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

5.1.1 ชุดน้ำยาสกัด Kylt® RNA/DNA Purification

5.1.2 ชุดตรวจ Kylt® *Salmonella* spp. 2.0

5.1.3 Real-time PCR

5.1.4 Balance, sensitivity 0.1 g

5.1.5 Incubator, 34-38°C

5.1.6 Heating Block

5.1.7 Centrifuge

5.1.8 Refrigerator, 2-8°C and -20°C

5.1.9 Single channel Micropipette

5.1.10 Sterile bag

5.1.11 Filter pipette tips

5.1.12 Vortex mixer

5.1.13 Pipet aids

5.1.14 Sterile tube

5.1.15 bottle

5.1.16 Graduated pipettes

5.1.17 Scissors

5.1.18 Forceps

5.1.19 Spoons

5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ (Culture medium and reagent)

5.2.1 Buffered Peptone Water (BPW)

5.2.2 Maximum Recovery Diluent

5.2.3 Isopropanol

5.2.4 Ethanol ≥96%

5.3 เชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Reference cultures)

Salmonella Typhimurium ATCC 14028

6. วิธีดำเนินการ

6.1 การเตรียมตัวอย่าง

6.1.1 ตัดตัวอย่างให้ได้ 25 ± 0.5 กรัม

6.1.2 เติม Buffered Peptone Water (BPW) ปริมาตร 225 ml เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่ตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 34-38 °C เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมง

6.2 การสกัด DNA

6.2.1 เมื่อบ่มครบตามกำหนดตามข้อ 6.1.2 นำตัวอย่างที่ทำการบ่มจนครบเวลาออกจากตู้เพาะเชื้อ แล้วเขย่าเบาๆ แล้วดูดตัวอย่าง ปริมาตร 200 µl และเติมใส่ในหลอด nuclease-free 1.5 ml microcentrifuge tube จากนั้นเติม Lysis Solution 200 µl และ Proteinase K 10 µl

6.2.2 จากนั้น Vortex 20 วินาที และ spin down 5 วินาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปบ่มใน Heating block ที่ 70 ± 2°C เป็นเวลา 5 นาที

6.2.3 เติม Ethanol 200 µl Vortex 20 วินาที spin down 5 วินาที ประกอบ Kylt Binding Column กับ Collection Tube เข้าด้วยกัน จากนั้นถ่ายของเหลวทั้งหมดลงใน Kylt binding Column ทำการ centrifuge 1 นาที ที่ 10,000 x g

6.2.4 หลังจากนั้น ย้าย Kylt Binding Column ไปใส่ Collection Tube อันใหม่

6.2.5 เติม Wash Solution 1 ปริมาตร 500 µl ลงใน Kylt Binding Column และนำไป Centrifuge 1 นาที ที่ 10,000 x g

6.2.6 หลังจากนั้น ทิ้ง Collection Tube แล้วย้าย Kylt Binding Column ไปใส่ Collection Tube อันใหม่

6.2.7 เติม Wash Solution 2 ปริมาตร 500 µl ลงใน Kylt Binding Column แล้วนำไป Centrifuge 2 นาที ที่ความเร็วสูงสุด

6.2.8 จากนั้นทิ้ง Collection Tube แล้วย้าย Kylt Binding Column ใส่ในหลอด nuclease-free 1.5 ml microcentrifuge tube

6.2.9 เติม Elution Buffer ปริมาตร 100 µl ลงใน Kylt Binding Column แล้วบ่มใน Heating block ที่อุณหภูมิ 70 ± 2°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไป Centrifuge 1 นาที ที่ความเร็วสูงสุด

6.2.10 ทิ้ง Kylt Binding Column เก็บ DNA ในหลอดด้านล่างไว้เพื่อวิเคราะห์ต่อไป หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C หรือที่อุณหภูมิ -15 to -25 °C เพื่อรอวิเคราะห์ในภายหลัง

6.3 การวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ด้วย Real-time PCR ด้วยชุด Kylt® *Salmonella* spp. 2.0

6.3.1 PCR Setup and Amplification

6.3.1.1 ทำการ Vortex Reaction Mix และ Positive-Negative Control แล้ว spin down เล็กน้อยก่อนการใช้งานทุกครั้ง

6.3.1.2 กำหนดจำนวนปฏิกิริยาที่ต้องวิเคราะห์ : จำนวนตัวอย่าง + Positive Control + Negative Control

6.3.1.3 เขียนเลข Sample No. หลอด หรือแต่ละหลุม (รวมถึง Positive และ Negative Control) ดูด Reaction Mix ปริมาตร 16 µl ใส่ในแต่ละหลอด PCR หรือหลุมของ PCR plate (ระวังอย่าให้สารโดนแสงนาน)

6.3.1.4 จากนั้นเติม Negative Control ปริมาตร 4 µl ในหลอด PCR หรือ PCR plate ที่เตรียมไว้สำหรับ Negative Control ปิเปตขึ้นลงเล็กน้อยให้เข้ากัน แล้วปิดฝา

