

การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ ทางจุลชีววิทยา

ดร. สุปรรณี เทพอรุณรัตน์

Microbiological testing

การทดสอบทางจุลชีววิทยาครอบคลุมการวิเคราะห์จุลินทรีย์ แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และปรสิต ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เพื่อให้มั่นใจว่า อุตสาหกรรมเหล่านี้ผลิตเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยสำหรับการบริโภคของมนุษย์จะไม่ปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของเรา

จากลักษณะธรรมชาติของการทดสอบทางจุลชีววิทยา ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง มาตรฐานลดลงหรือการควบคุมคุณภาพถูกละเลยในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาจนำไปสู่ผลลัพธ์ที่ไม่ถูกต้องและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้

What Is Quality Control?

เป็นกระบวนการที่เป็นระบบ

- รับประกันความน่าเชื่อถือ ความถูกต้อง
- ทำซ้ำของผลการทดสอบทางจุลชีววิทยาในทุกวัน
- ป้องกันความผิดพลาดก่อนส่งมอบรายงานผล
- ป้องกันสิ่งเจือปนที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนได้

ชุดของวิธีปฏิบัติและมาตรการต่างๆ

- ลดข้อผิดพลาด
- สภาพแวดล้อมในการทดสอบได้รับการควบคุมและปลอดภัยตลอดเวลา
- นักจุลชีววิทยาและเจ้าหน้าที่ทุกคนต้องปฏิบัติตามวิธีปฏิบัติและมาตรฐานที่กำหนดไว้

ทำไมถึงสำคัญ?

ปฏิบัติตามข้อกำหนดด้านกฎระเบียบ และรับประกันว่าผลิต ภัณฑที่ทดสอบนั้นปลอดภัยสำหรับการบริโภค

ลดความเสี่ยงของข้อมูลที่ไม่ถูกต้องหรือผลลัพธ์ที่ผิดพลาด เพิ่มโอกาสในการทำซ้ำผลลัพธ์ได้ในแต่ละล็อตการควบคุมคุณภาพ

เพิ่มประสิทธิภาพด้านต้นทุนโดยลดจำนวนการเรียกคืนผลิตภัณฑ์ หลีกเลี่ยงการฟ้องร้องที่อาจเกิดขึ้นหากมีผลิตภัณฑ์ปนเปื้อน

ส่งมอบผลลัพธ์ที่มีคุณภาพได้อย่างสม่ำเสมอ สร้างความไว้วางใจ และความน่าเชื่อถือให้กับทั้งลูกค้าและผู้บริโภค

องค์ประกอบหลักของ IQC ทางจุลชีววิทยา

การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ (Media QC)

- ความปราศจากเชื้อ (Sterility Check): มีการปนเปื้อนหรือไม่
- ประสิทธิภาพการเติบโต (Growth Promotion Test): ยืนยันว่าอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นช่วยให้เชื้อเป้าหมายโตได้จริง และยับยั้งเชื้อที่ไม่เกี่ยวข้อง

การใช้เชื้อมาตรฐาน (Control Organisms)

- Positive Control: ใช้เชื้อที่ทราบผลแน่นอนว่าต้องให้ผลบวก (เช่น ใช้ *E. coli* ทดสอบการเปลี่ยนแปลงสีในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะทาง)
- Negative Control: ใช้เชื้อที่ต้องไม่ให้ผลการทดสอบนั้นๆ เพื่อเช็คความจำเพาะ (Specificity)

การตรวจสอบเครื่องมือ (Equipment Monitoring)

- มีอุปกรณ์ที่ถูกต้องครบถ้วน
- ตรวจสอบ (Functional check) และบำรุงรักษาอย่างสม่ำเสมอว่าอุปกรณ์เหมาะสมกับการใช้งาน เช่น เช็คอุณหภูมิ
- เครื่องมือหลักควรได้รับการสอบเทียบและตรวจสอบความถูกต้อง

