

การพัฒนาวิธีทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution

ชนิษฐา เอี่ยมละออ วราภรณ์ ภูนาเหนือ มัลลิกา สระศรี นรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution โดยใช้เชื้อทดสอบ *T. mentagrophytes* ATCC 9533 และทำการหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเตรียมเชื้อด้วยวิธี Enumeration of viable fungi from carrier (Carrier count) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา 3 กลุ่มสารสำคัญ ได้แก่ Alcohols, Aldehydes และ Phenolics ทดสอบตามอัตราส่วนที่ผลากระบุ ระยะเวลาสัมผัสเชื้อ 10 นาที ใช้จำนวน Carrier ทดสอบ 60 ชิ้นต่อตัวอย่าง (ทดสอบ 2 ซ้ำ โดยผู้ทดสอบ 2 คน) พร้อมทั้งควบคุมคุณภาพในทุกรอบการทดสอบ ได้แก่ Carrier sterility, Carrier viability, Neutralization confirmation, การปนเปื้อนในตัวอย่าง และ Carrier count เพื่อยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธี ผลการศึกษาพบว่า การเตรียมเชื้อที่มีความขุ่นในช่วง 0.20 - 0.23 McFarland ให้ปริมาณเชื้อราอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามแนวทางของ Health Canada คือ 1×10^4 - 1×10^5 conidia/carrier (log 4 - 5) จึงเลือกใช้เป็นความเข้มข้นมาตรฐานสำหรับการเตรียมเชื้อทดสอบ ด้านผลการทดสอบประสิทธิภาพพบว่า ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อราทั้ง 3 กลุ่มสารสำคัญมีประสิทธิภาพในการกำจัด *T. mentagrophytes* ได้อย่างสมบูรณ์โดยไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ ตามอัตราส่วนที่ระบุบนฉลาก (ผลลัพธ์ผ่าน 60/60 carriers หรือ negative/total) และทุกตัวอย่างผ่านเกณฑ์การควบคุมคุณภาพที่กำหนด สรุปได้ว่า ห้องปฏิบัติการประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *T. mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution แต่อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) เพิ่มเติม เพื่อยืนยันความถูกต้อง ความเที่ยง และความน่าเชื่อถือของวิธีทดสอบในขั้นต่อไป

Keywords: *Trichophyton mentagrophytes*, carrier count, สารฆ่าเชื้อรา, ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ, use-dilution

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุดิบรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Development for the Assessment of Fungicidal Efficacy of Disinfectants Against *Trichophyton mentagrophytes* by the Use-Dilution Method

Kanitta Aiumlaau, Waraporn Phunanua, Mallika Srasri, and Naraya Tangsirirap

Abstract

This study aimed to develop a method for testing the efficacy of antifungal products against *Trichophyton mentagrophytes* using the use-dilution method, with *T. mentagrophytes* ATCC 9533 as the test microorganism. The appropriate concentration range for preparing the test inoculum was determined using the enumeration of viable fungi from carriers (carrier count). Three groups of active ingredients in antifungal products were evaluated: alcohols, aldehydes, and phenolics. The products were tested at the use-dilutions specified on the product labels with a contact time of 10 minutes. A total of 60 carriers per sample were tested in duplicate by two operators. Furthermore, quality controls were implemented in each test run, including carrier sterility, carrier viability, neutralization confirmation, sample contamination, and carrier count, to ensure the reliability of the test method. The results showed that fungal suspensions with a turbidity of 0.20 - 0.23 McFarland yielded a fungal concentration within the acceptable criteria of Health Canada, ranging from 1×10^4 to 1×10^5 conidia/carrier (log 4 - 5); therefore, this turbidity range was selected as the standard concentration for preparing the test inoculum. The efficacy test results demonstrated that all three groups of antifungal products completely eliminated *T. mentagrophytes*, showing no fungal growth at the specified label dilutions (60/60 carriers, negative/total). All product samples met the established quality control criteria. In conclusion, the laboratory successfully developed the use-dilution method for evaluating the antifungal efficacy against *T. mentagrophytes*. However, further method validation is required to confirm the accuracy, precision, and reliability of the developed test method.

Keywords: *Trichophyton mentagrophyte*, carrier count, fungicide, disinfectant, use-dilution

Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

บทนำ

เชื้อราเป็นหนึ่งในสาเหตุของอุบัติการณ์ของการเกิดโรคบริเวณผิวหนังในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะโรคผิวหนัง (Dermatitis) ที่เกิดจากเชื้อรา คือ โรคกลาก (Ringworm) (Chermette *et al.*, 2008; Hurst, 2016) ซึ่งเกิดจากเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาไฟท์ (Dermatophytes) ส่วนใหญ่เชื้อรากลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับผิวหนังและโครงสร้างที่มีเคอราติน (keratin structure) เป็นส่วนประกอบ (Chermette *et al.*, 2008; Hubka *et al.*, 2018) โดยเชื้อราสกุล *Trichophyton* เป็นสกุลที่พบการเกิดโรคผิวหนังในสัตว์มาก โดยเฉพาะ *T. mentagrophytes* เป็นเชื้อราที่มีการรายงานว่าเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคผิวหนังในสัตว์เศรษฐกิจ เช่น โค กระบือ แพะ และแกะ เป็นต้น (Hurst, 2016) นอกจากโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อราส่งผลเสียต่อสุขภาพของสัตว์แล้ว ยังส่งผลทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เนื่องจากโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อราสามารถติดต่อกันโดยการสัมผัสจากสัตว์ที่เป็นโรค และยังสามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้อีกด้วย (Hubka *et al.*, 2018)