6.3.1.5 เติมตัวอย่าง DNA แต่ละ Sample No. ปริมาตร 4 µl ลงในหลอด PCR หรือ PCR plate ที่เตรียมไว้ ปิเปตขึ้นลงเล็กน้อยให้เข้ากัน แล้วปิดฝา

6.3.1.6 จากนั้นเติม Positive Control ปริมาตร 4 µl ในหลอด PCR หรือ PCR plate ที่เตรียมไว้สำหรับ Positive Control ปิเปตขึ้นลงเล็กน้อยให้เข้ากัน แล้วปิดฝา

6.3.1.7 จากนั้นทำการ spin down เล็กน้อย ก่อนเข้าเครื่อง Real-time PCR

6.3.2.8 นำหลอด PCR หรือ PCR plate ที่เตรียมเสร็จแล้ว เข้าเครื่อง Real-time PCR โดยใช้พารามิเตอร์ดังตารางที่ 1 หรือ ตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงการตั้งค่า Amplify สำหรับวิเคราะห์ *Salmonella* spp.

Description	Temperature	Duration	cycles
Activation of Polymerase	95 °C	10 นาที	
Denaturation	95 °C	15 วินาที	42 cycles
Annealing & Extension	60 °C	1 นาที	
Fluorescence Detection	Channels FAM and HEX		

ตารางที่ 2 แสดงการตั้งค่า Amplify วิธีทางเลือกสำหรับวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ที่สามารถใช้ร่วมกับการตรวจ Real-time-(RT-) PCR ของชุดตรวจอื่นๆ ของ Kylt ได้

Description	Temperature	Duration	cycles
Reverse Transcription	50 °C	10 นาที	
Activation of Polymerase	95 °C	1 นาที	
Denaturation	95 °C	10 วินาที	42 cycles
Annealing & Extension	60 °C	1 นาที	
Fluorescence Detection	Channels FAM and HEX		

6.3.2 การประเมินผลการทดสอบ

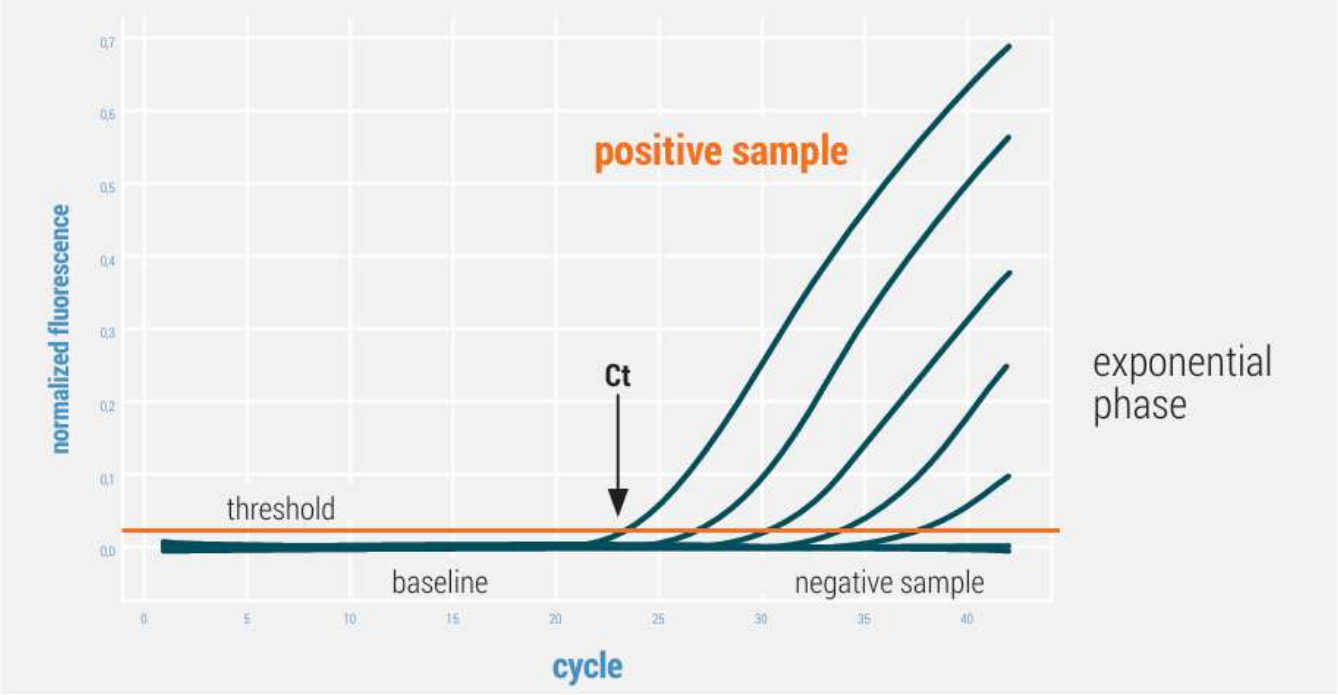
- การทดสอบจะถือว่าถูกต้องก็ต่อเมื่อกราฟของ FAM (FAM-curve) ของ Negative control แสดงผลเป็น ลบ (Negative) และกราฟของ HEX (HEX-curve) ของ Negative control แสดงผลเป็น บวก (Positive) และกราฟ FAM ของ Positive control แสดงผลเป็น บวก (Positive)

