



คู่มือ

การตรวจประเมินห้องปฏิบัติการ
ที่รับการถ่ายโอนภารกิจด้านการวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์
ทางจุลชีววิทยา



กรมปศุสัตว์

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

กลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการ

ผู้จัดทำ

นายชานนท์ ขำตา

นายสรเฉลิม ศักดิ์ศรี

เลขทะเบียนวิชาการ: 66(2)-0304-036

คู่มือการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการที่รับการถ่ายโอนภารกิจ
ด้านการวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์ทางจุลชีววิทยา

ผู้จัดทำ

นายชานนท์ ขำตา นายสรเฉลิม ศักดิ์ศรี

กลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการ

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

คู่มือการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการที่รับการถ่ายโอนภารกิจ ด้านการวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์ทางจุลชีววิทยา

นายชานนท์ ขำตา^{1/} นายสรเฉลิม ศักดิ์ศรี^{1/}

บทคัดย่อ

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ได้มีการถ่ายโอนภารกิจด้านการวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์ทางจุลชีววิทยา ตั้งแต่ปี 2554 แต่เนื่องด้วยปัจจุบันมาตรฐานวิชาการทางจุลชีววิทยา ข้อกำหนดประเทศคู่ค้า และระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการถ่ายโอนภารกิจด้านการวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์ มีการปรับปรุงเป็นฉบับใหม่ กลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ในฐานะหน่วยงานส่วนกลางของกรมปศุสัตว์ที่ทำหน้าที่ตรวจสอบ ควบคุม กำกับ ห้องปฏิบัติการเอกชนที่ขึ้นทะเบียนรับการ ถ่ายโอนภารกิจฯ จึงได้ศึกษา ค้นคว้า และรวบรวมมาตรฐานวิชาการทางจุลชีววิทยา ข้อกำหนดประเทศคู่ค้า และระเบียบของกรมปศุสัตว์ฉบับปัจจุบัน ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเนื้อหาไปจากเดิม นำมาจัดทำเป็นคู่มือที่มีเนื้อหาเป็นปัจจุบัน ซึ่งประกอบไปด้วยแนวทางการตรวจประเมินด้านบุคลากร สภาวะแวดล้อม วิธีทดสอบ การทวนสอบวิธีทดสอบ ความไม่แน่นอนของการวัด เครื่องใช้ อุปกรณ์ เครื่องมือ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและวัสดุอ้างอิง การสุ่มตัวอย่าง การระบุตัวอย่าง การจัดการตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่าง การประกันคุณภาพผลการทดสอบ และการรายงานผล เพื่อให้ผู้ตรวจประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ ซึ่งมาจากส่วนกลางและส่วนภูมิภาค สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการที่รับการถ่ายโอนภารกิจฯ ทางจุลชีววิทยา ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: คู่มือการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการ, ห้องปฏิบัติการที่รับการถ่ายโอนภารกิจด้านการวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์, การตรวจประเมินห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา

เลขทะเบียนวิชาการ: 66(2)-0304-036

^{1/} กลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Microbiological Designated Laboratory Assessment Manual

Chanon Khamta^{1/} Sornchalerm Suksri^{1/}

Abstract

Bureau of Quality Control of Livestock Products (BQCLP), Department of livestock development (DLD) has designated the microbiological livestock product testing, since 2011. The Laboratory Accreditation Division (LAD), BQCLP is the DLD's central authority which has responsibility to inspect, control and monitoring the livestock product testing designated laboratory. Because the international microbiological testing standard, importer's regulation and DLD's laboratory designation regulation had been revised, LAD studied, reviewed and summarized the up-to-date information from the revised standard and regulation for composing this manual which contained most recent information. The manual includes the microbiological laboratory assessment guidelines for personnel, environment, test method, verification of methods, measurement uncertainty, apparatus, device, equipment, media and reagent, reference cultures and reference materials, sampling, sample identification, sample handing, sample preparation, quality assurance of results and Test report. This manual provides the DLD's laboratory auditors whom from the central and local authorities with available appropriate assessment guidelines, for effective microbiological laboratory assessment.

Keyword: Laboratory Assessment manual, livestock product testing designated laboratory, microbiological laboratory assessment

Registered No.: 66(2)-0304-036

^{1/} Laboratory Accreditation Subdivision, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

คำนำ

มติคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ 11 พฤษภาคม 2553 เห็นชอบข้อเสนอให้มีการดำเนินการถ่ายโอนภารกิจด้านการตรวจสอบและรับรองคุณภาพมาตรฐานของส่วนราชการ ให้ภาคเอกชนหรือภาคส่วนอื่นรับไปดำเนินการแทน ซึ่งตั้งแต่ปี 2554 ถึงปัจจุบัน กรมปศุสัตว์ ได้มีการถ่ายโอนภารกิจด้านการตรวจวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์ ซึ่งประกอบด้วยการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาและทางด้านเคมี ให้กับห้องปฏิบัติการเอกชนและภาคส่วนอื่น ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยานั้นมีความสำคัญในการบ่งชี้การปนเปื้อนเชื้อก่อโรคและสุขอนามัยของสินค้าปศุสัตว์ และกรมปศุสัตว์ได้มีการถ่ายโอนภารกิจฯ การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาให้ห้องปฏิบัติการหลายแห่ง เจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์จะมีการเข้าตรวจประเมินห้องปฏิบัติการที่รับการถ่ายโอนภารกิจฯ อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าการดำเนินการของห้องปฏิบัติการนั้นมีประสิทธิภาพ สอดคล้องตามมาตรฐานสากล ข้อกำหนดประเทศคู่ค้า และระเบียบของกรมปศุสัตว์

เนื่องด้วยปัจจุบันมาตรฐานวิชาการทางจุลชีววิทยา ข้อกำหนดประเทศคู่ค้า และระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการถ่ายโอนภารกิจด้านการวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์ มีการปรับปรุงเป็นฉบับใหม่ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ภายใต้การดำเนินการของกลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการ ในฐานะหน่วยงานส่วนกลางของกรมปศุสัตว์ที่ทำหน้าที่ตรวจสอบ ควบคุม กำกับ ห้องปฏิบัติการเอกชนที่ขึ้นทะเบียนรับการถ่ายโอนภารกิจฯ ได้ศึกษา ค้นคว้า และรวบรวมมาตรฐานวิชาการทางจุลชีววิทยา ข้อกำหนดประเทศคู่ค้า และระเบียบของกรมปศุสัตว์ฉบับปัจจุบัน ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเนื้อหาไปจากเดิม มาจัดทำเป็นคู่มือ เพื่อให้ผู้ตรวจประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ ซึ่งมาจากส่วนกลางและส่วนภูมิภาค สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการที่รับการถ่ายโอนภารกิจฯ ทางจุลชีววิทยา ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งห้องปฏิบัติการที่ทำการตรวจวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยา สามารถใช้คู่มือฉบับนี้เป็นแนวทางในการปรับปรุงการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ผลทดสอบมีความน่าเชื่อถือและมั่นใจในความถูกต้องของผลทดสอบมากยิ่งขึ้น

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าคู่มือเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ตรวจประเมินห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ ทำให้สามารถตรวจประเมินการตรวจวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ด้านจุลชีววิทยา ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผู้จัดทำ

นายชานนท์ ขำตา

นายสรเฉลิม ศักดิ์ศรี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
หัวข้อในการตรวจประเมินทางวิชาการ	
1. บุคลากร (Personnel)	2
2. สภาพแวดล้อม (Environment)	5
3. วิธีทดสอบ (Test method)	13
4. การทวนสอบวิธีทดสอบ (Verification of methods)	15
5. ความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)	21
6. เครื่องใช้ อุปกรณ์ และเครื่องมือ (Apparatus, Device and Equipment)	24
7. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Media and Reagent)	37
8. เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและวัสดุอ้างอิง (Reference cultures and Reference materials)	47
9. การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)	49
10. การบ่งชี้ การจัดการ และการเตรียมตัวอย่าง (Sample identification, handing and preparation)	51
11. การประกันคุณภาพผลการทดสอบ (Quality assurance of results)	56
12. รายงานผล (Test report)	61
บรรณานุกรม	63
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	66
ภาคผนวก ข	68
ภาคผนวก ค	71

หนึ่งในหน้าที่ที่สำคัญของกรมปศุสัตว์ คือการเป็นหน่วยงานภาครัฐที่มีอำนาจหน้าที่ (competent authority) ในการกำกับ ดูแลการส่งออกและนำเข้าสินค้าปศุสัตว์ ได้แก่ เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์ และอาหารสัตว์ ซึ่งในการกำกับดูแลนั้น กรมปศุสัตว์จะต้องส่งตัวอย่างสินค้ามาทดสอบทางห้องปฏิบัติการ และใช้ผลทดสอบทางห้องปฏิบัติการนั้นมาประกอบการพิจารณาออกใบรับรองสุขภาพสัตว์ (health certificate) สำหรับสินค้าปศุสัตว์ส่งออก ซึ่งสินค้าในแต่ละวันมีจำนวนมาก ทำให้ใน พ.ศ.2564 กรมปศุสัตว์ได้มีการถ่ายโอนภารกิจด้านการตรวจวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์ให้กับห้องปฏิบัติการเอกชนและภาคส่วนอื่น แต่ในฐานะที่กรมปศุสัตว์เป็นหน่วยงานที่ดูแลข้อกำหนดที่เกี่ยวข้อง (regulation body) ของสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ยังคงต้องมีการตรวจสอบ ควบคุม กำกับ ห้องปฏิบัติการที่รับการถ่ายโอนภารกิจฯ ให้ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทดสอบที่มีมาตรฐาน เป็นที่ยอมรับของประเทศคู่ค้า ซึ่งผลทดสอบต้องมีความถูกต้อง แม่นยำ ผ่านกระบวนการตรวจประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะเป็นสิ่งที่ยืนยันได้ว่าสินค้าปศุสัตว์นั้นมีคุณภาพและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ

ระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการถ่ายโอนภารกิจด้านการวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์ พ.ศ.2564 ระบุว่า การตรวจประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการที่รับการถ่ายโอนภารกิจฯ ของกรมปศุสัตว์นั้น จะพิจารณาตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025 มาตรฐานวิชาการ รวมถึงหลักเกณฑ์การตรวจประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการ (กรมปศุสัตว์, 2564) โดยหลักเกณฑ์การตรวจประเมินฯ ด้านจุลชีววิทยาที่ใช้เป็นแนวทางในปัจจุบันคือ คู่มือการตรวจประเมินความสามารถทางวิชาการของห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ด้านจุลชีววิทยา (พิเชษฐและสมชาย, 2555) ซึ่งมีการจัดทำขึ้นตั้งแต่ พ.ศ.2555 จากการรวบรวมมาตรฐานวิชาการด้านจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้อง ซึ่งปัจจุบันเอกสารมาตรฐานวิชาการมีการเปลี่ยนแปลงหลายฉบับ และมีรายละเอียดที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากฉบับเดิม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ภายใต้การดำเนินการของกลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการ จึงได้จัดทำคู่มือฉบับนี้ขึ้น

เนื้อหาคู่มือฉบับนี้ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่ง ได้แก่ แนวทางการตรวจประเมินด้านบุคลากร สภาวะแวดล้อม วิธีทดสอบ การทวนสอบวิธีทดสอบ ความไม่แน่นอนของการวัด เครื่องใช้ อุปกรณ์ เครื่องมือ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและวัสดุอ้างอิง การส่งตัวอย่าง การระบุตัวอย่าง การจัดการตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่าง การประกันคุณภาพผลการทดสอบ และการรายงานผล พร้อมทั้งข้อเสนอแนะที่ได้มาจากการประสบการณ์ของผู้จัดทำ ซึ่งจะช่วยให้ผู้อ่านสามารถนำแนวทางการตรวจประเมินไปใช้กับการปฏิบัติงานจริงได้ดียิ่งขึ้น และส่วนที่สอง ซึ่งเป็นภาคผนวกที่ประกอบด้วย แนวทางในการกำหนดระยะเวลาการสอบเทียบ การทวนสอบประสิทธิภาพ และการบำรุงรักษาเครื่องมือประเภทต่าง ๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

หัวข้อในการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการ ที่รับการถ่ายโอนภารกิจด้านการวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์ทางจุลชีววิทยา

1. บุคลากร (Personnel)

แนวทางการตรวจประเมิน

1.1 การคัดเลือกบุคลากร

การทดสอบด้านจุลชีววิทยา จะต้องดำเนินการโดยบุคลากรที่มีความสามารถ หรือได้รับการควบคุมการปฏิบัติงานโดยบุคคลที่มีความรู้ และประสบการณ์ ดังนั้น ผู้ปฏิบัติงานวิเคราะห์ควรมีวุฒิการศึกษาสาขาจุลชีววิทยาหรือเทียบเท่า และต้องผ่านการทดสอบความสามารถหรือการทดลองปฏิบัติงานก่อนที่จะปฏิบัติงานจริง โดยมีหลักฐานที่แสดงได้ว่าบุคคลนั้น มีความรู้ ความสามารถและทักษะในงานที่ตนรับผิดชอบ

ห้องปฏิบัติการต้องมีบุคลากรอย่างน้อย 1 คน ที่มีคุณสมบัติเป็นผู้ดำเนินการ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ผู้ดำเนินการและผู้มีหน้าที่ปฏิบัติการตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

1.2 การฝึกอบรมเพื่อพัฒนาความรู้ ความสามารถและทักษะ

ห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาจะต้องมีการบริหารจัดการ เพื่อให้มั่นใจได้ว่าบุคลากรได้รับการฝึกอบรม เพื่อเพิ่มศักยภาพและความสามารถในการทดสอบและการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่าง ๆ โดยการฝึกอบรมจะต้องประกอบด้วย หลักสูตรเทคนิคขั้นพื้นฐานที่สำคัญต่อการดำเนินงานทดสอบ เช่น การผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ (plate pouring) การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ หรือการใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เป็นต้น โดยแต่ละหลักสูตรจะต้องกำหนดเกณฑ์ในการยอมรับไว้อย่างชัดเจน ในบางกรณีอาจจำเป็นต้องทดสอบความสามารถของบุคลากรโดยการให้ทดสอบตัวอย่างจริงและควรได้รับการเฝ้าระวังความสามารถอย่างต่อเนื่อง ความสามารถของบุคลากรต้องมีการจัดทำเป็นเอกสารซึ่งต้องสัมพันธ์กับ internal quality control และ external quality control โดยทั้งสองประเด็นนี้ควรนำไปใช้สำหรับการพิจารณาผลการฝึกอบรมและการทำการฝึกอบรมในอนาคตอีกด้วย

1.3 การทดสอบ/วิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบในแต่ละวิธีทดสอบ ต้องกระทำโดยผู้ที่ได้รับมอบหมายซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับแล้วเท่านั้น วิธีทดสอบหรือเทคนิคใด ๆ ที่ผู้ปฏิบัติงานไม่คุ้นเคยหรือไม่ได้ทำเป็นประจำจะต้องทำการทวนสอบความสามารถของบุคลากรผู้นั้นก่อนทำการทดสอบจริง การแปลผลการทดสอบเพื่อระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์และการทวนสอบ จะต้องกระทำโดยผู้มีความชำนาญในด้านการวิเคราะห์และควรมีการเฝ้าระวังความสามารถอย่างสม่ำเสมอ กรณีที่ห้องปฏิบัติการต้องแปลผลการทดสอบและให้ข้อเสนอแนะในใบรายงานผลการทดสอบจะต้องกระทำโดยผู้ได้รับมอบอำนาจที่มีความรู้และ

ประสบการณ์ที่เหมาะสมเท่านั้น บุคลากรในตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อการทดสอบจะต้องมีการสำรองบุคลากรไว้ด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ส่งผลกระทบต่อการทำงาน หลักฐานที่แสดงถึงความสามารถของบุคลากรต้องจัดทำเป็นหมวดหมู่และมีพร้อมไว้ ณ ห้องปฏิบัติการ โดยแยกไว้เป็นลำดับ เช่น การจัดการตัวอย่างก่อนการทดสอบ การตรวจสอบความใช้ได้ (validation) ของวิธีทดสอบ สมรรถนะในการทำงานที่ปฏิบัติอยู่เป็นประจำ การรายงานผลการทดสอบ การประกันคุณภาพ การใช้งานเครื่องมือแต่ละชนิด และการแปลผล (interpretations) เป็นต้น

1.4 สุขอนามัยส่วนบุคคล

บุคลากรต้องปฏิบัติตามหลักความสะอาดสำหรับห้องปฏิบัติการ ดังต่อไปนี้

- 1) ชุดที่ใส่ปฏิบัติงาน ต้องสะอาด อยู่ในสภาพดี ทำจากผ้าที่ติดไฟได้ยาก และไม่สวมใส่นอกบริเวณปฏิบัติงานหรือห้องเก็บชุด
- 2) มีการสวมใส่สิ่งป้องกันผมและหนวดเครา
- 3) เล็บควรตัดให้สั้นและสะอาด
- 4) เจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ รวมถึงผู้เยี่ยมชม ต้องล้างมือในน้ำอุ่น (โดยแนะนำให้ใช้ระบบที่ไม่ใช้การสัมผัสด้วยมือ) ทุกครั้งหลังเข้าห้องน้ำหรือทำงานทดสอบ ร่วมกับการใช้น้ำยาล้างมือที่มาจากเครื่องจ่ายที่สะอาด และเช็ดให้แห้งโดยกระดาษหรือผ้าที่ไม่ใช้ซ้ำ
- 5) ห้ามใช้ปากในการดูดปิเปตต์ (pipette)
- 6) ในเวลาปฏิบัติงานให้หลีกเลี่ยงการพูดคุยและการไอ
- 7) บุคคลที่ผิวหนังติดเชื้อหรือเจ็บป่วยควรระวังเชื้อโรคจะปนเปื้อนสู่การทดสอบ
- 8) ห้ามรับประทาน ดื่ม หรือจัดเก็บอาหารในห้องปฏิบัติการ

ที่มา : กระทรวงสาธารณสุข, 2561; สมชายและคณะ, 2555 และ Eurachem, 2023

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

บุคลากรของห้องปฏิบัติการทุกตำแหน่ง ถือว่าเป็นผู้ที่มีความสำคัญโดยเฉพาะตำแหน่งผู้วิเคราะห์ซึ่งมีผลต่อความถูกต้องของผลการทดสอบโดยตรง ดังนั้นห้องปฏิบัติการต้องมีเอกสารหลักฐานที่แสดงได้อย่างชัดเจนว่า บุคลากรเหล่านั้นมีความสามารถเพียงพอที่จะดำเนินการทดสอบนั้นได้อย่างถูกต้อง นำมาซึ่งผลการทดสอบที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ โดเมนของการประเมินต้องอ้างอิงจากเทคนิค หลักเกณฑ์ และวัตถุประสงค์ของแต่ละวิธีทดสอบนั้น ๆ เป็นสำคัญ นอกเหนือไปจากความรู้ความสามารถแล้ว บุคลากรในห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามหลักปฏิบัติที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการทางด้านจุลชีววิทยา เช่น ความสะอาดและสุขลักษณะอนามัยที่ดีในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ไม่เกิดความผิดพลาดของกระบวนการทดสอบที่มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อน อีกทั้งยังสร้างความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานเองอีกด้วย

ในทางปฏิบัติผู้ตรวจประเมินสามารถขอข้อมูลเอกสารดังต่อไปนี้ เพื่อประเมินความสามารถบุคลากร

- 1) แฟ้มประวัติบุคลากร
- 2) คำบรรยายลักษณะงาน (job description)
- 3) แผนและผลการฝึกอบรมตามลักษณะงานที่ได้รับมอบหมาย (on the job training) และผลการประเมินการฝึกอบรม
- 4) บันทึกการมอบหมายงาน

ในทางปฏิบัติผู้ตรวจประเมินสามารถขอข้อมูลเอกสารดังต่อไปนี้ เพื่อประเมินการตรวจสอบความสามารถในระหว่างระยะการปฏิบัติงาน

- 1) ผลการเฝ้าระวังความสามารถบุคลากรประจำปี
- 2) แบบสำรวจความต้องการฝึกอบรมและแผนการฝึกอบรมประจำปี

2. สภาวะแวดล้อม (Environment)

แนวทางการตรวจประเมิน

2.1 การออกแบบห้องปฏิบัติการ

2.1.1 การวางผังและความเหมาะสมของสถานที่

หลีกเลี่ยงการเกิดปนเปื้อนข้าม (cross contamination) เช่น

- 1) วางผังตามหลักการเข้าออกทางเดียว (no way back layout)
- 2) ปฏิบัติตามขั้นตอนอย่างเป็นลำดับโดยใช้ความระมัดระวัง เพื่อให้มั่นใจในความสมบูรณ์ของการทดสอบ และความสมบูรณ์ของตัวอย่าง (เช่น การใช้ภาชนะที่ปิดสนิท)
- 3) มีการแยกกิจกรรมที่เข้ากันไม่ได้ โดยแยกพื้นที่หรือแยกเวลา

ผนัง เพดาน และพื้นควรเรียบ โดยที่พื้นต้องไม่ลื่น ง่ายต่อการทำความสะอาด ทนต่อสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อที่ใช้

ประตูและหน้าต่างสามารถปิดได้ในขณะทำการทดสอบ หลีกเลี่ยงการเกิดบริเวณที่จะเป็นแหล่งสะสมของฝุ่น มีอุณหภูมิเหมาะสม 18-27 องศาเซลเซียส และแนะนำให้มระบบกรองอากาศทั้งขาเข้าและขาออก

การออกแบบห้องปฏิบัติการต้องสอดคล้องข้อกำหนดความปลอดภัยทางชีวภาพ ซึ่งพิจารณาตามลำดับความเสี่ยง (risk categories) ของเชื้อ ซึ่งห้องปฏิบัติการที่รับการถ่ายโอนภารกิจฯ การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา มักจะดำเนินการกับเชื้อระดับ 1 และ 2 ซึ่งการดำเนินการกับเชื้อระดับนี้จะแนะนำให้มีการแยกพื้นที่หรือออกแบบพื้นที่ต่าง ๆ ไว้เป็นส่วนชัดเจน

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา จะต้องมีการควบคุมการเข้าออกของ บุคคลผู้ได้รับอนุญาต และบุคลากรของห้องปฏิบัติการจะต้องให้ความเอาใจใส่และปฏิบัติตามโดยเคร่งครัด

2.1.2 การจัดแบ่งพื้นที่

ต้องประกอบไปด้วย 2 บริเวณ ที่ควรแยกออกจากกัน ดังนี้

1. บริเวณของการจัดการตัวอย่างและบริเวณทดสอบ

ต้องมีการแยกหรือกำหนดบริเวณดังต่อไปนี้ไว้อย่างชัดเจน

- 1.1) บริเวณรับและจัดเก็บตัวอย่าง
- 1.2) บริเวณเตรียมตัวอย่าง เช่น พื้นที่ที่เตรียมตัวอย่างที่เป็นผง และตัวอย่างดิบ ต้องแยกออกมาเนื่องจากมีโอกาสปนเปื้อนสูง
- 1.3) บริเวณทำการทดสอบตัวอย่าง ตั้งแต่ initial suspension รวมไปถึงบริเวณบ่มเพาะเชื้อ
- 1.4) บริเวณทดสอบเชื้อก่อโรค
- 1.5) บริเวณที่เก็บเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

- 1.6) บริเวณเตรียมและทำการปลอดเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อและเครื่องมือ
- 1.7) บริเวณเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
- 1.8) บริเวณที่ใช้ทำการฆ่าเชื้อ
- 1.9) บริเวณทำความสะอาดเครื่องแก้วและเครื่องมือ
- 1.10) บริเวณตรวจสอบความปลอดเชื้อของตัวอย่างอาหาร
- 1.11) บริเวณเก็บสารเคมีอันตราย ควรเก็บอยู่ในตู้ cabinet หรือห้องที่มี

การออกแบบเป็นพิเศษ

2. บริเวณทั่วไป

ควรมีการแยกบริเวณดังต่อไปนี้

- 2.1) ทางเข้า ทางเดิน (corridor) บันได และลิฟต์
- 2.2) บริเวณธุรการ
- 2.3) บริเวณเก็บสัมภาระ และห้องน้ำ
- 2.4) คลังเก็บเอกสารสำคัญ
- 2.5) โชนเก็บของ
- 2.6) ห้องพัก

พื้นที่สำหรับล้างหลังการจัดการปนเปื้อนแล้วสามารถอยู่ร่วมกับบริเวณอื่นได้ แต่ต้องมีการจัดการกับการตกค้างของสารทำความสะอาดหรือการปนเปื้อนของสารที่อาจจะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ห้องปฏิบัติการไม่ควรเคลื่อนย้ายเครื่องมือระหว่างพื้นที่เป็นประจำเพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้าม