ในปัจจุบันมีการทำความสะอาดโรงเรือน คอก และอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้กับสัตว์ โดยใช้กลุ่มผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา เช่น กลุ่มอัลดีไฮด์ (Aldehyde) (Perry and Caveney, 2011) กลุ่มสารประกอบฟีนอล (Phenols) (Ingraham and Fleischer, 2003; Perry and Caveney, 2011) และกลุ่มสารประกอบฮาโลเจน (Halogen compounds) (Perry and Caveney, 2011) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม ห้องปฏิบัติการของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุดิบด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ยังขาดวิธีการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *T. mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *T. mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเพิ่มขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการ ในการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อราชนิดฆ่าเชื้อรา ด้วยวิธี Use-dilution ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุดิบด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อรา ด้วยวิธี Use-dilution

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีที่ผ่านการพัฒนาวิธีทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution และนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป

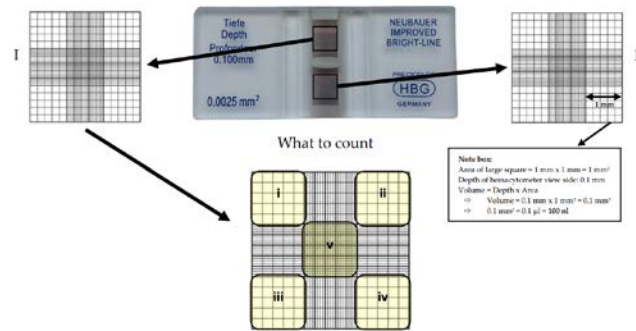
4. วิธีดำเนินการ

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 Micropipette
- 4.1.2 กล้องจุลทรรศน์
- 4.1.3 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยระบบไอน้ำแรงดันสูง (autoclave)
- 4.1.4 เครื่องชั่ง
- 4.1.5 เครื่องผสมสารละลายและควบคุมอุณหภูมิ (hot plate and stirrer)
- 4.1.6 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- 4.1.7 เครื่อง pH meter
- 4.1.8 เครื่องนับจำนวนจุลินทรีย์
- 4.1.9 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์
- 4.1.10 เครื่อง ultrasonic bath
- 4.1.11 นาฬิกาจับเวลา
- 4.1.12 ตะเกียงเบนเสน
- 4.1.13 ตู้อบไฟฟ้า (Hot air oven)
- 4.1.14 ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet)
- 4.1.15 ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 25-30 °C และ 36±1 °C
- 4.1.16 ตู้แช่แข็งชนิดอุณหภูมิต่ำได้ -86 °C
- 4.1.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) อุณหภูมิ 20±1 °C และ 45-50 °C
- 4.1.18 Beaker
- 4.1.19 Bottle solution
- 4.1.20 Carriers
- 4.1.21 Cylinder
- 4.1.22 Erlenmeyer flask
- 4.1.23 Graduated pipette
- 4.1.24 Glass bead
- 4.1.25 Hook
- 4.1.26 Loop
- 4.1.27 Petri dish
- 4.1.28 Pipette tip
- 4.1.29 Sterile spatula
- 4.1.30 Test tube ฝาเกลียว
- 4.1.31 Volumetric flask
- 4.1.32 Volumetric pipette
- 4.1.33 กระดาษกรอง cellulose filter paper ยี่ห้อ Whatman No.2 ขนาด 90 cm

- 4.1.34 กระดาษ lint free
- 4.1.35 กรวยกรอง
- 4.2 สารเคมี
- 4.2.1 Sodium hydroxide (NaOH) ชนิด AR grade
- 4.2.2 Phenolphthalein ชนิด AR grade
- 4.2.3 Hydrochloric acid (HCl) ชนิด AR grade
- 4.2.4 Lactophenol cotton blue
- 4.2.5 Sterile RO
- 4.2.6 0.85% NaCl
- 4.2.7 70% ethyl alcohol
- 4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ
- 4.3.1 Glucose Broth สำหรับทดสอบ
- ในการเตรียม 1 L มีส่วนประกอบดังนี้
- | | | |
|---------------|----|---|
| a. Neopeptone | 10 | g |
| b. D-glucose | 20 | g |
- pH 6.2 ± 0.1
- 4.3.2 Glucose Agar สำหรับเพาะเชื้อและนับปริมาณเชื้อ
- ในการเตรียม 1 L มีส่วนประกอบดังนี้
- | | | |
|-------------------------|----|---|
| a. Neopeptone | 10 | g |
| b. D-glucose | 20 | g |
| c. Bacteriological agar | 20 | g |
- pH 6.2 ± 0.1
- 4.3.3 Sabouraud Dextrose Agar สำหรับตรวจคุณลักษณะเชื้ออ้างอิง
- 4.4 เชื้อมาตรฐาน
- เชื้อรามาตรฐาน *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533
- 4.5 ขั้นตอนการทดลอง
- 4.5.1 การเพาะเชื้อมาตรฐาน และการเก็บ stock spore suspension
- 4.5.1.1 นำหลอดเชื้อออกจากตู้แช่แข็งที่เก็บที่อุณหภูมิ -70°C หรือต่ำกว่า ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อละลายน้ำแข็ง จากนั้นใช้ sterile needle เขี่ยเม็ดปิดจากในหลอดเชื้อ มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose agar slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $27.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 วัน เมื่อครบกำหนด สามารถเก็บเป็น stock working ที่อุณหภูมิ $2-5^{\circ}\text{C}$ ได้ไม่เกิน 3 เดือน (ห้ามเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

