

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

หลักการทั่วไปว่าด้วยความสามารถ สอบกลับได้ทางมาตริวิทยา

สาขาจุลชีววิทยา

ร่างเอกสารประชาสัมพันธ์

สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
3/4-5 หมู่ 3 ตำบลคลองห้า อำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

สารบัญ

63			
64			
65	1	ขอบข่ายและการใช้งาน	1
66	2	บทนำ.....	2
67	3	หลักการทั่วไปว่าด้วยความสามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา.....	3
68	3.1	แนวคิดและบริบทที่เกี่ยวข้อง.....	3
69	3.2	คำศัพท์และนิยาม.....	3
70	3.3	สิ่งที่เจตนาวัด วิธีดำเนินการวัด และผลการวัด.....	5
71	3.3.1	สิ่งที่เจตนาวัด (measurand).....	5
72	3.3.2	วิธีดำเนินการวัด (measurement procedure).....	5
73	3.3.3	ผลการวัด (measurement result).....	5
74	3.4	มาตรฐานการวัด และหน่วยการวัด.....	5
75	3.4.1	มาตรฐานการวัด (measurement standard).....	5
76	3.4.2	หน่วยการวัด (measurement unit).....	6
77	3.5	การสอบเทียบ.....	6
78	3.6	ปัจจัยและเงื่อนไขที่กระทบต่อผลการวัด.....	6
79	3.6.1	ผู้ปฏิบัติงาน (operator).....	6
80	3.6.2	สภาวะแวดล้อม (environment).....	6
81	3.6.3	เครื่องมือและอุปกรณ์ (equipment).....	7
82	3.6.4	วิธีวัด (measurement method).....	12
83	3.6.5	ผู้ให้บริการสอบเทียบ (calibration service provider).....	16
84	3.6.6	การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (preservation of reference culture).....	16
85	3.6.7	อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media).....	24
86	3.7	การควบคุมเงื่อนไขคงที่.....	24
87	4	วัสดุอ้างอิง/วัสดุอ้างอิงรับรองที่ได้รับการยอมรับในการทดสอบด้านจุลินทรีย์ สำหรับห้องปฏิบัติการ	
88		ทดสอบในประเทศไทย	25
89	4.1	เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงในลักษณะเชื้อบริสุทธิ์.....	25
90	4.2	เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงในตัวกลาง	25
91	5	บทสรุปการสถาปนาความสามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา.....	26
92	6	ภาคผนวก: ตัวอย่างใบรับรองของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง.....	27
93	7	เอกสารอ้างอิง	34
94			
95			

96 **1 ขอบข่ายและการใช้งาน**

97 1.1 คู่มือนี้เป็นคำแนะนำในการสร้างความสามารถในการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาของการวิเคราะห์
98 ทางจุลชีววิทยา เพื่อช่วยให้ห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการตามข้อกำหนดที่เกี่ยวข้องกับการสอบกลับ
99 ได้ของผลการวัด ตามข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและ
100 ห้องปฏิบัติการสอบเทียบ ISO/IEC 17025
101

102 1.2 ห้องปฏิบัติการทดสอบ สามารถนำคู่มือนี้ไปใช้ในส่วนงานต่อไปนี้

- 103 1) การทดสอบ
- 104 2) การทดสอบที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาวัสดุอ้างอิง
- 105 3) การควบคุมคุณภาพและการประกันคุณภาพ
- 106 4) การวิจัยและพัฒนาที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
107

108 1.3 หน่วยรับรองระบบงาน (accreditation body) สามารถนำคู่มือนี้ไปใช้เป็นแนวทางในการให้การ
109 รับรองห้องปฏิบัติการ
110

111 1.4 หน่วยงานกำกับดูแลทางกฎหมาย (regulatory body) สามารถนำคู่มือนี้ไปใช้เป็นแนวทางกำกับ
112 ดูแลตามกฎหมาย
113

114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131

132 2 บทนำ

133 ความสามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา (metrological traceability) เป็นสมบัติของผลการวัด
134 ที่ใช้เปรียบเทียบผลการวัดจากต่างห้องปฏิบัติการ ทำให้ผลการวัดเหล่านี้สามารถเปรียบเทียบกันได้ โดยการ
135 อ้างอิงไปยังตัวอ้างอิงที่เป็นที่ยอมรับร่วมกัน ความสามารถสอบกลับได้ของผลการวัดจะทำให้ผลการวัดมีความ
136 น่าเชื่อถือ นอกจากนี้ความสามารถสอบกลับได้ของการวัดยังมีความสำคัญต่อการประกันคุณภาพของ
137 ห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: General requirement for the competence of testing
138 and calibration laboratories