- สำหรับการทดสอบที่ถูกต้อง ค่า FAM-Ct (Cycle of threshold)-value ของ Positive control ควรมีค่าอยู่ในช่วง >15 และ ≤ 35 และ ค่า HEX-Ct-value ของ Negative control ควรมีค่า ≤ 40 ดังภาพที่ 1 และ 2

Target	Channel	Signal			
Internal Control	HEX	positive	positive	negative	negative
Salmonella spp.	FAM	negative	positive	positive	negative
The sample is *Salmonella spp.*		**negative**	**positive**	**positive**	**inhibited**

- A **sample** is **negative for *Salmonella spp.*** if its HEX-curve is positive, but its FAM-curve is negative.
- A **sample** is **positive for *Salmonella spp.*** if its FAM-curve is positive, independent of the HEX-curve.
- A **sample** is **inhibited** if neither the FAM-curve nor the HEX-curve are positive.
- **Recommendation:** Recommendation: In case of an inhibited sample the PCR can be repeated with a 1/10 dilution of the DNA extract. If the sample is still inhibited after running the PCR with the diluted sample or as a direct alternative, the pre-enrichment may be incubated for at least 5 hours in RVS (for details see chapter D.1. »Cultural Pre-Enrichment«). By this step potentially present ingredients in the preenrichment that have inhibitory effects on the effectiveness of the Real-Time PCR are diluted and potentially present Salmonellae are selectively propagated. After the second enrichment the entire process of DNA preparation and Real-Time PCR is repeated (see chapters D.3. »DNA Preparation« and D.4. »PCR Setup and Amplification«).

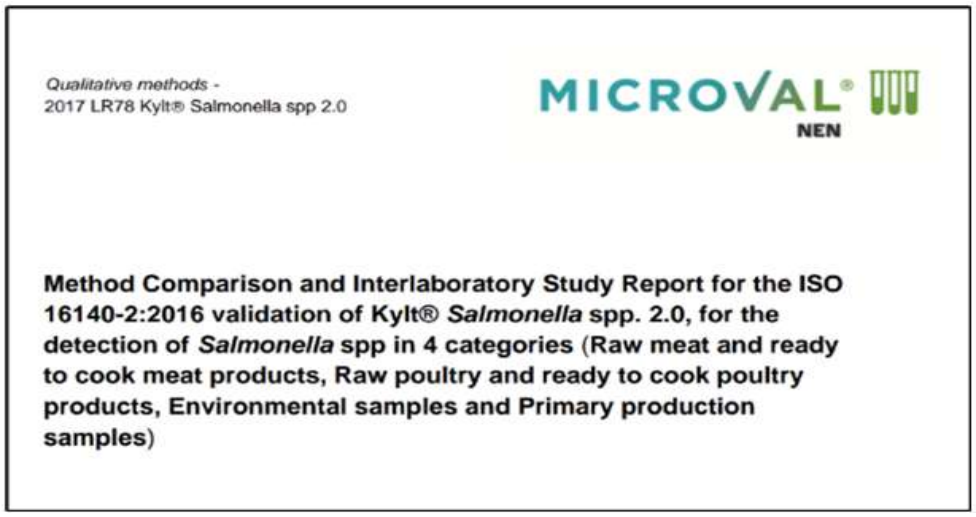
ภาพที่ 1 การประเมินผลการทดสอบ



ภาพที่ 2 Linear view

6.4 การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp.

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี Real-time PCR ด้วยชุดตรวจ Kylt® *Salmonella* spp. 2.0 ซึ่งมีผลการทดสอบความใช้ได้ (validation) ของวิธีทดสอบแล้วตามมาตรฐานสากล Method Comparison and Interlaboratory Study Report for the ISO 16140-2:2016 validation of Kylt® *Salmonella* spp. 2.0, for the detection of *Salmonella* spp. in 4 categories. การทวนสอบแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ Implementation verification และ (Food) item verification



การทดสอบ performance characteristic ของวิธีเชิงคุณภาพเป็นการหาค่า Estimate LOD_{50} ($eLOD_{50}$) ตามเกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 Acceptability limits for verification of a validated reference method

Method	Performance characteristics	Acceptability limits
Qualitative	$eLOD_{50}$	For protocols 1 and 2: $eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50}$ For protocol 3: ≥ 6 out of 7 positive results
Quantitative	S_{IR}	$S_{IR} \leq 2 \times$ lowest S_R mean value[a] determined in the validation study
	eBias	$\lvert \log_{10}$ cfu/ml (inoculum) – mean $\log_{10}$ cfu/test portion (artificially contaminated [food] item) $\rvert$ ≤ 0,5 $\log_{10}$ for each of the inoculation levels
Confirmation or typing	inclusivity and exclusivity	100 % agreement between methods