- 4.5.1.2 นำ stock working มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose agar โดยใช้ sterile loop และบริเวณเส้นใยเชื้อราตามบริเวณตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose agar plate จำนวน 5 plates นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27.5 ± 2.5 °C เป็นเวลา 10-15 วัน
- 4.5.1.3 ใช้ sterile spatula ขูดเชื้อราที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร ลงในขวดที่มี 0.85% NaCl ปริมาตร 25 mL จนครบทั้ง 5 plates
- 4.5.1.4 ใส่ sterile glass bead ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-4 mm ประมาณ 5 g แล้วเขย่าเพื่อให้สปอร์หลุด
- 4.5.1.5 นำมารองผ่านกระดาษ lint free ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำเส้นใยเชื้อราออก ให้ได้แต่ spore suspension ลงใน sterile bottle
- 4.5.1.6 เก็บรักษาเพื่อเป็น stock spore suspension ที่อุณหภูมิ 2-10 °C ได้ไม่เกิน 4 สัปดาห์
- 4.5.1.7 แบ่ง stock spore suspension ไปนับปริมาณสปอร์ด้วย hemacytometer (ข้อ 4.5.2.1) หรือ pour plate technique (ข้อ 4.5.2.2) เพื่อหาปริมาณเชื้อของ stock spore suspension (ประมาณ $125-155 \times 10^6$ conidia/mL)
- 4.5.2 การนับปริมาณเชื้อ stock spore suspension
 - 4.5.2.1 การนับปริมาณเชื้อ stock spore suspension ด้วย hemacytometer
 - 4.5.2.1.1 ดูด stock spore suspension ปริมาตร 1 mL ใส่ลงใน 0.85% NaCl ที่มีปริมาตร 9 mL ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ทำ ten-fold dilution จนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-2}
 - 4.5.2.1.2 ดูดสารละลาย lactophenol cotton blue ปริมาตร 10 μ L ใส่ลงใน microcentrifuge tube และเติม suspension ที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} ปริมาตร 10 μ L ผสมให้เข้ากัน
 - 4.5.2.1.3 นำ hemacytometer มาเช็ดด้วย 70% ethyl alcohol และปิดด้วย cover slip ให้คลุม scale ทั้งสองด้าน
 - 4.5.2.1.4 ดูดสารละลายในข้อ 4.5.2.1.2 ปริมาตร 10 μ L ใส่ลงในช่องบริเวณขอบ slide ให้ spore suspension ค่อยๆ ซึมเข้าไปจนเต็มบริเวณ scale ทั้งสองด้าน ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้สปอร์นอนกัน
 - 4.5.2.1.5 นำไปนับจำนวนสปอร์ ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40X โดยนับจำนวนสปอร์บริเวณพื้นที่ I, ii, iii, iv และ v ดังรูปที่ 1
 - 4.5.2.1.6 คำนวณหาปริมาณเชื้อ ตามสูตร การคำนวณหาความเข้มข้น ด้วย hemacytometer



รูปที่ 1 การนับปริมาณสปอร์ด้วย hemacytometer

4.5.2.2 การนับปริมาณเชื้อจาก stock spore suspension ด้วยวิธี pour plate

4.5.2.2.1 ดูดเชื้อจาก stock spore suspension ปริมาตร 1 mL ใส่ลงในหลอด 0.85% NaCl ที่มีปริมาตร 9 mL (ระดับความเจือจางที่ 10^{-1}) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ทำ ten-fold dilution จนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-6}

4.5.2.2.2 เลือกดูดสารละลายเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาตร 1 mL ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ และ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose agar โดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ (duplicate)

4.5.2.2.3 ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27.5 ± 2.5 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 วัน

4.5.2.2.4 เมื่อครบกำหนด นำมาอ่านผลโดยการนับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อ (conidia/mL) และค่า $\log_{10}$

4.5.3 การหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของการเตรียมเชื้อทดสอบ (standardize spore suspension) เกณฑ์การยอมรับ 1×10^4 - 1×10^5 conidia/carrier ($\log_{10}$ 4-5)

4.5.3.1 กำหนดอัตราส่วนการเจือจางเชื้อทดสอบ โดยเจือจางเชื้อ stock spore suspension ผสมกับ 0.85% NaCl เพื่อหาช่วงการเตรียมที่มีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ และวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง McFarland

4.5.3.2 การทดสอบ Enumeration of viable fungi from carrier (carrier count)

4.5.3.2.1 ใช้ sterile hook เกี่ยว sterile carriers ที่เตรียมไว้ล่วงหน้า ใส่ลงใน tube ขนาด 25 x 150 mm จำนวน 10 carriers/tube

4.5.3.2.2 ดูดเชื้อแต่ละอัตราส่วน ปริมาตร 10 mL ใส่ลงใน tube ข้อ 4.5.3.2.1 แช่ carriers ให้ทั่วมนาน 15 ± 2 นาที (อัตราส่วนเชื้อ 1 mL/carrier)