ห้องปฏิบัติการงานด้านชีวโมเลกุล (molecular biology laboratory) อุปกรณ์ควรมีการแยกจากส่วนงานอื่น บริเวณที่เตรียม Polymerase Chain Reaction (PCR) primers และ probes ควรมีการแยกออกมา และขั้นตอนของ DNA amplification ควรทำในพื้นที่ซึ่งมีการจัดสรรไว้เฉพาะ

พื้นที่ในห้องปฏิบัติการควรเพียงพอที่จะสามารถจัดการให้เกิดความสะอาดและเป็นระเบียบเรียบร้อยอยู่เสมอ อีกทั้งต้องเหมาะสมกับปริมาณงานและจำนวนกิจกรรมย่อย ๆ ภายในห้องปฏิบัติงาน

ทิศทางการไหลของอากาศควรมีทิศทางเดียว (unidirectional) เพื่อช่วยลดการความเสี่ยงการเกิด cross contamination ซึ่งสามารถจัดการได้โดยให้อุปกรณ์ที่นำอากาศเข้า (air intake devices) อยู่ตรงกันข้ามกับอุปกรณ์ที่นำอากาศออก (air outtake devices)

2.1.3 การลดการปนเปื้อน

สามารถลดการปนเปื้อนได้โดย

- 1) พื้น ผนัง เพดาน และโต๊ะปฏิบัติงาน ควรมีผิวเรียบ ง่ายต่อการทำความสะอาด (ไม่แนะนำให้ใช้โต๊ะที่ปูด้วยกระเบื้อง)

- 2) รอยต่อระหว่าง พื้น ผนัง และเพดานมีลักษณะเว้า
- 3) เลี่ยงการใช้วัสดุที่มีความขรุขระ มีรูพรุน หรือดูดซับความชื้นและน้ำ เพื่อช่วยต่อการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ
- 4) ไม่ควรมีท่อพาดผ่านบนเพดาน อย่างน้อยควรมีการปิดมิดชิด รวมถึงสิ่งของที่อยู่นเหนือศีรษะควรมีการปกคลุมให้สามารถทำความสะอาดได้อย่างง่ายดาย
- 5) มีระบบกรองฝุ่นในอากาศก่อนหมุนเวียนเข้าห้องปฏิบัติการ
- 6) มีการแยกจุดล้างมือ แนะนำให้ใช้ระบบที่ไม่ใช้มือในการควบคุม
- 7) ตู้ที่ใช้มีการทำด้านบนของตู้เป็นลักษณะลาดเอียง (slope) เพื่อให้สะดวกต่อการทำความสะอาด
- 8) ไม่มีการใช้วัสดุที่ทำจากไม้ หรือมีการ seal พื้นผิวที่เป็นไม้
- 9) จัดวางสิ่งของและเครื่องมือให้ช่วยต่อการทำความสะอาด
- 10) ไม่ควรมีเฟอร์นิเจอร์ เอกสาร หรือสิ่งของอื่น ๆ นอกเหนือจากสิ่งจำเป็นในการทดสอบ
- 11) มั่นใจว่าประตูหน้าต่างสามารถปิดได้สนิท
- 12) มีการใช้อุปกรณ์ extraction เพื่อช่วยในการป้องกันการฟุ้งกระจายในระหว่างการเตรียม dehydrate media หรือการเตรียมตัวอย่างที่เป็นผง
- 13) หากดำเนินการทดสอบวิธีที่ต้องการปนเปื้อนต่ำ ควรมีการใช้ clean laminar airflow cabinet และ/หรือ safety cabinet

รายการที่กล่าวมานี้ไม่ได้กำหนดไว้อย่างตายตัว ถ้าไม่สามารถปฏิบัติได้ ห้องปฏิบัติการควรมีเอกสารหลักฐานแสดงถึงการควบคุมสุขลักษณะที่มีประสิทธิภาพ เช่น การทำความสะอาดพื้นผิวและโปรแกรมการตรวจสอบ (inspection program)

ห้องปฏิบัติการที่ตั้งอยู่ในสถานที่ผลิตสินค้า ต้องมีการตระหนักถึงโอกาสการปนเปื้อนที่จะมาจากบริเวณผลิต และต้องมีมาตรการป้องกันที่เหมาะสม

ในห้องปฏิบัติการ molecular เช่น PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ละเอียดอ่อน (sensitive) ทำให้ฝุ่นละอองหรือชิ้นส่วนเล็ก ๆ สามารถเป็นตัวที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของ DNA ได้ จึงควรมีการแยกพื้นที่หรือเวลาในแต่ละขั้นตอนของการวิเคราะห์ โดยเฉพาะพื้นที่ วัสดุ และอุปกรณ์ของ pre - amplification stages และ post - amplification stages ควรมีการแยกออกจากกัน ทั้งนี้ PCR biosafety cabinets สามารถนำมาใช้ได้เพื่อการควบคุมการปนเปื้อน

2.2 การเฝ้าระวังสภาพแวดล้อม

ห้องปฏิบัติการควรมีการตรวจสอบและบันทึกอุณหภูมิของพื้นที่ปฏิบัติงาน และมีการจัดทำโปรแกรมการเฝ้าระวังสภาพแวดล้อมตามระยะเวลาที่เหมาะสม เช่น การตรวจสอบพื้นผิว (ดูเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ โดยเฉพาะเชื้อก่อโรค) การทำ air settlement plates (ดูทั้งการปนเปื้อนแบคทีเรียและเชื้อรา) เป็นต้น การกระทำดังกล่าวต้องทำเป็นเอกสารที่แสดงถึงขอบเขตการยอมรับ

ของแต่ละพื้นที่ รวมถึงมีการวิเคราะห์แนวโน้มของข้อมูลเกี่ยวกับระดับของการปนเปื้อนด้วย ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการเฝ้าระวังในเรื่องไฟฟ้า โดยต้องมีเครื่องสำรองไฟฟ้าในกรณีที่ไฟฟ้าดับและต้องตรวจสอบการใช้งานสม่ำเสมอ

การตรวจสอบและบันทึกอุณหภูมิภายในห้องปฏิบัติการเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องดำเนินการเนื่องจากอุณหภูมิและสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการทดสอบ ซึ่งจะต้องควบคุมให้เป็นไปตามข้อกำหนดของวิธีวิเคราะห์

2.3 สุขลักษณะของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

ห้องปฏิบัติการ ต้องจัดทำโปรแกรมการทำความสะอาดภายในห้องปฏิบัติการ รวมถึงเครื่องมือและพื้นผิวอื่น ๆ และมีผลของการตรวจสอบที่แสดงถึงประสิทธิภาพของการทำความสะอาด และนำไปพิจารณาถึงโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนข้ามด้วย ควรมียุทธศาสตร์การปฏิบัติกรณที่เกิดการหกหรือรั่วไหล (spillage) ในส่วนของเครื่องแต่งกาย (protective clothing) จะต้องเหมาะสมกับการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ โดยต้องกำหนดมาตรการในการรักษาความสะอาดส่วนบุคคลของพนักงานเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจาก มือ เล็บ ผม หนวด และรองเท้า เป็นต้น protective clothing นั้นควรถอดออกเมื่อออกจากห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะในงาน molecular biology อาจจะมีการ cross contamination ระหว่างพื้นที่ที่มี high DNA load ไปยังพื้นที่ low DNA load ได้โดยไม่เจตนา

พื้น ผนัง เพดาน หลังเครื่องมือ เฟอร์นิเจอร์ และรอยต่อต่าง ๆ ควรมีการบำรุงรักษาอยู่เสมอไม่ให้มีรอยแตก ป้องกันการเกิดแหล่งสะสมของสิ่งปนเปื้อน พื้นผิวที่มีการปนเปื้อนควรทำการฆ่าเชื้อด้วยสารที่มีฤทธิ์สามารถกำจัดแบคทีเรียหรือราได้

ระบบหมุนเวียนอากาศพร้อมชุดกรองอากาศ ควรบำรุงรักษาเป็นประจำหรือมีการเปลี่ยนกรณีที่จำเป็น

ที่มา : สมชายและคณะ, 2555; Eurachem, 2023 และ ISO7218, 2014

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาต้องมีการจัดการสภาวะแวดล้อมเพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนข้ามจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนสูงไปสู่บริเวณที่ต้องการความสะอาด โดยการการวางผังที่เหมาะสมการจัดแบ่งพื้นที่หรือเวลาการปฏิบัติงาน การเลือกใช้และการติดตั้งอุปกรณ์ต่าง ๆ ทิศทางของอากาศอีกทั้งลักษณะทางโครงสร้าง พื้นผิว ของสถานที่และวัสดุของอุปกรณ์ต้องไม่มีจุดสะสมของสิ่งสกปรกอีกด้วย รวมไปถึงอุณหภูมิและความชื้นต้องเหมาะสมต่อวิธีทดสอบ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้อยู่ในบริเวณนั้น โดยการจัดการทั้งหลายเหล่านี้จะนำมาซึ่งความสะอาดในการปฏิบัติงาน ความถูกต้องและสมบูรณ์ของกระบวนการทดสอบ รวมทั้งลดความอันตรายที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างปฏิบัติงาน

ทั้งนี้ นอกจากจัดการที่เหมาะสมแล้ว ห้องปฏิบัติการต้องมีโปรแกรมการเฝ้าระวังสภาพแวดล้อมในส่วนต่าง ๆ ของห้องปฏิบัติการ เช่น สถานที่ อากาศ เครื่องมือ และอื่น ๆ อย่าง

เหมาะสม โดยมีหลักฐานที่แสดงถึงการดำเนินการอย่างต่อเนื่อง เพื่อผลจากการดำเนินการดังกล่าวจะเป็นสิ่งยืนยันได้ว่า การจัดการสภาพแวดล้อมนั้นมีประสิทธิภาพตลอดระยะเวลาที่มีการทดสอบ

ตัวอย่างการเฝ้าระวังสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

การควบคุมอุณหภูมิ

ทำการตรวจเช็คอุณหภูมิของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ความถี่ 2 ครั้งต่อวัน ในตอนเช้าภายหลังจากการเปิดเครื่องปรับอากาศเป็นเวลาประมาณ 30 นาที และในตอนบ่ายโดยอ่านค่าอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์ที่ติดตั้งไว้ในห้องแต่ละห้อง

กำหนดให้อุณหภูมิภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาจะควรอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงาน เช่น อุณหภูมิ 18-27 องศาเซลเซียส (ISO 7218, 2014) ยกเว้นบางกรณีที่ต้องมีการกำหนดอุณหภูมิที่จำเพาะ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด หรือเครื่องมือบางชนิดที่ต้องกำหนดอุณหภูมิในบริเวณนั้นตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

การควบคุมความชื้น

ทำการตรวจเช็คความชื้นภายในห้องที่ต้องการควบคุมความชื้นด้วย thermo-hygrometer หรือเครื่องมืออื่น ๆ ที่เหมาะสม ความถี่ 2 ครั้งต่อวันเช่นเดียวกับการควบคุมอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการ กำหนดให้ความชื้นสัมพัทธ์ในห้องที่ต้องการควบคุมขึ้นกับชนิดตัวอย่าง อุปกรณ์ หรือเครื่องมือที่ระดับความชื้นมีผลต่อการปฏิบัติงาน

การลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในภาวะแวดล้อมภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

ห้องปฏิบัติการสามารถลดปริมาณเชื้อ เช่น การเปิด UV ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทุกห้อง เป็นเวลา 30 นาทีทุกวัน นอกช่วงเวลาปฏิบัติงาน และ/หรืออีก 1 ชั่วโมงทุกวัน หลังเลิกปฏิบัติงานเป็นต้น โดยหลอด UV ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาควรเป็นรังสี UVC เนื่องจากมีความยาวคลื่นสั้น (short wave) โดยรังสี UVC มีความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร

การตรวจสอบคุณภาพของอากาศ

ห้องปฏิบัติการสามารถตรวจสอบคุณภาพของอากาศโดยวิธี Fallout Plate Technique อย่างน้อย 1 ครั้งต่อเดือน โดยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำจานเพาะเชื้อ (plate) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) และ/หรือ Potato Dextrose Agar (PDA) ไปวางตามจุดที่กำหนด
2. เปิดฝาและวาง plate ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที
3. เมื่อครบเวลาปิดฝา plate และนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่ม ในตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) ดังนี้

- 3.1) อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง โดยคว่ำ plate ลงและวางซ้อนกันไม่เกิน 6 plate โดยขณะบ่ม

ต้องวาง plate แต่ละกองห่างจากกัน และห่างจากผนัง incubator อย่างน้อย 25 มิลลิเมตร

3.2) อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยวาง plate ขึ้น และวางซ้อนกันไม่เกิน 3 plate โดยขณะบ่มต้องวาง plate แต่ละกองห่างจากกัน และห่างจากผนัง incubator อย่างน้อย 25 มิลลิเมตร และตลอดระยะเวลาที่ทำการบ่มห้ามเคลื่อนย้าย plate ของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเด็ดขาด เนื่องจากการเคลื่อนย้าย plate อาหารเลี้ยงเชื้ออาจทำให้เชื้อรามีการปล่อย spore ออกมา ซึ่งเมื่อสปอร์ตกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน plate จะทำให้สปอร์ดังกล่าวเจริญเป็นโคโลนีใหม่ซึ่งทำให้ได้ปริมาณของเชื้อราเพิ่มมากขึ้น (ISO 7218, 2014) เมื่อบ่มครบ 5 วัน หากไม่พบการเจริญของเชื้อ Yeast and Mold ให้บ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง

4. นำ plate อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ PDA มานับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญอยู่บน plate โดยกำหนดให้นำ plate อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มานับภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยปฏิบัติตามวิธีการปฏิบัติงานเรื่อง วิธีการใช้ และ บำรุงรักษาตู้ปลอดเชื้อ

5. นำจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA มารวมกับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

6. กำหนดให้ผลรวมของจำนวนโคโลนีที่นับได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ PDA จะต้องมีย่านน้อยกว่า 15 โคโลนี

(FAO, 1991)

การตรวจสอบพื้นผิวที่ปฏิบัติงาน

ตรวจสอบพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติงาน โดยวิธี Swab Contact Method อย่างน้อย 1 ครั้งต่อเดือน โดยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ sterile cotton swab จุ่มลงในหลอดที่บรรจุ Butterfield's phosphate buffered diluent ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

2. นำไป swab บนพื้นผิวที่ต้องการทดสอบเป็นบริเวณกว้างประมาณ 10 ตารางเซนติเมตร (cm^2) ตามจุดที่กำหนดไว้

3. นำ cotton swab ใส่ลงในหลอดที่บรรจุ Butterfield's phosphate buffered diluent ปริมาณ 10 มิลลิลิตร โดยหักปลายไม้บริเวณที่สัมผัสกับมือออก

4. นำไปทดสอบหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดโดยปฏิบัติตามการทดสอบหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

(APHA-Compendium, 2015)

5. คำนวณผลการทดสอบดังสูตรต่อไปนี้

$$N_s = (N \times F)/A \times D$$

เมื่อ N_s คือ ปริมาณเชื้อบนพื้นผิวที่ปฏิบัติงาน

เมื่อ N คือ จำนวนโคโลนีที่นับได้

เมื่อ F คือ ปริมาตรของสารละลายที่บรรจุภายในหลอด swab (มิลลิลิตร)

เมื่อ D คือ ค่าความเจือจาง (dilution factor) ที่ใช้

เมื่อ A คือ พื้นที่ที่ใช้ในการ swab (cm^2)

6. กำหนดให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดบนพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติงานต้อง ≤ 200 CFU/100 cm^2

(ISO 18593, 2018)

การตรวจสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของหลอด UV

ตรวจสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของหลอด UV อย่างน้อย 1 ครั้งต่อ 2 เดือน ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ใช้ปิเปตต์ (pipette) ดูดสารละลายเชื้อมาตรฐาน *Klebsiella aerogenes* ความเข้มข้น 2.0×10^3 - 2.5×10^3 CFU/มิลลิลิตร มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน plate อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ที่มีผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง (เพื่อให้มีปริมาณของเชื้ออยู่ในช่วง 200 - 250 โคโลนี/plate)

2. ทำการ spread plate โดยใช้ spreader ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว spread ให้ทั่วจนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

3. นำ plate จากข้อ 2. จำนวน 2 plate ไปวางไว้ภายใต้ fluorescent lamp เพื่อใช้เป็นชุด Control

4. เปิดฝา plate และเปิดหลอดไฟ fluorescent

5. ปลดปล่อยให้ plate วางอยู่ภายใต้แสงไฟ fluorescent เป็นเวลา 2 นาที ปิดไฟและปิดฝา plate

6. นำ plate จากข้อ 2. ไปวางไว้ภายใต้หลอด UV ตามจุดที่ห้องปฏิบัติการกำหนดไว้ใน จำนวนจุดละ 2 plate เพื่อใช้เป็นชุดทดสอบ

7. เปิดฝา plate และเปิดหลอดไฟ UV

8. ปลดปล่อยให้ plate วางอยู่ภายใต้แสงไฟ UV เป็นเวลา 2 นาที ปิดไฟและปิดฝา Plate

9. นำ plate จากข้อ 5. และข้อ 8. ไปบ่มใน incubator อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง โดยให้คว่ำ plate ลง และนำ plate วางซ้อนกัน ไม่เกิน 6 plate โดยขณะบ่มต้องวาง plate แต่ละกองห่างจากกันและห่างจากผนัง incubator อย่างน้อย 25 มิลลิเมตร (ISO7218, 2014)

10. นำมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Klebsiella aerogenes* บนแต่ละ plate และหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Klebsiella aerogenes* ที่นับได้จาก plate ของชุดควบคุม (Control) และ plate ของชุดทดสอบในแต่ละจุด

11. คำนวณหาประสิทธิภาพของหลอด UV ในการฆ่าเชื้อ

$$\text{ประสิทธิภาพของหลอด UV ในการฆ่าเชื้อ (\%)} = 100 - \left[\frac{\text{จำนวนโคโลนีของเชื้อ } K. \text{ aerogenes} \text{ จากชุดทดสอบ} \times 100}{\text{จำนวนโคโลนีของเชื้อ } K. \text{ aerogenes} \text{ จาก Control}} \right]$$

12. กำหนดให้ประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของหลอด UV ต้อง >80% ถ้าประสิทธิภาพของหลอด UV <80% ให้ทำการหาสาเหตุและดำเนินการแก้ไข

(FAO, 1991)

3. วิธีทดสอบ (Test method)

แนวทางการตรวจประเมิน

3.1 การเลือกใช้วิธีทดสอบ

ห้องปฏิบัติการควรเลือกใช้วิธีทดสอบที่เหมาะสม โดยแนะนำให้ใช้วิธีมาตรฐาน (standard method) ตัวอย่างเช่น International Organization for Standardization (ISO) เป็นต้น และควรเป็นเอกสารฉบับล่าสุด ซึ่งส่วนใหญ่วิธีดังกล่าวนี้มีการตรวจสอบความใช้ได้ (validation) แล้ว ในกรณีที่ห้องปฏิบัติการใช้วิธีที่ออกแบบขึ้นเองหรือดัดแปลงวิธีทดสอบมาตรฐานมาใช้ นอกเหนือจากข้อบ่งชี้ของวิธีจะต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้เพิ่มเติม สำหรับการใชชุดทดสอบ (test kit) จะต้อง มีข้อมูลของการตรวจสอบความใช้ได้แบบเต็มรูปแบบของวิธีทดสอบจากผู้ผลิตและต้องมีข้อมูลด้านระบบคุณภาพจากผู้ผลิต ถ้าไม่มีข้อมูลดังกล่าวห้องปฏิบัติการจะต้องดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบที่ใชชุดทดสอบนั้นก่อนการใช้งาน โดยการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบจะต้อง สะท้อนถึงสภาวะการทดสอบจริง ซึ่งอาจต้องใช้ตัวอย่างที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ หรือตัวอย่างที่ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์นำมาเติม (spike) เชื้อจุลินทรีย์ในระดับที่กำหนด ซึ่งอาจทำได้ในลักษณะ สารละลายของเชื้อ

ถึงแม้ห้องปฏิบัติการจะใช้วิธีมาตรฐานซึ่งทำการตรวจสอบความใช้ได้แล้ว แต่ห้องปฏิบัติการ ยังคงต้องมีการทดสอบการนำไปใช้ได้ ซึ่งเรียกว่าการทวนสอบ (verification) วิธีทดสอบด้วยแนวทางที่เชื่อถือได้

3.2 การดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ

ห้องปฏิบัติการต้องจัดทำขั้นตอนการดำเนินงานควบคุมเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการจัดทำและการทบทวนวิธีทดสอบ การดำเนินการทดสอบจะต้องไม่ปฏิบัติให้เบี่ยงเบนไปจากวิธีทดสอบที่กำหนดไว้ โดยไม่ได้รับอนุญาต หากวิธีทดสอบเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเองจะต้องกำหนดแผนงานและดำเนินการโดยผู้ที่มีคุณสมบัติเหมาะสม และอย่างน้อยเอกสารวิธีทดสอบดังกล่าวจะต้องประกอบด้วยหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

- 1) ขอบข่าย
- 2) เอกสารอ้างอิง
- 3) หลักการและคำจำกัดความ
- 4) สารเคมีและวัสดุ
- 5) อุปกรณ์
- 6) วิธีการสุ่มตัวอย่าง (ตัวอย่างทดสอบ และตัวอย่างที่ถูกแบ่งแยกออกมา)
- 7) วิธีทดสอบ
- 8) การรายงานผลการทดสอบ

- 9) การควบคุมจุดวิกฤต
- 10) วิธีการที่ระบุได้ว่าวิธีทดสอบเป็นที่ยอมรับแล้ว
- 11) ประวัติการทบทวนเอกสารวิธีทดสอบ
- 12) การควบคุมความปลอดภัย

ที่มา : สมชายและคณะ, 2555 และ Eurachem, 2023

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

การเลือกใช้วิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการนอกจากควรจะเป็นไปตามแนวทางวิธีมาตรฐานแล้ว ผู้ประเมินของกรมปศุสัตว์ต้องพิจารณาข้อกำหนดของประเทศคู่ค้า เกณฑ์ทางด้านจุลชีววิทยาของกรมปศุสัตว์ นโยบาย และมาตรการของกรมปศุสัตว์ร่วมด้วย ตัวอย่างเช่น การทดสอบ *Salmonella* spp. ในเนื้อสัตว์ปีก เพื่อวัตถุประสงค์ในการส่งออกสินค้าไปสหภาพยุโรป ต้องใช้วิธี ISO 6579 หรือวิธีเทียบเท่า (equivalent) ซึ่งระบุไว้ในเอกสาร The European Regulation EC 2073/2005 และการทดสอบ *Campylobacter* spp. ในตัวอย่าง นังคอสัตว์ปีก ต้องใช้วิธี ISO 10272-2 ตามที่ระบุไว้ในเอกสาร COMMISSION REGULATION (EU) 2017/1495 เนื่องจากกรมปศุสัตว์มีการถ่ายโอนภารกิจฯ เพื่อดำเนินการตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป เป็นต้น รวมทั้งต้องตรวจสอบเพิ่มเติมด้วยว่าวิธีทดสอบที่ใช้นั้นเป็นฉบับปัจจุบัน เช่น ISO 6579 ฉบับปัจจุบันคือ ISO 6579-1 : 2017/Amd 1 : 2020 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงช่วงอุณหภูมิของการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดไปจากเอกสารฉบับเดิม เป็นต้น

4. การทวนสอบวิธีทดสอบ (Verification of methods)

แนวทางการตรวจประเมิน

4.1 ขั้นตอนการ Verification of method

แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

Implementation verification ห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบผลที่ได้จาก verification กับผลที่ได้จาก validation

(Food) item verification ห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบผลที่ได้จาก verification กับเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดไว้ โดยตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา (food) item verification ควรเป็นตัวอย่างที่อยู่ในขอบข่ายการทดสอบของห้องปฏิบัติการ

4.2 การเลือก category ของตัวอย่างสำหรับทวนสอบวิธีการทดสอบ

4.2.1 Implementation verification

กรณีวิธีทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative method) ที่การใช้งานเป็น broad range of foods (≥ 5 food categories) และ limited range of food (< 5 food categories) ห้องปฏิบัติการสามารถเลือกได้ 1 food item จาก category ที่มีข้อมูล validation study ทั้งนี้ต้องเป็น category ที่เป็นขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการดำเนินการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามกรณี food item ที่มี validation study นั้นไม่อยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการดำเนินการวิเคราะห์ ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องเลือก 1 food item จาก validation study เพื่อมาทำการทดสอบ implementation verification