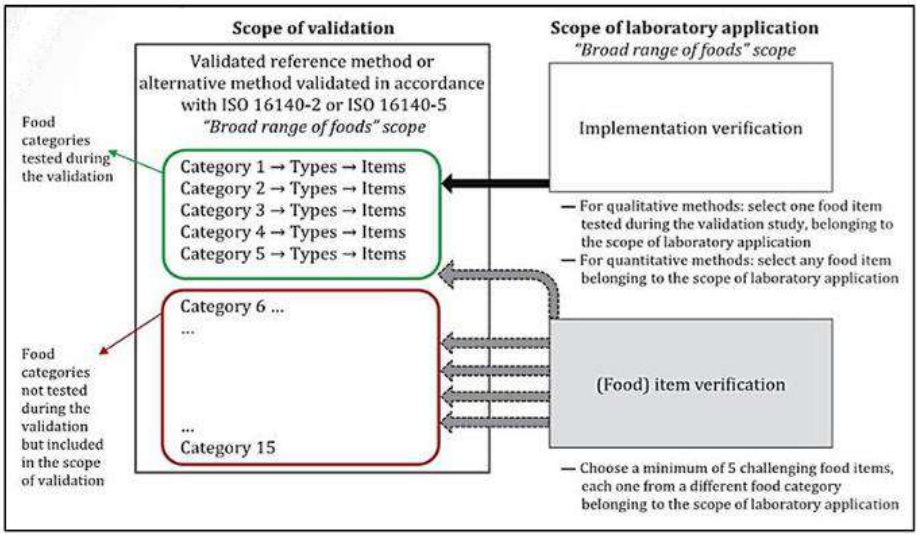
[a] $S_{IR} \leq 2 \times S_R$ for validation studies with only one S_R value.

6.4.1 การเลือกรูปแบบและการเลือกชนิดอาหารสำหรับการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี

การศึกษาครั้งนี้เลือกรูปแบบของ (food) items ที่เป็น “broad range of foods” ซึ่งแสดงให้เห็นจำนวนที่ทำ Implementation verification และ (Food) item verification ตามตารางที่ 4 และภาพที่ 3 ตามวิธี ISO 16140-2 ได้จำแนกผลิตภัณฑ์เป็น 17 categories โดยแบ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับการบริโภค 15 categories และผลิตภัณฑ์อื่นๆ 2 categories ตามตารางที่ 5

ตารางที่ 4 Summary of the minimum number of (food) items required for verification

Scope of validation	Number of samples		
	Implementation verification	(Food) item verification	Total
"Broad range of foods" scope ≥ 5 food categories	1	≥ 5	≥ 6
"Limited range of foods" scope N_{food} categories	1	$N_{food} \leq 4$	$(N_{food} + 1) \leq 5$
"Broad range of foods" + other categories (N_{other}) scope	1	≥ 5 food items + 1 item from each of the N_{other} other categories	$\geq 6 + N_{other}$
"Limited range of foods" N_{food} categories + other categories (N_{other}) scope	1	$N_{food} \leq 4$ + 1 item from each of the N_{other} other categories	$(N_{food} + N_{other} + 1) \leq 8$
Other categories (N_{other}) scope only	1	$N_{other} \leq 3$	$(N_{other} + 1) \leq 4$



ภาพที่ 3 Food items required when verifying a method for a "broad range of foods" scope

ตารางที่ 5 Classification of (food) categories and suggested target combinations

Categories					
Raw milk and dairy products	Heat-processed milk and dairy products	Raw meat and ready-to-cook meat products (except poultry)	Ready-to-eat, ready-to-reheat meat products	Raw poultry and ready-to-cook poultry products	Ready-to-eat, ready-to-reheat meat poultry products
Eggs and egg products (derivatives)	Raw and ready-to-cook fish and seafoods (unprocessed)	Ready-to-eat, ready-to-reheat fishery products	Fresh produce and fruits	Processed fruits and vegetables	Dried cereals, fruits, nuts, seeds and vegetables
Infant formula and infant cereals	Chocolate, bakery products and confectionary	Multi-component foods or meal components	Pet food and animal feed	Environmental samples (food or feed production)	Primary production samples (PPS)

ในการศึกษาครั้งนี้กลุ่มผลิตภัณฑ์ที่เลือกใช้ เป็นไปตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 กลุ่มผลิตภัณฑ์ (Food Item) สำหรับการทวนสอบความใช้ได้ของการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี Real-time PCR

Verification	Categories	Type	Item
Impremention verification	Raw meat & ready-to-cook meat product	Fresh meats (unprocessed)	Pork
(Food) item verification	Raw meat & ready-to-cook meat product ①	Fresh meats (unprocessed)	Beef
	Raw meat & ready-to-cook meat product	Fresh meats (unprocessed)	Beef liver
	Raw poultry & ready-to-cook poultry product ②	Fresh meats (unprocessed)	Chicken meat
	Egg & egg products (derivates) ③	Egg product (heat processed) without additives	Egg yolk
	Ready-to-eat, ready-to-reheat meat poultry products ④	Fermented or dried meat products	Sausage (Truffle flavoured cheese pork sausage)

ตารางที่ 7 Kylt® *Salmonella* spp. 2.0, for the detection of *Salmonella* spp. In food products.