4.5.3.2.3 เมื่อครบเวลาดูดเชื้อทิ้งใส่ขวดใบใหม่ และใช้ sterile hook เกี่ยว carriers วางบนเพลทกระดาดากรอง (แนวตั้ง) นำไป dry ที่อุณหภูมิ 36 ± 1 °C เป็นเวลา 40 ± 2 นาที

- 4.5.3.2.4 สุ่ม carrier จำนวน 3 carrier โดยใช้ sterile hook เกี้ยว carrier แต่ละอัน ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose broth ที่มีปริมาตร 10 mL จนครบทั้ง 3 หลอด นำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ± 5 วินาที
- 4.5.3.2.5 นำมา pool รวมกันใส่ใน sterile tube หลอดใหม่ (ระดับความเจือจางที่ 10^{-1}) เขย่าให้เข้ากัน ใช้ micropipette ดูดปริมาตร 1 mL ใส่ลงในหลอด 0.85% NaCl ที่มีปริมาตร 9 mL (ระดับความเจือจางที่ 10^{-2}) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จากนั้นดูดสารละลายเชื้อที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} ปริมาตร 1 mL ใส่ลงในหลอด 0.85% NaCl ที่มีปริมาตร 9 mL (ระดับความเจือจางที่ 10^{-3}) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer
- 4.5.3.2.6 ดูดสารละลายเชื้อแต่ละระดับความเจือจาง ปริมาตร 0.1 mL ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ และ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose agar โดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ (duplicate)
- 4.5.3.2.7 ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27.5 ± 2.5 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 วัน
- 4.5.3.2.8 เมื่อครบกำหนด นำมาอ่านผลโดยการนับจำนวนโคโลนี และคำนวณปริมาณเชื้อ Enumeration of viable fungi from carrier (carrier count) และค่า $\log_{10}$
- 4.5.4 การคัดเลือกตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อที่มีความจำเพาะในการฆ่าเชื้อรา (Specific claims against fungi)
- คัดเลือกตัวอย่างที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อรา ตามฉลากบรรจุระบุ จำนวน 3 ตัวอย่าง ที่มีความแตกต่างกันของประเภทสารสำคัญ
- 4.5.4.1 ตัวอย่างที่ 1 กลุ่มแอลกอฮอล์ (Alcohols)
- ชื่อตัวอย่าง : จีพีโอ แอลกอฮอล์ (GPO ALCOHOL)
- ชื่อและอัตราส่วนของสารสำคัญ :
- Ethyl alcohol solution 70% V/V
- Lot No. C680004 วันหมดอายุ : 10-01-28
- อัตราส่วนที่ใช้ : Ready to use (พร้อมใช้)
- ระยะเวลาสัมผัสเชื้อ (contact time) : 10 นาที
- 4.5.4.2 ตัวอย่างที่ 2 กลุ่มอัลดีไฮด์ (Aldehydes)
- ชื่อตัวอย่าง : เอวี – คลีน (AV – CLEAN)
- ชื่อและอัตราส่วนของสารสำคัญ :
1. Glutaraldehyde 10% W/V
 2. Alkyl benzyl dimethyl ammonium chloride 10% W/V

Lot No. 20L12401 วันหมดอายุ : 4/5/2027

อัตราส่วนที่ใช้ : 1 : 300 (ผลิตภัณฑ์ 1 ส่วน ผสมกับน้ำ 300 ส่วน)

ระยะเวลาสัมผัสเชื้อ (contact time) : 10 นาที

4.5.4.3 ตัวอย่างที่ 3 กลุ่มสารประกอบฟีนอล (Phenolics)

ชื่อตัวอย่าง : โพรพิล เอส (PROPHYL S)

ชื่อและอัตราส่วนของสารสำคัญ :

1. Chlorocresol 17.0% W/W

2. Glycolic acid 4.9% W/W

Lot No. 024451-1 วันหมดอายุ : 1/1/2028

อัตราส่วนที่ใช้ : 1 : 400 (ผลิตภัณฑ์ 1 ส่วน ผสมกับน้ำ 400 ส่วน)

ระยะเวลาสัมผัสเชื้อ (contact time) : 10 นาที

4.5.5 การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution

ดำเนินการทดสอบตัวอย่างที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรากับวิธี Use-dilution จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยผู้ทดสอบ 2 คน ทดสอบจำนวน 60 carriers/ตัวอย่าง ที่ระยะเวลาสัมผัสเชื้อ (contact time) 10 นาที

4.5.5.1 การเตรียมตัวอย่าง

4.5.5.1.1 ตัวอย่างที่ 1 ไม่ต้องเจือจาง (Ready to use)

- เทแบ่งตัวอย่างจากขวดใส่ลงใน sterile beaker ประมาณ 700 mL และใช้ sterile pipette ดูดตัวอย่าง 10 mL ใส่หลอดทดสอบ ขนาด 25x150 mm จำนวน 60 หลอด ปิดฝา และนำไปใส่ใน water bath 20 ± 1 °C ก่อนการทดสอบอย่างน้อย 10 นาที

4.5.5.1.2 ตัวอย่างที่ 2 อัตราส่วน 1 : 300 (ผลิตภัณฑ์ 1 ส่วน ผสมกับน้ำ 300 ส่วน)

- ตวง sterile RO ปริมาตร 900 mL ด้วย cylinder แล้วเทใส่ sterile bottle

- เทแบ่งตัวอย่างจากขวดใส่ลงใน sterile beaker และใช้ pipette ดูดตัวอย่าง ปริมาตร 3 mL ใส่ลงในขวดที่มี sterile RO ปริมาตร 900 mL ปิดฝา เขย่าให้เข้ากัน