กรณีวิธีทดสอบเชิงปริมาณ (quantitative method) ที่การใช้งานเป็น broad range of foods (≥ 5 food categories) และ limited range of food (< 5 food categories) ห้องปฏิบัติการสามารถเลือก food item ใด ๆ ก็ได้จาก category ที่เป็นขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการดำเนินการวิเคราะห์ แต่ต้องเป็น category ที่อยู่ในขอบข่ายของการ validation

4.2.2 (Food) item verification

กรณีวิธีทดสอบที่การใช้งานเป็น broad range of foods (≥ 5 food categories) ให้ทำการเลือก 1 challenging food item จากแต่ละ category ที่มีข้อมูล validation study ทั้งนี้ต้องเป็น category ที่เป็นขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการดำเนินการวิเคราะห์

กรณีวิธีทดสอบที่การใช้งานเป็น limited range of food (< 5 food categories) ให้ทำการเลือกอย่างน้อย 1 challenging food item จาก category ที่มีข้อมูล validation study ทั้งนี้ต้องเป็น category ที่เป็นขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการดำเนินการวิเคราะห์

หมายเหตุ : กรณีวิธีทดสอบที่ต้องการใช้ทดสอบ other category เช่น pet food และ animal feed, environmental sample และ primary production sample เป็นต้น ไม่ว่าจะเป็น broad range of foods (≥ 5 food categories) และ limited range of food (< 5 food categories) ให้เลือก 1 food item จากแต่ละ other category ที่มีข้อมูล validation study ทั้งนี้ ต้องเป็น category ที่เป็นขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการดำเนินการวิเคราะห์ นำมาทำการทดสอบ (food) item verification

4.3 การทดสอบวิธีทดสอบ qualitative method

4.3.1 Estimated LOD₅₀ (eLOD₅₀) determination

ให้ดำเนินการตามเงื่อนไขต่อไปนี้

- 1) ใช้ในการประเมินผล verification ทั้ง implementation verification และ (food) item verification
- 2) นำค่า LOD₅₀ จาก validation study มากำหนดปริมาณการปนเปื้อนในแต่ละช่วง ($1 \times \text{LOD}_{50}$ ถึง $9 \times \text{LOD}_{50}$) ซึ่งในกรณีที่วิธีมาตรฐานไม่มีค่า LOD₅₀ ให้ใช้ 1 CFU/test portion
- 3) ห้องปฏิบัติการต้องเลือก protocol ที่ใช้สำหรับ verification (ดังแสดงในตารางที่ 1) โดยเลือกตามความเหมาะสม

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของระดับของเชื้อที่ใช้ในแต่ละ protocol

protocol	Inoculation level of the test portion					Total number of replicates
	High level 9 x LOD ₅₀ / test portion	Intermediate level 3 x LOD ₅₀ / test portion	Low level 9 x LOD ₅₀ / test portion	3-5 CFU/ test portion	Blank	
1	1	4	4	-	1	10
2	-	3	5	-	1	9
3	-	-	-	7	1	8

Note : ตัวย่อ colony forming unit คือ CFU

4) เกณฑ์ในการเลือกใช้ protocol

Protocol ที่ 1 : ใช้เมื่อ มีความไม่แน่นอนในการบรรจุระดับการปนเปื้อนที่ต้องการหรือไม่ทราบระดับการปนเปื้อนที่แน่ชัดของ inocula (inoculation โดย reference culture)

Protocol ที่ 3 : ใช้เมื่อ ทราบระดับการปนเปื้อนที่แน่นอน (inoculation โดย reference material)

Protocol ที่ 2 : ใช้เมื่อ ทำตาม protocol 1 แล้วไม่สำเร็จ และต้องการทำซ้ำ

- 5) การใส่ target microorganism ต้องใส่ใน initial suspension
- 6) การเจือจาง (dilution) ให้ได้เชื้อที่ระดับที่ต้องการ ต้องทำ dilution ระหว่างระดับในอัตราส่วน 1 : 3 เสมอ
- 7) ทำการทดสอบตั้งแต่ขั้นตอนแรก ถึงขั้นยืนยันผลการทดสอบ (confirmation)
- 8) กรณีที่ใช้ protocol 1 และ 2 ให้เทียบผลกับตารางที่ 3 ใน ISO 16140-3
- 9) ทำการนับจำนวนเชื้อใน inocula ควบคู่ไปกับการทดสอบ โดย protocol ที่ 1 จะเป็นการนับที่ระดับ high level และ protocol ที่ 2 จะเป็นการนับที่ระดับ intermediate level ทั้งนี้ให้นับเชื้อตามที่ ISO 7218 กำหนด
- 10) ผลการทดสอบผ่าน Acceptability limits ของ protocol ที่เลือกใช้ ดังนี้
 Protocol ที่ 1 และ 2 : $eLOD \leq 4 \times LOD_{50}$ CFU/test portion
 Protocol ที่ 3 : ตรวจพบ Positive ≥ 6 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด
 Blank ต้องไม่เกิดผลบวก
 High level : $9 \times LOD_{50}/\text{test portion}$ ต้องให้ผลเป็นบวกเท่านั้น ถ้าเป็นลบให้ทำซ้ำเดิมกับทุกระดับ
- 11) กรณีผลการทดลอง ไม่อยู่ใน acceptability limits ให้ดำเนินการหา root cause analysis และทำการทวนสอบวิธีใหม่อีกครั้ง

4.4 การทวนสอบวิธีทดสอบ quantitative method

4.4.1 Intra-laboratory reproducibility standard deviation (S_R) determination

ให้ดำเนินการตามเงื่อนไขต่อไปนี้

- 1) ใช้สำหรับประเมินผล implementation verification เท่านั้น
- 2) ห้องปฏิบัติการควรเลือก food item สำหรับทดสอบที่สามารถทำให้มีความเป็นเนื้อเดียวกันได้ดี เพื่อลดความแปรปรวนจาก matrix uncertainty
- 3) ทำการทดสอบตั้งแต่รอบตั้งแต่ขั้นตอนแรก ถึงขั้นยืนยันผลการทดสอบ (confirmation)
- 4) ใช้ตัวอย่างในการทดสอบอย่างน้อย 10 ตัวอย่าง โดยเลือก food item ที่อยู่ในขอบเขตของ validation study ซึ่งอาจจะเลือกจาก batch number ที่แตกต่างกัน หรือผลิตโดยผู้ผลิตที่ต่างกันก็ได้ (สามารถทำการทดสอบมากกว่า 10 ตัวอย่างเพื่อให้ครอบคลุมผลการทดสอบที่อาจมีบางค่าที่ถูกต้องเนื่องจากการใช้การประเมินผลไม่ได้)
- 5) ระดับการปนเปื้อนที่ใช้ ต้องเป็นตัวแทนของช่วงการปนเปื้อนตามธรรมชาติที่ตรวจพบในตัวอย่างของห้องปฏิบัติการ

6) ผสมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized) ก่อนแบ่งออกเป็น 2 test portion เพื่อกระจายเชื้อให้ทั่ว

7) สามารถทำได้ทั้ง artificial contamination ที่ทราบระดับการปนเปื้อนของเชื้อ และ Natural contamination โดยหากตัวอย่าง natural contamination มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 10 CFU/g ใน 1 test portion ให้เติมเชื้อ ลงในตัวอย่าง (artificial contamination) ให้มีปริมาณเชื้อครอบคลุมช่วงการทดสอบของวิธี โดยระดับของการปนเปื้อนของเชื้อจาก artificial contamination นั้นต้องครอบคลุมช่วงการทดสอบและครอบคลุมการปนเปื้อนในธรรมชาติ ซึ่งสามารถทำได้ด้วยการทำ dilution หรือการใช้ inoculation volume ที่ต่างกัน โดยต้องมั่นใจว่าจะไม่มีผลต่อความสมบูรณ์ของตัวอย่าง (ไม่ควรเติม inoculation volume มากกว่า 1 มิลลิลิตร/ test portion) ในการเติมให้เต็มในช่วง initial suspension

8) เงื่อนไขการทดสอบ (Test condition) ที่ใช้ในการทดสอบระหว่าง test portion A และ test portion B ต้องมีความหลากหลาย เช่น ผู้ที่ทำการทดสอบต่างคน, batch Number ของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่แตกต่างกัน และเครื่องมือต่างกัน เป็นต้น

9) เกณฑ์การทดสอบ (acceptability limits) คือ $S_{IR} \leq 2 \times S_R$ Lowest mean value determined in the validation study

10) กรณีผลการทดลองไม่อยู่ใน acceptability limits ให้ดำเนินการหา root cause analysis และทำการทวนสอบวิธีทดสอบใหม่อีกครั้ง

4.4.2 Estimated bias (eBias) determination

ให้ดำเนินการตามเงื่อนไขต่อไปนี้

- 1) ใช้สำหรับประเมินผล (food) item verification เท่านั้น
- 2) ต้องทำการทดสอบตั้งแต่ขั้นตอนแรก ถึงขั้นยืนยันผลการทดสอบ (confirmation)
- 3) ทำ artificial contamination จำนวน 3 levels ที่ครอบคลุมช่วงการปนเปื้อนตามธรรมชาติของตัวอย่างของห้องปฏิบัติการ (หรือสามารถทำมากกว่า 3 levels) โดยให้ทำซ้ำในทุก levels ซึ่งในแต่ละ level ให้ดำเนินการดังวิธีต่อไปนี้

Uninoculated test portion (negative control/blank) ของแต่ละ test portion : เพื่อหาค่า background contamination level แล้วจดบันทึกไว้สำหรับใช้เป็นข้อมูลประกอบการหา root cause analysis กรณีผลการทดสอบไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

Artificially contaminated (food) item : โดยการเติมเชื้อลงในแต่ละ test portion

Inoculum suspension without (food) item : โดยการเติมเชื้อลงใน initial suspension ที่ไม่มี test portion

4) การประเมินผลในการหาค่า eBias คือ การเปรียบเทียบผลของ artificially contaminated (Food) item (ในรูป $\log_{10}$ CFU/test portion) กับ inoculum suspension without (food) item (ในรูป $\log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร)

5) มีเกณฑ์การยอมรับ (acceptability limits) คือ $eBias \leq 0.5 \log_{10}$ CFU ในแต่ละ inoculation level

4.5 การทวนสอบวิธีมาตรฐานที่ยังไม่ได้ทำการ validation

วิธีมาตรฐานที่ยังไม่ได้ทำการ validation ให้ผู้ปฏิบัติงานดำเนินการตาม protocol ใน annex F ใน ISO 16140-3 : 2021 จนกว่าวิธีทดสอบเหล่านั้นจะได้รับการ validation โดยคณะกรรมการ ISO (International Organization for Standardization) หรือ CEN (European Committee for Standardization) Implementation verification ไม่ต้องการทดสอบ

(Food) item verification โดยเลือก food item ที่เป็น challenging Food จาก category ที่ห้องปฏิบัติการจะนำมาประยุกต์ใช้ในงานทดสอบ รายละเอียดดังนี้

1) กรณีวิธีทดสอบที่ผล validation เป็น broad range of foods ให้ทำการเลือกอย่างน้อย 5 challenging food item และ 1 non - challenging food item จาก category ในขอบข่ายของวิธีมาตรฐาน และเป็น category ที่เป็นขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการดำเนินการวิเคราะห์

2) กรณีวิธีทดสอบที่ผล validation method เป็น limited range of food ให้ทำการเลือก 3 challenging food item และ 1 non - challenging food item จาก category ในขอบข่ายของวิธีมาตรฐาน และเป็น category ที่เป็นขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการดำเนินการวิเคราะห์

ที่มา : ISO 16140-3, 2021

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

จากเดิมที่การ verification ของวิธีวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยาภายในห้องปฏิบัติการนั้น จะต้องมีการนำบางขั้นตอนของมาตรฐานการ validation คือ ISO 16140-2 มาเทียบเคียงและประยุกต์ใช้ ทำให้เกิดความยุ่งยากซับซ้อนและเกิดข้อถกเถียงในเรื่องของการนำมาประยุกต์ใช้ แต่ปัจจุบันทางหน่วยงาน ISO ได้มีการออกเอกสาร ISO 16140-3 สำหรับการ verification ภายในห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะ ห้องปฏิบัติจึงไม่ต้องทำการประยุกต์ใช้แบบในอดีตที่ผ่านมา เพียงแต่ต้องดำเนินการให้สอดคล้องตาม ISO 16140-3 ทุกขั้นตอนเท่านั้น

ทั้งนี้เอกสาร ISO 16140-3 นั้นยังมีความซับซ้อนในการดำเนินการบางขั้นตอน เช่น ประเภทและจำนวนของ category ที่นำมาทดสอบ เช่น การเลือกตัวอย่างที่มาจากความ challenge มา

ทำการทดสอบ (food) item verification ซึ่งผู้ตรวจประเมินต้องให้ความสำคัญกับประเด็นดังกล่าวอีกทั้งบางวิธีทดสอบเป็นวิธีมาตรฐานไม่มีข้อมูลข้อมูลค่า S_R อาจจะพิจารณาดำเนินการตาม annex F

ในทางปฏิบัติผู้ตรวจประเมินสามารถขอเอกสารดังต่อไปนี้ เพื่อประเมินการทวนสอบวิธีทดสอบ

- วิธีปฏิบัติงานเรื่องการทวนสอบวิธีทดสอบ
- รายงานผลการทวนสอบวิธีทดสอบ
- รายงานผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

5. ความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

แนวทางการตรวจประเมิน

5.1 การประมาณค่าความไม่แน่นอนวิธีทดสอบ Quantitative method

ห้องปฏิบัติการต้องมีการการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในรูปแบบ การประมาณค่าความไม่แน่นอนรวม (Combined Standard Uncertainty หรือ $U_c(y)$) คือการประมาณค่าจากผลรวมของค่าความไม่แน่นอน 3 ส่วน ได้แก่

- Technical Standard Uncertainty (U_{tech}) หมายถึง ความไม่แน่นอนจากเทคนิคการปฏิบัติ
- Matrix Standard Uncertainty (U_{matrix}) หมายถึง ความไม่แน่นอนจากชนิดของตัวอย่าง
- Distributional Standard Uncertainty (U_{distrib}) หมายถึง ความไม่แน่นอนของการกระจายของเทคนิคของวิธีทดสอบที่เลือกใช้

5.1.1 Technical Standard Uncertainty (U_{tech})

ดำเนินการหาค่า intra-laboratory reproducibility (S_R) ในทุกวิธีทดสอบ โดย

- ทำการทดสอบตัวอย่าง 1 ชนิด
- ทำอย่างน้อย 10 ตัวอย่าง จากตัวอย่างของห้องปฏิบัติการ (ไม่ต้องแยกระดับการปนเปื้อน)
 - แต่ละตัวอย่างทำ 2 ซ้ำ โดยใช้ผู้ทดสอบต่างคนข้อมูลที่ได้จากแต่ละตัวอย่างควรทำในช่วงระยะเวลา (period of time) ที่กำหนดไว้เป็นพิเศษ (special exercise) หรือจากงานควบคุมคุณภาพที่ทำเป็นประจำ (routine)
 - จะต้องทำภายใต้การเปลี่ยนแปลงเงื่อนไขที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด เช่น ปฏิบัติงานทดสอบโดยพนักงานต่างกัน ปฏิบัติงานช่วงเวลาต่างกัน ใช้เครื่องมือต่างเครื่องกัน ใช้สารเคมีหรืออาหารเลี้ยงเชื้อต่าง batch กัน หรือตัวแปรอื่น ๆ ที่อาจมีผลกระทบ
 - เก็บรวบรวมข้อมูลผลการทดสอบ นำผลการทดสอบมาเปลี่ยนเป็นค่า $\log_{10}$ โดยข้อมูลที่นำไปใช้ต้องเป็นข้อมูลที่มีจำนวนนับรวมบน plate ตั้งแต่ 30 โคโลนีขึ้นไปและอยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการนับเชื้อจุลินทรีย์ของวิธีทดสอบนั้น ๆ

5.1.2 Matrix uncertainty (U_{matrix})

ต้องนำมาจาก 3 แหล่งที่มา ได้แก่

- 5.1.2.1. ใช้ $0.1 \log_{10}$ กรณีที่ห้องปฏิบัติการมีการเตรียมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

5.1.2.2. จากการหาค่า standard deviation ของการทำซ้ำจากตัวอย่างในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (within laboratory sample repeatability) สามารถเลือกทำได้ 2 วิธี ได้แก่

- ทำการทดสอบ 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 test portions
- ทำการทดสอบ 1 ตัวอย่าง จำนวน 11 test portions

5.1.2.3. ใช้ค่าที่ได้จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ใน matrix ที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน (similar matrix uncertainty or matrix homogeneity) เช่น อ้างอิงจากเอกสาร Report of 2003/2004 ISO Trials about Uncertainty Measurement (AFSSA) June 2004 เป็นต้น

5.1.3 Distributional Standard Uncertainty (U_{distrib})

มี 3 แบบ ตามชนิดของวิธีทดสอบ

5.1.3.1 Poisson Uncertainty (U_{poisson}) สำหรับวิธีทดสอบ colony count technique

5.1.3.2 Confirmation Uncertainty (U_{conf}) สำหรับวิธีทดสอบ colony count technique ที่ต้องมีการตรวจยืนยัน (ต้องนำค่านี้ไปรวมกับข้อ 5.1.3.1)

5.1.3.3 Most Probable Number Uncertainty (U_{MPN}) สำหรับวิธีทดสอบ MPN technique

5.1.4 การประมาณค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded Uncertainty: U)

สามารถคำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้

$$U = kU_c(y)$$

เมื่อ

$U_c(y)$ = Combined Standard Uncertainty

k คือ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ใช้ค่า $k = 2$, ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ใช้ค่า $k = 3$

5.1.5 การรายงานผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

รูปแบบของการรายงานผลการทดสอบค่า MU มี 3 รูปแบบ คือ

5.1.5.1 $y \pm U(\log_{10})$; เมื่อ $y = \log_{10}X$

5.1.5.2 $y \log_{10} [y-U, y+U]$;

5.1.5.3 $X \text{ CFU/g or } X \text{ CFU/มิลลิลิตร } [10^{y-U}, 10^{y+U}]$

รายงานผลเป็นตัวเลขที่มีนัยสำคัญ 2 ตำแหน่ง คือ เลขจำนวนเต็ม 1 หลักและทศนิยม 1 ตำแหน่ง โดยทำการปรับค่าที่ได้จากการคำนวณ คือถ้าตัวเลขมีค่าต่ำกว่า 5 ไม่ต้องปัดตัวเลขขึ้น แต่ถ้าตัวเลขมีค่ามากกว่า หรือเท่ากับ 5 ให้ปัดขึ้น 1 ค่า ทำการปัดตัวเลขขึ้นไปทีละหลักจนเหลือตัวเลขมีนัยสำคัญ 2 ตำแหน่ง

5.2 การประมาณค่าความไม่แน่นอนวิธีทดสอบ Qualitative method

ต้องมีการระบุ สรุป หรือชี้แจงแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการทดสอบทางจุลชีววิทยา เช่น คุณภาพของสารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ ความคลาดเคลื่อนของเครื่องมือ เป็นต้น และแสดงให้เห็นว่าสามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ นั้นได้

วิธีทดสอบที่ระบุค่า limit of detection ค่าความไม่แน่นอนของการวัดจำนวนเชื้อที่ใส่ จะต้องประมาณและประเมินค่านัยสำคัญทางสถิติไว้ด้วย

ห้องปฏิบัติการต้องมีการเฝ้าระวังผลบวกปลอม (false positive) และผลลบปลอม (false negative) โดยใช้การควบคุมบวก (positive control) และการควบคุมลบ (negative control)

ที่มา : สมชายและคณะ, 2555 และ ISO 19036, 2019

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

เอกสารมาตรฐานการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบทางจุลชีววิทยา ISO 19036 (2019) ระบุว่า การหา measurement uncertainty ของการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณ นั้นมีความแตกต่างไปจากฉบับเดิม โดย measurement uncertainty จะอยู่ในรูป combine uncertainty ที่เกิดจากผลรวมกันระหว่างความไม่แน่นอน 3 ส่วน คือ technical uncertainty matrix uncertainty และ distribution uncertainty แตกต่างจาก ISO 19036 (2006) ฉบับเดิมที่ measurement uncertainty จะมาจาก technical uncertainty เพียงส่วนเดียว

ถึงแม้ในทางปฏิบัติส่วนใหญ่ลูกค้ามักไม่ร้องขอให้รายงานค่าความไม่แน่นอน แต่ผู้ตรวจประเมินต้องขอดูรายงานผลการหาค่า technical uncertainty ซึ่งห้องปฏิบัติการต้องจัดทำเป็นเอกสารไว้ โดยนำมาตรวจสอบว่าการดำเนินการหาค่าดังกล่าวสอดคล้องตามที่ ISO 19036 กำหนด อีกทั้งต้องพิจารณาที่มาหรือความถูกต้องของการหาค่า matrix uncertainty อีกด้วย

ในทางปฏิบัติผู้ตรวจประเมินสามารถขอเอกสารดังต่อไปนี้ เพื่อประเมินความไม่แน่นอนของการวัด

- วิธีปฏิบัติงานเรื่องการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด
- รายงานผลการหาค่า Technical Standard Uncertainty (U_{tech}) ของวิธีทดสอบเชิงปริมาณแต่ละวิธี
- รายงานผลการหาค่า Matrix Uncertainty (U_{matrix})

6. เครื่องใช้ อุปกรณ์ และเครื่องมือ (Apparatus, Device and Equipment)

แนวทางการตรวจประเมิน

6.1 การบำรุงรักษา

เครื่องมือที่มีผลต่อการทดสอบต้องได้รับการบำรุงรักษาตามระยะเวลาที่กำหนด โดยขึ้นกับความถี่ในการใช้งานและการวิเคราะห์ความเสี่ยง (risk analysis) ว่าเครื่องมือนั้นอาจมีประสิทธิภาพเบี่ยงเบนออกนอกเกณฑ์การยอมรับ (acceptable limit) ความถี่ในการบำรุงรักษาต้องระบุไว้อย่างชัดเจนและต้องบันทึกรายละเอียดในการดำเนินการจัดเก็บไว้ นอกจากนี้ต้องให้ความสำคัญกับการป้องกันการปนเปื้อนข้ามด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น วัสดุประเภทเครื่องแก้วที่นำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก ต้องผ่านการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ ในการฆ่าเชื้อจะต้องแยกกันระหว่างการนึ่งฆ่าเชื้อวัสดุที่สะอาดกับการนึ่งฆ่าเชื้อวัสดุที่มีการปนเปื้อนก่อนทิ้ง หรือต้องป้องกันการปนเปื้อนข้ามด้วยการแยกเวลาในการทำงาน ทั้งนี้ ห้องปฏิบัติการต้องคำนึงถึงความปลอดภัยโดยต้องจัดทำโปรแกรมการทำความสะอาดในพื้นที่ปฏิบัติงานอย่างเพียงพอ

6.2 การสอบเทียบและการทวนสอบ

ห้องปฏิบัติการควรจัดทำโปรแกรมการสอบเทียบ (calibration) และการทวนสอบ (verification) คุณสมบัติของเครื่องมือ โดยเฉพาะเครื่องมือที่มีผลต่อการทดสอบ ความถี่ในการสอบเทียบและการทวนสอบขึ้นอยู่กับประวัติการใช้งานหรือการทำงานของเครื่องมือ นั้น ๆ และการวิเคราะห์ความเสี่ยง (risk analysis) ว่ามีการเบี่ยงเบนไปจากปกติ ซึ่งห้องปฏิบัติการจะต้องบันทึกประวัติการทำงานที่ผ่านมาของเครื่องมือ การสอบเทียบหรือทวนสอบจะต้องกระทำก่อนที่ระยะเวลาของการรับรองเดิมจะสิ้นสุดลง หากเป็นไปได้การวัดที่มีผลกระทบต่อผลการทดสอบจะต้องสอบกลับได้ถึงมาตรฐานของประเทศหรือมาตรฐานระหว่างประเทศ เครื่องมือที่ผ่านการสอบเทียบแล้วจะต้องติดป้ายแสดงสถานะของการสอบเทียบ โดยระบุวันที่สอบเทียบและวันที่จะสอบเทียบในครั้งต่อไป หากไม่สามารถติดแสดงไว้ต้องสามารถนำมาแสดงได้เมื่อมีการร้องขอ