139 ปัจจุบันการวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยามีความสำคัญทั้งทางด้านเกษตร อุตสาหกรรม ยา เครื่องสำอาง
140 สมุนไพร อาหาร อาหารสัตว์และสิ่งแวดล้อม การวัดทางด้านจุลชีววิทยาประกอบด้วยวิธีทดสอบเชิงคุณภาพ
141 (qualitative method) เป็นวิธีตรวจหาชนิดหรือกลุ่มของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในตัวอย่าง รายงานผลว่า พบ
142 หรือไม่พบ (detect/not detected) จุลินทรีย์ต่อหน่วยน้ำหนักหรือปริมาตร และวิธีทดสอบเชิงปริมาณ
143 (quantitative method) เป็นวิธีตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนในตัวอย่าง โดยทั่วไปรายงานผลเป็น
144 จำนวนจุลินทรีย์ต่อหน่วยน้ำหนักหรือปริมาตร มีหน่วยเป็น Colony Forming Unit (CFU)

145 ความสามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาของการวัดด้านจุลชีววิทยา ไม่สามารถสอบกลับไปยังหน่วย
146 เอสไอ (SI units) ได้เหมือนกับการวัดทางด้านฟิสิกส์ หรือด้านเคมี ทั้งนี้ความสามารถสอบกลับได้ทาง
147 มาตรวิทยาของการวัดด้านนี้ จะสอบกลับไปยังมาตรฐานอ้างอิงที่เป็นที่ยอมรับ จึงจำเป็นจะต้องมีการระบุชนิด
148 เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกต้องตรงกับชนิดและสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) และ/หรือสายพันธุ์ต้นแบบ (type
149 strain) ที่เป็นปัจจุบัน ซึ่งจะต้องอาศัยความจำเพาะเจาะจง (specificity) และความไว (sensitivity) ของการ
150 ทดสอบ

151 คณะทำงานจึงจัดทำเอกสารนี้ เพื่อเป็นแนวทางในการอธิบายความสามารถสอบกลับได้ของผลการวัด
152 ทางด้านจุลชีววิทยา โดยการเน้นถึงองค์ประกอบที่ทำให้ได้มาซึ่งผลการวัดที่สอบกลับได้ การประกันคุณภาพ/
153 ควบคุมคุณภาพของผลการทดสอบ ตลอดจนตัวอย่างการแสดงผลฐานความสามารถสอบกลับได้ทางด้าน
154 จุลชีววิทยา เพื่อช่วยให้ห้องปฏิบัติการได้ศึกษาให้เข้าใจได้มากยิ่งขึ้น และเพื่อใช้เป็นแนวทางปฏิบัติตลอดจน
155 เป็นแนวทางสำหรับหน่วยให้การรับรองใช้ในการประกอบการให้การรับรองระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166

167 3 หลักการทั่วไปว่าด้วยความสามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา

168 3.1 แนวคิดและบริบทที่เกี่ยวข้อง

169 การประกันคุณภาพ (Quality Assurance; QA) เป็นการดำเนินกิจกรรมบริหารคุณภาพ มุ่งทำ
170 ให้เกิดความมั่นใจว่าจะบรรลุข้อกำหนดทางด้านคุณภาพ การประกันคุณภาพด้านจุลชีววิทยาจะทำให้
171 มั่นใจในผลการวัด ทำให้ผลการวัดมีความถูกต้อง ทำให้ผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการมีคุณภาพได้
172 มาตรฐาน องค์ประกอบที่สำคัญของการประกันคุณภาพของการวัดด้านจุลชีววิทยา จะต้องอาศัย
173 บุคลากรมีความสามารถและความชำนาญ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การใช้เครื่องมืออุปกรณ์ที่ได้รับ
174 การสอบเทียบและการบำรุงรักษา การใช้วิธีการวัดที่ผ่านการตรวจสอบหรือทวนสอบความถูกต้องแล้ว
175 (method validation/verification) การควบคุมคุณภาพ (Quality Control; QC) การประเมินค่า
176 ความไม่แน่นอนของการวัด และความสามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา ซึ่งภาพรวมของการประกัน
177 คุณภาพของห้องปฏิบัติการทดสอบ คือ การปฏิบัติตามข้อกำหนดในมาตรฐาน ISO/IEC 17025

178 การประกันคุณภาพจะช่วยให้ลดความผิดพลาดของการทำงานในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้เกิด
179 ความมั่นใจว่ามีการปฏิบัติงานที่ถูกต้อง และสามารถสร้างความน่าเชื่อถือในกระบวนการวิเคราะห์
180 ทดสอบให้แก่ผู้รับบริการหรือลูกค้าได้