Table 2: Sample preparations required for the analysis of samples being used in the Method comparison study

Sample type	Category	Appropriate part of ISO 6887 to be used	Preparation used
All food products within the category	Raw meat and ready to cook meat products, Raw poultry and ready to cook poultry products	1 and 2	For 25g samples Add 225 ml BPW to 25g samples, dilution ratio = 1:10 For 375g samples Alternative method 1500ml BPW to 375g samples, dilution ratio 1:5 Reference method 3375ml to 375g samples dilution ratio = 1:10
Carcass swabs	Raw meat and ready to cook meat products	1 and 2	Add swab to 50ml tube containing 40ml BPW and make sure that the whole sample is submerged. Mix/ shake well before enrichment
Process water poultry, cattle and swine	Environmental	1 and 2	Samples <100ml added to an equal volume of double strength BPW
Dust wipe samples	Environmental	N/A	Make sure that the whole sample is submerged in BPW. Mix/ shake well before enrichment

6.4.2 การเลือก Protocol ที่ใช้ในการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี

เลือก Protocol ที่ใช้ในการทวนสอบ ตามหลักการ ISO 16140-3 (Experimental design) ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ Protocol 1 เพื่อทำการประมาณค่า LOD_{50} ($eLOD_{50}$) และกำหนดจำนวนตัวอย่างของแต่ละระดับการปนเปื้อน ได้แก่ low level, intermediate level, high level และการทำ blank เพื่อควบคุมระบบ ซึ่งแสดงผลการประมาณค่า LOD_{50} ($eLOD_{50}$) ได้ ดังตารางที่ 8 และพิจารณาเลือกค่า LOD_{50} ที่เหมาะสมตามตารางที่ 9

ตารางที่ 8 Protocols to determine $eLOD_{50}$ and number of replicates needed per inoculation level

Protocol	Inoculation level of the test portion					
	High level $9 \times LOD_{50}$ / test portion	Intermediate level $3 \times LOD_{50}$ / test portion	Low level $1 \times LOD_{50}$ / test portion	3 cfu to 5 cfu /test portion	Blank	Total number of replicates
1	1	4	4	–	1	10
2	–	3	5	–	1	9
3	–	–	–	7	1	8
NOTE The abbreviation of colony forming units is cfu.						

ตารางที่ 9 Validation study of Kylt® *Salmonella* spp. 2.0 In food products. (ISO 16140-2:2016)

ค่า LOD_{50} = 3.062 cfu/test portion

Type (Category)	LOD50 cfu per portion	Lower confidence limit cfu per portion	Upper confidence limit cfu per portion
Raw meat and ready to cook meat products	3.062	1.548	6.056
Raw poultry and ready to cook poultry	0.997	0.997	0.1735
Environmental	1.964	1.149	3.356
Primary production	2.642	1.589	4.393
Primary production 5h RVS	2.642	1.589	4.393
Combined	2.169	1.694	2.777

ตารางที่ 10 ตารางแสดงปริมาณที่เหมาะสมในการเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงใน test portion ที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ

Protocol ที่ 1	High level 9 x LOD50 / test portion	Intermediate level 3 x LOD50 / test portion	Low level 1 x LOD50 / test portion	Blank
Inoculation of the test portions (cfu/ml)	9 x 3.062 = 27.558	3 x 3.062 = 9.186	1 x 3.062 = 3.062	-

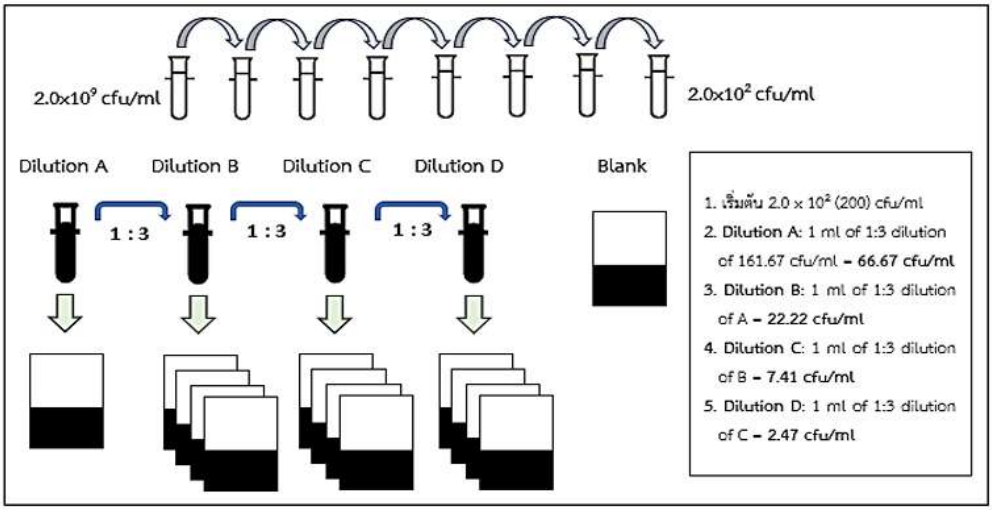
6.4.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานที่ใช้ในการทวนสอบ