การสอบเทียบต้องทำโดยหน่วยงานที่ได้รับการรับรอง (accredited) การสอบเทียบภายใน (in-house calibration) สามารถทำได้ แต่ต้องสอดคล้องกับข้อกำหนดของ ILAC P10 ทั้งนี้ควรสอดคล้องตามนโยบายของหน่วยรับรองแห่งชาติ (national accreditation body) ด้วย ซึ่งการตรวจสอบการทำงานของเครื่องมือ นั้นจะเป็นส่วนหนึ่งในการช่วยสอบสวนหาสาเหตุของความล้มเหลวของการควบคุมคุณภาพ

6.3 ความสอบกลับได้ (metrological traceability)

6.3.1 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิ (temperature measurement devices)

เครื่องมือวัดอุณหภูมิที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์แบบแท่งแก้ว (liquid-in-glass thermometers) เป็นต้น และอุปกรณ์วัดอุณหภูมิ ได้แก่ เทอร์โมคัปเปิล (thermocouples)

และเซนเซอร์วัดอุณหภูมิซึ่งใช้วัดความต้านทานเป็นแพลทินัม (platinum resistance thermometer หรือ PRTs) สำหรับใช้วัดอุณหภูมิของเครื่องบ่มเพาะเชื้อ (incubator) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ตู้เย็น (refrigerator) และตู้แช่แข็ง (freezer) จะต้องมีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้งาน ได้รับการทดสอบความถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพในการเข้าถึงอุณหภูมิที่ต้องการจะวัดได้ และต้องมีการใช้ค่าแก้ (correction) ที่เหมาะสม ไม่แนะนำให้ใช้ liquid-in-glass thermometers ชนิด mercury หรือ toluene เนื่องจากเหตุผลด้านความปลอดภัยและสุขภาพ

ในกรณีที่มีความจำเป็นต้องยืนยันว่าความคลาดเคลื่อนของอุณหภูมินั้นสามารถยอมรับได้ (acceptable tolerance) แนะนำให้ใช้ temperature data loggers สำหรับเฝ้าระวัง storage fridge, freezer, incubator และ water bath

6.3.2 ต้มน้ำหนัก (check calibration weights)

สามารถสอบกลับไปยังมาตรฐานระดับชาติหรือนานาชาติ มีการส่งสอบเทียบตามระยะเวลาที่กำหนดและมีการใช้ค่าแก้ที่เหมาะสม

6.3.3 เครื่องชั่ง (balance)

มีการทำความสะอาดหลังการใช้ มีการตรวจสอบด้วยต้มน้ำหนักมาตรฐาน มีการสอบเทียบตามระยะเวลาที่กำหนด หรือภายหลังการซ่อม หรือการเปลี่ยนสถานที่วางเครื่องมือ

6.3.4 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ตู้อบ (oven) ตู้เย็น (refrigerator) และตู้แช่แข็ง (freezer)

ต้องได้รับการตรวจสอบความคงที่ของอุณหภูมิ ความสม่ำเสมอ (uniformity) ในการกระจายตัวของอุณหภูมิ เวลาที่ใช้ในการเข้าถึงอุณหภูมิ ณ จุดที่ต้องการ และบันทึกอุณหภูมิอย่างน้อยวันละครั้ง มีวิธีการปฏิบัติงานทำความสะอาดเครื่องมือเหล่านี้ รวมทั้งมีเอกสารที่แสดงถึงความคงที่ของอุณหภูมิ ความสม่ำเสมอของการกระจายตัว และเวลาที่ใช้ในการถึงอุณหภูมิที่ตั้งไว้ หากมีการซ่อมหรือปรับปรุงจะต้องตรวจสอบและบันทึกความสอดคล้องของคุณลักษณะเหล่านี้ด้วย

มีบันทึกการตรวจสอบอุณหภูมิอย่างน้อยวันละครั้ง หรือสอดคล้องตามการใช้งานและระบบการทำงานของเครื่องมือชนิดนั้น

ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง มีโปรแกรมทำความสะอาดทั้งข้างนอกและข้างในตู้ มีการละลายน้ำแข็งตามระยะเวลาที่เหมาะสม

6.3.5 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รวมทั้งเครื่องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (media preparator)

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ต้องมีความสามารถทำอุณหภูมิตามเวลาที่กำหนดไว้ มีการสอบเทียบโดยที่ผลการสอบเทียบต้องพบว่าเครื่องมือมีความคลาดเคลื่อนไม่เกิน tolerance ที่กำหนด และมีการตรวจสอบความสามารถของ timer มีการตรวจสอบความใช้ได้ครั้งแรก ซึ่งรวมถึงการศึกษาเรื่องความสามารถ เช่น การศึกษาการกระจายตัวของอุณหภูมิ สำหรับแต่ละรอบของการทำงาน และแต่ละรูปแบบของการใส่วัสดุที่นิ่ง กระบวนการศึกษาเหล่านี้จะต้องทำซ้ำหลังจากมีการซ่อมหรือปรับแต่ง หรือมีผลทดสอบของอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุมคุณภาพให้ผลผิดปกติ มี temperature

sensor อย่างเพียงพอและมีตำแหน่งอยู่ในภาชนะบรรจุที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อบรรจุอยู่เพื่อแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของอุณหภูมิในตำแหน่งต่าง ๆ มีการตรวจสอบความใช้ได้โดยพิจารณาถึงเวลาที่ขึ้นและลงของอุณหภูมิ รวมทั้งเวลาของการทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization) มีคำแนะนำการใช้งานและเกณฑ์การยอมรับหรือไม่ยอมรับ มีบันทึกต่าง ๆ ของการใช้เครื่องมือเหล่านี้ รวมทั้งบันทึกของอุณหภูมิ และเวลาในทุก ๆ รอบของการทำงาน มีการตรวจสอบประสิทธิภาพของแต่ละรอบของการทำงานโดยใช้ตัวชี้วัดทางเคมีหรือจุลชีววิทยา เพื่อบ่งบอกถึงความสำเร็จของการ sterilization หรือการขจัดกาปนเปื้อน (decontamination) มีการใช้ autoclave tape หรือ pressure/temperature/sensitive strips เพื่อแสดงถึงการผ่านการนึ่งหรือฆ่าเชื้อเท่านั้นไม่ใช่แสดงถึงความสำเร็จของการ sterilization หรือ decontamination มีการเฝ้าระวังประสิทธิภาพของเครื่องนึ่งฆ่าเชื้ออย่างน้อยเดือนละครั้งด้วยการใช้ *Bacillus stearothermophilus* spore strip/ampoule และมีการบันทึกผลเก็บไว้ นาฬิกาของเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อต้องตรวจสอบกับนาฬิกาที่สอบเทียบแล้ว หรือตรวจสอบกับสัญญาณนาฬิกาของประเทศ

6.3.6 เครื่องแก้ว (glassware)

ต้องใช้เครื่องแก้วชนิด Borosilicate ในการทดสอบ เครื่องแก้วทุกชนิดต้องทำความสะอาดอย่างสอดคล้องตามวิธีปฏิบัติงาน ความถูกต้อง (accuracy) ของเครื่องแก้ววัดปริมาตรต้องได้มาจากการสอบเทียบหรือมีฉลากนั้นต้องใช้ class A รวมทั้งมีการตรวจสอบสารล้างทำความสะอาดที่อาจตกค้างด้วยวิธีการที่เหมาะสม เช่น การใช้ Bromothymol blue เป็นสารละลาย indicator หรือใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

6.3.7 เครื่องมือวัดปริมาตร (volumetric equipment)

เครื่องมือวัดปริมาตร ได้แก่ automatic dispensers, dispensers/diluters, micropipettes และ disposable pipettes

เครื่องดูด-จ่ายสารละลาย เครื่องปิเปตต์อัตโนมัติมีการตรวจสอบก่อนนำมาใช้งานเกี่ยวกับปริมาตรที่จ่ายออก รวมทั้งมีการตรวจสอบอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะ เพื่อให้มั่นใจว่าปริมาตรที่จ่ายออกยังคงอยู่ภายในขอบเขตการใช้งานเฉพาะที่ระบุไว้ เช่น ตรวจสอบ accuracy ของปริมาตรที่จ่ายออกเทียบกับปริมาตรที่ตั้งไว้ และตรวจสอบ precision ของปริมาตรที่จ่ายออกว่ามีความเที่ยงเบนมากน้อยเพียงใด

6.3.8 Thermal cyclers (PCR)

ควรทวนสอบเรื่อง temperature, ramp rate, overshoots/undershoots และ hold time อีกทั้งในกรณีที่มีการใช้ thermal cyclers ในการทดสอบทาง quantitative ต้องมีการยืนยันความเทียบเท่าของประสิทธิภาพเครื่อง

6.3.9 เครื่องมืออื่น ๆ

conductivity meters, hygrometers, centrifuges, oxygen meters, pH meters, CO₂ sensors และ microscopes ควรมีการทวนสอบก่อนการใช้งานทุกครั้ง

6.4 การดำเนินการที่สำคัญสำหรับเครื่องใช้ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

6.4.1 ตู้ Protective cabinet

ควรจัดการให้มีเครื่องมือ อุปกรณ์ หรือเครื่องใช้ อยู่ภายในในให้น้อยที่สุดเท่าที่ทำได้ ก่อนการเริ่มใช้งานควรนำสิ่งของทั้งหมดที่จำเป็นใส่ไว้ให้พร้อมเพื่อลดจำนวนครั้งของการนำมือเข้า-ออกจากตู้ cabinet

การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อควรระวังสารที่มีฤทธิ์กัดกร่อน และควรตรวจสอบ wire grids protecting pre-filters เป็นประจำหากมีการทำความสะอาดด้วยผ้าชุบยาฆ่าเชื้อ

หลังการทำความสะอาด cabinet ควรมีการใช้หลอด UV เพื่อฆ่าเชื้อ

หลังการซ่อม ดัดแปลง หรือเคลื่อนย้าย ควรจะมีการตรวจเช็คโดยช่างผู้ชำนาญการจากบริษัทผู้ผลิต

ควรมีการทวนสอบความปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ของ working surface และผนังของตู้ cabinet

ควรมีการทวนสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ (airborne microorganism) ในช่วงที่ filter ทำงาน ตัวอย่างเช่น การเปิด Petri-dishes ที่บรรจุ non-selective agar culture (เช่น PCA) ไว้เป็นเวลา 30 นาที

6.4.2 เครื่องชั่งและเครื่อง gravimetric diluter

ห้องปฏิบัติการต้องใช้เครื่องชั่งที่ครอบคลุมช่วงของความไม่แน่นอนที่ยอมรับได้สำหรับตัวอย่างต่าง ๆ สำหรับการทดสอบ

เครื่องชั่งต้องมีความละเอียด (resolution) ไม่เกินร้อยละ 1 (โดยอย่างน้อยต้องไม่เกินร้อยละ 5) ของน้ำหนักที่ชั่ง

ควรพิจารณาว่าเครื่องชั่งอยู่ในระดับสมดุล รวมถึงมีการป้องกันการสั่นสะเทือนและการลาก

ควรมีการทำความสะอาดหรือฆ่าเชื้อหลังการใช้ หรือกรณีที่มีการรั่วไหลในขณะการใช้ ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อที่เหมาะสมและไม่มีฤทธิ์กัดกร่อน

การสอบเทียบควรทำครอบคลุมช่วงการใช้งาน และทำโดยช่างที่มีประสิทธิภาพ เช่น หน่วยสอบเทียบ เป็นต้น

ควรทวนสอบประสิทธิภาพของระบบเครื่องชั่งเป็นประจำระหว่างใช้งาน และหลังการทำความสะอาด

6.4.3 เครื่อง Homogenizers, เครื่อง blender และเครื่อง mixer

กรณีใช้ peristaltic blender ตัวอย่างเช่น Stomacher® โดยทั่วไป จะมีระยะการทำงานอยู่ที่ 1-3 นาที แผ่นตีต้องมีความสะอาด โดยมีการดูแลรักษาความสะอาดก่อนและหลังการใช้งาน

กรณีใช้ rotary homogenizer (blender) ช่วงรอบการทำงานควรอยู่ที่ 1500-2000 รอบต่อนาที แม้ในรอบการทำงานที่ช้าที่สุด ต้องใช้ระยะเวลาไม่เกิน 2 นาที 30 วินาที

กรณีใช้ vibrational mixer เช่น Pulsifier® จะมีระยะเวลาการทำงานอยู่ที่ 30 วินาที ถึง 1 นาที

6.4.4 เครื่อง pH meter

ห้องปฏิบัติการต้องใช้ stand buffer solution อย่างน้อย 2 ระดับความเข้มข้น ในการทำ daily check ทั้งนี้แนะนำให้ใช้ 3 ระดับ คือ pH 4.0, 7.0 และ 10 สำหรับใช้ในการเปรียบเทียบ สารมาตรฐานดังกล่าวต้องไม่หมดอายุและเก็บไว้ในที่ที่เหมาะสม ความคลาดเคลื่อนมากที่สุดที่ยอมรับได้ (maximum permissible error หรือ MPE) ที่หาได้จากการทำ daily check ต้องน้อยกว่าช่วงการยอมรับ (tolerance) ของการใช้งาน

ควรมีความสามารถที่จะอ่านค่าละเอียดได้เข้าใกล้ 0.01 pH unit และมีความคลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน 0.1 pH unit อีกทั้งยังควรติดตั้งไว้พร้อมกับเครื่องปรับอุณหภูมิ

ควรวัด pH ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เช่น 25 องศาเซลเซียส และทำการจดบันทึกในรูปแบบ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

หลังการใช้งานควรล้าง electrode ด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดและซับให้แห้ง จากนั้นนำไปแช่ลงใน pH electrode storage solution เพื่อรักษาสภาพ

6.4.5 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

ภายในเครื่องควรจะมีอุปกรณ์ที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับ ± 3 องศาเซลเซียส ของอุณหภูมิเป้าหมาย (target temperature)

ในการทำ sterilization ของอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีอุณหภูมิอย่างน้อย 121 ± 3 องศาเซลเซียส (ISO 7218, 2014) เป็นเวลา 15 นาที บางอาหารเชื้อใช้ที่อุณหภูมิ 115 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ในการจัดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แล้วควรมีอุณหภูมิอย่างน้อย 121 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 30 นาที

แนะนำให้แยกเครื่อง autoclave ที่ใช้สำหรับใช้ sterilization และเครื่องที่ใช้สำหรับ decontamination ออกจากกัน แต่กรณีจำเป็นต้องสามารถยอมรับการใช้เครื่องเดียวกันได้หากมีการแยกเวลาการใช้งานเพื่อ sterilization และ decontamination ออกจากกัน

เพื่อความปลอดภัยไม่ควรนำสิ่งของออกก่อนที่อุณหภูมิจะลดลงต่ำกว่า 80 องศาเซลเซียส

การทดสอบความใช้ได้ครั้งแรกต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของการทำงานในแต่ละรอบเมื่อมีการตั้งค่าใหม่ในแต่ละครั้ง และควรมีการดำเนินการทุกครั้งหลังการซ่อมหรือปรับแต่ง การทดสอบความใช้ได้ต้องประกอบไปด้วยการดูความเหมาะสมของเวลาในการเพิ่มอุณหภูมิและลดอุณหภูมิ ตลอดจนความเหมาะสมของอุณหภูมิ

กรณีมีการใช้ indicator ในการตรวจสอบกระบวนการทำงาน ต้องมีการตรวจสอบที่บริเวณ จุดกึ่งกลางของสิ่งของที่น่าเข้าไปฆ่าเชื้อ

6.4.6 เครื่องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (media preparator)

การทดสอบความใช้ได้ครั้งแรกควรประกอบด้วย การทดสอบประสิทธิภาพในทูลรอบการทำงาน และทุกปริมาตรที่ใช้เตรียม ซึ่งควรทำทุกครั้งหลังซ่อมหรือดัดแปลง สามารถใช้หัววัด (probe) วัดอุณหภูมิสองตัวในการดู uniformity ของอุณหภูมิ โดยตัวหนึ่งอยู่ใกล้ตัว control probe ของเครื่องมือ ส่วนอีกตัวอยู่ในระยะห่างออกไป

ควรมีการเช็อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำงานในแต่ละรอบ

6.4.7 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)

ในกรณีอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมมีค่าเข้าใกล้หรือสูงกว่าอุณหภูมิของเครื่อง จำเป็นจะมีการติดตั้งระบบทำความเย็นเพิ่มเติม

ผนังตู้ incubator ไม่ควรโดนแสงแดด

ควรมีการทำความสะอาดทั้งภายใน และภายนอก หากเป็นไปได้ควรมีการกำจัดฝุ่นออกจากระบบ ventilation

การวาง plate ที่มีใส่เชื้อจุลินทรีย์แล้ว (inoculated culture dish) ให้ดำเนินการโดยการคว่ำ plate ลง และนำไปเข้าตู้ incubator ให้เร็วที่สุด ถ้าไม่สามารถนำไปบ่มได้ทันทีสามารถเก็บ plate ที่มีเชื้อโดยการแช่เย็นได้แต่ห้ามเกิน 24 ชั่วโมง การวาง plate ในตู้ควรวางซ้อนกันไม่เกิน 6 plate โดยขณะบ่มต้องวาง plate แต่ละกองห่างจากกันและห่างจากผนังตู้ incubator อย่างน้อย 25 มิลลิเมตร หลังบ่มเสร็จหากไม่ได้มีมาตรฐานอื่นกำหนดไว้ควรทำการอ่านผลทันที

ควรมีการสอบเทียบเพื่อบ่งบอกความเหมาะสมในการใช้งานในช่วงอุณหภูมิเป้าหมาย และตำแหน่งภายในเครื่องที่สามารถใช้งานได้

อุณหภูมิในการทำงานควรทำการตรวจสอบโดย thermometer หรือ thermocouples อันเดียวหรือหลายอัน โดยตรวจสอบในจุดที่มีการเก็บข้อมูลอุณหภูมิไว้ก่อนหน้านี้

ในช่วงการทำงานต้องให้ความสำคัญกับเรื่องการหมุนเวียนอากาศภายในเครื่อง

ต้องมีการตรวจสอบอุณหภูมิอย่างน้อยในทุก ๆ วันที่มีการใช้งาน โดยใช้ thermometer หรือ temperature measurement device

6.4.8 ตู้เย็น (refrigerator) และห้องเย็น (cold-storage room)

การเก็บตัวอย่างควรป้องกันการเกิด cross contamination โดยอย่างน้อยต้องมีการแยกระหว่าง

- (1) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ได้มีการใส่เชื้อลงไป (uninoculated culture media) และสารเคมี (reagents)
- (2) ตัวอย่างทดสอบ (Test sample)
- (3) เชื้ออ้างอิง (Microorganism cultures) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มแล้ว (incubated media)

มีการควบคุมระบบหมุนเวียนอากาศเพื่อป้องกันการเกิดการปนเปื้อนข้าม

มีการตรวจสอบอุณหภูมิแต่ละ chamber ทุกวันที่มีการใช้งาน โดยใช้ thermometer หรือ probe ที่มีการติดตั้งถาวร

ควรจะมีการดำเนินการบำรุงรักษาดังต่อไปนี้

- (1) กำจัดฝุ่นออกจากระบบระบายความร้อน
- (2) มีการละลายน้ำแข็ง
- (3) ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อภายใน

6.4.9 ตู้แช่แข็ง (freezer) และตู้แช่เยือกแข็ง (deep freezer)

Freezer หากไม่มีการกำหนดเฉพาะต้องมีอุณหภูมิต่ำกว่า -15 องศาเซลเซียส (ซึ่งแนะนำที่ -18 องศาเซลเซียส) อย่างน้อยต้องมีการแยกให้เป็นสัดส่วน

Deep freezer หากไม่มีการกำหนดเฉพาะต้องมีอุณหภูมิต่ำกว่า -70 องศาเซลเซียส ส่วนมากใช้ในการเก็บเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและ reagent ซึ่งหากเก็บด้วยกันต้องมีการป้องกันการปนเปื้อนข้าม

ตรวจสอบอุณหภูมิในแต่ละช่องเก็บ (chamber) เป็นประจำด้วยอุปกรณ์ (device) วัดอุณหภูมิที่เหมาะสม

ควรจะมีการดำเนินการบำรุงรักษาดังต่อไปนี้

- (1) กำจัดฝุ่นออกจากระบบระบายความร้อน
- (2) มีการละลายน้ำแข็ง
- (3) ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อภายใน

6.4.10 อ่างน้ำ thermostatically controlled bath

ประสิทธิภาพการทำงานขั้นต่ำต้องสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ระดับ $MPE \pm 0.5$ องศาเซลเซียสหรือดีกว่านั้น

กรณีต้องการความแม่นยำของอุณหภูมิต้องมีระบบหมุนเวียนของเหลวภายใน และมีระบบควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ

สำหรับบ่ม inoculated media ระดับของเหลวภายในต้องสูงกว่าระดับอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 2 เซนติเมตร

มีการตรวจสอบ stability และ homogeneity ก่อนเริ่มใช้, หลังจากการซ่อม และการดัดแปลง

เฝ้าสังเกตอุณหภูมิอย่างน้อยวันละ 1 ครั้ง ด้วย thermometer, thermocouple หรือ temperature-recording device อื่นๆ ที่มี measurement uncertainty เหมาะสม ซึ่งเป็นอิสระจากระบบควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (automatic temperature-regulator system) ของเครื่อง

มีการเติมน้ำตามปริมาณที่ผู้ผลิตแนะนำ สำหรับการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อแนะนำให้ใช้น้ำปราศจากไอออน (DI water)

ควรมีการถ่ายน้ำออก ล้าง ทำความสะอาด และเติมน้ำเป็นประจำ

6.4.11 อ่างน้ำ boiling-water baths

ระดับน้ำในอ่างต้องปกคลุมระดับของสิ่งที่ต้องการให้ความร้อน
ควรมีการกำจัดตะกอนเป็นระยะ

6.4.12 ตู้อบฆ่าเชื้อ (sterilizing oven)

ช่วงการทำงาน มักจะอยู่ที่อุณหภูมิ 160-180 องศาเซลเซียส
ต้องใช้งานกับอุปกรณ์เครื่องแก้วหรือโลหะเท่านั้น ห้ามใช้กับอุปกรณ์ที่เป็นพลาสติกหรือยาง
เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่นำมาฆ่าเชื้อควรมีการทวนสอบปริมาตรเป็นประจำ
กระบวนการฆ่าเชื้อต้องใช้เวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 170 ± 10 องศาเซลเซียส
ตรวจสอบ stability และ homogeneity ก่อนการเริ่มใช้ หลังจากการซ่อม และการ
ดัดแปลง

ควรติดตั้ง thermometer, thermocouple หรือ temperature-recording device ที่ซึ่งเป็นอิสระจาก automatic temperature-regulator system ของเครื่อง โดยอุปกรณ์เฝ้าระวังควรมี resolution ที่ 1 องศาเซลเซียส หรือดีกว่า

ต้องเฝ้าสังเกตและบันทึกอุณหภูมิระหว่างใช้ทุกครั้ง
บำรุงรักษาโดยการทำความสะอาดพื้นผิวด้านใน

6.4.13 ตู้ microwave oven

ห้ามใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสม heat - sensitive components และห้ามใช้ในการ
ทำ sterilization อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภายในไมโครเวฟควรมีจานหมุนเพื่อให้การกระจายตัวของความร้อนเป็นไปอย่างสม่ำเสมอ
คลายฝาภาชนะสิ่งของที่นำมาให้ความร้อนก่อนทุกครั้ง

แนะนำให้ใช้พลังงานต่ำและระยะเวลานาน จะทำให้การกระจายตัวของความร้อนเกิดขึ้นได้
ดีกว่า

ระวังการเดือดของ content ที่จะล้นออกมานอกภาชนะได้ ควรทิ้งไว้ในเครื่องอย่างน้อย 5
นาทีก่อนนำออกมา

ในช่วงที่เริ่มใช้งานควรมีการศึกษาหาระดับพลังงานและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการใช้
งานในแต่ละปริมาตร และกำหนดไว้ใช้ปฏิบัติ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดภาวะ overheating

ควรเช็คประตูว่าปิดสนิท และเช็คการรั่วไหลของรังสี เป็นระยะ ๆ

6.4.14 เครื่องล้างเครื่องแก้ว (glass washer)

ควรตรวจสอบประสิทธิภาพการล้างด้วยการสังเกต และตรวจการตกค้างของสารยับยั้ง
(inhibit substance)

อาจมีการตรวจสอบการตกค้างของกรดหรือด่าง ด้วย pH indication solution โดยใช้
ระดับ pH ที่เหมาะสม

การบำรุงรักษาอาจจะถี่ขึ้นในกรณีที่มีการใช้งานอย่างหนัก และใช้ในพื้นที่ที่มีน้ำกระด้าง (hard water)