181 ซึ่งในเอกสารฉบับนี้ จะเน้นถึงองค์ประกอบการประกันคุณภาพสำหรับห้องปฏิบัติการ
182 จุลชีววิทยาที่เฉพาะเจาะจง ได้แก่ การใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีอิทธิพลต่อผลการวัด การเก็บรักษา
183 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง และการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณภาพเพื่อให้แต่ละห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา
184 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมต่อไป

185 3.2 คำศัพท์และนิยาม

186 ความสามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา (metrological traceability)

187 สมบัติของผลการวัด โดยที่ผลการวัดนั้นสัมพันธ์กับสิ่งอ้างอิงอย่างไม่ขาดช่วงการสอบเทียบที่ได้จัดทำ
188 เป็นเอกสารไว้ โดยการสอบเทียบแต่ละครั้งมีส่วนต่อความไม่แน่นอนการวัด (VIM)

189 **หมายเหตุ:** เป็นคุณสมบัติของผลการวัดที่สอบกลับไปได้ยังมาตรฐานที่ยอมรับได้ในระดับชาติหรือระดับ
190 นานาชาติ หรือค่าของมาตรฐานที่เกี่ยวข้องอย่างต่อเนื่อง

191 วัสดุอ้างอิง (reference material)

192 วัสดุที่เป็นเอกพันธ์และเสถียรพอเพียงเมื่อเทียบกับสมบัติที่ระบุให้มีความเหมาะสมกับเจตนาในการใช้
193 ในการวัดหรือในการตรวจสอบสมบัติระบุ (VIM)

194 **หมายเหตุ:** วัสดุที่มีการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเสถียร มีคุณลักษณะเหมาะสมต่อการควบคุม
195 คุณภาพของการวัด

196 วัสดุอ้างอิงรับรอง (certified reference material)

197 วัสดุอ้างอิงที่มีเอกสารหลักฐานซึ่งออกโดยองค์กรที่มีอำนาจหน้าที่ และให้ค่าสมบัติที่ระบุค่าหนึ่งหรือ
198 หลายค่า พร้อมกับความไม่แน่นอนที่เชื่อมสัมพันธ์กัน และความสามารถสอบกลับได้ โดยใช้
199 วิธีดำเนินการที่สมเหตุสมผล (VIM)

200 **หมายเหตุ:** วัสดุอ้างอิงที่ได้รับการกำหนดคุณสมบัติหนึ่งหรือมากกว่านั้นด้วยวิธีทางมาตรวิทยา พร้อม
201 กับใบรับรองที่จะแสดงค่าของคุณสมบัติและระบุค่าความไม่แน่นอน และการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา
202

205 **วัสดุควบคุม (quality control material)**
206 ตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินผลการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการ ภายใต้ขอบเขตขีดจำกัดของ
207 ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (tolerance limits) ของวิธีวิเคราะห์ที่กำหนดไว้ รวมถึงตัวอย่างควบคุม
208 ตัวอย่างมาตรฐานที่ใช้ในการสอบเทียบและตัวอย่างเชิงลบ (negative sample)
209

210 **จุลินทรีย์อ้างอิง (reference culture)**

211 สายพันธุ์จุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ทราบรายละเอียดลักษณะทางชีวเคมี น้ำเหลืองวิทยา (serology) พันธุกรรม
212 แหล่งที่มาแน่ชัดว่าคัดแยกจากแหล่งใด และแหล่งเก็บรักษาที่ชัดเจน อาจหมายถึง สายพันธุ์ต้นแบบ
213 (type strain) สายพันธุ์ตัวแรกของชื่อ สกุลนั้น ๆ หรือสายพันธุ์มาตรฐาน (standard strains)
214 สายพันธุ์ที่ระบุในมาตรฐานต่าง ๆ เป็นต้น รวมถึงสายพันธุ์ที่ได้รับการจัดจำแนกโดยห้องปฏิบัติการที่
215 สามารถสอบกลับได้ไปถึงสายพันธุ์ต้นแบบที่ใช้อ้างอิง เพื่อให้ผู้ใช้สามารถนำไปใช้ได้ตรงตามขอบข่าย
216 หรือวัตถุประสงค์การใช้งาน
217

218 **การประกันคุณภาพ (quality assurance)**

219 กิจกรรมการบริหารคุณภาพในส่วนที่มุ่งทำให้เกิดความมั่นใจว่าจะบรรลุข้อกำหนดทางด้านคุณภาพผล
220 การวัด
221

222 **การควบคุมคุณภาพ (quality control)**

223 กิจกรรมหรือการดำเนินงานทางเทคนิค ในส่วนที่มุ่งทำให้บรรลุข้อกำหนดทางด้านคุณภาพผลการวัด
224