เนื่องจากผู้ทดสอบไม่ทราบปริมาณที่แท้จริง (actual count) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมลงไปใน test portions ของแต่ละระดับการปนเปื้อน จึงต้องใช้ค่าประมาณ (expected count) ในการทดสอบ แล้วคำนวณกลับตามปริมาตรที่ใช้ในการ Inoculation เชื้อ ซึ่งสามารถใช้ dilution มากกว่าที่ระบุไว้ตามตารางที่ 11 ได้ เพื่อให้ครอบคลุมปริมาณการปนเปื้อนในแต่ละระดับโดยไม่ต้องทำซ้ำในกรณีที่ปริมาณเชื้อไม่เป็นไปตามต้องการ

ตารางที่ 11 Inoculation levels for each protocol

Protocol	High level $9 \times LOD_{50}$/test portion	Intermediate level $3 \times LOD_{50}$/test portion	Low level $1 \times LOD_{50}$/test portion	3 cfu to 5 cfu/test portion
1	This should be at a maximum of nine times the expected LOD_{50}.	From the high inoculation level, perform a 1:3 dilution to achieve the intermediate level.	From the intermediate inoculation level, perform 1:3 dilution to achieve the low level.	–
2	–	This should be at a maximum of three times the expected LOD_{50}.	From the intermediate inoculation level, perform 1:3 dilution to achieve the low level.	–
3	–	–	–	The level of contamination of the inoculum is known, (e.g. reference material with known concentration).

การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ทำ inoculation ของเชื้อที่ทำการศึกษา นำเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 1 โคโลนี ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Non selective broth แล้วบ่มที่ 34-38°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนบน Non selective agar เพื่อหาปริมาณเชื้อที่แท้จริง (actual count) ควบคู่ไปกับการ inoculation เชื้อลงใน test portion เนื่องจากผลการนับเชื้อมาตรฐานอ้างอิงของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) ที่ผ่านมาของห้องปฏิบัติการ คือ 2.0×10^9 cfu/ml ดังนั้นจึงวางแผนเตรียมเชื้อเพื่อทำการ Inoculation แต่ละระดับได้ตามภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แผนในการเตรียมเชื้อเพื่อทำการ Inoculation แต่ละระดับการปนเปื้อนของห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 12 ตารางแสดงปริมาณเชื้อที่แท้จริง (actual Count) ที่ทำการ Inoculation แต่ละ test portion

Dilution	A	B	C	D
Implement verification : pork	100 cfu/ml	33.33 cfu/ml	11.11 cfu/ml	3.7 cfu/ml
(food) item verification : Beef	100 cfu/ml	33.33 cfu/ml	11.11 cfu/ml	3.70 cfu/ml
Beef liver	74.67 cfu/ml	24.89 cfu/ml	8.30 cfu/ml	2.77 cfu/ml
Chicken meat	67.33 cfu/ml	22.44 cfu/ml	7.48 cfu/ml	2.49 cfu/ml
Egg yolk	40.00 cfu/ml	13.33 cfu/ml	4.44 cfu/ml	1.48 cfu/ml
Sausage (Truffle flavoured cheese pork sausage)	74.67 cfu/ml	24.89 cfu/ml	8.30 cfu/ml	2.77 cfu/ml

7. ผลการทดลอง

7.1 ผลการศึกษา performance characteristics

7.1.1 การทำ Implement verification

จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (validation) ของชุดตรวจ Kylt® *Salmonella* spp. 2.0 ใน Raw meat & ready-to-cook meat product ระบุค่า LOD_{50} = 3.062 cfu/25 g ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการเลือกใช้ เนื้อหมูในการทดสอบ (pork) ซึ่งผลทดสอบเป็นดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 Determine of $eLOD_{50}$ and Number of replicates needed per inoculation level

Item	Inoculation level of the test portion (25g)				$eLOD_{50}$
	Blank level	High level	Intermediate level	Low level	
		9 x LOD_{50} = 27.56 cfu/25g	3 x LOD_{50} = 9.19 cfu/25g	1 x LOD_{50} = 3.06 cfu/25g	
		Actual count = 33.33 cfu	Actual count = 11.11 cfu	Actual count = 3.7 cfu	
Pork	0/1	1/1	4/4	4/4	<1.0 x 3.7