องค์ประกอบหลักของ IQC ทางจุลชีววิทยา

- **จัดทำ SOP** (ขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐาน) อย่างละเอียดพร้อมคำแนะนำเกี่ยวกับ
 - วิธีการทดสอบอย่างถูกต้อง
 - การจัดการตัวอย่างอย่างปลอดภัย
 - การวิเคราะห์ผลลัพธ์อย่างแม่นยำ SOP
- **ความชำนาญของบุคลากร (Staff Competency)**
 - ได้รับการฝึกอบรมที่เหมาะสม
 - เข้าใจอย่างลึกซึ้งถึงความสำคัญของการควบคุมคุณภาพที่มีประสิทธิภาพ
- **สภาพแวดล้อมของห้องปฏิบัติการ**
 - ควรประเมินเป็นระยะ เพื่อระบุและกำจัดความเสี่ยงจากการปนเปื้อน
 - ตรวจสอบอากาศและพื้นผิวการทำงาน
- **ระบบเอกสาร** ต้องจัดทำเอกสารและบันทึก
 - การทดสอบในห้องปฏิบัติการ ผลลัพธ์ และความผิดปกติ
 - เป็นประโยชน์สำหรับการตรวจสอบย้อนกลับ การตรวจสอบห้องปฏิบัติการ และการปฏิบัติตามกฎระเบียบอีกด้วย

มาตรฐานที่เกี่ยวข้อง

มาตรฐาน ISO
15189 สำหรับ
ห้องปฏิบัติการ
การแพทย์

ISO
17025 สำหรับ
ห้องปฏิบัติการ
ทดสอบทั่วไป

แนวทาง
จาก CLSI สำหรับ
การทดสอบความไว
ต่อยาปฏิชีวนะ

ISO 7218 สำหรับ
ห้องปฏิบัติการ
อาหาร อาหารสัตว์
และห้วงโซ่อาหาร

การควบคุมคุณภาพภายใน (IQC) ทางจุลชีววิทยาในทางปฏิบัติ

การเตรียมและการตรวจสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture Media QC) แต่ละรุ่น (Lot/Batch) ต้องทำสิ่งต่อไปนี้ก่อนนำไปใช้งานจริง

Sterility Test: นำอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วประมาณ 5-10% ไปบ่มที่อุณหภูมิที่ใช้ทดสอบจริง เพื่อดูว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่

Performance Testing (GPT): ต้องใช้ เชื้อมาตรฐาน (Reference Strains)

- **Productivity:** เชื้อเป้าหมายต้องโตได้ดีตามลักษณะที่ควรจะเป็น
- **Selectivity:** สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะทาง เชื้อที่ไม่เกี่ยวข้องต้องถูกยับยั้งไม่ให้โต

Physical Check: ตรวจสอบค่า pH, สีของอาหาร, ความแข็งของเจล และความเรียบของผิวหน้าอาหาร

การควบคุมคุณภาพภายใน (IQC) ทางจุลชีววิทยาในทางปฏิบัติ

การควบคุมคุณภาพของเชื้อมาตรฐาน (Reference Culture Maintenance)

- การรักษา "สายพันธุ์เชื้อ" ให้คงเดิมมีความสำคัญมากในทางปฏิบัติ:
 - **Traceability:** ต้องใช้เชื้ออ้างอิงจากหน่วยงานระดับชาติหรือสากล
 - **Seed Lot System:** เก็บเชื้อต้นแบบเป็น stock culture แล้วแบ่งมาทำ working culture เพื่อลดความเสี่ยงที่เชื้อจะกลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงซ้ำหลายครั้ง

การตรวจสอบระหว่างการทดสอบ (Analytical QC)

- **Positive & Negative Controls:** ต้องทำควบคู่ไปกับตัวอย่างจริงทุกครั้ง (เช่น การเพาะเชื้อใน selective media หรือการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี)
- **Duplicate Testing:** สุ่มตัวอย่างเดียวกันให้เจ้าหน้าที่สองคนตรวจ หรือคนเดียวตรวจซ้ำ เพื่อเช็คความสอดคล้องของผลลัพธ์
- **Environmental Monitoring:** วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Settle Plates) หรือเช็คพื้นผิว (Swab Test) ในบริเวณที่ทำการทดสอบ เพื่อตรวจสอบระดับการปนเปื้อนในอากาศและโต๊ะปฏิบัติงาน

การควบคุมคุณภาพภายใน (IQC) ทางจุลชีววิทยาในทางปฏิบัติ

การจัดการข้อมูลและการติดตาม (Data Monitoring)

- **Levey-Jennings Charts:** ในการทดสอบเชิงปริมาณควรรนำค่าที่ได้จาก Positive Control มาลงกราฟเพื่อดูแนวโน้ม (Trend) หากพบว่าค่าเริ่มออกนอกช่วง $\pm 2SD$ หรือ $\pm 3SD$ ต้องรีบหาสาเหตุและแก้ไข
- **SOPs (Standard Operating Procedures):** เจ้าหน้าที่ทุกคนต้องปฏิบัติตามคู่มือขั้นตอนการดำเนินงานมาตรฐานอย่างเคร่งครัด และมีการบันทึกผล (Records) อย่างเป็นระบบเพื่อการตรวจสอบย้อนกลับ