- ใช้ sterile pipette ดูดตัวอย่าง 10 mL ใส่หลอดทดสอบ ขนาด 25x150 mm จำนวน 60 หลอด ปิดฝา และนำไปใส่ใน water bath 20 ± 1 °C ก่อนการทดสอบอย่างน้อย 10 นาที

4.5.5.1.3 ตัวอย่างที่ 3 อัตราส่วน 1 : 400 (ผลิตภัณฑ์ 1 ส่วน ผสมกับน้ำ 400 ส่วน)

- ตวง sterile RO ปริมาตร 800 mL ด้วย cylinder แล้วเทใส่ sterile bottle
- เทแบ่งตัวอย่างจากขวดใส่ลงใน sterile beaker และใช้ pipette ดูดตัวอย่าง ปริมาตร 2 mL ใส่ลงในขวดที่มี sterile RO ปริมาตร 800 mL ปิดฝา เขย่าให้เข้ากัน
- ใช้ sterile pipette ดูดตัวอย่าง 10 mL ใส่หลอดทดสอบ ขนาด 25x150 mm จำนวน 60 หลอด ปิดฝา และนำไปใส่ใน water bath 20 ± 1 °C ก่อนการทดสอบอย่างน้อย 10 นาที

4.5.5.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

- 4.5.5.2.1 นำ stock spore suspension มาเจือจางกับ 0.85% NaCl ให้ได้ความเข้มข้นที่ประมาณ 0.18-0.23 McFarland (ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 80 mL/ตัวอย่าง)
- 4.5.5.2.2 ใช้ sterile pipette ขนาด 25 mL ดูดเชื้อทดสอบปริมาตร 37 mL ใส่ลงในขวดที่มี carrier 37 carriers (อัตราส่วนเชื้อ 1 mL: 1 carrier) แช่ให้ท่วม carrier เป็นเวลา 15 ± 2 นาที
- 4.5.5.2.3 เมื่อครบเวลาใช้ pipette ดูดเชื้อออก ทั้งใส่ขวดใบใหม่ และใช้ sterile hook เกี่ยว carrier แต่ละใบๆ ที่ข้างภาชนะเพื่อกำจัดเชื้อทดสอบส่วนเกิน จากนั้นวางบน petri dish ที่ใส่กระดาษกรอง และปิดฝา petri dish การวาง carrier ต้องวางแนวตั้ง และไม่ให้ carrier ล้มหรือสัมผัสกัน วางไม่เกิน 12 carriers/petri dish
- 4.5.5.2.4 นำเข้าตู้อบเชื้อที่อุณหภูมิ 36 ± 1 °C เป็นเวลา 40 ± 2 นาที เพื่อ dry carriers ให้แห้ง carrier ที่ dry แล้วต้องใช้ทดสอบภายใน 2 ชั่วโมง
- 4.5.5.2.5 ทำซ้ำตามข้อ 4.5.5.2.2-4.5.5.2.4 โดยแช่ลงใน carrier ขวดที่ 2 หลังจาก dry ชุดที่ 1 ไปประมาณ 10 นาที
- 4.5.5.2.6 เมื่อครบเวลานำ petri dish ที่ dry ในตู้อบออกมาวางบนโต๊ะโดยไม่ให้ carrier ล้มหรือสัมผัสกัน
- 4.5.5.2.7 ก่อนการทดสอบ สุ่ม carrier ชุดที่ 1 จำนวน 3 carrier โดยสุ่ม 1 carrier/petri dish และสุ่ม carrier ชุดที่ 2 หลังการทดสอบ เพื่อทำ enumeration of viable fungi from carriers ตามข้อ 4.5.5.5

4.5.5.3 ขั้นตอนทดสอบ (แบ่งการทดสอบเป็น 2 ชุด ชุดละ 30 หลอด)