225 **การสอบเทียบ (calibration)**

226 การปฏิบัติงานภายใต้เงื่อนไขที่ระบุ ซึ่งในขั้นแรกสร้างความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณกับความไม่
227 แน่นนอนการวัดที่ได้จากมาตรฐานการวัด และค่าบ่งชี้ที่สมนัยกับความไม่แน่นอนการวัดที่เชื่อมสัมพันธ์ค่า
228 บ่งชี้ นั้น และในขั้นที่ 2 จะใช้สารสนเทศดังกล่าวสร้างความสัมพันธ์เพื่อให้ได้ผลการวัดจากค่าบ่งชี้ (VIM)
229

230 **ความไม่แน่นอนการวัด (measurement uncertainty)**

231 ตัวแปรเสริมที่ไม่มีค่าเป็นลบซึ่งใช้บ่งบอกลักษณะเฉพาะของการกระจายของค่าปริมาณของสิ่งที่เจตนา
232 วัด ขึ้นอยู่กับข้อมูลที่ใช้ (VIM)
233

234 **การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation)**

235 การยืนยันการตรวจหาคุณสมบัติเฉพาะของวิธีทดสอบและจัดทำหลักฐานที่เป็นรูปธรรม เพื่อการ
236 นำไปใช้ตามจุดมุ่งหมายเฉพาะ และสามารถบรรลุผลได้ครบถ้วนตามวิธีการ
237

238 **การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method verification)**

239 การทดสอบเพื่อประกันว่าวิธีการวิเคราะห์มาตรฐาน หรือวิธีการวิเคราะห์อ้างอิง หรือวิธีวิเคราะห์อื่น ๆ
240 ที่นำไปใช้ในห้องปฏิบัติการ มีความถูกต้องและความเที่ยงเป็นไปตามคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์นั้น ๆ
241

242

243

244

245

246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283

3.3 สิ่งที่เจตนาวัด วิธีดำเนินการวัด และผลการวัด

3.3.1 สิ่งที่เจตนาวัด (measurand)

สิ่งที่เจตนาวัด คือ “ปริมาณที่ตั้งใจจะวัด” (quantity subjected to measurement) ทั้งนี้จะต้องมีการระบุให้ชัดเจนด้วยว่าเป็นการวัดในเชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณ หากมีการระบุเชิงปริมาณจะต้องระบุถึงชนิดของเชื้ออะไร ในตัวกลาง (matrix) ชนิดไหน และการวัดนั้นรายงานในหน่วยอะไร (unit) นอกจากนี้จะต้องระบุว่า วัดด้วยวิธีดำเนินการวัดอะไร การระบุสิ่งที่เจตนาวัดมีความสำคัญอย่างมากที่ปริมาณที่ตั้งใจวัดนั้นจะต้องมีความชัดเจน

สาขาจุลชีววิทยามีหลากหลายในสิ่งที่สามารถวัดและตรวจสอบได้ โดยทั่วไปสิ่งที่วัด ได้แก่ แบคทีเรีย ไวรัส และจุลินทรีย์ต่าง ๆ ซึ่งแบ่งออกได้ 2 รูปแบบ คือ เชิงคุณภาพที่ใช้ในการตรวจหาว่า พบหรือไม่พบจุลินทรีย์เป้าหมายนั้น ๆ ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง ซึ่งใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรค สิ่งที่วัดในเชิงปริมาณจะเป็นการตรวจหาจำนวนเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร ที่ใช้ตรวจหาจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีแสดงถึงคุณภาพของอาหาร ซึ่งมีการรายงานผลเป็นจำนวนที่นับได้ทั้งหมด มีหน่วยเป็น (Colony Forming Unit; CFU) หรือ (Most Probable Number; MPN) เป็นต้น

3.3.2 วิธีดำเนินการวัด (measurement procedure)

วิธีดำเนินการวัด คือ “คำบรรยายลักษณะอย่างละเอียดของการวัดที่เป็นไปตามหลักการวัด (measurement principle) หนึ่ง หรือมากกว่า และวิธีการวัดที่ตั้งอยู่บนวิธีวัดมาตรฐาน (standard method) และรวมถึงการคำนวณใด ๆ เพื่อให้ได้ผลการวัด” เอกสารบรรยายวิธีดำเนินการวัดต้องมีรายละเอียดเพียงพอให้ผู้ดำเนินการวัดปฏิบัติงานได้ และได้รับการควบคุม เช่น เป็นวิธีที่มีหน่วยวัดเป็นโคโลนี (Colony Forming Unit; CFU) หรือมีค่าความน่าจะเป็น (Most Probable Number; MPN)