Remark LIL = Low Inoculation Level = 3.7

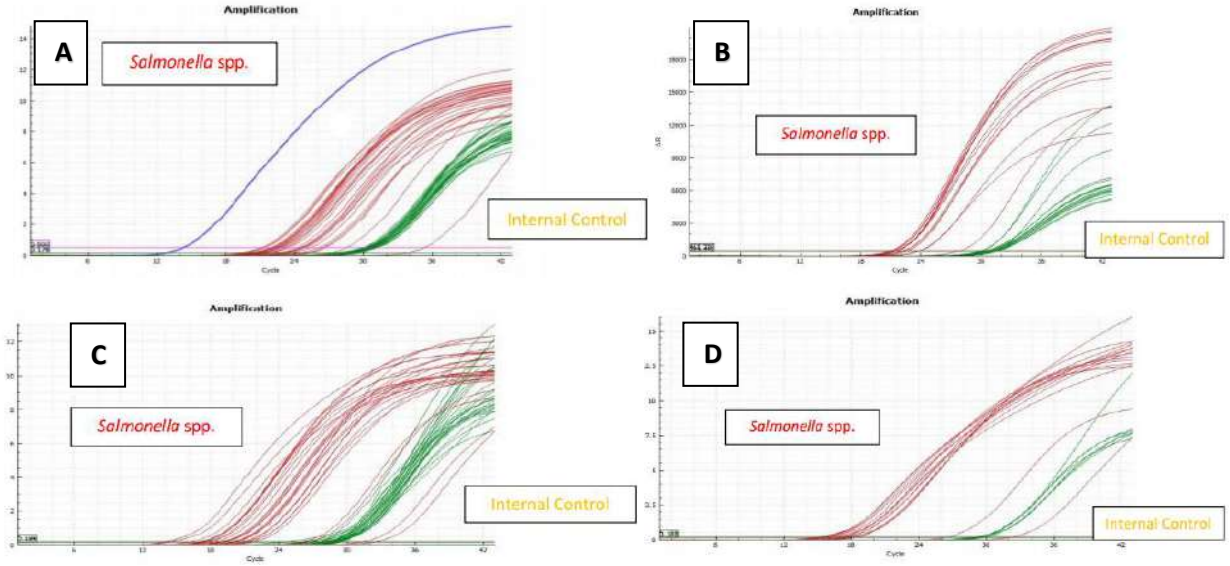
7.1.2 การทำ (food) item verification

จากผลที่ได้จากการเลือกกลุ่มผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ศึกษา โดยกำหนดค่า LOD_{50} = 3.062 cfu/test portion ทางห้องปฏิบัติการเลือกใช้ categories จำนวน 4 categories ซึ่งประกอบด้วย 5 items (ตามตารางที่ 6) โดยผลการทดสอบเป็น ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 Determine of $eLOD_{50}$ and Number of replicates needed per inoculation level

Item	Inoculation level of the test portion (25g)					
	Blank level	High level (9 x LOD_{50} = 27.56 cfu/25g)	Intermediate level (3 x LOD_{50} = 9.19 cfu/25g)	Low level (1 x LOD_{50} = 3.06 cfu/25g)	$eLOD_{50}$	LIL
Beef	0/1	Actual count = 33.33 cfu 1/1	Actual count = 11.11 cfu 4/4	Actual count = 3.7 cfu 4/4	<1.0 x 3.7	3.7
Chicken meat	0/1	Actual count = 22.44 cfu 1/1	Actual count = 7.48 cfu 4/4	Actual count = 2.49 cfu 4/4	<1.0 x 2.49	2.49
Beef Liver	0/1	Actual count = 24.89 cfu 1/1	Actual count = 8.30 cfu 4/4	Actual count = 2.77 cfu 4/4	<1.0 x 2.77	2.77
Sausage	0/1	Actual count = 24.89 cfu 1/1	Actual count = 8.30 cfu 4/4	Actual count = 2.77 cfu 4/4	<1.0 x 2.77	2.77
Egg yolk	0/1	Actual count = 13.33 cfu 1/1	Actual count = 4.44 cfu 4/4	Actual count = 1.48 cfu 4/4	<1.0 x 1.48	1.48

Remark LIL : Low Inoculation Level



ภาพที่ 5 กราฟแสดงผล Amplification curve (A = ตัวอย่างเนื้อหมูและเนื้อโค, B = ตัวอย่างเนื้อไก่, C = ตัวอย่างตับโคและไส้กรอกแปรรูป, D = ตัวอย่างไข่สด)

7.2 การประเมินผล eLOD$_{50}$ สำหรับ protocol ที่ 1

ทำการแปลผลการทดสอบโดยการเก็บข้อมูลจำนวน test portion ที่พบเชื้อในแต่ละ inoculum level เพื่อคำนวนหา eLOD$_{50}$ ตัวอย่าง Blank ผลต้องไม่พบเชื้อ และ high level inoculation ต้องพบเชื้อเท่านั้น นำค่าที่ได้มาประเมินตามเกณฑ์การยอมรับ (acceptability limit) ตามตารางที่ 15 และผลการประเมินดังตารางที่ 16

ตารางที่ 15 Determination of eLOD$_{50}$ base on the number of positive results per of contamination using protocol 1