การดำเนินการเมื่อผล QC "หลุด" หรือไม่เป็นไปตามเกณฑ์:

- **Quarantine:** ระวังการรายงานผลของตัวอย่างที่ทำพร้อมกับ QC ชุดนั้น
- **Investigation:** ตรวจสอบหาสาเหตุ เช่น อาหารเสื่อมสภาพ, เครื่องมืออุณหภูมิไม่คงที่, หรือความผิดพลาดของตัวบุคคล
- **Re-test:** ทำการทดสอบใหม่ทั้งหมดหลังจากแก้ไขสาเหตุแล้ว และบันทึกเหตุการณ์ไว้ในใบ Non-Conformance (NC)

Internal Quality Control ตาม ISO 7218

สำหรับมาตรฐาน **ISO 7218:2024** เน้นการใช้ **Risk-based approach** และการตรวจสอบความถูกต้องเชิงสถิติที่ชัดเจนขึ้น ดังนี้:

1. การควบคุมประสิทธิภาพการทดสอบ (Performance Monitoring)

- เน้นว่าห้องปฏิบัติการต้องมีแผนการตรวจสอบที่ครอบคลุมตลอดกระบวนการ:
- **การใช้ Matrix Control:** แนะนำให้ใช้ตัวอย่างที่มีลักษณะใกล้เคียงกับตัวอย่างจริง (Matrix-matched) ในการทำ QC เช่น หากตรวจเนื้อสัตว์ ควรใช้ตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่เติมเชื้อลงไป (Spiked sample) แทนการใช้เพียงน้ำยาบัฟเฟอร์
- **ความถี่ (Frequency):** ต้องกำหนดตามปริมาณงานและความเสี่ยง หากพบผลที่ผิดปกติบ่อยครั้ง หรือมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยสำคัญ (เช่น เปลี่ยน Lot อาหารเลี้ยงเชื้อ, เปลี่ยนเจ้าหน้าที่) ต้องเพิ่มความถี่ในการทำ IQC

Internal Quality Control ตาม ISO 7218

2. การควบคุมเชิงปริมาณ (Quantitative IQC)

เน้นย้ำเรื่องความแม่นยำและการตรวจสอบซ้ำ:

- **Replicate Counts:** การนับจำนวนเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes) โดยเจ้าหน้าที่คนเดิมหรือต่างคน เพื่อประเมิน **Repeatability** และ **Reproducibility** ภายในแล็บ
- **Acceptance Criteria:** กำหนดเกณฑ์การยอมรับโดยใช้ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (Maximum Permissible Error) เช่น ผลต่างของการนับซ้ำต้องไม่เกินค่าทางสถิติที่กำหนด (มักใช้ ≤ 0.1 ถึง 0.3 หน่วย CFU)
- **Use of Control Charts:** ให้มีการใช้กราฟควบคุมเพื่อดูแนวโน้ม (Trending) และวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนเชิงระบบ (Systematic Error)

Internal Quality Control ตาม ISO 7218

3. การควบคุมเชิงคุณภาพ (Qualitative IQC)

เน้นการยืนยันประสิทธิภาพของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อ (Enrichment):

- **Positive & Negative Controls:** ต้องทำควบคู่ไปกับทุก Batch ของตัวอย่าง
- **Low-level Inoculation:** การทำ Positive Control ต้องใช้เชื้อในปริมาณน้อย (Target level) เพื่อพิสูจน์ว่าวิธีทดสอบมีความไว (Sensitivity) เพียงพอที่จะตรวจพบเชื้อในสภาวะจริงได้

4. การจัดการเชื้อมาตรฐาน (Reference Strains)

เน้นย้ำเรื่องความบริสุทธิ์และการตรวจสอบย้อนกลับ:

- **Verification of Strains:** ต้องมีการตรวจสอบยืนยันคุณลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotypic) หรือจีโนไทป์ (Genotypic) ของเชื้อมาตรฐานที่เก็บไว้เป็นระยะ
- **Subculturing:** จำกัดจำนวนครั้งในการต่อเชื้อ (Passage) เพื่อป้องกันการกลายพันธุ์ (โดยปกติไม่เกิน 5 ครั้งจาก Reference strain ต้นฉบับ)

Internal Quality Control ตาม ISO 7218

5. ความคลาดเคลื่อนและความไม่แน่นอน (Measurement Uncertainty - MU) ให้ความสำคัญกับการคำนวณ MU ที่ครอบคลุมมากขึ้น:

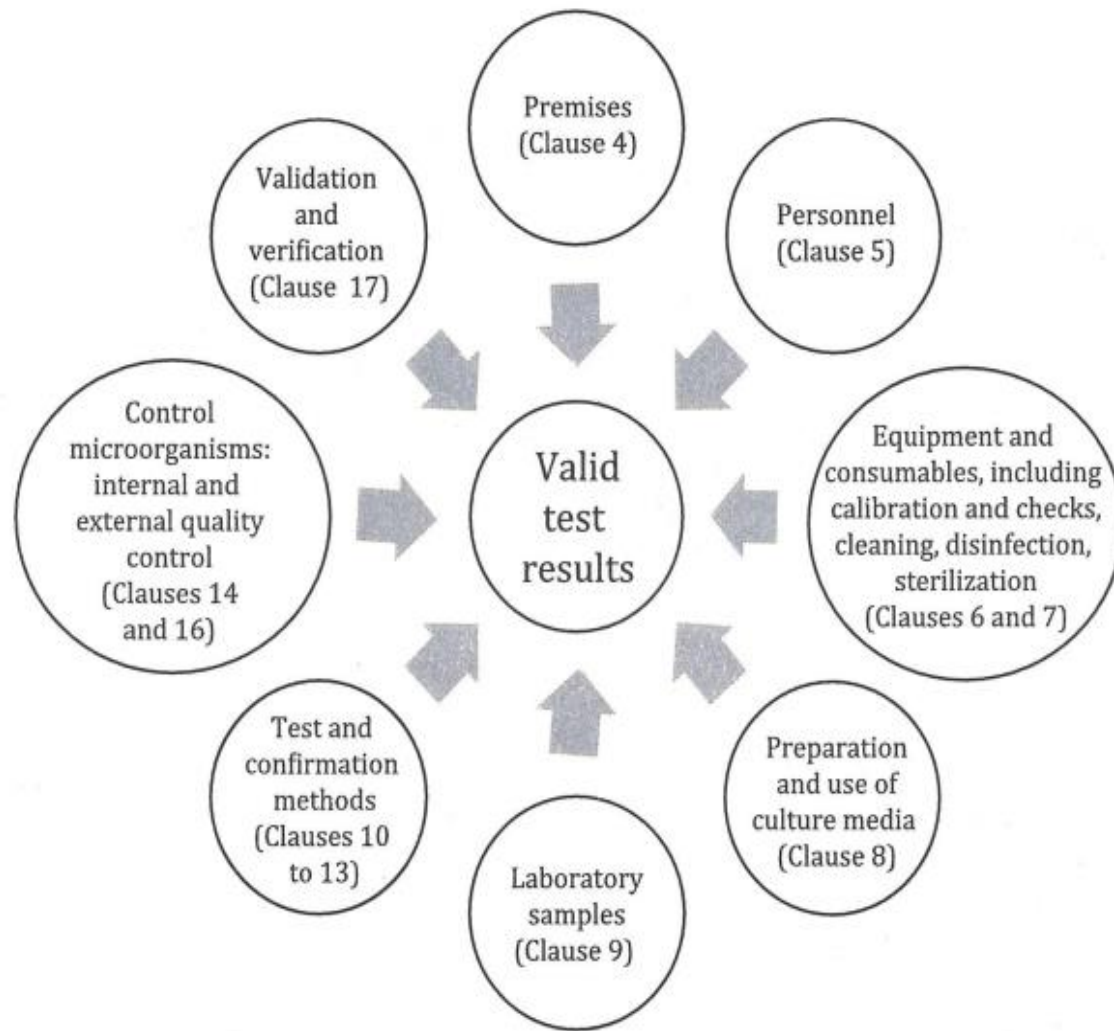
- ต้องนำผลจาก **IQC Data** (เช่น ผลต่างจากการทำ Duplicate) มาใช้เป็นส่วนหนึ่งในการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด
- ต้องสามารถอธิบายได้ว่าค่าความไม่แน่นอนนั้นส่งผลต่อการตัดสินใจ (Statement of Conformity) อย่างไร

6. การตรวจสอบความชำนาญของเจ้าหน้าที่ (Analyst Competence)

- ต้องมีแผนการทดสอบ **Blind Testing** โดยให้ทดสอบตัวอย่างที่ไม่ทราบผลลัพธ์ล่วงหน้า เพื่อยืนยันความสามารถส่วนบุคคลอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง

7. การบูรณาการระบบการจัดการข้อมูลให้เป็นดิจิทัลมากขึ้น และการให้ความสำคัญกับ "ความถูกต้องของกระบวนการเตรียมตัวอย่าง" (Sample Preparation) ซึ่งเป็นจุดที่เกิดความคลาดเคลื่อนได้สูงที่สุดในจุลชีววิทยาอาหาร