6.4.15 กล้องจุลทรรศน์ (optical microscope)

ระวางการเกิดไอน้ำหากใช้งานในบริเวณที่มีความชื้นสูง ซึ่งอาจจะทำให้เลนส์เสื่อมสภาพได้ หลังใช้ให้กำจัดคราบมันจากเลนส์ โดยกระดาษเช็ดเลนส์และน้ำยาเช็ดเลนส์ที่ผู้ผลิตแนะนำ มีการใช้ผ้าหรือพลาสติกคลุมเมื่อไม่ได้ใช้งาน มีการทำความสะอาดหลังการใช้งานทุกครั้งมีบันทึกการซ่อมและดูแลรักษา มีการตรวจสอบ alignment (หากใช้สำหรับวัดขนาด)

6.4.16 เครื่องกำเนิดแก๊สสำหรับฆ่าเชื้อ (gas burner) หรือเครื่องเผาผลาญ (wire incinerator)

การใช้ gas burner จะทำให้เกิด turbulence flow ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงการใช้ใน protective cabinet โดยแนะนำให้ใช้อุปกรณ์ที่ทำการ sterile แล้ว หรือใช้ wire incinerator จะมีความเหมาะสมมากกว่า

ต้องมีการทำความสะอาด และฆ่าเชื้อเป็นประจำ โดยเฉพาะเมื่อมีการรั่วไหล หรือการกระเด็นของเชื้อไปโดน

6.4.17 เครื่องกระจายสารสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (dispenser for culture media and reagent)

อุปกรณ์จะต้องไม่มีการตกค้างของ inhibit substances และมีการแยกใช้หลอดกระจายสารในกรณีใช้จ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective media

กรณีที่ต้องการจ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อหรือ reagent ที่ปลอดเชื้อ ทุกส่วนที่สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อหรือ reagent ต้องปราศจากเชื้อ (sterile)

มีการล้างและกลั้ว (หรือทำการปลอดเชื้อ) ทุกส่วนที่ต้องสัมผัสกับของเหลวก่อนใช้จ่ายสาร โดยทั่วไปความคลาดเคลื่อนของเครื่องมือต้องไม่เกิน $\pm 5\%$ ของปริมาตร ถ้ากรณี diluent ต้องไม่เกิน $\pm 2\%$ ของปริมาตร

6.4.18 เครื่อง vortex mixer

รักษาความสะอาดอยู่เสมอ หากพบการรั่วไหลหรือการหกของของเหลวที่นำมา vortex ให้ทำความสะอาดทันที

6.4.19 เครื่องนับโคโลนี (colony-counting device)

ทำการตรวจสอบความแม่นยำของการนับจำนวนเป็นประจำ กรณีเครื่องมือมีระบบอัตโนมัติ (มีกระบวนการ image analysis ที่เป็นการทำงานร่วมกันระหว่าง hardware และ software) ควรทำการตรวจสอบทุกวันโดยงานเพาะเชื้อที่ทราบจำนวนที่แท้จริง

รักษาความสะอาด ควรปราศจากฝุ่น และเลี่ยงการขีดข่วนบริเวณพื้นผิวที่ซึ่งมีผลกระทบต่อกระบวนการนับ

6.4.20 เครื่องมือสำหรับเลี้ยงเชื้อในบรรยากาศที่มีการดัดแปลง (equipment for culture in modified atmosphere)

มีการใช้ biological หรือ chemical indicator ในการ monitor สภาพภายใน chamber

6.4.21 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

ในกรณีนี้ที่ความเร็วในการปั่นเป็นจุดที่มีผลกระทบต่อการทดสอบ (critical) จะต้องมีการสอบเทียบ และทำการตั้งค่าให้ตรงกับการสอบเทียบนั้นเมื่อนำมาใช้งาน

ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อเป็นประจำ หรือเมื่อมีสิ่งของที่มีเชื้อหรือสิ่งปนเปื้อนรั่วไหลออกมา

ควรได้รับการตรวจสอบโดยการบริการหลังการขายเป็นประจำ

มีการบันทึกการใช้งานทุกครั้งที่ใช้งาน หัวปั่นมีการตรวจสอบและมีบันทึกการตรวจสอบ มีบันทึกการซ่อมและบำรุงรักษา มีคู่มือการใช้งานอยู่ในที่ปฏิบัติงาน

6.4.22 เครื่อง hotplate และเครื่อง heating mantle

ทำความสะอาดของที่หกหรือรั่วไหลให้เร็วที่สุด

6.4.23 เครื่องจ่ายตัวอย่างแบบหมุนวงเกลียว (spiral plater)

ส่วน surface ของ agar plate ที่นำมาใช้จะต้องปราศจาก air bubble ดังนั้นจึงควรมีการ pre-dry ก่อน

ระบบจ่าย ควรทำความสะอาด และกลั้วด้วย sterile water ก่อนใช้และหลังใช้

ตรวจสอบองค์ stylus tip ทุกวัน ว่าชนกับผิวของ agar plate 1 มิลลิเมตรเสมอ

รูปแบบ (pattern) ของการจ่ายต้องได้รับการทวนสอบทุกวันด้วยหมึกที่ล้างออกได้ (washable ink) โดยลักษณะ spiral pattern ต้องหนาแน่นที่สุดในด้านในและค่อย ๆ ลดลงเมื่อห่างออกมา และส่วนช่องว่าง (clear portion) ตรงกลางต้องมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร

สถานะความปลอดภัยของเครื่อง สามารถตรวจเช็คได้โดยการทดสอบจ่าย sterile water ก่อนการจ่ายตัวอย่าง

ตรวจสอบปริมาตรที่จ่ายเป็นประจำด้วยน้ำกลั่น ค่า MPE ต้องไม่เกินร้อยละ 5

ฆ่าเชื้อ tube และ stylus ด้วยสารละลายที่มี free chlorine 0.5-1% และตามด้วยการ flush ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำปราศจากไอออน (DI water)

หากมีสิ่งรั่วไหลต้องกำจัดสิ่งรั่วไหลนั้นออกโดยทันที

6.4.24 เครื่องทำน้ำกลั่น (still), น้ำ DI (deionizers) และน้ำ RO (reverse osmosis)

ต้องมีการตรวจสอบเป็นประจำว่ามี conductivity ที่เหมาะสมคือ ไม่เกิน 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

มีการล้างและกำจัดตะกอนความถี่ตามความกระด้างของน้ำ

มีการบำรุงรักษาตามที่ผู้ผลิตกำหนด

6.4.25 นาฬิกาจับเวลาและอุปกรณ์จับเวลา (timer and timing device)

มีการตรวจสอบนาฬิกาจับเวลาทุกตัว ที่ใช้กับงานกับจุดที่มีผลกระทบต่อทดสอบ เทียบกับสัญญาณเวลาระดับชาติ เป็นประจำและหลังการซ่อมแซม

6.4.26 ปิเปตต์ (pipette) และปิเปตต์อัตโนมัติ (pipettor)

ไม่ใช่ pipette ที่ชำรุดหรือเสียหาย

ปิเปตต์แบบใช้ดวง (graduated pipette) ที่ทำการปลดเชื้อแล้ว และ pipettor tip ต้องมีการใส่ non-absorbent cotton wool plug เพื่อป้องกันการปนเปื้อนขึ้นไปในระบบของปิเปตต์อัตโนมัติ ในระหว่างการดูดสารละลาย

ตรวจสอบปริมาตรการจ่าย ถ้าผู้ผลิตไม่ได้รับรองความแม่นยำ (trueness และ precision)

สอบเทียบตาม ISO 835 (สำหรับ graduated pipette) และ ISO 8655 โดยเฉพาะใน ISO 8655-2

มีการทดสอบปิเปตต์ใหม่ก่อนการใช้ และเป็นประจำเพื่อยืนยันว่า MPE อยู่ที่ 2% (สำหรับการทำ dilution และ inocula) หรือ 5% (สำหรับการใช้งานอื่น ๆ) อีกทั้งต้องมีการทำ Intermediate check ว่ายังคงสามารถทำงานได้ภายใต้ MPE ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำ DI

จัดการปนเปื้อนและทำความสะอาด อย่างเหมาะสมหลังการใช้ ถ้าหากตัวเครื่องหรือลูกสูบปนเปื้อน ให้ทำการแยกชิ้นส่วน จัดการปนเปื้อนและทำความสะอาด จากนั้นทำการประกอบใหม่และสอบเทียบ หากไม่สามารถทำได้ให้แจ้งผู้ผลิตมาดำเนินการ

6.4.27 เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer) และอุปกรณ์เฝ้าระวังอุณหภูมิ (temperature-monitoring device)

Reference thermometer และ reference temperature-monitoring device ต้องทำการสอบเทียบกับ national standard หรือ international standard และจะใช้ในวัตถุประสงค์เพื่อการอ้างอิงเท่านั้น ไม่ใช่เป็นประจำ

Working thermometer และ temperature-recording device ต้องทำการสอบเทียบในแนวทางที่สามารถสอบไปยัง national standard หรือ international standard ได้

Temperature-monitoring device ต้องมีค่าความละเอียด (resolution) น้อยกว่า MPE ที่ต้องการ 4 เท่า และในการใช้งานต้องให้ความสำคัญกับค่า measurement uncertainty จากการสอบเทียบด้วย

Thermometer หรือ thermocouple ที่ใช้งานในตัว incubator ต้องมีการบรรจุอยู่ใน container ที่บรรจุ glycerol, liquid paraffin หรือ polypropylene glycerol เพื่อช่วยป้องกันการสูญเสียความร้อนขณะเปิดประตูตู้ ทำให้อ่านค่าได้เสถียรมากขึ้น

Thermometer ที่ใช้จุ่มเพื่อการวัด เช่น ใน water bath ระดับความลึกในการจุ่มต้องถูกต้องตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

Reference thermometer ต้องสอบเทียบครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดยเทียบกับ national standard หรือ international standard ก่อนการใช้งานและทุก ๆ 5 ปี อีกทั้งต้องทำการ intermediate calibration 1 จุด (เช่น ice point) เพื่อทวนสอบประสิทธิภาพ

Reference thermocouple ต้องสอบเทียบครอบคลุมช่วงการใช้งานเทียบกับ national standard หรือ international standard ที่สอบกลับได้ ก่อนการใช้งาน และ intermediate check กับ Reference thermometer เพื่อทวนสอบประสิทธิภาพ

Temperature-monitoring devices ต้องสอบเทียบกับ national standard หรือ international standard ที่สอบกลับได้

Working thermometer และ working thermocouple ควรตรวจสอบที่จุด ice point และ/หรือเทียบกับ reference thermometer ที่ช่วงอุณหภูมิการใช้งาน

6.4.28 เครื่อง Immunomagnetic separator

ต้องทวนสอบว่าระบบสามารถ isolate เชื้อเป้าหมายในระดับต่ำ ๆ ได้

6.4.29 ระบบกรองน้ำ (filtration system)

การใช้ต้องสอดคล้องกับมาตรฐาน ISO 8199

ที่มา : สมชายและคณะ, 2555; Eurachem, 2023 และ ISO7214, 2014

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

ห้องปฏิบัติการควรเข้าใจหลักการใช้งานของเครื่องมือต่าง ๆ เพื่อให้ใช้งานได้อย่างถูกต้อง ปลอดภัยไม่ส่งผลกระทบต่อผลทดสอบและยืดอายุการใช้ของเครื่องมือ นอกจากนั้นห้องปฏิบัติการต้องกำหนดโปรแกรมที่จะตรวจสอบหรือเฝ้าระวังการทำงานของเครื่องมือ เช่น ก่อนการใช้งานครั้งแรก (initial check) การใช้งานระหว่างวัน (daily check) การสอบเทียบ (calibration) การทวนสอบระหว่างการสอบเทียบ (Intermediate check) และบำรุงรักษาโดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเองหรือโดยบริการหลังการขายของผู้ผลิต (service) เป็นต้น ทั้งนี้การดำเนินการทำ intermediate check นั้น ต้องทำโดยเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่เป็นอิสระ (independent) จากอุปกรณ์ที่ใช้ daily check ของเครื่องมือที่จะทำการตรวจสอบนั้น โดยเกณฑ์การตรวจสอบต้องอ้างอิงเอกสารฉบับนี้ มาตรฐาน ISO หรือมาตรฐานสากลอื่น ๆ ที่มีการระบุไว้

ผู้ตรวจประเมินต้องมีการตรวจสอบว่าห้องปฏิบัติการมีนาค่าแก้ (correction) และค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) จากการสอบเทียบเครื่องใช้ อุปกรณ์ และเครื่องมือ มาประกอบการทำการ intermediate check และ daily check

ในทางปฏิบัติผู้ตรวจประเมินสามารถขอเอกสารดังต่อไปนี้

- แผนการสอบเทียบประจำปี และ/หรือประวัติการการสอบเทียบ
- ใบรับรองการสอบเทียบ
- เอกสารทวนสอบผลการสอบเทียบ

- เอกสารการทำ daily check
- เอกสารการทำ intermediate check
- บันทึกการใช้งาน การดูแล และการบำรุงรักษา
- วิธีปฏิบัติงานเรื่องการใช้หรือการบำรุงรักษาเครื่องมือแต่ละชนิด

7. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Media and Reagent)

แนวทางการตรวจประเมิน

7.1 การจัดการด้านประกันคุณภาพ

7.1.1 ด้านเอกสารประกอบ dehydrated culture media

7.1.1.1 เอกสารจากผู้ผลิต เช่น ใบประกันคุณภาพ (certificate) ควรประกอบด้วยข้อมูลดังต่อไปนี้

- ชื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนประกอบแต่ละตัว ส่วนเสริม (supplement) และรหัสผลิตภัณฑ์ (ถ้าเป็นไปได้)

- เอกสารข้อมูลทางเทคนิค เช่น สูตร วัตถุประสงค์ในการใช้งาน ปริมาณการบรรจุ และการอ้างอิงต่าง ๆ

- ข้อมูลความปลอดภัยและอันตราย

- batch number

- pH เป้าหมาย

- ข้อมูลการเก็บและวันหมดอายุ

7.1.1.2 เอกสารประกันคุณภาพ เช่น ใบประกันคุณภาพ (certificate) หรือเทียบเท่าจะต้องมีรายละเอียดเหล่านี้รวมอยู่ด้วย คือ

- อายุการใช้งาน

- สถานะการเก็บรักษา

- อัตราการเสื่อมตัวอย่าง

- การตรวจสอบความปลอดภัย

- รวมทั้งเงื่อนไขการยอมรับ

- การตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการหาและเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (รวมทั้งต้องระบุ culture collection reference) และเงื่อนไขการยอมรับ

- วันที่ออกรายละเอียด

7.1.1.3 การยอมรับการขนส่งผลิตภัณฑ์ ควรตรวจสอบข้อมูลดังต่อไปนี้

- การบ่งชี้ผลิตภัณฑ์ถูกต้อง

- ความสมบูรณ์ของหีบห่อ

- วันหมดอายุ

- เอกสารประกอบ

- จำนวนที่ได้รับ

7.1.2 การเก็บ dehydrated culture media

โดยทั่วไปต้องปฏิบัติตามผู้ผลิตแนะนำ

การจัดการและการควบคุมคุณภาพของ dehydrate media และ supplement ประกอบด้วย

- ก่อนเปิด ต้องตรวจสอบการปิดผนึก หลังจากนั้นต้องทำการเปิดดูเพื่อประเมินลักษณะทางกายภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน
- หลังเปิด ต้องติดฉลากที่ขวดของสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อหรือกล่องของชุดทดสอบ เพื่อแสดงวันที่รับ วันหมดอายุ วันที่วันที่เปิดใช้ หลังเปิดใช้แล้วคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อจะขึ้นกับสภาพแวดล้อมในการจัดเก็บ ซึ่งสามารถดูได้จาก ความเป็นเนื้อเดียวกัน การจับตัวเป็นก้อน และการเปลี่ยนสี เป็นต้น หากพบว่ามี การดูดซับความชื้นหรือการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน ควรนำไปทิ้ง หลังเปิดใช้แล้วต้องมีการระบุระยะเวลาการจัดเก็บ

7.1.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

7.1.3.1 การปฏิบัติทั่วไป

- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจาก dehydrated media ต้องถูกต้องตรงตามรายละเอียดที่ผู้ผลิตระบุ
- บันทึกของการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องประกอบด้วย
 - (1) วันที่เตรียม
 - (2) ชื่อของอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - (3) บริษัทผู้ผลิตและหมายเลขรุ่นการผลิต (lot No.)
 - (4) วันหมดอายุ
 - (5) น้ำหนักที่ชั่ง (กรัม) หรือ ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตรหรือลิตร)
 - (6) pH ที่วัดได้ และ pH ที่ปรับ (ตามวิธีทดสอบที่ระบุไว้)
 - (7) วัสดุต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด
 - (8) ในกรณีที่เหมาะสม จะต้องมีการตรวจสอบความปลอดภัย
 - (9) ผู้ที่เตรียม

7.1.3.2 น้ำที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- ต้องเป็นน้ำบริสุทธิ์ ดังนี้
 - (1) ประเภทของน้ำเหมาะสม เช่น distilled water, demineralized water, deionized water และ reverse osmosis water
 - (2) ปราศจากสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น chlorine ammonia และ metal ion
- เก็บรักษาในภาชนะที่ปิดสนิท ที่ผลิตจาก inert material เช่น neutral glass หรือ polyethylene เป็นต้น และควรจะใช้ให้เร็วที่สุดหลังจากวันที่ผลิต

- ต้องมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ไม่เกิน 10^3 CFU/มิลลิลิตร
- ต้องมีค่า conductivity ไม่เกิน $25 \mu\text{Scm}^{-1}$
- หากใช้เกณฑ์ตามมาตรฐาน Standard Method for the Examination of water and wastewater 24rd edition (2023) ต้องมีการทดสอบดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของน้ำที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐาน Standard Method for the Examination of water and wastewater 24rd edition (2023)

รายการทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
Chemical test		
- Conductivity	อย่างต่อเนื่อง หรือทุกวันที่มีการใช้	$<2 \mu\text{mhos/cm}$ ($\mu\text{msiemens/cm}$) ที่ 25 องศาเซลเซียส
- Total organic carbon	ทุกเดือน	$<1.0 \text{ mg/L}$
- Heavy metal, single (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn)	ทุกปี	$<0.05 \text{ mg/L}$
- Heavy metal, total	ทุกปี	$<0.1 \text{ mg/L}$
- Total chlorine residual	ทุกเดือนหรือทุกครั้งที่มีการใช้	$<0.1 \text{ mg/L}$
Bacteriological test		
- Heterotrophic plate count	ทุกเดือน	$<500 \text{ CFU/ml}$ or MPN $<500/\text{ml}$

(APHA-AWWA, 2023)

7.1.3.3 การชั่งน้ำหนัก

- เครื่องชั่งน้ำหนักที่ใช้ในการเตรียม ต้องใช้เครื่องที่มีความคลาดเคลื่อน (MPE) ไม่เกิน 1%

7.1.3.4 การแตกตัวและการละลาย

- การละลาย dehydrated media ควรจะทำการละลายอย่างรวดเร็ว ด้วยการคนอย่างช้าไปช้ามาหรืออย่างต่อเนื่อง ตามด้วยการให้ความร้อนในกรณีที่ต้องการให้เกิดการละลาย

7.1.3.5 การวัดและการปรับ pH

- หลังนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำ sterilization และทำให้เย็นลงที่ 25 องศาเซลเซียส pH สามารถคลาดเคลื่อนได้จาก pH เป้าหมายได้ ± 0.2 pH unit กรณีต้องมีการปรับสามารถใช้ NaOH 1 mol/L HCl 1 mol/L หากเป็นการปรับหลังการทำ sterilization ควรจะใส่อาร์ละลายที่ sterile

7.1.3.6 การจ่าย (dispensing)

- การจ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อลงในภาชนะควรจะมีการเหลือพื้นที่ด้านบน (head space) ไว้รองรับการเดือดในระหว่างการ autoclave หรือ remelt หรือไว้เพื่อป้องกันการล้นหลังจากเติม supplement

7.1.3.7 การทำ Sterilization

- ควรจะมีทำการ sterilization อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียม ในวันเดียวกับวันที่เตรียม
- โดยทั่วไปกระทำได้สองวิธีคือการนึ่ง (moist heat) และ การกรอง (filtration)
- การฆ่าเชื้อด้วยการนึ่ง มักทำในเครื่อง autoclave ควรหลีกเลี่ยงการนึ่งภาชนะที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเกิน 1,000 มิลลิลิตร เนื่องจากมีโอกาสเกิดการ overheat ขึ้นได้
- การฆ่าเชื้อโดยการกรอง สามารถทำได้ภายใต้สภาวะที่มีความดันหรือสุญญากาศ โดยเครื่องมือที่ปลอดเชื้อและแผ่นกรอง (membrane) ที่มีขนาดของรูพรุนน้อยกว่า 0.2 ไมโครเมตร

7.1.4 การเก็บรักษาและอายุของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้น

7.1.4.1 อาหารสำเร็จรูป (commercially supplied media)

- ให้ยึดสภาวะการเก็บ วันหมดอายุ และการใช้ ตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

7.1.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้น

- ต้องมีการบ่งชี้อาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการสอบกลับได้ เช่น การกำหนด lot No.
- ปกป้องอาหารจากแสงและป้องกันไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการระเหยของน้ำ
- ถ้าไม่สามารถใช้ได้ทันทีต้องเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 5 ± 3 องศาเซลเซียส กรณีที่เป็นเพลท (plate) สามารถเก็บได้ไม่เกิน 2-4 สัปดาห์ กรณีเป็นขวด (bottle) หรือหลอด (tube) ที่มีการ seal สามารถเก็บได้นาน 3-6 เดือน สามารถเก็บได้ยาวนานกว่านี้หากที่ห้องปฏิบัติการมีหลักฐานการประเมินอายุการเก็บ (shelf-life evaluation)

- การเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในรูปแบบ Petri-dish หากเป็นไปได้ควรมีการใช้ทันที กรณีไม่สามารถใช้ได้ทันทีควรเก็บแบบกลับหัว (invert) ในสภาวะที่มืดและ/หรือในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 ± 3 องศาเซลเซียส โดยต้องมีการบ่งชี้วันที่เตรียม วันที่หมดอายุ และชื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ ไว้ที่ด้านล่างหรือด้านข้างของ Petri-dish (กรณีมีการให้ code สามารถนำมาใช้แทนรายละเอียดดังกล่าวได้) สามารถยืดอายุของ plate ได้โดยใช้ถุง sealed plastic หรือถุง cellophane bag โดยเราสามารถลดการเกิดการ condense ภายในถุงได้โดยการทำ plate เย็นลงก่อนนำไปใส่ในถุง

7.1.5 การเตรียมการก่อนการใช้

ทำการหลอม (melting) ใน boiling water bath หรือเครื่องอื่น ๆ เช่น Steam flow-through autoclave หรือเครื่องอื่น ๆ ตามที่ระบุใน ISO 7218 และ ISO 8199 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการ autoclave แล้วไม่ควรให้ความร้อนนานเพื่อเป็นการรักษาคุณภาพ (หลีกเลี่ยงการเกิด

overheat) และให้นำอาหารเลี้ยงเชื้อออกทันทีเมื่อเกิดการลอม เสร็จแล้วนำมาวางที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลาสั้น ๆ เช่น 2 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ละลายแล้วให้เย็นลงที่ 47-50 องศาเซลเซียส ในอ่าง thermostatically controlled water bath อาหารเลี้ยงเชื้อที่ลอมแล้วควรใช้ให้เร็วที่สุด โดยต้องไม่เกิน 4 ชั่วโมง หากไม่ได้ใช้ทันที ไม่ควรนำไปทำให้แข็งตัวอีกครั้งและไม่ควรนำไปใช้

ในระหว่างขั้นตอนการให้ความร้อนใน water bath ให้คลายฝาปิดอาหารเลี้ยงเชื้อเล็กน้อยก่อนจะปิดให้แน่น และลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วลงมาที่อุณหภูมิที่จะปฏิบัติงาน

การเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลอมแล้วลงบน Petri-dishes ต้องมีความหนาอย่างน้อย 3 มิลลิเมตร (18 - 20 มิลลิเมตร ของ dish ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร)

7.2 เชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

7.2.1 การเลือกใช้

ควรใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่คุณลักษณะที่แน่นอน (stable characteristic) และเป็นตัวแทนของ species นั้น ๆ

7.2.2 การเก็บและการบำรุงรักษาเชื้อ

การเก็บสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทำ lyophilization เก็บในเม็ด bead ที่ -70 องศาเซลเซียส หรือใช้ liquid nitrogen ทั้งนี้ไม่มีวิธีใดที่เหมาะสมสำหรับทุกเชื้อ