High inoculation level targeted 9 × LOD$_{50}$/ test portion	**Intermediate inoculation level** targeted 3 × LOD$_{50}$/ test portion	**Low inoculation level** targeted 1 × LOD$_{50}$/ test portion	**Blank level**	**eLOD$_{50}$** cfu/test portion
1/1	4/4	4/4	0/1	< 1,0 × LIL[a]
1/1	4/4	3/4	0/1	= 0,5 × LIL
1/1	4/4	2/4	0/1	= 0,7 × LIL
1/1	4/4	1/4	0/1	= 1,0 × LIL
1/1	4/4	0/4	0/1	= 1,5 × LIL
1/1	3/4	4/4	0/1	= 0,7 × LIL
1/1	3/4	3/4	0/1	= 1,0 × LIL
1/1	3/4	2/4	0/1	= 1,3 × LIL
1/1	3/4	1/4	0/1	= 1,7 × LIL
1/1	3/4	0/4	0/1	= 2,3 × LIL
1/1	2/4	4/4	0/1	= 1,1 × LIL
1/1	2/4	3/4	0/1	= 1,5 × LIL
1/1	2/4	2/4	0/1	= 1,9 × LIL
1/1	2/4	1/4	0/1	= 2,6 × LIL
1/1	2/4	0/4	0/1	= 3,7 × LIL
1/1	1/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result[b]
1/1	1/4	3/4	0/1	= 2,1 × LIL
1/1	1/4	2/4	0/1	= 2,8 × LIL
1/1	1/4	1/4	0/1	= 4,0 × LIL
1/1	1/4	0/4	0/1	= 6,3 × LIL
1/1	0/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result[b]
1/1	0/4	3/4	0/1	= 3,0 × LIL
1/1	0/4	2/4	0/1	= 4,3 × LIL
1/1	0/4	1/4	0/1	= 6,7 × LIL
1/1	0/4	0/4	0/1	= 14,0 × LIL

[a] LIL = low inoculation level.

[b] Unreliable MPN result: MPN combination is very unlikely to occur. The experiment shall be repeated.

ตารางที่ 16 ผลการประเมินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี Real-time PCR

Implementation/Item verification	Performance characteristics	Acceptability limit	Pass/Fail
เนื้อหมู	$eLOD_{50}$	$eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50}$ < $1.0 \times 3.7 \leq 4 \times 3.062$ $eLOD_{50}$ (< 3.7) ≤ LOD50 (12.248)	Pass
เนื้อไก่สด	$eLOD_{50}$	$eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50}$ < $1.0 \times 2.49 \leq 4 \times 3.062$ $eLOD_{50}$ (< 2.49) ≤ LOD50 (12.248)	Pass
ตับโค	$eLOD_{50}$	$eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50}$ < $1.0 \times 2.77 \leq 4 \times 3.062$ $eLOD_{50}$ (< 2.77) ≤ LOD50 (12.248)	Pass
ไส้กรอกแปรรูป	$eLOD_{50}$	$eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50}$ < $1.0 \times 2.77 \leq 4 \times 3.062$ $eLOD_{50}$ (< 2.77) ≤ LOD50 (12.248)	Pass
ไข่สด	$eLOD_{50}$	$eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50}$ < $1.0 \times 1.48 \leq 4 \times 3.062$ $eLOD_{50}$ (< 1.48) ≤ LOD50 (12.248)	Pass
เนื้อโค	$eLOD_{50}$	$eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50}$ < $1.0 \times 3.70 \leq 4 \times 3.062$ $eLOD_{50}$ (< 3.70) ≤ LOD50 (12.248)	Pass

จากการประเมินผลเทียบกับตาราง Determination of $eLOD_{50}$ base on the number of positive results per of contamination กับค่า acceptability limit พบว่าค่า $eLOD_{50}$ ของทั้ง 4 categories มีค่า ≤ 4 cfu/test portion แสดงว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (acceptable) ทุก categories ที่ศึกษา

8. สรุปผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี

จากการแปลผลเทียบกับตาราง Determination of $eLOD_{50}$ base on the number of positive results per of contamination กับค่า acceptability limit พบว่าผ่านเกณฑ์ที่กำหนดทุก categories ที่ศึกษา ห้องปฏิบัติการมีความสามารถทดสอบได้อย่างถูกต้องในการดำเนินการตามวิธีที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้แล้ว สรุปได้ว่าผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี Real-time PCR ในตัวอย่างเนื้อหมู ตับโค ไส้กรอกแปรรูป ไข่สด เนื้อไก่ และเนื้อโค ของห้องปฏิบัติการงานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ มีค่า $eLOD_{50}$ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (acceptable) สามารถนำมาใช้เป็นวิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้อง และใช้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. สำหรับตัวอย่างที่ส่งมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการได้

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการงานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

10. เอกสารอ้างอิง

10.1 ISO 16140-3: 2021. Microbiology of food chain -Method validation-, Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. 1st edition. Published by the international organization for standardization 2021-01.

10.2 Anonymous. EN ISO 6579-1 Microbiology of the Food Chain–Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of *Salmonella*–Part 1: Detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization Geneva, Switzerland; 2017.

10.3 Qualitative methods-2017 LR78 Kylt® *Salmonella* spp. 2.0. MicroVal study number: 2017LR78 Method Comparison and Interlaboratory Study Report for the ISO 16140-2:2016 validation of Kylt® *Salmonella* spp. 2.0, for the detection of *Salmonella* spp. in 4 categories (Raw meat and ready to cook meat products, Raw poultry and ready to cook poultry products, Environmental samples and Primary production samples).