- 4.5.5.3.1 หยิบหลอดตัวอย่างออกจาก water bath ปิดฝา และลบไฟบริเวณปากหลอด

- 4.5.5.3.2 ใช้ sterile hook เกี่ยว carrier ออกจาก petri dish ใส่ในหลอดตัวอย่าง (ขั้นตอนนี้ให้ระมัดระวัง carrier ห้ามสัมผัสปากหลอด และสัมผัสข้างในหลอดตัวอย่าง) หลอดละ 1 carrier ลนไฟปากหลอด ปิดฝา เขย่าเบาๆ และวางใน water bath ตามเดิม จับเวลาทันที กำหนดระยะเวลาระหว่างหลอด 15 ± 5 วินาที โดยให้ทุกหลอดมีระยะเวลาสัมผัสผลิตภัณฑ์ฆ่าเชือนาน 10 นาที
- 4.5.5.3.3 ใช้ sterile hook เกี่ยว carrier ออกจาก petri dish ใส่ในหลอดตัวอย่าง หลอดที่ 2 ลนไฟปากหลอด ปิดฝา เขย่าเบาๆ และวางใน water bath ทำจนครบ 30 หลอด ต่อการทดสอบ 1 ชุด
- 4.5.5.3.4 เมื่อครบเวลา 10 นาที ใช้ sterile hook เกี่ยว carrier จากหลอดตัวอย่าง หลอดที่ 1 ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose broth ปริมาตร 10 mL และเกี่ยวหลอดที่ 2 ตามลำดับเวลา (ทุก 15 ± 5 วินาที) carrier สามารถสัมผัสข้างในหลอดได้ เพื่อให้ยาฆ่าเชื้อติดขึ้นมาน้อยที่สุด แต่ควรระวังไม่ให้ carriers สัมผัสบริเวณ $\frac{1}{3}$ จากปากหลอด จากนั้นลนไฟปากหลอด ปิดฝา เขย่าเบาๆ ทำจนครบ 30 หลอด
- 4.5.5.3.5 ทำซ้ำตามข้อ 4.5.5.3.1-4.5.5.3.4 ในชุดที่ 2
- 4.5.5.3.6 นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 27.5 ± 2.5 °C เป็นเวลา 10 วัน
- 4.5.5.4 การอ่านผล
- อ่านผลหลอดทดสอบโดยดูการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อพบ/ ไม่พบ การเจริญเติบโตของเชื้อรา ทั้ง 60 หลอด และบันทึกผลเป็น จำนวนหลอด Negative/total ดังนี้
- Positive (+) คือ พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าไม่สามารถฆ่าเชื้อได้
 - Negative (-) คือ ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าสามารถฆ่าเชื้อได้
- ผ่าน หมายถึง ฆ่าเชื้อราได้ไม่น้อยกว่า 59 carriers จาก 60 carriers (59/60 หรือ 60/60)
- ไม่ผ่าน หมายถึง ฆ่าเชื้อราได้น้อยกว่า 59 carriers จาก 60 carriers (0/60 ถึง 58/60)
- 4.5.5.5 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ
- 4.5.5.5.1 Carriers sterility control เพื่อให้มั่นใจว่า carrier ที่ใช้ทดสอบ ปราศจากเชื้อปนเปื้อน

- ใช้ sterile hook เกี่ยว carrier ใน bottle solution ขนาด 100 mL ขวดละ 1 carrier ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose broth ปริมาตร 10 mL นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อ $27.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 วัน

อ่านผล โดยดูการเปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

ผ่าน คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่า carrier ปราศจากเชื้อปนเปื้อน

ไม่ผ่าน คือ มีการเปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ จากใสเป็นขุ่น หรือพบการเจริญเติบโตของเชื้อรา แสดงว่า carrier มีเชื้อปนเปื้อน

4.5.5.5.2 Carriers viability control เพื่อให้มั่นใจว่า carrier ที่ dry แล้วยังมีเชื้อทดสอบอยู่

- ใช้ sterile hook เกี่ยว carrier ใน petri dish ที่ dry แล้ว 1 carrier ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose broth ปริมาตร 10 mL นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อ $27.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 วัน ทำการสุม carrier ก่อนและหลังการทดสอบตัวอย่างชุดนั้นๆ

อ่านผล โดยดูการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบ/ไม่พบ การเจริญเติบโตของเชื้อรา ดังนี้

ผ่าน คือ พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่ามีเชื้อใน carrier

ไม่ผ่าน คือ ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าไม่มีเชื้อใน carrier

4.5.5.5.3 Neutralization Confirmation

- ใช้ sterile hook เกี่ยว sterile carrier ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดสอบ ลนไฟปากหลอด ปิดฝา เขย่าเบาๆ และวางใน water bath เป็นระยะเวลา 10 นาที ± 5 วินาที

- เมื่อครบเวลา 10 นาที ± 5 วินาที ใช้ sterile hook เกี่ยว carrier จากหลอดตัวอย่าง ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose broth ปริมาตร 10 mL และเติมเชื้อทดสอบที่มีปริมาณเชื้อในช่วง 10 – 100 CFU ปริมาตร 1 mL เขย่าเบาๆ นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ $27.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 วัน

อ่านผล โดยดูการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

ผ่าน คือ พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ไม่ผ่าน คือ ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.5.5.5.4 การควบคุมการปนเปื้อนในตัวอย่าง

- ใช้ micropipette ดูดตัวอย่างปริมาตร 1 mL ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose broth ปริมาตร 10 mL นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 27.5 ± 2.5 °C เป็นเวลา 10 วัน

อ่านผล โดยดูการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้
ผ่าน คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ
ไม่ผ่าน คือ มีการเปลี่ยนแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ จากใสเป็นขุ่น หรือพบการเจริญเติบโตของเชื้อรา

4.5.5.5.5 Enumeration of viable fungi from carrier (carrier count) เพื่อบันทึกปริมาณเชื้อที่อยู่ใน carriers ซึ่งควรอยู่ในเกณฑ์ การยอมรับ 1×10^4 - 1×10^5 conidia/carrier ($\log_{10}$ 4-5)

- สุ่มเลือก carrier จาก petri dish ที่ dry แล้วทิ้ง 2 ชุดการทดสอบ โดยชุดที่ 1 สุ่มก่อนการทดสอบ 1 carrier /petri dish (สุ่ม 3 carriers) และชุดที่ 2 สุ่มเลือกทันทีหลังการทดสอบ 1 carrier /petri dish (สุ่ม 3 carriers)

- ใช้ sterile hook เกี้ยว carrier ใน petri dish ที่ dry แล้ว ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose broth ปริมาตร 10 mL ทั้ง 3 หลอด จากนั้นนำเข้าเครื่อง ultrasonic bath เวลา 60 ± 5 วินาที