3.3.3 ผลการวัด (measurement result)

ผลการวัด คือ “ชุดของค่าปริมาณที่ถือได้ว่าเป็นตัวแทนของสิ่งที่เจตนาวัด พร้อมด้วยข้อมูลเกี่ยวข้องอื่นใดที่ปรากฏ” เช่น ในเชิงปริมาณจะต้องมีการระบุตัวเลขหน่วยการวัด ความไม่แน่นอนการวัด ความคลาดเคลื่อน สภาวะอ้างอิง เงื่อนไขการวัด และการแสดงถึงความสามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาของผลการวัด เป็นต้น

3.4 มาตรฐานการวัด และหน่วยการวัด

3.4.1 มาตรฐานการวัด (measurement standard)

มาตรฐานการวัด คือ จุดอ้างอิงหรือเกณฑ์ที่กำหนดขึ้นเพื่อใช้ในการวัดหรือวิเคราะห์พารามิเตอร์หนึ่ง ๆ เป็นค่าที่รู้จักและมีความน่าเชื่อถือ ซึ่งใช้เป็นพื้นฐานในการเปรียบเทียบผลการวัดที่ได้จากเครื่องมือหรือวิธีการต่าง ๆ

มาตรฐานการวัดช่วยให้เกิดความน่าเชื่อถือและเปรียบเทียบได้ ในการวัดค่าของพารามิเตอร์ระหว่างห้องปฏิบัติการหรือการวิจัยที่แตกต่างกัน เพื่อให้ผลการวัดเป็นไปอย่างสอดคล้องและสามารถใช้เปรียบเทียบได้ในระหว่างหน่วยงานหรือระหว่างประเทศ

หมายเหตุ: มาตรฐานการวัดอาจเป็นสารหรือเชื้อที่ทราบค่า เช่น *E. coli* 5.0×10^8 CFU/mL

284 **3.4.2 หน่วยการวัด (measurement unit)**

285 หน่วยการวัด คือ ค่าที่ใช้ในการแสดงหรือวัดปริมาณของพารามิเตอร์ หรือสิ่งที่กำลังวัด
286 หน่วยการวัดช่วยให้สามารถเปรียบเทียบและเข้าใจข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับปริมาณนั้น ๆ ได้ เป็น
287 ค่าที่มีมาตรฐานกำหนดโดยองค์กรหรือสถาบันที่เกี่ยวข้อง หรือเป็นหน่วยประเภทเดียวกันที่ใช้
288 กันอย่างแพร่หลายในแต่ละสาขาวิชา เช่น CFU ย่อมาจาก "Colony Forming Unit" ซึ่งเป็น
289 หน่วยที่ใช้ในการนับจำนวน และการวัดปริมาณของจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่เติบโตในจานเลี้ยงเชื้อ

291 **3.5 การสอบเทียบ**

292 การสอบเทียบ (calibration) คือ การปฏิบัติงานภายใต้เงื่อนไขที่ระบุ ซึ่งในขั้นแรกสร้าง
293 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณกับความไม่แน่นอนการวัดที่ได้จากมาตรฐานการวัด และค่าบ่งชี้ที่สมนัย
294 กับความไม่แน่นอนการวัดที่เชื่อมสัมพันธ์ค่าบ่งชี้ นั้น และในขั้นที่ 2 จะใช้สารสนเทศดังกล่าวสร้าง
295 ความสัมพันธ์เพื่อให้ได้ผลการวัดจากค่าบ่งชี้

296 **หมายเหตุ:** การสอบเทียบในทางจุลชีววิทยา คือ การเปรียบเทียบผลการวัดกับสารหรือเชื้อที่ทราบค่า
297 เป็นกระบวนการพื้นฐานในการแสดงความสามารถในการสอบกลับได้ ซึ่งเป็นแนวทางปฏิบัติที่ทำให้เกิด
298 การเชื่อมความสัมพันธ์ระหว่างค่าประมาณของสิ่งที่เจตนาวัด (measurand) ไปยังมาตรฐานการวัด
299 (measurement standard) ดูหัวข้อ 3.2

301 **3.6 ปัจจัยและเงื่อนไขที่กระทบต่อผลการวัด**

302 ในการวัดหรือทดสอบมักมีปัจจัยและเงื่อนไขที่ส่งผลกระทบต่อผลการวัด เช่น ในการตรวจ
303 วิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ผลการวัดได้รับผลกระทบจากปัจจัยต่าง ๆ ยกตัวอย่างเช่น

- 304 - อุณหภูมิของสภาพแวดล้อม
- 305 - อาหารเลี้ยงเชื้อ
- 306 - การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