ต้องบันทึกครั้งของการถ่ายเชื้อ (passage) ไว้เป็นลายลักษณ์อักษร ป้องกันการการ subculture ที่มากเกินไป ซึ่งจะทำให้ลักษณะทางกายภาพของเชื้อเปลี่ยนแปลงไปได้ โดยการถ่ายเชื้อ 1 ครั้ง หมายถึง การถ่ายเชื้อที่มีชีวิตและเจริญเติบโตได้ไปลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ๆ (fresh media) และมีการเจริญเติบโตเกิดขึ้น

เชื้อที่ซื้อมาจากแหล่งการค้า ควรทำการสืบทราบ ว่าเป็น reference strain หรือ reference stock รวมไปถึงจำนวนครั้งของการถ่ายเชื้อก่อนหน้านี้ และทำการบันทึกไว้ และห้องปฏิบัติการควร check การแสดงออกของลักษณะที่ต้องการ

การเตรียม reference stock ต้องทำอย่างระมัดระวัง ลดโอกาสการเกิดการปนเปื้อนข้าม การกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงลักษณะเฉพาะ ควรจะเก็บ reference stock ในรูปแบบ multiple portion ทั้งนี้ reference stock ไม่ควรนำกลับไปทำเป็น reference strain

การเตรียม stock culture ต้องทำอย่างระมัดระวัง ลดโอกาสการเกิดการปนเปื้อนข้ามและการเสื่อมสภาพ ควรจะทำการเตรียมโดยการ re-suspending จาก reference stock ลงใน non-selective growth medium จากนั้นนำไป incubate เพื่อให้ได้มาซึ่งเชื้อที่อยู่ในช่วง stationary phase culture ทั้งนี้ stock culture ไม่ควรนำกลับไปทำเป็น reference stock

การเตรียม working cultures ควรเตรียมจาก stock culture หรือ reference stock เพื่อใช้ในการทดสอบ ทั้งนี้ working cultures ไม่ควรนำกลับไปทำ reference stock, stock culture หรือแม้แต่นำไปทำเป็น working culture เพื่อใช้อีกครั้ง

หมายเหตุ : คำจำกัดความ (definition) ของ reference strain, reference stock, stock culture และ working culture อ้างอิงตาม ISO 11133 : 2014

7.2.3 เชื้อจุลินทรีย์สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพ

การเตรียม stock culture ควรใส่เชื้อลงใน solid medium เช่น TSA หรือ Blood TSA เพื่อให้ได้มาซึ่ง single colony หรือมีการเตรียมตามคำแนะนำของผู้ผลิต ทั้งนี้ควรมีการนำไปบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสมด้วย เช่น สำหรับ aerobic bacteria ส่วนมากคือ 18-24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และควรตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) ของเชื้อที่เจริญขึ้น จากนั้นเก็บรักษาในระยะเวลาที่เหมาะสม เช่น 14 วัน ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นต้น

การเตรียม working cultures ควรเตรียมจาก stock culture หรือ reference stock โดยต้องได้เชื้อที่มีความบริสุทธิ์ (pure culture) ที่อยู่ในระยะ stationary phase ลงใน non-selective broth และสำหรับ aerobic bacteria ส่วนใหญ่อยู่ที่ 18-24 ชั่วโมง 37 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ต้องมีการกำหนดระยะเวลาการใช้ เช่น ไม่เกิน 3 วัน เป็นต้น

การเตรียม inocula สำหรับการทดสอบ ปริมาตรของ inocula นั้นควรจะเป็นสัดส่วนเดียวกันกับที่ระบุในวิธีมาตรฐานที่ใช้อ้างอิงของวิธีการทดสอบ ซึ่งมักจะเท่ากับร้อยละ 10 ของ medium ที่ใช้ในขั้นตอนการทดสอบนั้น

ระดับของ inocula ในแต่ละวัตถุประสงค์ ควรสอดคล้องตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

(1) Productivity test

Quantitative test

Enumeration test : 10^2 CFU

Diluent : 10^4 CFU

Qualitative test

Qualitative test สำหรับ plate media : 10^3 - 10^4 CFU

Productivity test สำหรับ pre-enrichment/enrichment media : ≤ 100 CFU

Qualitative test สำหรับ transport media : 10^4 - 10^6 CFU

(2) Selectivity test : 10^4 - 10^6 CFU

(3) Specificity : 10^3 - 10^4 CFU

7.3 การควบคุมคุณภาพและการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ

7.3.1 การควบคุมคุณภาพทางกายภาพและเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมสำเร็จแล้ว ต้องสังเกตลักษณะดังต่อไปนี้

- ปริมาตร/ความหนา
- ลักษณะภายนอก สี และความเป็นเนื้อเดียวกัน
- ความสม่ำเสมอของเนื้อเจล

- ความขุ่นขึ้น
- ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท diluent ที่เตรียมเสร็จแล้ว ต้องมีความคลาดเคลื่อนไม่เกิน $\pm 2\%$

7.3.2 การควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยา

การทดสอบประสิทธิภาพทางจุลชีววิทยาต้องมีการดำเนินการในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นตัวแทนของ batch

ต้องมีการตรวจสอบ sterility อย่างน้อย 1 plate หรือ 1 tube ต่อชุดผลิตชุดเล็ก (<100 units)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วจาก dehydrate media ต้องมีการประเมินด้วยวิธีการทดสอบเชิงปริมาณ (quantitative) หรือเชิงคุณภาพ (qualitative) ตามรายละเอียดการทดสอบตามที่ ISO 11133 กำหนดไว้

อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ selective media จะต้องตรวจสอบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ไม่ต้องการ ทั้งนี้โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมทั้งที่เป็นบวกและลบ

กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อวัตถุประสงค์การนับจำนวน ต้องมีการทดสอบ quantitative testing method

กรณีอาหารเลี้ยงเชื้อที่รับเข้ามาใหม่หรือผู้ผลิตรายใหม่ ต้องมีการทดสอบ quantitative testing method เพื่อข้อมูลการเปลี่ยนแปลง

กรณีอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (ready to use media) ต้องดำเนินการดังต่อไปนี้

- ผู้ผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่ซึ่งได้ ISO 9001 แล้วต้องมี certificate ด้านคุณภาพมาพร้อมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่พวกเขาจำหน่าย ห้องปฏิบัติไม่จำเป็นต้องมาทดสอบมากมายเกินไป เพียงเก็บตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

- อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่มีการใส่ supplement หรือมีการควบคุมคุณภาพตามมาตรฐาน ISO 11133 โดยผู้ผลิตแล้วก็ตาม อย่างน้อยแนะนำให้ทำการทดสอบ qualitative test method

- ห้องปฏิบัติการต้องตรวจสอบเอกสารของผู้ผลิตให้แน่ใจว่าผู้ผลิตมี quality program สอดคล้องกับ requirement ของพวกเขา ตลอดช่วงการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

- การตรวจสอบเป็นระยะ (periodic check) ควรมีการทำเพื่อควบคุมคุณภาพการขนส่ง อีกทั้งการตรวจสอบในระหว่างการเก็บและการใช้งาน ต้องมีการกำหนดความถี่ไว้

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบยืนยัน (confirmation media) และตัวทำปฏิกิริยาสำหรับทดสอบยืนยัน (confirmation reagent) ควรมีการทวนสอบก่อนการใช้ ด้วยเชื้อ positive และ negative organism

เงื่อนไขการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดให้ดำเนินการตาม table E. 1 ใน ISO 11133 : 2014

7.4 วิธีทดสอบประสิทธิภาพ solid culture media

7.4.1 วิธีทดสอบสำหรับ quantitative test

ต้องมีการประเมินค่า productivity ratio โดยใช้เชื้อ target organism

- เกณฑ์การทดสอบ แบ่งออกเป็น 2 กรณี คือ

≥ 0.5 : สำหรับ selective medium

≥ 0.7 : สำหรับ non-selective medium

ต้องมีการประเมินค่า selectivity factor โดยใช้เชื้อ non-target organism

- เกณฑ์การทดสอบ คือ ≥ 2

7.4.2 วิธีทดสอบสำหรับ Qualitative test

ต้องมีการทำ qualitative streak method ประกอบด้วย การทดสอบ productivity โดยใช้เชื้อ target organism และ selectivity โดยใช้เชื้อ non-target organism

- เกณฑ์การทดสอบ คือ

productivity : score = 2 (เชื้อเจริญได้ดี)

selectivity : ยับยั้งการเจริญอย่างสมบูรณ์หรือบางส่วน

- การทดสอบ Selectivity ต้องใช้ loop ขนาด 1 ไมโครลิตร

7.5 วิธีทดสอบประสิทธิภาพ liquid culture media

7.5.1 วิธีทดสอบสำหรับ quantitative tube method

ต้องมีการทดสอบ productivity และ selectivity โดยใช้ loop ขนาด 10 ไมโครลิตร ถ่ายเชื้อลง non-selective agar medium

- เกณฑ์การทดสอบ คือ

Productivity : พบการเจริญอย่างน้อย 10 CFU จากการใช้เชื้อ target ปริมาตร 0.1 มิลลิตร ที่มีเชื้อ < 100 CFU

Selective factor : อย่างน้อยมีค่าเท่ากับ 2 จากการหาค่าของ dilution สูงสุดที่มีการเจริญของเชื้อ non-target ≥ 10 CFU หาค่าด้วย dilution สูงสุดที่มีการเจริญของเชื้อ non-target < 10 CFU

7.5.2 วิธีทดสอบสำหรับ qualitative tube method

สามารถใช้เชื้อ target/non-target หรือ ผสมกันได้ โดยต้องใช้เชื้อ target organism ปริมาณ ≤ 100 CFU ในขณะที่เชื้อ non-target organism $\geq 1,000$ CFU

หลอดที่ใช้ทดสอบต้องบรรจุปริมาตร 10 มิลลิตร ต่อ 1 batch กรณีหลอดที่ทดสอบบรรจุปริมาตรมากกว่านี้ ให้ใช้ inoculum size มากขึ้นตามสัดส่วน

- เกณฑ์การทดสอบ

Productivity : target organism target organism >10 colonies ใน specific medium โดยใช้ loop ขนาด 10 ไมโครลิตร

Selectivity : non target organism <10 colonies ใน non-selective agar plate โดยใช้ loop ขนาด 10 ไมโครลิตร

- เกณฑ์การแปลผลอาจแตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อและแต่ละ medium

7.5.3 วิธีทดสอบสำหรับ qualitative single tube method

เป็นวิธีการประเมินโดยประเมินจากความขุ่น (turbidity)

- เกณฑ์การทดสอบ

Score = 0 : no turbidity

Score = 1 : slight turbidity

Score = 2 : good turbidity

มักใช้วิธีนี้ในการทดสอบ non-selective liquid culture media เช่น pre-enrichment media และ selective media สำหรับการทดสอบ confirmation

กรณีเป็น pre-enrichment media ใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ batch ในการทดสอบ และใช้เชื้อ ≤ 100 CFU

กรณีเป็น confirmation media ใช้เชื้อ $>10^6$ CFU/มิลลิลิตร และใช้ loop ขนาด 1 ไมโครลิตร และต้องปฏิบัติตามเกณฑ์ที่ระบุไว้ใน Table K. 1 ใน ISO 11133 : 2014/amd. 2 : 2020 กำหนด

กรณีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความขุ่นอยู่แล้วสามารถทดสอบวิธีนี้ได้ แต่ต้องมีการ subculture เพื่อดูการเจริญใน solid medium เพิ่มเติม

7.6 การทดสอบประสิทธิภาพ diluent

7.6.1 Diluent

ให้ดำเนินการตามลำดับดังต่อไปนี้

1. ใช้ Suspension 1 มิลลิลิตร ที่มีเชื้อประมาณ 10^4 CFU ใส่ลงใน Diluent ปริมาตร 9 มิลลิลิตร

2. นำ 0.1 มิลลิลิตร ของ diluent มา spread ลงบน non-selective agar เช่น TSA ใช้เป็น reference media ในการทดสอบ กำหนดให้ส่วนนี้เป็น t_0

3. ทิ้ง Diluent ที่ใส่เชื้อแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที แล้วนำ 0.1 มิลลิลิตร ของ diluent มา spread ลงบน non-selective agar เช่น TSA ใช้เป็น reference media ในการทดสอบ กำหนดให้ส่วนนี้เป็น t_1

4. นำ TSA (t_0) และ TSA (t_1) ไปป้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง เกณฑ์การทดสอบ คือปริมาณเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปที่ t_1 ต้องไม่เกิน 30 ของปริมาณเชื้อที่ t_0

ที่มา : ISO 11133, 2104; ISO 11133 amd.1, 2018 และ ISO 11133 amd.2, 2020

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีมีความสำคัญต่อผลการทดสอบโดยตรง เพราะเป็นสิ่งที่แสดงออกถึงลักษณะหรือจำนวนของเชื้อเป้าหมายที่ทำการทดสอบ ห้องปฏิบัติการจึงควรให้ความสำคัญกับการตรวจรับ การตรวจสอบประสิทธิภาพ ความถูกต้องในการเตรียม ตลอดจนความเหมาะสมในการเก็บรักษา

การตรวจสอบประสิทธิภาพนั้นมีรายละเอียดการดำเนินการที่แตกต่างกันไปตามคุณสมบัติหรือวัตถุประสงค์การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อนั้น รวมถึงระดับของ inocula ที่ใช้สำหรับการทดสอบก็แตกต่างกันอีกด้วย ห้องปฏิบัติต้องดำเนินการตามรายละเอียดต่าง ๆ ในส่วนนี้ตามที่มาตรฐาน ISO 11133 (2014) ISO 11133 amd.1 (2018) และ ISO 11133 amd.2 (2020) กำหนด ซึ่งในภาพรวมได้กล่าวถึงไปแล้วในเอกสารคู่มือฉบับนี้

ในทางปฏิบัติผู้ตรวจประเมินสามารถขอเอกสารดังต่อไปนี้ เพื่อช่วยในการตรวจประเมินเรื่อง อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Media and Reagent)

- บันทึกการตรวจรับอาหารเลี้ยงเชื้อ
- บันทึกการตรวจสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ
- บันทึกการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
- บันทึกการทดสอบประสิทธิภาพน้ำที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
- บันทึกการทวนสอบปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท diluent
- เอกสารกำหนดรายละเอียดการจัดเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ

ถึงแม้มาตรฐาน ISO 11133 (2014) จะกำหนดให้จัดเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส แต่ในทางปฏิบัติ ห้องปฏิบัติการในโรงงานผลิตสินค้าปศุสัตว์ที่มีตัวอย่างต่อวันจำนวนมาก อาจจะไม่มียุทธรณ์ เพียงพอในการจัดเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นมาทั้งหมด ห้องปฏิบัติการสามารถเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ แต่ต้องกำหนดให้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีอายุสั้นกว่าที่มาตรฐานกำหนด และควรใช้ positive control และ negative control ควบคู่ไปกับการทดสอบเพื่อเป็นการเฝ้าระวังประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ

8. เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและวัสดุอ้างอิง (Reference cultures and Reference materials)

แนวทางการตรวจประเมิน

8.1 วัสดุอ้างอิง

ห้องปฏิบัติการควรมีการใช้วัสดุอ้างอิงและวัสดุอ้างอิงรับรอง (ตม้น้ำหนักและเครื่องมือวัดอุณหภูมิ) เพื่อใช้ในกรณีต่าง ๆ เช่น ความถูกต้องของผลการทดสอบ สอบเทียบเครื่องมือ ตรวจสอบความสามารถของห้องปฏิบัติการ ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหรือทวนสอบวิธีทดสอบ เปรียบเทียบวิธีทดสอบต่างวิธี แสดงคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ และแสดงความสม่ำเสมอของประสิทธิภาพของชุดทดสอบ หากเป็นไปได้วัสดุอ้างอิงจะต้องใช้ให้เหมาะสมกับ matrix ที่เราทดสอบ

วัสดุอ้างอิงควรมีการจัดการ (handle) และจัดเก็บภายใต้สภาวะที่ไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ ตามขั้นตอนที่จัดทำไว้เป็นเอกสารและวิธีทดสอบที่เกี่ยวข้อง

8.2 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (มีการกล่าวถึงไปบางส่วนในข้อ 7. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี)

เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ใช้สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อและชุดทดสอบ หรือใช้สำหรับทดสอบภายในห้องปฏิบัติการนั้น จำเป็นจะต้องสอบกลับได้ โดยห้องปฏิบัติการควรมีสายพันธุ์ (strain) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับโดยตรงจากศูนย์รวบรวมแห่งชาติหรือนานาชาติที่เป็นที่ยอมรับ หรือองค์กรที่ยอมรับโดยหน่วยรับรอง โดยห้องปฏิบัติการควรจัดทำเอกสารเกี่ยวกับการจัดเก็บและการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

Reference strain ควรมีการ sub-culture เพียงหนึ่งครั้งเพื่อทำให้เป็น reference stock ทั้งนี้ควรมีการตรวจสอบความบริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามความเหมาะสม Reference stock ควรเก็บรักษาไว้ในลักษณะ deep frozen หรือ lyophilize เพื่อรักษาคุณสมบัติ

Working culture ที่ใช้งานประจำควรได้มาจากการทำ primary subculture จาก reference stock ซึ่งห้องปฏิบัติการต้องแสดงหลักฐานว่าคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องไม่มีการเปลี่ยนแปลง สำหรับ reference stock ส่วนที่ได้มีการนำมาละลายเพื่อใช้ในการทำ working culture แล้วจะต้องไม่นำส่วนนั้นกลับไปแช่แข็งเพื่อนำกลับมาใช้เป็น reference stock ใหม่

ที่มา : สมชายและคณะ, 2555 และ Eurachem, 2023

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงมีความสำคัญในการประกันคุณภาพของการทดสอบ และการทดสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้ออ้างอิงที่ได้รับมาต้องมีคุณสมบัติตรงตามชนิดของเชื้อนั้น ๆ รวมถึงห้องปฏิบัติการต้องมีการจัดการที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเชื้อตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บจนถึงการใช้งาน โดยมีการตรวจสอบเชื้ออ้างอิงเป็นระยะ

ดังนั้นจุดสำคัญในการตรวจประเมินเชื้อจุลินทรีย์ คือ ห้องปฏิบัติการต้องมีหลักฐานแสดงได้ว่าเชื้อยังคงคุณสมบัติของเชื้อนั้นไปจนถึงช่วงเวลาที่นำมาใช้ในการทดสอบ

ในทางปฏิบัติผู้ตรวจประเมินสามารถขอเอกสารดังต่อไปนี้ เพื่อช่วยในการตรวจประเมินเรื่อง เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

- เอกสารวิธีปฏิบัติงานเรื่องการจัดการเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง
- บันทึกการตรวจสอบคุณสมบัติเชื้ออ้างอิง
- ใบ certificate ของเชื้อ reference strain หรือ reference stock จากผู้ผลิตหรือผู้จำหน่าย
- บันทึกอุณหภูมิประจำวัน (daily check) ของเครื่องมือที่ใช้จัดเก็บ reference stock และ working culture

9. การสุ่มตัวอย่าง (Sampling) (กรณีที่ห้องปฏิบัติการต้องรับผิดชอบ)

แนวทางการตรวจประเมิน

หากห้องปฏิบัติการต้องรับผิดชอบการสุ่มตัวอย่าง (sampling) เพื่อใช้เป็นตัวอย่างทดสอบ การสุ่มตัวอย่างนั้นควรจะอยู่ภายใต้ระบบการประกันคุณภาพ รวมทั้งต้องได้รับการรับรองจากหน่วยรับรองด้วย

ห้องปฏิบัติการที่รับผิดชอบการสุ่มตัวอย่าง ควรมีขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง ณ สถานที่สุ่มนั้น และขั้นตอนการสุ่มตัวอย่างนั้น ควรประกอบด้วย

- แผนการสุ่มตัวอย่าง (ซึ่งใช้วิธีการทางสถิติที่เหมาะสม)
- ปัจจัยต่าง ๆ ที่ต้องควบคุมเพื่อให้มั่นใจว่า ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ
- การคัดเลือกตัวอย่าง
- การชักและการเตรียมตัวอย่าง

หากลูกค้าร้องขอให้ปฏิบัติเบี่ยงเบนจากแผนการสุ่มตัวอย่างที่กำหนด ห้องปฏิบัติการควรบันทึกไว้เป็นเอกสาร และสื่อสารให้บุคคลที่เกี่ยวข้องทราบ

การสุ่มตัวอย่างจะต้องกระทำโดยบุคคลที่ผ่านการฝึกอบรม และต้องกระทำอย่างปลอดภัย ห้องปฏิบัติการต้องบันทึกข้อมูลการสุ่มและการดำเนินงานต่าง ๆ บันทึกดังกล่าว ซึ่งต้องรวมถึง

- ขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง
- ผู้สุ่มตัวอย่าง
- วันเวลาที่สุ่มตัวอย่าง
- สภาพแวดล้อม (หากมีความเกี่ยวข้อง) เช่น การปนเปื้อนในอากาศและอุณหภูมิ เป็นสิ่งที่ต้องเฝ้าระวังและบันทึก ณ จุดที่ทำการสุ่มตัวอย่าง
- ตำแหน่งที่สุ่ม
- ต้องใช้ขั้นตอนทางสถิติ ในกรณีที่เหมาะสม

การขนส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการและจัดเก็บตัวอย่างไว้ยืนยัน จะต้องกระทำภายใต้ สภาพแวดล้อมที่สามารถลดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างไว้ได้ (อาจต้องแช่เย็นหรือ แช่แข็ง เป็นต้น) โดยสภาพแวดล้อมดังกล่าว ควรมีการตรวจสอบและเก็บบันทึกเหล่านั้นไว้ ความรับผิดชอบต่าง ๆ ในการขนส่งและการเก็บรักษาระหว่างที่ตัวอย่างเดินทางมายังห้องปฏิบัติการต้อง จัดทำเป็นเอกสารไว้ ต้องทำการทดสอบตัวอย่างหลังจากการสุ่มให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้

ที่มา : สมชายและคณะ, 2555 และ Eurachem, 2023

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการถ่ายโอนภารกิจฯ ส่วนใหญ่ มีนโยบายไม่สุ่มตัวอย่าง ซึ่งระบุไว้ในคู่มือคุณภาพ (quality manual) แต่หากห้องปฏิบัติการต้องการทำการสุ่มตัวอย่างเอง การสุ่มตัวอย่างต้องทำโดยบุคคลที่ผ่านการฝึกอบรม มีการบันทึกรายละเอียดต่าง ๆ ในระหว่างการสุ่มตัวอย่างให้ครบถ้วนจัดเก็บตัวอย่างระหว่างการขนส่งตัวอย่างภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมจนกระทั่งถึงจุดรับตัวอย่างของห้องปฏิบัติการ

10. การบ่งชี้ การจัดการ และการเตรียมตัวอย่าง (Sample identification, handing and preparation)

แนวทางการตรวจประเมิน

10.1 การบ่งชี้ตัวอย่าง

ห้องปฏิบัติการควรมีเอกสารขั้นตอนที่ครอบคลุมถึงการขนส่งตัวอย่างและการบ่งชี้ตัวอย่าง หากตัวอย่างมีไม่เพียงพอหรือตัวอย่างมีสภาพไม่ดี เนื่องจากเน่าเสีย อุณหภูมิเก็บรักษาไม่เหมาะสม ภาชนะบรรจุฉีกขาดหรือฉลากมีความไม่สมบูรณ์ในรายละเอียด ห้องปฏิบัติการควรหารือกับลูกค้า ก่อนการตัดสินใจใด ๆ (ไม่ว่าจะทดสอบหรือไม่รับตัวอย่าง) โดยต้องมีการเก็บบันทึกเหล่านี้ไว้และ สภาพที่ผิดปกติของตัวอย่างต้องถูกระบุลงไปใน test report

ห้องปฏิบัติการควรบันทึกข้อมูลที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับการรับตัวอย่าง ได้แก่

- วัน เดือน ปีที่รับตัวอย่าง ซึ่งอาจรวมถึงเวลาที่รับตัวอย่าง
- สภาพตัวอย่างขณะที่รับ และหากจำเป็นจะต้องระบุอุณหภูมิไว้ด้วย
- รายละเอียดของการสุ่มตัวอย่าง เช่น วันที่สุ่ม และสถานะของการสุ่ม
- แผนการสุ่ม ขั้นตอนการสุ่ม กฎเกณฑ์การสุ่ม และความเบี่ยงเบนใด ๆ ที่เกิดขึ้น

จากการสุ่ม

ควรมีการบ่งชี้ตัวอย่างอย่างจำเพาะ (unique identification)