- เสร็จอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 หลอด ใส่หลอดใหม่ เขย่า (ระดับความเจือจางที่ 10^{-1}) ทำการเจือจาง ด้วย 0.85% NaCl โดยใช้ micropipette ดูดเชื้อทดสอบจากระดับความเจือจางที่ 10^{-1} ปริมาตร 1 mL ใส่ลงในหลอด 0.85% NaCl ที่มีปริมาตร 9 mL จากนั้น vortex (ระดับความเจือจางที่ 10^{-2}) และเจือจางต่อจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-3}

- ใช้ micropipette ดูดเชื้อทดสอบ ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} – 10^{-3} ปริมาตร 0.1 mL ใส่ petri dish ทำ duplicate และ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose agar

- ตั้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วนำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 27.5 ± 2.5 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 วัน

5. ผลการทดลอง

ผลการนับปริมาณเชื้อ stock spore suspension ด้วยวิธี pour plate แสดงในตารางที่ 1 ผลการหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของการเตรียมเชื้อทดสอบ (standardize spore suspension) แสดงในตารางที่ 2 และผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 ผลการนับปริมาณเชื้อ stock spore suspension ด้วยวิธี pour plate

ควรรอยู่ในช่วงเกณฑ์ $125-155 \times 10^6$ conidia/mL ($\log_{10}$ 8.10 – 8.19) (AOAC 955.17, 2023)

ครั้งที่	ค่าความขุ่น (McFarland)	ปริมาณเชื้อ stock spore suspension (conidia/mL)	$\log_{10}$
1	0.89	6.4×10^5	5.81
2	0.75	5.8×10^5	5.76
3	0.65	4.1×10^5	5.61
4	0.96	7.2×10^5	5.86
5	0.73	3.9×10^5	5.59
6	0.60	4.0×10^5	5.60
7	0.56	8.4×10^5	5.92
8	0.44	2.8×10^5	5.45
9	0.61	2.0×10^5	5.30
10	0.68	8.2×10^5	5.91
11	0.74	8.0×10^5	5.90
ค่าต่ำสุด (Min)	0.44	2.0×10^5	5.30
ค่าสูงสุด (Max)	0.96	8.4×10^5	5.92
ค่าเฉลี่ย (Average)	0.69	5.5×10^5	5.74

ตารางที่ 2 ผลการหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของการเตรียมเชื้อทดสอบ (standardize spore suspension)
เกณฑ์การยอมรับ 1×10^4 - 1×10^5 conidia/carrier ($\log_{10}$ 4-5) (Health Canada, 2014, Appendix 3)

ครั้งที่	stock spore suspension		การเตรียมเชื้อ		ปริมาณเชื้อตั้งต้น	ปริมาณเชื้อ
			(เชื้อ+0.85% NaCl)		(CFU/mL)	carrier count
	(conidia/mL)	ความขุ่น	อัตราส่วน	ความขุ่น	($\log_{10}$)	(CFU/carrier)
	($\log_{10}$)	(McF)	(mL)	(McF)		($\log_{10}$)
1	6.4×10^5 (5.81)	0.89	5+50	0.15	4.85	3.89
2	5.8×10^5 (5.76)	0.75	5+50	0.14	4.70	3.56
3	4.1×10^5 (5.61)	0.65	5+50	0.15	4.64	3.51
4	7.2×10^5 (5.86)	0.96	5+50	0.16	4.85	3.83
5	3.9×10^5 (5.59)	0.73	5+50	0.15	4.72	3.95
6	2.8×10^5 (5.45)	0.44	39+50	0.18	5.08	4.15
7	2.8×10^5 (5.45)	0.44	39+50	0.18	5.04	3.95
8	2.0×10^5 (5.30)	0.61	75 + 100	0.20	5.48	4.36
9	2.0×10^5 (5.30)	0.61	75 + 100	0.20	5.49	4.26
10	8.2×10^5 (5.91)	0.68	70+150	0.23	5.41	4.45
11	8.2×10^5 (5.91)	0.68	70+150	0.23	5.41	4.26
12	8.2×10^5 (5.91)	0.68	65+100	0.23	5.53	4.34
13	8.2×10^5 (5.91)	0.68	65+100	0.23	5.45	4.53
ค่าต่ำสุด (Min)				0.14	4.64	3.51
ค่าสูงสุด (Max)				0.23	5.53	4.53
ค่าเฉลี่ย (Average)				0.19	5.13	4.08

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution

ผู้ทดสอบ A คือ นางสาวนิษฐา เอี่ยมละออ

ครั้งที่	กลุ่มสาร	วันที่ทดสอบ	ผู้ทดสอบ	ผลทดสอบ (Negative/ Total)	การควบคุมคุณภาพการทดสอบ						
					Carriers sterility	Carriers viability	Neutralization confirmation	การปนเปื้อน ในตัวอย่าง	Positive Sample	Negative Sample	Carrier count (log ₁₀)
1	Alcohols	10-20/8/69	A	60/60	✓	✓	✓	✓	✓	✓	4.36
			B	60/60	✓	✓	✓	✓	✓	✓	4.26
2	Aldehydes	21-31/8/69	A	60/60	✓	✓	✓	✓	✓	✓	4.45
			B	60/60	✓	✓	✓	✓	✓	✓	4.26
3	Phenolics	24/8/69- 3/9/69	A	60/60	✓	✓	✓	✓	✓	✓	4.34
			B	60/60	✓	✓	✓	✓	✓	✓	4.53