307 เมื่อปัจจัยหรือเงื่อนไขที่ส่งผลกระทบเปลี่ยนไป จะทำให้ผลการวัดที่ได้เปลี่ยนไปด้วย โดยปัจจัย
308 หลัก 7 ประการ ที่มีอิทธิพลต่อผลการวัด ได้แก่

310 **3.6.1 ผู้ปฏิบัติงาน (operator)**

311 ผู้ปฏิบัติงานในกระบวนการทดสอบเป็นปัจจัยหนึ่งที่อาจส่งผลต่อความคลาดเคลื่อน และ
312 ความไม่แน่นอนการวัดอย่างมีนัยสำคัญ ในกรณีที่บุคคลมากกว่าหนึ่งทำการวัดเดียวกันอาจส่งผล
313 ต่อความไม่แน่นอนการวัดที่ต่างกัน ปัจจัยต่าง ๆ เช่น องค์กรความรู้ ประสบการณ์ ทักษะ และความ
314 ชำนาญล้วนส่งผลต่อผลการวัด ดังนั้น มาตรฐาน ISO/IEC 17025 จึงมีข้อกำหนดว่าด้วย
315 สมรรถนะของบุคคลที่ได้รับมอบหมายให้ดำเนินการวัด

317 **3.6.2 สภาวะแวดล้อม (environment)**

318 สภาวะแวดล้อมขณะทำการทดสอบส่งผลต่อผลการวัด ตัวแปรต่าง ๆ ของสภาวะ
319 แวดล้อม เช่น อุณหภูมิ เป็นต้น สามารถส่งผลกระทบต่อผลการวัด ทั้งในมิติของความ
320 คลาดเคลื่อนการวัดและความไม่แน่นอนรวมของการวัด ซึ่งการทดสอบบางอย่างอาจมีความ
321 อ่อนไหวต่อสภาวะแวดล้อมมากกว่าการวัดอย่างอื่น โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการต้องสะอาด มีสิ่ง

322 ต้องการทดสอบในปริมาณน้อย ๆ หรือไม่มี เช่น ปริมาณจุลินทรีย์ในอากาศไม่เกิน 15 โคโลนี ต่อ
323 15 นาที ต่อจานเพาะเชื้อ ปริมาณจุลินทรีย์บนพื้นที่ปฏิบัติงานไม่ควรเกิน 100 CFU ต่อพื้นที่
324 50 ตารางเมตร และตู้ปราศจากเชื้อต้องไม่มีจุลินทรีย์ โดยทำการเปิดตู้อย่างน้อย 30 นาที
325 เป็นต้น ขณะเดียวกันพื้นที่ห้องปฏิบัติการไม่ควรกวาดหรือดูดฝุ่น เพราะจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ฟุ้ง
326 กระจาย
327

3.6.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ (equipment)

329 เครื่องมือและอุปกรณ์เป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการทดสอบ เพื่อให้
330 ได้ผลการทดสอบถูกต้องและเป็นจริงมากที่สุด เครื่องมือจะต้องมีแนวปฏิบัติที่เหมือนกัน ได้แก่
331 มีคู่มือการใช้งาน มีบันทึกการใช้งานประจำวัน (log book) มีบันทึกการบำรุงรักษาและซ่อม
332 เครื่องมือ และมีการจัดทำประวัติการสอบเทียบและทวนสอบเครื่องมือ โดยเครื่องมือหลักที่ใช้ในงาน
333 ทางด้านจุลชีววิทยา มีดังนี้

ตู้บ่ม (incubator)

334 ตู้บ่มเป็นเครื่องมือที่มีการควบคุมอุณหภูมิของอากาศภายในตู้ ใช้ในการเพาะเชื้อมี
335 ส่วนประกอบที่สำคัญ คือ แหล่งกำเนิดความร้อน บางชนิดจะมีพัดลมในการช่วยกระจายความ
336 ร้อนให้มีความสม่ำเสมอ เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้อง
337 สอบเทียบและตรวจสอบอุณหภูมิภายในตู้ เพื่อให้มั่นใจว่าเป็นไปตามความต้องการใช้
338

339 เพื่อให้อุณหภูมิภายในตู้บ่มมีอุณหภูมิตามที่ตั้งค่าไว้ การใช้งานตู้บ่มควรเปิดใช้และตั้งค่า
340 อุณหภูมิของตู้บ่มก่อนการใช้งานอย่างน้อย 30 นาที การสอบเทียบขึ้นอยู่กับข้อกำหนดมาตรฐาน
341 ที่เกี่ยวข้องที่ใช้อ้างอิง ตัวอย่างเช่น
342
343