ใบรับตัวอย่างจะควรมีรายละเอียดเหล่านี้

- การบ่งชี้ห้องปฏิบัติการ
- การบ่งชี้ของใบรับตัวอย่าง (รวมทั้งหมายเลขหน้า)
- การบ่งชี้ลูกค้า
- วันเวลาของการเก็บตัวอย่าง รับตัวอย่าง และรายการทดสอบที่ร้องขอตามความ

เหมาะสม

- รายละเอียดของการสุ่มตัวอย่างในกรณีที่เกี่ยวข้อง

ห้องปฏิบัติการต้องระวังไม่ให้ข้อมูลของลูกค้าเข้าไปถึงผู้ทำการทดสอบ เพราะจะส่งผลกระทบต่อ ความเป็นกลางในการทดสอบ (ISO/IEC 17025, 2017)

10.2 การจัดการตัวอย่าง

ตัวอย่างที่รอการวิเคราะห์ ห้องปฏิบัติการควรเก็บไว้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเพื่อลดการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ และสภาวะการเก็บรักษาจะต้องถูกระบุไว้และบันทึกให้ครบถ้วน

ภาชนะบรรจุและฉลากจากตัวอย่างที่อาจมีการปนเปื้อนสูง ควรจะต้องจัดการด้วยความ ระมัดระวัง เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่จะแพร่กระจายออกไป

ห้องปฏิบัติการควรมีขั้นตอนในการเก็บและหึ่งตัวอย่าง ตัวอย่างควรเก็บไว้จนกว่าผลทดสอบจะออกมา หรือนานกว่านี้หากมีเงื่อนไขกำหนดไว้ เช่น ข้อกำหนดทางกฎหมายหรือข้อกำหนดของลูกค้า ส่วนของตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการที่มีการปนเปื้อนสูง ต้องทำการฆ่าเชื้อก่อนที่จะหึ่ง

10.3 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

การสุ่มเลือกตัวอย่างทดสอบ (sub-sampling) ก่อนที่จะทำการทดสอบทันที ควรพิจารณาว่าเป็นส่วนหนึ่งของวิธีการทดสอบ โดยควรปฏิบัติตามมาตรฐานระดับประเทศหรือมาตรฐานสากล หรือ ขั้นตอนการ sub-sampling ควรคำนึงถึงการกระจายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ แนวทางทั่วไประบุไว้ใน ISO 6887 และ ISO 7218

ห้องปฏิบัติการควรแสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างนั้น ส่วนที่จะนำไปทดสอบได้เป็นตัวแทนที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์และเหมาะสมที่จะนำไปวิเคราะห์ อีกทั้งต้องมีการหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของส่วนที่จะนำไปวิเคราะห์และมีการหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ในกรณีตัวอย่างเป็นเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ควรตัดและสุ่มเลือกตัวอย่างจากบริเวณผิวด้านนอกและส่วนที่ลึกลงไป (ISO 6887-2, 2017)

การเตรียมตัวอย่าง ได้แก่ การตัดและสุ่มเลือกตัวอย่างทดสอบ การชั่งตัวอย่างทดสอบ การเตรียมสารละลายตัวอย่างเริ่มต้น การเจือจางสารละลายตัวอย่าง และช่วงระยะเวลาของการทดสอบ ต้องถูกต้องตามหลักมาตรฐานสากล และ/หรือเงื่อนไขของวิธีทดสอบที่มีการระบุไว้

ที่มา : สมชายและคณะ, 2555 และ Eurachem, 2023

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

การระบุตัวอย่าง การจัดการตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่าง นั้นมีความสำคัญมากเนื่องจากเป็นกระบวนการที่ช่วยเก็บรักษาความเป็นจริงของตัวอย่างที่ทำการทดสอบ ว่ามีเชื้อใดอยู่ปริมาณเท่าใด ในลำดับแรกห้องปฏิบัติต้องมีการกำหนดเกณฑ์การตรวจสอบสภาพตัวอย่างว่ามีความสมบูรณ์เพียงพอที่จะทำการวิเคราะห์หรือไม่ เนื่องจากอาจเกิดความผิดปกติขึ้นในระหว่างการสุ่มตัวอย่าง และการขนส่งตัวอย่างมายังจุดรับตัวอย่าง และหากพบข้อสังเกตอาจจะต้องมีการบันทึกข้อสังเกตดังกล่าวลงในใบรายงานผลด้วยเพื่อแจ้งให้ลูกค้าทราบ หลังจากตรวจสอบสภาพตัวอย่างแล้ว ห้องปฏิบัติการจะมีการจัดการตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ที่เหมาะสมตามชนิดของตัวอย่าง ต่อจากนั้นห้องปฏิบัติการต้องทำการเตรียมตัวอย่างทดสอบอย่างถูกต้องตามหลักมาตรฐานสากลหรือเงื่อนไขของวิธีทดสอบที่มีการระบุไว้ เพื่อให้ผลการทดสอบสะท้อนความเป็นจริงของตัวอย่างมากที่สุด ทั้งนี้ตัวอย่างการจัดเก็บตัวอย่างเพื่อรอการทดสอบได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสม จากมาตรฐานวิชาการด้านจุลชีววิทยา

ชนิด/สภาพ ตัวอย่าง	สถานที่จัดเก็บ	อุณหภูมิ	ระยะเวลา	เอกสารอ้างอิง
ตัวอย่างแช่แข็ง	Freezer	<-18 องศา เซลเซียส	<36 ชั่วโมง	(ISO 7218, 2014)
ตัวอย่างแช่เย็น	Refrigerator	0-4 องศา เซลเซียส	<36 ชั่วโมง	(FDA BAM, 2023)
ตัวอย่าง อุณหภูมิห้อง เช่น วัตถุดิบ ขนไก่ปน บรรจุภัณฑ์ สารเคมี	ห้องที่มีการเปิด เครื่องปรับอากาศ ตลอดเวลา	18-27 องศา เซลเซียส	<36 ชั่วโมง	(ISO 7218, 2014)
เนื้อหน้าอก	Freezer	<-18 องศา เซลเซียส	<12 ชั่วโมง	(ISO 7218, 2014)
อาหารจากโรง อาหาร	Refrigerator	1-5 องศา เซลเซียส	<36 ชั่วโมง	(ISO 7218, 2014)
Air Sampling	ห้องที่มีการเปิด เครื่องปรับอากาศ ตลอดเวลา	18-27 องศา เซลเซียส	<2 ชั่วโมง	(ISO 7218, 2014)

ตัวอย่างการเตรียมตัวอย่างทดสอบ

การตัดและสุ่มเลือกตัวอย่างทดสอบ (sub-sampling)

1. ทำความสะอาดภาชนะสำหรับเตรียมตัวอย่าง และบริเวณที่จะทำการเตรียมตัวอย่างโดยการสเปรย์หรือเช็ดด้วยสารเคมีที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค (disinfectant) แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง
2. ทำการฆ่าเชื้อบริเวณรอบนอกถุงบรรจุตัวอย่าง โดยการสเปรย์หรือเช็ดด้วย disinfectant แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง
3. มีดหรือกรรไกร ที่เปิดถุงตัวอย่าง และกรรไกร ปากคีบและ/หรือ cork borers ตัดตัวอย่าง ต้องเป็นอุปกรณ์ชุดใหม่

(ISO 7218, 2014)

4. อุปกรณ์ที่ใช้ตัดตัวอย่างต้องผ่านการฆ่าเชื้อโดย autoclave จะดีที่สุด ซึ่งการฆ่าเชื้อโดยใช้การแอลกอฮอล์ 70% ร่วมกับการเผาไฟนั้นสามารถทำได้แต่ไม่แนะนำให้ใช้กับเชื้อที่มีสปอร์เพราะเชื้อจะสามารถอยู่รอดได้ (ISO 6887-2, 2017)

5. การตัดตัวอย่างต้องตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยวิธีปลอดภัย (aseptic technique) และสุ่มเลือกจากหลาย ๆ จุด จุดละเท่า ๆ กัน และหลีกเลี่ยงจากบริเวณที่ทำการเปิดถุง เพราะอาจจะทำให้เกิดการปนเปื้อน ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็งหรือของเหลวให้ใช้ช้อนสแตนเลส (Stainless Steel) คนให้เข้ากันก่อนที่จะตัดตัวอย่างไปชั่งน้ำหนัก

6. ในกรณีที่ตัวอย่างแช่แข็ง สามารถทำการละลาย (thawing) ที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส จะต้องเตรียมตัวอย่างให้เสร็จเรียบร้อยภายใน 3 ชั่วโมง ยกเว้นกรณีต้องละลายอย่างรวดเร็วสามารถทำได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาไม่เกิน 15 นาที

(FDA BAM, 2023)

การชั่งตัวอย่างทดสอบ

1. ชั่งตัวอย่างลงใน sterile plastic bags หรือ filtered bags ด้วยเครื่องชั่ง
2. น้ำหนักของตัวอย่างที่ชั่ง ควรมีความผิดพลาดสูงสุดไม่เกิน $\pm 1\%$ (FDA BAM, 2023) หรือ $\pm 5\%$ (ISO7218, 2014) ขึ้นกับวิธีการทดสอบของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด ทั้งนี้ต้องมีการบันทึกน้ำหนักตัวอย่างไว้

การเตรียมสารละลายตัวอย่างเริ่มต้น (initial suspension หรือ primary dilution)

เติม diluent ที่เหมาะสมปริมาตร 9 เท่า ให้ได้ dilution เริ่มต้นเป็น 1 : 10 ตามที่กำหนดไว้ในเอกสารวิธีการทดสอบ กรณีตัวอย่างเป็นชนิดของเหลว (liquid products) สามารถนำไปทำการทดสอบได้โดยไม่ต้องเติม diluent (ISO6887-1, 2017)

การเจือจางสารละลายตัวอย่าง

1. เตรียมสารละลาย (diluent) เช่น BPB, Peptone Diluent, 0.1% หรือ Peptone Salt Solution เป็นต้น ให้มีจำนวนเพียงพอต่อความต้องการทำ dilution
2. ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างในอัตราส่วน 1 : 9 โดยใช้ sterile pipette ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ± 0.02 มิลลิลิตร (หากดูดปริมาตรใหญ่กว่านี้ให้ใช้ $\pm 2\%$) จากระดับ dilution เริ่มต้นคือ 1 : 10 (10^{-1}) หรือ undiluted ใส่ลงในหลอดบรรจุ diluent 9 มิลลิลิตร หรือ 9 เท่าของ initial suspension ที่ดูดมา ผสมให้เข้ากันดีโดยใช้ vortex mixer ประมาณ 5-10 วินาที แล้วทำการเจือจางลง ในลำดับถัดไปจนถึง dilution ที่ต้องการ

(ISO6887-1, 2017)

ควรใช้ปิเปตต์ที่มีความเที่ยงตรง และไม่ควรรูดปริมาตร น้อยกว่าร้อยละ 10 ของ total volume ของปิเปตต์ (FDA BAM, 2023)

ช่วงระยะเวลาของการทดสอบ

เริ่มตั้งแต่การเตรียม initial suspension จนถึงการ inoculate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อควรใช้ระยะเวลาไม่เกิน 45 นาที (ISO7218, 2014 และ ISO6887-1, 2017) สำหรับวิธีทดสอบเชิงปริมาณ หรือระยะเวลาตามที่วิธีทดสอบมีการกำหนดไว้อย่างจำเพาะ

ในทางปฏิบัติผู้ตรวจประเมินสามารถขอดูเอกสารดังต่อไปนี้ เพื่อช่วยในการตรวจประเมินเรื่อง การบ่งชี้ตัวอย่าง การจัดการตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่าง

- ใบคำขอของลูกค้า
- ใบรับตัวอย่าง
- ใบสรุปรายการวิธีทดสอบที่จะต้องดำเนินการกับตัวอย่าง
- เอกสารวิธีปฏิบัติงานเรื่องการจัดการตัวอย่าง
- บันทึกการทวนสอบการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง

11. การประกันคุณภาพผลการทดสอบ (Quality assurance of results)

แนวทางในการตรวจประเมิน

11.1 การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal quality control)

การควบคุมคุณภาพควรครอบคลุมขั้นตอนต่าง ๆ ภายในห้องปฏิบัติการ เพื่อการประเมินงานอย่างต่อเนื่อง โดยมีวัตถุประสงค์หลัก คือการทำให้มั่นใจในคุณภาพและความสม่ำเสมอของผลทดสอบ รวมถึงความสอดคล้องในการปฏิบัติงานทดสอบตามเงื่อนไขที่ได้รับไว้

ควรมีโปรแกรมการตรวจสอบองค์ประกอบต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทดสอบเป็นระยะ เพื่อตรวจสอบความผันแปรต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างผู้วิเคราะห์ และระหว่างเครื่องมือหรือวัสดุ เป็นต้น และมีการต้องควบคุมให้อยู่ในเกณฑ์กำหนด ตัวอย่างโปรแกรมการตรวจสอบ ได้แก่

1. การตรวจสอบการทำงานของเครื่องมือวัดและเครื่องมือทดสอบ
2. การใช้ spiked/naturally contaminated sample ที่มีระดับการปนเปื้อนของเชื้อที่พบในธรรมชาติของตัวอย่างประเภทนั้น ๆ
3. การใช้วัสดุอ้างอิง (reference material) รวมทั้งวัสดุของ proficiency testing scheme
4. การทดสอบซ้ำ (replicate testing)
5. การประเมินผลทดสอบที่มีการทำซ้ำ เช่น การนับจำนวนโคโลนีใน Petri-dish ระหว่างผู้วิเคราะห์ 2 คน
6. การใช้ blind sample
7. การสุ่มทบทวน รายงานผลทดสอบ

สำหรับวิธีทดสอบทาง molecular ควรมีการใช้ positive control, negative control, internal amplification control และ external amplification controls และควรมีการจัดทำสรุปอัตราส่วนของ false positive และ false negative เป็นเอกสารไว้อย่างชัดเจน

โปรแกรมการควบคุมคุณภาพเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับความถี่ของการดำเนินการวิธีทดสอบนั้น ๆ (รวมถึงแต่ละ matrix ถ้าเป็นไปได้) และวิธีทดสอบต่าง ๆ จะมีการควบคุมคุณภาพเหล่านี้เพื่อเฝ้าระวังความสามารถ และแนะนำว่าข้อมูลจากการควบคุมคุณภาพควรจะนำมาทำการ plot ให้เห็นได้ชัดเจนเพื่อช่วยในการประเมินแนวโน้ม

ในกรณีวิธีทดสอบที่ห้องปฏิบัติการได้รับการรับรองแต่ไม่ค่อยได้ดำเนินการ ควรมีการควบคุมคุณภาพที่มากกว่าปกติ ควบคู่ไปกับการทดสอบ

โดยทั่วไปแล้วความแตกต่างที่ยอมรับได้ของการทำซ้ำมักจะไม่เกิน $0.5 \log_{10}$ ซึ่งเกณฑ์ดังกล่าวมีพื้นฐานมาจากการควบคุมคุณภาพภายในของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาของการทำซ้ำ

ในวิธีทดสอบที่มีหน่วยนับเป็น CFU สำหรับกรณีวิธีทดสอบที่มีหน่วยเป็น MPN นั้นธรรมชาติของวิธีทดสอบจะมีความผันแปร (variability) มากกว่าวิธีทดสอบที่มีหน่วยนับ CFU (ISO 22117, 2019)

ห้องปฏิบัติการต้องกำหนดความถี่และเกณฑ์การควบคุมคุณภาพภายในไว้อย่างชัดเจน โดยความถี่ในการดำเนินการจะขึ้นอยู่กับความเสี่ยงของตัวอย่างที่ดำเนินการทดสอบ

11.2 การควบคุมคุณภาพจากภายนอก (External quality control)

ห้องปฏิบัติการควรเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) หรือการประเมินคุณภาพจากภายนอก (external quality assessment หรือ EQA) โดยสม่ำเสมอตามขอบข่ายที่ได้รับการรับรอง โดยการทดสอบความชำนาญนั้นต้องเลือก matrix ที่เหมาะสม ในกรณีที่ไม่สามารถเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญได้อาจจะต้องมีการทำ interlaboratory comparisons ที่มีจำนวนห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมที่เพียงพอ บนพื้นฐานการใช้เอกสารหลักเกณฑ์การปฏิบัติที่เหมาะสม

นอกจากการใช้ผลการทดสอบความชำนาญประเมิน laboratory bias ห้องปฏิบัติการควรใช้ผลดังกล่าวในการตรวจสอบความน่าเชื่อถือของระบบคุณภาพทั้งหมด หากมีผลทดสอบที่ไม่น่าพอใจ ห้องปฏิบัติการต้องมีแผนปฏิบัติการ มีการแก้ไขและตรวจสอบผลการแก้ไขและจัดทำเป็นเอกสารไว้

ตามระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการถ่ายโอนภารกิจด้านการวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์ พ.ศ. 2564 ห้องปฏิบัติการต้องเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญ ที่ดำเนินการโดยกรมปศุสัตว์ (กรมปศุสัตว์, 2564) โดยโปรแกรมทดสอบความชำนาญการที่ห้องปฏิบัติการเข้าร่วมต้องมาจาก PT provider ที่ได้รับรองมาตรฐาน ISO 17043

กรณี z-score หรือ z'-score ที่คำนวณโดยใช้ ตามเกณฑ์ the conventional interpretation of z-score (ISO 13528, 2015) ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ใช้ในโปรแกรมทดสอบความชำนาญ คือ

$|z| \leq 2.00$ แสดงว่า ผลการทดสอบนั้นน่าพึงพอใจ (satisfactory)

$2.00 < |z| < 3.00$ แสดงว่า ผลการทดสอบนั้นน่าสงสัย (questionable)

$|z| \geq 3.00$ แสดงว่า ผลการทดสอบนั้นไม่น่าพึงพอใจ (unsatisfactory)

ผลการเข้าร่วมโปรแกรมฯ ห้องปฏิบัติการต้องมีค่า $|z| \leq 2.00$ หรือ ให้ผลการทดสอบเป็น satisfactory

ที่มา : สมชายและคณะ, 2555 และ Eurachem, 2023

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

การตรวจประเมินเรื่องการประกันคุณภาพผลการทดสอบ เป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องในการดำเนินการทดสอบ ผู้ตรวจประเมินควรพิจารณาเอกสารหรือหลักฐานที่แสดงได้ว่าห้องปฏิบัติการได้จัดทำแผนการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการครอบคลุมวิธีทดสอบที่ใช้ โดย

ต้องมีรายละเอียดของการดำเนินการในแต่ละวิธีอย่างเหมาะสมตามหลักการและวัตถุประสงค์ของวิธีนั้น ๆ อีกทั้งห้องปฏิบัติการต้องมีการดำเนินการตามแผนที่กำหนด และต้องมีหลักฐานแสดงการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการประกันคุณภาพผลการทดสอบเพื่อนำไปใช้ในการป้องกันหรือแก้ไขปัญหา โดยห้องปฏิบัติการได้กำหนดให้มีผู้รับผิดชอบในการดำเนินการวิเคราะห์ข้อมูล และนำไปแก้ไขปัญหา หากการควบคุมคุณภาพไม่เป็นไปตามกำหนด

ทั้งนี้ผู้ตรวจประเมินควรพิจารณาว่าการของประกันคุณภาพผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งขึ้นกับลักษณะการทดสอบเชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณ ชนิดตัวอย่าง จำนวนบุคลากร การควบคุมสภาวะแวดล้อม นโยบายของห้องปฏิบัติการ ลักษณะการให้บริการ ระบบการควบคุมคุณภาพด้านอื่น ๆ ต้นทุนทางธุรกิจ และข้อกำหนดของประเทศคู่ค้า เป็นต้น (สรเฉลิมและคณะ, 2563) โดยตัวอย่างการประกันคุณภาพผลการทดสอบมีการแสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการควบคุมคุณภาพการทดสอบด้านจุลชีววิทยาที่กำหนดโดยองค์กรระดับสากล และระดับประเทศ

รูปแบบการควบคุมคุณภาพการทดสอบ	แนวทางการควบคุมคุณภาพผลทดสอบ			องค์กรที่อ้างอิง
	วิธีดำเนินการ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ	
1. การทดสอบตัวอย่างควบคุมบวก	1. เติมเชื้อเป้าหมายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ	-	กำหนดให้พบเชื้อที่แสดงลักษณะเชื้อเป้าหมาย	FAO
		ทุกครั้งที่เปลี่ยน lot media	-	AWWA
	2. เติมเชื้อเป้าหมายลงในตัวอย่างเลียนแบบการปนเปื้อนต่ำที่ขีดจำกัดความสามารถในการตรวจพบ	ทุกชุดการทดสอบ	-	NATA
		-	พบลักษณะของเชื้อเป้าหมายในทุกกระบวนการ	FAO
	3. เติมเชื้อเป้าหมายลงในตัวอย่างควบคุมคู่กับเชื้อแข่งขัน	เป็นระยะสัมพันธ์กับปริมาณงาน	-	Eurachem
		-	-	DMSc
	4. ทดสอบตัวอย่างทราบการปนเปื้อนตามธรรมชาติ ที่มีความหลากหลาย	เป็นระยะสัมพันธ์กับปริมาณงาน	-	Eurachem
		-	-	DMSc
	5. ทดสอบตัวอย่างอ้างอิงเช่น จากตัวอย่าง PT	เป็นประจำ	-	Eurachem, APHA
		-	-	DMSc
	6. การใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง และ/หรือวัสดุอ้างอิงทุติยภูมิ	ทุกวัน	-	A2LA
		-	-	TSI
2. การทดสอบตัวอย่างควบคุมลบ	1. ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อเสมือนเป็นตัวอย่างปกติ (Blank)	-	ไม่พบเชื้อ	FAO
	2. ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการ	-	พบลักษณะของเชื้อที่	FAO

รูปแบบการควบคุมคุณภาพการทดสอบ	แนวทางการควบคุมคุณภาพผลทดสอบ			องค์กรที่อ้างอิง
	วิธีดำเนินการ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ	
	เดิมเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายของการทดสอบเสมือนตัวอย่างปกติ		ไม่ใช่เป้าหมายในทุกกระบวนการ หรือเชื้อไม่เจริญ	
		ทุกครั้งที่เปลี่ยน lot ทำ media	-	AWWA
	3. ทดสอบตัวอย่างที่มีการเดิมเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายของการทดสอบที่ควบคู่กับการทดสอบตัวอย่างปกติ	ทุกชุดการทดสอบ	ต้องไม่พบเชื้อเป้าหมายของการทดสอบ	NATA
3. การเปรียบเทียบการนับจำนวนซ้ำ	1. ประเมินผลการนับจำนวนเชื้อที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อซ้ำโดยผู้ทดสอบคนเดิม	อย่างน้อยเดือนละครั้ง	แตกต่างไม่เกิน 5%	AWWA
		เป็นระยะสัมพันธ์กับปริมาณงาน	-	Eurachem
4. การเปรียบเทียบการนับจำนวนซ้ำระหว่างนักวิเคราะห์	1. ประเมินผลการนับจำนวนเชื้อที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อซ้ำโดยผู้วิเคราะห์ต่างคน	อย่างน้อยเดือนละครั้ง	แตกต่างไม่เกิน 10%	AWWA
		เป็นระยะสัมพันธ์กับปริมาณงาน	-	Eurachem
5. การทดสอบซ้ำ	1. ทดสอบตัวอย่างเดียวกันซ้ำทั้งกระบวนการ	ทุก 10% หรือถ้าตัวอย่างน้อยกว่า 10 ตัวอย่าง/สัปดาห์ให้ทำอย่างน้อย 1 ตัวอย่าง / สัปดาห์	ตามค่า precision criteria กรณีทดสอบเชิงปริมาณ	AWWA
		เป็นระยะสัมพันธ์กับปริมาณงาน	-	Eurachem
		ใช้ทดแทนกรณีที่ไม่มีโปรแกรมPT	-	NATA
		-	-	TISI, DMSC
		-	-	TSI
6. การทดสอบซ้ำโดยวิธี	1. ทดสอบโดยใช้วิธีใหม่เปรียบเทียบกับวิธีเดิมที่มีใช้งานอย่างน้อย 100 ตัวอย่าง ในช่วงตลอด 1 ปีก่อนนำวิธีใหม่มาใช้	-	-	AWWA
	2. การทดสอบซ้ำโดยวิธีการต่างวิธี	-	-	TISI
7. การเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญ	1. ห้องปฏิบัติการต้องร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญโดยผู้วิเคราะห์ทดสอบทุกคน	1ครั้ง/ปี	Z score ไม่เกิน 3 หรือพบ/ไม่พบ ในตัวอย่างตามกำหนด	FAO
	2. ห้องปฏิบัติการต้องร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญในขอบข่ายที่เกี่ยวข้องกับการ	2ครั้ง/ปี	Z score ไม่เกิน 3 หรือพบ/ไม่พบ ในตัวอย่าง	NATA AWWA, Eurachem,