ผู้ทดสอบ B คือ นางสาววราภรณ์ ภูนาเหนือ

6. สรุปผลการทดลอง

จากผลการพัฒนาวิธีทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution พบว่า

1. ผลการทดลองเพาะเชื้อรามาตรฐาน และเก็บ stock spore suspension ทั้ง 11 ครั้ง ได้ปริมาณเชื้อ อยู่ในช่วง $2.0 \times 10^5 - 8.4 \times 10^5$ ($\log_{10}$ 5.30 – 5.74) conidia/mL ซึ่งมีปริมาณสปอร์น้อยกว่าที่วิธีมาตรฐานระบุไว้ประมาณ $125-155 \times 10^6$ conidia/mL ($\log_{10}$ 8.10 – 8.19) (AOAC 955.17) โดยอาจมีสาเหตุมาจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือขั้นตอนการกรองสปอร์เชื้อรา ยังมีความเหมาะสมไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้ได้ปริมาณสปอร์น้อยกว่าที่วิธีระบุ

2. ผลการทดลองหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของการเตรียมเชื้อทดสอบ (standardize spore suspension) ด้วยวิธี Enumeration of viable fungi from carrier (carrier count) ที่มีปริมาณเชื้ออยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ conidia/carrier ($\log_{10}$ 4-5) (Health Canada, 2014, Appendix 3)) พบว่า การเตรียมเชื้อที่มีความขุ่นในช่วง 0.20 - 0.23 McF จะได้ปริมาณเชื้ออยู่ในเกณฑ์การยอมรับมากที่สุด

3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution กับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ 3 กลุ่มสารสำคัญ ได้แก่ กลุ่ม Alcohols กลุ่ม Aldehydes และกลุ่ม Phenolics ตามอัตราส่วนที่ฉลากระบุ ที่ระยะเวลาสัมผัสเชื้อ 10 นาที โดยทดสอบตัวอย่างละ 2 ข้ำ ด้วยผู้ทดสอบ 2 คน พบว่า ทั้ง 3 ตัวอย่าง สามารถฆ่าเชื้อได้ตามอัตราส่วนฉลากบรรจุระบุ เท่ากับ 60/60 carriers, 60/60 carriers และ 60/60 carriers (Negative/total) ตามลำดับ โดยทุกตัวอย่าง ผ่านเกณฑ์การควบคุมคุณภาพ ได้แก่ Carriers sterility, Carriers viability, Neutralization confirmation การปนเปื้อนในตัวอย่าง และ Enumeration of viable fungi from carrier (carrier count) ทั้งหมด

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ห้องปฏิบัติการประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี Use-dilution และเพื่อยืนยันว่าวิธีการทดสอบของห้องปฏิบัติการมีความถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ จำเป็นต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) ต่อไป เพื่อนำวิธีทดสอบที่ถูกต้องและแม่นยำไปใช้ในการเพิ่มขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการ ในการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อชนิดฆ่าเชื้อรา ด้วยวิธี Use-dilution ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ต่อไป

7. ข้อเสนอแนะ

-

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่พิจารณาให้ดำเนินการในงบประมาณ 2569 ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ชูศักดิ์ อาจสูงเนิน ผู้เชี่ยวชาญด้านการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม

ที่ให้คำแนะนำและข้อมูลทางวิชาการที่เป็นประโยชน์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ และสัตวแพทย์ด้านรายด้านการปศุสัตว์ ที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International 21st Edition, 2023

Chermette, R., Ferreiro, L., & Guillot, J. (2008). Dermatophytoses in

animals. *Mycopathologia*, 166(5-6), 385–405. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9102-7>

Easy way to count spores and prepare spore suspension by Hemocytometer. Farhat A. Avin. Tennessee State University. December 2019.

Health Canada. Guidance document – Safety and efficacy requirements for hard surface disinfectant drug. January 2014

Hubka, V., Peano, A., Cmokova, A., & Guillot, J. (2018). Common and emerging

dermatophytoses in animals: well-known and new threats. In *Emerging and epizootic fungal infections in animals* (pp. 31-79). Cham: Springer International Publishing

Hurst, C. J. (2016). Opportunistic algae, fungi and ichthyosporea associated with

mammalian livestock disease. In *The Rasputin Effect: When Commensals and Symbionts Become Parasitic* (pp. 261-300). Cham: Springer International Publishing.

Ingraham, A., & Fleischer, T. M. (2003). Disinfectants in laboratory animal science: what are they and who says they work?. *Lab animal*, 32(1), 36–40. <https://doi.org/10.1038/labani0103-36>

International Organization for Standardization (ISO) Standard 16140, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Protocol for the Validation of Alternative Methods

Perry, K., & Caveney, L. (2011). Chemical Disinfectants. In *Veterinary Infection Prevention and Control* (pp. 129-143). [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119266037.ch7](https://doi.org/10.1002/9781119266037.ch7)

กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พ.ศ.2553 เรื่อง วิธีทดสอบและเกณฑ์ตัดสินผลการทดสอบประสิทธิภาพฆ่าเชื้อโรคบนพื้นแข็งที่ไม่มีรูพรุนของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรค ชนิดของเหลวหรือชนิดผงที่ละลายน้ำได้. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 128 ตอนพิเศษ 7 ง (ลงวันที่ 26 พฤศจิกายน พ.ศ. 2553)