อุณหภูมิ	รายการ	MPE*
อุณหภูมิที่ใช้งานตู้ 35 °C	temperature accuracy & stability	±1 °C
อุณหภูมิที่ใช้งานตู้ 36 °C	temperature accuracy & stability	±1 °C
อุณหภูมิที่ใช้งานตู้ 42 °C	temperature accuracy & stability	±1 °C

*หมายเหตุ: ห้องปฏิบัติการสามารถสอบเทียบขึ้นอยู่กับ MPE ของเครื่องมือที่ระบุในวิธี

344 การตรวจสอบผลสอบเทียบ ตรวจสอบทุกตำแหน่งภายในตู้ที่ได้รับการสอบเทียบ โดยใช้เกณฑ์
345 ยอมรับ error + UM (Uncertainty Of Measurement) ≤ MPE หรือใช้เกณฑ์ ตาม ISO 7218
346 เรื่อง stability และ uniformity ไม่เกิน MPE ของวิธีทดสอบ
347

348 หมายเหตุ: ควรใช้ค่า correction ในกรณีที่ผลการสอบเทียบมีผลกระทบต่อการใช้ตัดสินใน
349 กรณีที่สอบเทียบไม่ผ่านไม่ควรทำการทวนสอบและนำมาใช้งาน
350
351
352
353

354
355

357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388

การตรวจสอบขณะใช้งาน

1. ตรวจสอบประจำวัน (daily check) อย่างน้อย 1 ครั้ง ในวันทำการ โดยให้อุณหภูมิของตู้บ่มคงที่ก่อนการอ่าน (เข้าหรือบายที่ยังไม่มีผู้ปฏิบัติงานมาเปิดใช้ตู้บ่ม)
2. ทำ intermediate check เป็นระยะ ๆ ตามความเหมาะสม หรืออย่างน้อย 6 เดือน ครั้ง ภายหลังจากสอบเทียบ

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการอุ่นอาหารเลี้ยงเชื้อหรือบ่มการทดสอบ โดยใช้ความร้อนจากน้ำที่อ่างควรใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีปิดฝาเพื่อลดการสูญเสียน้ำ ความร้อนและรักษาระดับอุณหภูมิ

หมายเหตุ: ควรตรวจสอบระดับน้ำในอ่างก่อนใช้งานทุกครั้ง โดยน้ำจะต้องสูงกว่าระดับน้ำที่ต่ำที่สุด (minimum water level) และควรสูงกว่าปริมาณตัวอย่างหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการอุ่น อย่างน้อย 2 เซนติเมตร

การตรวจสอบขณะใช้งาน

1. ตรวจสอบประจำวัน (daily check) อย่างน้อย 1 ครั้ง ในวันทำการ
2. ทำ intermediate check เป็นระยะ ๆ ตามความเหมาะสม หรืออย่างน้อย 6 เดือน ครั้ง ภายหลังจากสอบเทียบ

ตู้อบลมร้อน (hot air oven หรือ dry oven)

เป็นเครื่องที่ใช้ความร้อนในการทำให้อุปกรณ์แห้งหรือปราศจากเชื้อ โดยใช้ความร้อนแห้ง ซึ่งต้องการระดับอุณหภูมิที่ถูกต้องและเหมาะสม การใช้งานส่วนใหญ่ใช้สำหรับอบเครื่องแก้วหรืออุปกรณ์ที่ทนความร้อนได้สูง โดยอบฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส \pm 10 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ตู้อบลมร้อนควรมีเครื่องวัดอุณหภูมิที่ได้รับการสอบเทียบและปรับแก้ (calibrated) อย่างถูกต้อง เช่น เครื่องเทอร์โมมิเตอร์ (thermometer) ที่ได้รับการสอบเทียบเทอร์โมคัปเปิล (thermocouple) หรืออุปกรณ์บันทึกอุณหภูมิ (temperature-recording device) ที่มีความแม่นยำที่เหมาะสม และสามารถทำงานได้อิสระจากระบบการควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ อุปกรณ์การตรวจวัดควรมีความละเอียดในการแสดงผลอุณหภูมิที่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 1 องศาเซลเซียส การสอบเทียบขึ้นอยู่กับข้อกำหนดมาตรฐานที่เกี่ยวข้องที่ใช้อ้างอิง ตัวอย่างเช่น

อุณหภูมิ	รายการ	MPE
170 °C	temperature accuracy & stability	\pm 10 °C

389
390
391
392
393

การตรวจสอบผลสอบเทียบ ใช้เกณฑ์ยอมรับ error + UM (Uncertainty of Measurement) \leq MPE คือ \pm 10 องศาเซลเซียส (ตำแหน่งที่สอบเทียบเมื่อทำการ \pm uncertainty ไม่ควรต่ำกว่า 160 องศาเซลเซียส) หรือใช้เกณฑ์ stability และ uncertainty ไม่ควรเกิน \pm 10 องศาเซลเซียส ตาม ISO 7218