Laboratory quality control in microbiology



Process controls

process controls อาจทำควบคู่ไปกับงานทดสอบประจำด้วยความถี่ที่กำหนดไว้ล่วงหน้า โดยรวมทั้ง blanks, positive controls of target organisms และ negative controls of a non-target or atypical organisms, การใช้ culture suspension หรือ spiked samples

Blank samples

Blank samples หรือ sterilized sample จากห้องโชนอาหารเพื่อดู matrix effects ให้ความมั่นใจความปลอดเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์ และ aseptic performance ของทุกการดำเนินการ ต้องไม่มีการเจริญ แต่การปนเปื้อนระดับต่ำอาจยอมได้ในการนับจำนวนถ้าในเกณฑ์กำหนดระบุไว้

Positive control organisms

Positive control เทียบได้กับเชื้อเป้าหมายและสร้างโคโลนีจำเพาะบน agar หรือให้ปฏิกิริยาบวกใน broth และในการตรวจยืนยัน

Positive control มีความสำคัญที่จะแสดงว่าการทดสอบถูกต้อง การตรวจพบในตัวอย่างแสดงว่ามีการปนเปื้อนข้ามและต้องการการสืบสวนต่อ และทำการทดสอบซ้ำก่อนรายงานว่าเป็น negative

Qualitative methods: control organism ควรใกล้ค่า LOD_{95} (e.g. 3-10 cfu/test portion) เพื่อหลีกเลี่ยง false-negative

Enumeration method:

solid media control organism ควรสร้างโคโลนีจำนวนที่เชื่อถือได้บนจาน (e.g. 50-100),

อาหารเหลวโดย MPN จำนวนหลอดบวกที่เชื่อถือได้

Negative control organisms

Atypical and non-target

Atypical and non-target controls สามารถเจริญบน tested medium แต่สร้าง atypical colony บนวุ้น (หรือปฏิกิริยาใน broth) และการตรวจยืนยัน

Inhibition

Negative control จะถูกยับยั้งใน used media และใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของ media แต่พบน้อยใน IQC

Miscellaneous process controls

กิจกรรมสำคัญอื่นๆ เช่น

- culture media control
- time-temperature control of incubation
- Verifying Proprietary Kits/Commercial Confirmation Tests (positive +/- negative control cultures)

ควรเผื่อระวังควบคู่กับการทดสอบประจำ

Replicate testing

Replicate testing เป็นการทดสอบซ้ำจากต่างส่วนของตัวอย่างเดียวกัน (split samples), reference samples หรือ artificially contaminated (spiked) matrices

มีทั้ง repeatability (same conditions) and/or reproducibility (different conditions) สำหรับเผื่อระวางการปฏิบัติงานของบุคลากร และอื่นๆ นิยมทำซ้ำสอง แต่มากกว่านี้ก็ทำได้

reproducibility ใช้ในการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบได้ด้วย (ISO 19036)

Spiked samples

แนะนำให้ใช้เมื่อเชื่อเป้าหมายพบน้อยในงานทดสอบประจำ ให้บุคลากรทุกคน ทำ blind tested

เตรียมโดยใช้ทั้งเชื้อ typical และ atypical, ทราบปริมาณ, appropriate to samples, method, organism หรือ Reference materials (if available/appropriate)

ใช้ตัวอย่างที่ทดสอบประจำอย่างสม่ำเสมอ

มีประโยชน์ในการอบรมหรือ updating technicians และเป็นส่วนเสริมของการทดสอบ EQA ซึ่งอาจไม่บ่อยนักและมีค่าใช้จ่ายสูง

External quality assessment

- การเข้าร่วม PT หรือ interlaboratory comparisons (ILC) เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของห้องปฏิบัติการกับห้องปฏิบัติการอื่น เมื่อประเมินผล PT ไม่ควรดูเฉพาะคะแนน ควรตรวจสอบแนวโน้มต่างๆ เพื่อประเมิน และหากจำเป็นแก้ไข bias ที่อาจเกิดขึ้น
- เลือก PT schemes ที่ได้รับการรับรอง ISO/IEC 17043 และประเด็นสำคัญคือจำนวนตัวอย่างเชิงลบและเชิงบวก ระดับของการปนเปื้อนเหมาะสมหรือไม่ และประเภทของ matrix
- ถ้า PT หรือ EQA schemes ไม่มีสำหรับเชื้อเฉพาะ และ/หรือ matrix ให้เข้าร่วม ILC studies กับห้องปฏิบัติการอื่นที่มีตัวอย่างใกล้เคียง ให้ใช้การประเมินผลทางสถิติเมื่อทำได้ (ดู ISO 17043 และ ISO 22117)

การควบคุมผลการทดสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative Control)

เป็นการทดสอบเพื่อดูว่า "พบ (Detected)" หรือ "ไม่พบ (Not Detected)"

- **Positive Control (ตัวควบคุมผลบวก):**
- **Negative Control (ตัวควบคุมผลลบ):**
- **เกณฑ์การตัดสิน:** ผลต้องออกมา "ตรงตามคาดหมาย 100%" หาก Positive ให้ผลลบ หรือ Negative ให้ผลบวก จะต้องปฏิเสธผลการทดสอบในชุดนั้นทันที

การควบคุมผลการทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative Control)

เป็นการทดสอบเพื่อหา "จำนวน" ของจุลินทรีย์ (เช่น CFU/g หรือ CFU/ml)

- **Duplicate/Replicate Testing:**

วิธีทำ: นำตัวอย่างเดียวกันมาแยกทำเป็น 2 ส่วน (Duplicate) แล้วทดสอบขนานกันไป เพื่อดู **Repeatability (ความแม่นยำภายในตัวบุคคล)** ผลต่างระหว่างสองค่าต้องไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด (เช่น ไม่เกิน 0.3 log unit)

- **Duplicates of plates:**

ประเมินความแตกต่างของจำนวนโคโลนีที่มาจากตัวอย่างเดียวกัน ความเอนจางเดียวกัน (เกณฑ์ดูจาก ISO 14461-2)

- **Dilution factor:**

ประเมินความแตกต่างของจำนวนโคโลนีระหว่าง 2 tenfold dilutions จากตัวอย่างเดียวกัน (เกณฑ์ดูจาก ISO 14461-2)

ISO 7218 แนะนำให้ใช้ the colony count techniques (CCT) calculator หาได้จาก <https://standards.iso.org/iso/7218/ed-4/en/> ในการคำนวณ รวมถึงผลการทวนสอบการคำนวณ

การควบคุมผลการทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative Control)

- **Spiked Sample:**

วิธีทำ: ใส่เชื้อมาตรฐานในจำนวนที่ทราบค่าแน่นอน ลงในตัวอย่างควบคุม แล้วนำไปทดสอบตามกระบวนการปกติ เพื่อคำนวณ **% Recovery** (ค่าที่ตรวจได้เทียบกับค่าที่ใส่จริง) เพื่อดูความแม่นยำของกระบวนการ

- **Control Charts (Levey-Jennings Chart):**

วิธีทำ: นำค่าที่ได้จากตัวอย่างควบคุมในแต่ละวันมาพล็อตลงกราฟ เพื่อดูแนวโน้ม (Trend) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

เกณฑ์การตัดสินใจ: มักใช้กฎ **Westgard Rules** เช่น หากค่าหลุดเกิน $\pm 3SD$ หรือมีค่าเรียงกันเกิน 7 วันในทิศทางเดียวกัน แสดงว่าระบบเริ่มมีความผิดปกติ (Systematic Error)

การตั้งเกณฑ์การยอมรับ (Acceptance Criteria)

สำหรับการทดสอบเชิงปริมาณ (เช่น การนับจำนวน CFU) เราจะใช้ค่าสถิติจากผล QC ย้อนหลัง (อย่างน้อย 20-30 ค่า) มาคำนวณหา:

- **Mean** : ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่นับได้ (แนะนำให้แปลงเป็นค่า Log10 ก่อนคำนวณ)
- **Standard Deviation (SD)**: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อดูการกระจายตัวของข้อมูล

เกณฑ์การยอมรับสากล:

- **Warning Limit (ขีดจำกัดเตือน)**: คือช่วง $\pm 2SD$ (ข้อมูล 95% ควรอยู่ในช่วงนี้)
- **Control/Action Limit (ขีดจำกัดควบคุม)**: คือช่วง $\pm 3SD$ (ข้อมูล 99.7% ควรอยู่ในช่วงนี้)
- **ในเชิงจุลชีววิทยาอาหาร**: มักกำหนดว่าผลต่างของ Duplicate ต้อง $\leq 0.3 \log \text{ UNIT}$

การอ่านกราฟควบคุม (Control Chart / Levey-Jennings)

จากกราฟ ให้สังเกตลักษณะความผิดปกติตามกฎ **Westgard Rules** ดังนี้:

ความผิดพลาดแบบสุ่ม (Random Error)