รูปแบบการควบคุมคุณภาพการทดสอบ	แนวทางการควบคุมคุณภาพผลทดสอบ			องค์กรที่อ้างอิง
	วิธีดำเนินการ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ	
	ทดสอบ	มีปริมาณเหมาะสมกับขอบข่ายงาน	ตามกำหนด	APHA, A2LA, TISI, DMSc

หมายเหตุ :

FAO หมายถึง Food and Agriculture Organization of the United Nation

AWWA หมายถึง American Water Works Association

NATA หมายถึง National Association of Testing Authorities

APHA หมายถึง American Public Health Association

A2LA หมายถึง American Association for Laboratory Accreditation

TISI หมายถึง Industrial Standards Institute

DMSc หมายถึง Department of Medical Sciences

(สรณลิมและคณะ, 2563)

12. รายงานผล (Test report)

แนวทางในการตรวจประเมิน

12.1 ทัวไป

การรายงานควรสอดคล้องตามข้อกำหนดเฉพาะของวิธี และควรมีข้อมูลเพียงพอที่จะนำไปใช้แปลผลต่อไป

12.2 การทดสอบเชิงปริมาณ

จะรายงานในหน่วย colony forming units (CFU) หรือ most probable number (MPN) ต่อมวลหรือปริมาตรของตัวอย่าง

ในวิธีทดสอบเชิงปริมาณ กรณีที่มีโคโลนีน้อยกว่า 10 CFU/plate จะทำให้ความเที่ยง (precision) ลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญ จึงต้องมีการรายงานอย่างจำเพาะ ดังแสดงในตารางที่ 5 ตารางที่ 5 แสดงการรายงานผลการทดสอบในหน่วย CFU ต่อ มิลลิลิตร หรือต่อ test portion

จำนวน colony ที่นับได้	ลักษณะการรายงานผล	
	สำหรับตัวอย่างน้ำ (ISO 8199, 2018)	สำหรับตัวอย่างอาหาร (ISO 7218, 2014)
0	ไม่พบ หรือ <1	<1
1-2	ตรวจพบ	ตรวจพบ แต่ <4
3	รายงานเป็นค่าประมาณ	ตรวจพบ แต่ <4
4 - 9	รายงานเป็นค่าประมาณ	รายงานเป็นค่าประมาณ
≥10	รายงานตามจำนวน colony ที่พบ	รายงานตามจำนวน colony ที่พบ

หมายเหตุ :

1. การรายงานที่มีผลทางกฎหมายอาจจะมีการกำหนดในรูปแบบอื่นได้
2. ควรพิจารณาระดับการเจือจางสุดท้ายที่พบโคโลนีนั้นประกอบด้วย เช่น กรณีพบ 3 CFU จากในตัวอย่างอาหารที่มีการเจือจาง 10 เท่า จะต้องรายงานเป็น “ตรวจพบ แต่ <40 CFU”
3. สามารถใช้ตารางนี้อ้างอิงสำหรับวิธี MPN
4. วิธีทดสอบมาตรฐานอื่น ๆ เช่น BAM และ APAHA เป็นต้น อาจมีการระบุเกณฑ์การรายงานผลที่แตกต่างออกไป ทั้งนี้ให้ยึดตามที่วิธีทดสอบกำหนดก่อนเป็นลำดับแรก

12.3 การทดสอบเชิงคุณภาพ

ผลจะรายงานในรูป พบ/ไม่พบ ในปริมาณตัวอย่างที่ทดสอบ (detect/not detect) ในปริมาณตัวอย่างที่ทดสอบ ผลทดสอบจะต้องไม่รายงานว่าศูนย์ (zero) และสามารถรายงานว่าน้อยกว่าจำนวนจำเพาะตามที่วิธีทดสอบกำหนดได้ หากจำนวนที่พบนั้นน้อยเกินขีดจำกัดของวิธี แต่ต้องมีการตกลงกับลูกค้าก่อน

12.4 การรายงานผลในรูปความสอดคล้องและการใช้เกณฑ์การตัดสิน (decision rule)

กรณีที่ข้อกำหนดหรือมาตรฐานที่เกี่ยวข้องในการรายงานความสอดคล้อง ไม่ได้กำหนด decision rule ไว้ การรายงานผลในรูปความสอดคล้อง ต้องระบุ decision rule ไว้ด้วย ซึ่งต้องพิจารณาตามความเสี่ยงการปนเปื้อน และต้องมีการตกลงกับลูกค้าก่อน

12.5 การให้ความเห็น (opinions) และการแปลความผลการทดสอบ (interpretations)

หากมีการให้ความเห็นและการตีความผลการทดสอบต้องทำโดยผู้ที่ได้รับมอบหมาย (authorized person) ที่มีความรู้ และประสบการณ์ในการทดสอบนั้น ตลอดจนต้องสอดคล้องกับข้อกำหนดทางกฎหมายและข้อกำหนดด้านเทคนิค

ที่มา : สมชายและคณะ, 2555 และ Eurachem, 2023

12.6 การรายงานผลตามระเบียบของกรมปศุสัตว์

ห้องปฏิบัติการต้องบ่งชี้สัญลักษณ์ของกรมปศุสัตว์ ดังแสดงภาพที่ 1 ในรายงานผลการทดสอบ บริเวณขอบข่ายวิธีทดสอบที่ได้รับการถ่ายโอนภารกิจด้านการวิเคราะห์หัตถ์คำปศุสัตว์ (กรมปศุสัตว์, 2564)



ภาพที่ 1 สัญลักษณ์ของกรมปศุสัตว์สำหรับลงในใบรายงานผลทดสอบ

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะ/บทวิเคราะห์

การตรวจประเมินหัวข้อการรายงานผลการทดสอบ ควรพิจารณาความถูกต้องตามหลักวิชาการของการคำนวณผลและการรายงานผลการทดสอบด้านจุลชีววิทยา ผู้ประเมินควรตรวจสอบความถูกต้องในการถ่ายโอนข้อมูลผลการวิเคราะห์ มีผู้ตรวจทานความถูกต้องและลงนามกำกับ ใบรายงานผลการทดสอบต้องมีรายละเอียดครบถ้วนอย่างน้อยตามข้อกำหนดและแสดงข้อความที่สำคัญ ซึ่งมีความจำเป็นต่อการแปลผลและการนำผลการทดสอบไปใช้ กรณีที่ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ ต้องแสดงสัญลักษณ์ของการได้รับการรับรองตามขอบข่ายในใบรายงานผลการทดสอบ นอกจากนี้กรณีที่มีการส่งผลการทดสอบทางเครื่องมือสื่อสารหรือสื่ออิเล็กทรอนิกส์ ควรตรวจสอบความเหมาะสมของหลักเกณฑ์ในการดำเนินการดังกล่าวด้วย

บรรณานุกรม

- กรมปศุสัตว์. 2564. **ระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการถ่ายโอนภารกิจด้านการวิเคราะห์สินค้าปศุสัตว์ พ.ศ. 2564**. กรุงเทพฯ.
- กระทรวงสาธารณสุข. 2561. **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ผู้ดำเนินการและผู้มีหน้าที่ปฏิบัติการตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์**. กรุงเทพฯ.
- สมชาย วงศ์สมุทร และพิเชษฐ์ กุมภาว. 2555. **คู่มือการตรวจประเมินความสามารถทางวิชาการของห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ด้านจุลชีววิทยา**. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์. ปทุมธานี.
- สรเฉลิม ศักดิ์ศรี, พิเชษฐ์ กุมภาว และ ชานนท์ ขำตา. 2563. **การศึกษาเปรียบเทียบการควบคุมคุณภาพการทดสอบด้านจุลชีววิทยาของห้องปฏิบัติการที่รับการถ่ายโอนภารกิจจากกรมปศุสัตว์**. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์. ปทุมธานี.
- European Commission, 2005. **Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs**. Official Journal of the European Union. L338: 1-26.
- European Commission, 2017. **COMMISSION REGULATION (EU) 2017/1495 of 23 August 2017 amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards Campylobacter in broiler carcasses**. Official Journal of the European Union. L218: 4.
- Food and agriculture organization of the United Nations. 1991. **Manual of food quality control 12. quality assurance in the food control microbiological laboratory**. FAO food and nutrition paper. 14/12: 108.
- International Organization for Standardization. 2010. **ISO/IEC 17043 Conformity assessment – General requirement for proficiency testing**. International Organization for Standardization, Geneva.
- International Organization for Standardization. 2014. **ISO 11133: 2014 Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media**. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Organization for Standardization. 2014. **ISO 7218:2007/AMD 1:2013/Corrected version:2014 Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations**. International Organization for Standardization, Switzerland.

- International Organization for Standardization. 2015. **ISO 13528 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison**. International Organization for Standardization, Geneva.
- International Organization for Standardization. 2017. **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**. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Organization for Standardization. 2017. **ISO 6887-2:2017 Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products**. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Organization for Standardization. 2018. **ISO 11133:2014/AMD 1:2018 Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media — Amendment 2**. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Organization for Standardization. 2018. **ISO 18593:2018 Microbiology of the food chain — Horizontal methods for surface sampling**. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Organization for Standardization. 2019. **ISO 19036:2019 Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations**. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Organization for Standardization. 2019. **ISO 22117 Microbiology of the food chain – Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison**. International Organization for Standardization, Geneva.
- International Organization for Standardization. 2020. **ISO 11133:2014/AMD 2:2020 Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media — Amendment 2**. International Organization for Standardization, Switzerland.
-

- International Organization for Standardization. 2020. **ISO 6579-1: 2017/Amd 1:2020 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp. — Amendment 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC.** International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Organization for Standardization. 2021. **ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.** International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Organization for Standardization. 2021. **ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory.** International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Organization for Standardization. 2022. **ISO 8655-2:2022 Piston-operated volumetric apparatus — Part 2: Pipettes.** International Organization for Standardization, Switzerland.
- Lipps, W.C., E.B. Braun-Howland and T.E. Baxter. 2023. **Standard Method for the Examination of water and wastewater 24rd edition.** American Public Health Association (APHA), American water works association (AWWA). Washington, DC.
- Magnusson, B. and K.C. Tsimillis. 2023. **EA-0 4 / 1 0 : 2 0 2 3 Accreditation for Microbiological Laboratories Third edition (2023).** EURACHEM.
- Salfinger, Y. and M.L. Tortorello. 2015. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food: 5 th Edition, Chapter 6 , Culture Methods for Enumeration of Microorganisms.** American Public Health Association (APHA). Washington, DC
- Wallace, H.A. and T.S. Hammack. 2023. **FDA-BAM Online. April 2023, Chapter 1. Food Sampling/Preparation of Sample Homogenate.** Available source : <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-1-food-samplingpreparation-sample-homogenate>

ภาคผนวก ก

แนวทางในการกำหนดระยะเวลาการสอบเทียบและการตรวจสอบการสอบเทียบทางจุลชีววิทยา

ชื่อเครื่องมือ	ข้อกำหนด	ความถี่ที่แนะนำ
Reference thermometers (liquid-in-glass)	Calibration	ทุก ๆ 5 ปี
	ตรวจสอบ 1 จุด (เช่น ice-point)	ปีละครั้ง
Reference thermocouples	Calibration	ทุก ๆ 3 ปี
	ตรวจสอบเทียบกับ reference thermometer	ปีละครั้ง
Working thermometers และ Working thermocouples	Calibration	ปีละครั้งใน 3 ปีแรก หลังจากนั้นความถี่ลด น้อยลง ขึ้นกับ สมรรถนะ
	ตรวจสอบเทียบกับ reference thermometer ที่จุด ice-point และ/หรือช่วงอุณหภูมิที่ใช้งาน	ปีละครั้ง
Balances	Calibration ครอบคลุมช่วงการใช้งาน	ปีละครั้งใน 3 ปีแรก, หลังจากนั้นความถี่ลด น้อยลง ขึ้นกับ สมรรถนะ
Calibration weights	Calibration	ทุก ๆ 5 ปี
Check weight(s)	ตรวจสอบเทียบกับตุ้มน้ำหนักหรือเครื่องชั่งที่ได้รับการสอบเทียบแล้ว	ทุก ๆ 3 ปี
Volumetric glassware รวมถึง Glass pipettes	Gravimetric calibration กับช่วงการยอมรับที่ใช้ (required tolerance) โดยต้องมีใบ certificates ประกอบ และเครื่องแก้วที่มีทำปลอดเชื้อโดย oven ต้องได้รับการตรวจสอบเป็นประจำถึงแม้มีใบ certificates แล้วก็ตาม	ปีละครั้ง
Pipettors/ pipettes	Calibration	ปีละครั้ง
Hygrometers	Calibration	ปีละครั้ง

ชื่อเครื่องมือ	ข้อกำหนด	ความถี่ที่แนะนำ
pH meters	Calibration โดย standard buffer solutions ที่สามารถสอบกลับได้ (traceable)	ปีละครั้งหรือมากกว่า
Gas analyzers	Calibration	ปีละครั้ง
Autoclaves, media preparators	Calibration ในส่วน sensor อุณหภูมิและความดัน หากอุณหภูมิและความดันนั้นจะส่งผลต่อการทดสอบ	ปีละครั้ง

(Eurachem, 2023)

ภาคผนวก ข

แนวทางในการตรวจสอบความใช้ได้และการทวนสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือทางจุลชีววิทยา

ชื่อเครื่องมือ	ข้อกำหนด	ความถี่ที่แนะนำ
Temperature controlled equipment (incubators, baths, fridges, freezers)	(ก) ระบุเกณฑ์การยอมรับ (acceptability limits) ของ ลักษณะ stability และ homogeneity ของ atmosphere composition (มักจะประกอบด้วย ปริมาณความชื้นและ CO ₂) (ข) ตัดสินลักษณะ stability and homogeneity ของ atmosphere composition โดยเทียบกับเกณฑ์ การยอมรับ (ค) ระบุ/ ยืนยันช่วงการทำงานและ ขอบเขตของการแจ้งเตือน (ง) ตรวจสอบอุณหภูมิ	(ก) ครั้งแรก (ข) ครั้งแรกและหลังการซ่อม/ ดัดแปลง/การเปลี่ยนตำแหน่งที่ ส่งผลต่อการควบคุมอุณหภูมิ (ค) ครั้งแรกและครั้งต่อไปเมื่อมีการ ประเมิน (evaluation) (ง) ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน หรือโดย การเฝ้าสังเกตและบันทึกอย่าง ต่อเนื่องในระหว่างการใช้งาน
Atmosphere controlled equipment (incubators etc.)	(ก) ระบุเกณฑ์การยอมรับ (acceptability limits) ของ ลักษณะ stability และ homogeneity ของ atmosphere composition (มักจะประกอบด้วย ปริมาณความชื้นและ CO ₂) (ข) ตัดสินลักษณะ stability and homogeneity ของ atmosphere composition โดยเทียบกับเกณฑ์ การยอมรับ (ค) ระบุ/ยืนยันช่วงการทำงานและ ขอบเขตของการแจ้งเตือน (ง) เฝ้าสังเกตลักษณะ atmosphere composition	(ก) ครั้งแรก (ข) ครั้งแรกและหลังการซ่อม/ ดัดแปลง/การเปลี่ยนตำแหน่งที่ ส่งผลต่อการควบคุมอุณหภูมิ (ค) ครั้งแรกและครั้งต่อไปเมื่อมีการ ประเมิน (evaluation) (ง) ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน หรือโดย การเฝ้าสังเกตและบันทึกอย่าง ต่อเนื่องในระหว่างการใช้งาน
Thermocyclers (PCR and Real time PCR)	ตัดสินลักษณะ stability and homogeneity ของอุณหภูมิ โดย เทียบกับเกณฑ์การยอมรับ	ครั้งแรกและทุกวัน/สัปดาห์ละครั้ง ขึ้นกับความถี่และจำนวนตัวอย่างที่ ทำการวิเคราะห์
Sterilizing ovens	(ก) ระบุเกณฑ์การยอมรับ (acceptability limits) ของ ลักษณะ stability และ homogeneity ของอุณหภูมิ	(ก) ครั้งแรก, (ข) ครั้งแรกและหลังการซ่อม/ ดัดแปลง/การเปลี่ยนตำแหน่งที่ ส่งผลต่อการควบคุมอุณหภูมิ

ชื่อเครื่องมือ	ข้อกำหนด	ความถี่ที่แนะนำ
	(ข) ตัดสินลักษณะ stability and homogeneity ของอุณหภูมิ โดยเทียบกับเกณฑ์การยอมรับ (ค) ตรวจสอบอุณหภูมิ	(ค) ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน หรือโดยการเฝ้าสังเกตและบันทึกอย่างต่อเนื่องในระหว่างการใช้งาน
Autoclaves	(ก) แสดงลักษณะ (characteristics) ของการทำงาน/รอบ (loads/cycles) (ข) ตรวจสอบอุณหภูมิ/เวลา	(ก) ครั้งแรก, เป็นระยะ ๆ, ตามความถี่ที่ระบุไว้ในเอกสาร, และหลังการซ่อม/ดัดแปลง (ข) ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน หรือโดยการเฝ้าสังเกตและบันทึกอย่างต่อเนื่องในระหว่างการใช้งาน
Centrifuges	ตรวจสอบเทียบกับ tachometer ที่สอบเทียบแล้วและเป็นอิสระจากการใช้งานประจำวัน ถ้าความเร็วนั้นเป็นจุดวิกฤต (critical) ของการทดสอบ	ปีละครั้ง
Safety cabinets	(ก) แสดงประสิทธิภาพการทำงาน (ข) Microbiological monitoring (ค) Air flow monitoring	(ก) ครั้งแรก, ทุก ๆ ปี และหลังการซ่อม/ดัดแปลง/การเปลี่ยนตำแหน่งที่ส่งผลต่อการทำงาน (ข) สัปดาห์ละครั้ง (ค) ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน
Laminar air flow cabinets (ก)	(ก) แสดงประสิทธิภาพการทำงาน (ข) ตรวจสอบกับ sterility plates	(ก) ครั้งแรก, และหลังการซ่อม/ดัดแปลง/การเปลี่ยนตำแหน่งที่ส่งผลต่อการทำงาน (ข) สัปดาห์ละครั้ง
Timers	ตรวจสอบหากช่วงเวลาที่ใช้งานนั้นเป็นจุดวิกฤต (critical) ของการทดสอบ	ปีละครั้ง
Microscopes	ตรวจสอบการวางตำแหน่ง (alignment) ของส่วนต่าง ๆ ของเครื่อง	ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน
pH meters	การตรวจสอบโดยใช้ buffers อย่างน้อย 2 ระดับ ที่มีคุณภาพเหมาะสม	ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน
Balances	อ่านค่าเทียบกับตุ้มน้ำหนักอ้างอิง (check weight)	ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน
De-ionisers & reverse osmosis units	(ก) ตรวจสอบ conductivity	(ก) สัปดาห์ละครั้ง

ชื่อเครื่องมือ	ข้อกำหนด	ความถี่ที่แนะนำ
	(ข) ตรวจสอบ microbial contamination	(ข) เดือนละครั้ง
Gravimetric diluters	(ก) ตรวจสอบปริมาตรที่ง่าย (ข) ตรวจสอบ dilution ratio	(ก) ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน (ข) ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน
Media dispensers	ตรวจสอบปริมาตรที่ง่าย	ทุกครั้งหลังที่มีการปรับ หรือการเคลื่อนย้าย
Pipettors/pipettes	ตรวจสอบความเที่ยงและความแม่นยำ (accuracy and precision) ของปริมาตรที่ง่ายด้วยวิธีชั่งน้ำหนัก (gravimetric method)	เป็นประจำ โดยขึ้นกับความถี่และธรรมชาติการใช้งาน
Spiral platers	(ก) แสดงประสิทธิภาพการทำงาน (performance) เทียบกับ conventional method (ข) ตรวจสอบ stylus condition ที่ตอนเริ่มและสิ้นสุด (start and end points) (ค) ตรวจสอบปริมาตรที่ง่าย	(ก) ครั้งแรก และปีละครั้ง (ข) ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน (ค) เดือนละครั้ง
Colony counters	ตรวจสอบเทียบกับการนับจำนวนด้วยมือ	ปีละครั้ง
Centrifuges	ตรวจสอบความเร็วเทียบกับ tachometer ที่สอบเทียบแล้วและเป็นอิสระต่อการใช้งานประจำ (calibrated และ independent)	ปีละครั้ง
Anaerobic jars/incubators	ตรวจสอบกับ anaerobic indicator	ทุกวัน/ทุกครั้งที่ใช้งาน
Laboratory environment	เฝ้าระวัง airborne และ surface microbial contamination เช่น - air samplers - settle plates - contact plates or swabs	- สัปดาห์ละครั้ง สำหรับ total count และ moulds - ปีละ 2 ครั้ง สำหรับ pathogens หรือขึ้นกับการตัดสินใจของห้องปฏิบัติการบนพื้นฐาน activities, historical trends และ results

(Eurachem, 2023)

ภาคผนวก ค

แนวทางในการบำรุงรักษาเครื่องมือทางจุลชีววิทยา

ชื่อเครื่องมือ	ข้อกำหนด	ความถี่ที่แนะนำ
(ก) Incubators (ข) Fridges (ค) Freezers และ ovens	ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวภายใน	(ก) เดือนละครั้ง (ข) เมื่อต้องการ (เช่น ทุก ๆ 3 เดือน) (ค) เมื่อต้องการ (เช่น ปีละครั้ง)
Water baths	ถ่ายน้ำออกให้หมด ทำความสะอาด ค่าเชื้อ และเติมน้ำเข้าใหม่	เดือนละครั้ง, หรือทุก ๆ 6 เดือนถ้ามีการใช้ biocide
Centrifuges	(ก) ตรวจสอบโดยผู้ขาย (service) (ข) ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิว	(ก) ปีละครั้ง (ข) ทุกครั้งที่ใช้งาน
Autoclaves	(ก) สังเกตบริเวณ gasket, clean/drain chamber (ข) ตรวจสอบโดยผู้ขายแบบเต็มรูปแบบ (full service) (ค) ตรวจสอบความปลอดภัยของ pressure vessel	(ก) เป็นประจำตามที่คุณผลิตแนะนำ (ข) ปีละครั้ง หรือตามที่คุณผลิตแนะนำ (ค) ปีละครั้ง
Safety cabinets และ Laminar flow cabinets	ตรวจสอบโดยผู้ขายแบบเต็มรูปแบบ (full service) และตรวจสอบการทำงานเชิงกล (mechanical check)	ปีละครั้ง หรือตามที่คุณผลิตแนะนำ
Microscopes	บำรุงรักษาโดยผู้ขายแบบเต็มรูปแบบ (full maintenance service)	ปีละครั้ง
pH meters	ทำความสะอาด electrode	ทุกครั้งที่ใช้งาน
Balances และ gravimetric diluters	(ก) ทำความสะอาด (ข) ตรวจสอบโดยผู้ขาย	(ก) ทุกครั้งที่ใช้งาน (ข) ปีละครั้ง
Stills	ทำความสะอาด และกำจัดตะกอน	ตามที่ต้องการ (เช่น ทุก ๆ 3 เดือน)
De-ionisers, reverse osmosis units	เปลี่ยน cartridge/membrane	ตามที่คุณผลิตแนะนำ
Anaerobic jars	ทำความสะอาด/ฆ่าเชื้อ	ทุกครั้งหลังใช้งาน
Media dispensers, volumetric equipment, pipettes, และ general service equipment	กำจัดการปนเปื้อน (decontaminate) ทำความสะอาด และทำการปลอดเชื้อตามความเหมาะสม	ทุกครั้งที่ใช้ใช้งาน
Spiral platers	(ก) ตรวจสอบโดยผู้ขาย (service) (ข) กำจัดการปนเปื้อน (decontaminate) ทำความสะอาด	(ก) ปีละครั้ง (ข) ทุกครั้งที่ใช้งาน

ชื่อเครื่องมือ	ข้อกำหนด	ความถี่ที่แนะนำ
	และทำการปลดเชื้อ	
Laboratory	(ก) ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวปฏิบัติงาน (ข) ทำความสะอาดพื้น ค่าเชื้ออ่าง (sinks และ basins) (ค) ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวอื่น ๆ	(ก) ทุกวัน, และระหว่างการใช้ (ข) สัปดาห์ละครั้ง หรือบ่อยกว่านี้ตามต้องการ (ค) ทุก ๆ 3-12 เดือน ขึ้นกับประเภทของงานในห้องปฏิบัติการ

(Eurachem, 2023)