- **1_{3s} Rule:** มีจุดใดจุดหนึ่งกระโดดออกนอกเส้น $3SD$
- **การตัดสินใจ: Reject**ทันที เพราะถือว่ามีความผิดปกติที่รุนแรงในรอบนั้น

ความผิดพลาดเชิงระบบ (Systematic Error)

แสดงถึงความเสื่อมของน้ำยา, เครื่องมือเริ่มรวน หรือเทคนิคของเจ้าหน้าที่เปลี่ยนไป:

- **Shift (การเปลี่ยนระดับ):** มีจุดติดต่อกัน **7-10 จุด** อยู่ฝั่งเดียวกับค่า Mean (เช่น สูงกว่าค่าเฉลี่ยตลอด)
สาเหตุ: อาจเปลี่ยน Lot อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ หรือตู้บ่มเปลี่ยนอุณหภูมิ
- **Trend (แนวโน้ม):** มีจุดติดต่อกัน **6-7 จุด** รุ่งขึ้นหรือลงในทิศทางเดียวอย่างต่อเนื่อง
สาเหตุ: น้ำยา/เชื้อมาตรฐานค่อยๆ เสื่อมสภาพ หรือเครื่องมือค่อยๆ คลาดเคลื่อน
- **2_{2s} Rule:** มีจุด 2 จุดติดต่อกัน ออกนอกเส้น $2SD$ (แต่อยู่ใน $3SD$) ในทิศทางเดียวกัน
 - **การตัดสินใจ: Reject** และต้องหาสาเหตุเชิงระบบ

ตัวอย่างการอ่านและแปลผลในทางปฏิบัติ

สถานการณ์บนกราฟ	การแปลผล (Interpretation)	สิ่งที่ต้องทำ (Action)
จุดพล็อตอยู่ระหว่าง 2SD	In Control (ปกติ)	รายงานผลตัวอย่างจริงได้ตามปกติ
มี 1 จุดอยู่ระหว่าง 2SD ถึง 3SD	Warning (เฝ้าระวัง)	รายงานผลได้ แต่ต้องสังเกตจุดถัดไป
มี 1 จุดหลุด 3SD ออกไป	Out of Control (ผิดปกติ)	ห้ามรายงานผล หาสาเหตุ และทำการทดสอบใหม่ (Retest)
จุด 7 วันหลัง ต่ำกว่า Mean ทั้งหมด	Shift (ผิดปกติเชิงระบบ)	ตรวจสอบการ Calibrate เครื่องมือ หรือประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

Selection and characterization of control microorganisms

- จุลินทรีย์ถูกเลือกใช้ตาม end use
- positive control จะมีลักษณะเดียวกันกับเป้าหมายในการทดสอบ
- negative จะไม่มีลักษณะดังกล่าว
- การทำร่วมกันในการทดสอบใช้เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดสอบ

Characterization of microorganisms

Phenotypic characterization

- ลักษณะเฉพาะที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ,
- รูปร่างและการย้อมติดสี Gram ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- motility test
- biochemical and serological tests
- ใช้ในการแยกและจำแนกจุลินทรีย์เป้าหมายในวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

Molecular characterization

- กำหนดลักษณะด้วย molecular properties (e.g. DNA, RNA, protein, carbohydrate patterns)
- ใช้ในการจำแนก และ/หรือ กำหนดลักษณะจุลินทรีย์เป้าหมาย

Selecting of control microorganisms

การเลือก test controls สำคัญ เนื่องจากเชื้อ species เดียวกันสามารถมี พันธุกรรมและกายภาพต่างกัน

test controls ต้อง fit for intended purpose การทดสอบที่ใช้ biochemical reactions ต้องการ **Phenotypic characterization** ขณะที่การ ทดสอบเชิงโมเลกุลต้องการ **Molecular characterization**

ควรใช้ reference strains จาก

- biological resource centres (BRCs) ที่น่าเชื่อถือ มีการจำแนกลักษณะ และได้แสดงให้เห็นว่ามีคุณสมบัติที่จำเป็นสำหรับ end-use
- characterized laboratory strains จากแหล่งอื่น (food, feed, environment, clinical samples, from outbreak, etc,)
- "wild strain" laboratory strains
- ควรมีการเก็บรักษาเพื่อให้มี genetic drift น้อย

Method validation and verification :

- ใช้เชื้อ target and non-target หลายตัวเพื่อแสดงว่าสามารถตรวจหรือนับจำนวนเชื้อเป้าหมายในตัวอย่างได้
- the method performance characteristics ยังแสดงให้เห็นว่าเป็นไปตามข้อกำหนดสำหรับการใช้งานที่ตั้งใจไว้
- อาจใช้ laboratory strains ที่ได้จากตัวอย่างทดสอบมีประโยชน์ในแง่ความท้าทายด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ เชื้อต้องมีกำหนดลักษณะเป็นอย่างดีโดยการจำแนกเชื้อที่เพียงพอ และให้ผลตามที่ระบุไว้ในวิธีทดสอบ (เช่น เจริญได้ในสภาวะทดสอบ เคลื่อนที่ได้หรือไม่ ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ)
- ต้องมีการเก็บรักษาเพื่อใช้งานในอนาคต เชื้อที่ใช้ในการทวนสอบวิธีต้องมีการกำหนดลักษณะชัดเจนตามที่ระบุในวิธีทดสอบ และควรได้จาก culture collections

Challenge testing :

- วัตถุประสงค์ของ Challenge testing เพื่อตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สนใจว่ามีการเจริญเติบโตหรือ inactivation ในอาหารบางชนิด
- การเลือกเชื้อควรพิจารณาความหลากหลายของ growth or inactivation kinetics ระหว่างสายพันธุ์ หรือใช้ laboratory strains ที่ได้จากตัวอย่างทดสอบ
- เชื้อต้องมีกำหนดลักษณะเป็นอย่างดีด้วยค่าหลัก (เช่น อุณหภูมิ, pH, a_w , minimal inhibitory concentration for preservatives) เพื่อให้แน่ใจว่าเหมาะกับการใช้งาน ลักษณะเหล่านี้อาจได้จากการทดสอบหรือจากเอกสาร, peer-reviewed data
- ต้องมีการเก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้งานทดสอบในอนาคต

Proficiency testing (PT)

- วัตถุประสงค์หลัก คือ การประเมินประสิทธิภาพของห้องปฏิบัติการ
- ตัวอย่างที่มีเป้าหมายจะส่งไปให้ผู้เข้าร่วมกิจกรรมเพื่อทดสอบ ผลจะเปรียบเทียบกับ assigned value มักจะเป็น consensus value จากห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม (ดู ISO 22117) เพื่อตรวจสอบ trueness/bias
- ตัวอย่าง PT schemes เตรียมโดยการเติมเชื้อเป้าหมายลงในอาหาร เชื้ออาจเป็น typical or atypical target strains หรือ microbial (sub)types และในบางกรณีรวมถึง non-target strains
- ดูความสามารถในการตรวจหรือนับเชื้อเป้าหมายในตัวอย่างที่มีเชื้อ background
- ควรใช้เชื้อ/สารอนุพันธ์ จาก BRCs อาจใช้ wild หรือ laboratory strains เพื่อให้ผลที่น่าเชื่อถือมากขึ้น เชื้อต้องมีลักษณะตามมาตรฐาน ดูข้อกำหนดของ PT ใน ISO/IEC 17043 และ ISO 22117

แหล่งที่มาของจุลินทรีย์อ้างอิง

- **ศูนย์เก็บเชื้อจุลินทรีย์** (Culture Collection Center) ที่เป็นที่ยอมรับของ World Federation for Culture Collections (WFCC)
- **PT providers** ที่น่าเชื่อถือ
- **บริษัทจัดจำหน่าย** เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (ตัวแทนจำหน่ายเชื้อ ATCC)
- **คัดแยกเอง** จาก wild type/mutant และได้รับการยืนยันสายพันธุ์ที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ

In-House Prepared Cultures or Commercial Preparations

- In-House Prepared Cultures :
 - Cheap, wide availability of many strains/cultures
 - Broth cultures containing high numbers handled increased risk of cross contamination
- Commercial Preparations :
 - Stable; easy to use; ? less risk of cross contamination.
 - Expensive for day to day use.
 - May not be available at required levels
 - May not be acceptable to local Accreditation Body as either reference stock culture or working culture (depends on number of growth passages from NC)

Storage and Handling of Cultures

- Potential risk of cross contamination to samples
- Minimise by:
 - เก็บเชื้อ (reference/working stocks) แยกจาก media/samples
 - Set up controls/spikes and sub หลังจากทดสอบตัวอย่าง, incubate แยกจาก samples
 - ใช้ automatic pipettes และ/หรือ filtered tips
 - Handle/process ใน designated areas of lab
 - ฆ่าเชื้อ hands/disinfect surfaces หลังทำงาน
- ใช้ uncommon salmonella เป็น control strain และเช็คเชื้อ positives จากตัวอย่างด้วย antisera เฉพาะสำหรับ lab control strain