394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415

การตรวจสอบขณะใช้งาน

1. ตรวจสอบประจำวัน (daily check) อย่างน้อย 1 ครั้ง ในวันทำการ
2. ทำ intermediate check เป็นระยะ ๆ ตามความเหมาะสมหรืออย่างน้อย 6 เดือน ครั้ง ภายหลังการสอบเทียบ

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการทำให้อาหารปราศจากเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ โดยให้สิ่งที่ต้องการทำให้ปราศจากเชื้อสัมผัสกับไอน้ำอิ่มตัวที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่กำหนด การทำงานของเครื่องนึ่งไอน้ำแรงดันสูง ใช้หลักการให้ไอน้ำไปแทนที่อากาศในตัวถังจนหมด แล้วปิดฝาตัวถังจนความดันและอุณหภูมิภายในตัวถังเพิ่มขึ้นตามที่กำหนด เนื่องจากอุณหภูมิของไอน้ำอิ่มตัว มีความสัมพันธ์คงที่กับความดัน ดังนั้นจึงต้องทำการสอบเทียบและตรวจสอบขณะใช้งาน เพื่อให้มั่นใจว่าใช้งานได้ถูกต้อง

ในการใช้งานควรตรวจระดับน้ำภายในหม้อ หากระดับน้ำมีน้อยเกินไปทำการเติมน้ำลงในหม้อนึ่ง (น้ำที่ใช้ควรเป็นน้ำกลั่นหรือน้ำสะอาดที่ไม่มีตะกอน) จนกระทั่งมองเห็นน้ำบริเวณตรงกลางหม้อนึ่ง ตัวอย่างที่ต้องการฆ่าเชื้อลงในหม้อนึ่ง การวางภาชนะ อาหารเลี้ยงเชื้อ หรือสารเคมีที่ต้องการฆ่าเชื้อ ควรจัดใส่ในตะกร้าที่มีมากับเครื่อง ควรวางให้มีที่ว่างห่างกัน

การสอบเทียบกับหน่วยงานภายนอกควรดำเนินการอย่างน้อย 1 ครั้ง ภายใน 1 ปี หรือตามความเหมาะสม การสอบเทียบขึ้นอยู่กับข้อกำหนดมาตรฐานที่เกี่ยวข้องที่ใช้อ้างอิง และทำ intermediate check เป็นระยะ ๆ ตามความเหมาะสม ตัวอย่างเช่น

อุณหภูมิ	รายการ	MPE*
121 °C	temperature accuracy	± 3 °C

*หมายเหตุ: MPE ของอุณหภูมิเป้าหมายไม่เกิน ± 3 °C

416
417
418

การตรวจสอบผลสอบเทียบ ใช้เกณฑ์ยอมรับ error + UM (Uncertainty of Measurement) ≤ MPE หรือใช้เกณฑ์ ตาม ISO 7218

การตรวจสอบขณะใช้งาน

1. ตรวจสอบและบันทึกอุณหภูมิ ความดัน ด้วยหน่วยวัดปอนด์ต่อตารางนิ้ว และเวลาที่ใช้งานทุกครั้ง
2. ตรวจสอบระบบการทำงานและประสิทธิภาพของเครื่องนึ่งไอน้ำแรงดันสูงอย่างน้อยเดือนละครั้ง หรือตามมาตรฐานที่อ้างอิงด้วยการทดสอบ spore test โดยใช้สปอร์ของ *Geobacillus stearothermophilus* โดยนำหลอดของเชื้อมา 2 หลอด ดังนี้
หลอดที่ 1 นำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
หลอดที่ 2 ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อใช้เป็นชุดควบคุม

430
431
432

จากนั้นนำทั้งสองหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ (60 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือตามที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของหลอดเชื้อถ้าการฆ่าเชื้อได้ผล อาหารเลี้ยงเชื้อจะยังคงเป็นสีม่วงหลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ้าการฆ่าเชื้อไม่ได้ผล อาหารเลี้ยงเชื้อ

433 จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เนื่องจากกรดถูกปล่อยออกมาระหว่างที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโต และ
 434 จะมีความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สังเกตได้ (สีเหลืองของอินดิเคเตอร์สามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อ
 435 ระยะเวลาการบ่มนานเกินไป ดังนั้น ควรสังเกตหาค่าควบคุมหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)
 436 3. ใช้ maximum thermometer อย่างน้อยเดือนละครั้ง หรือตามมาตรฐานที่อ้างอิง

437
 438 **เครื่องวัดความเป็นกรด – ต่าง (pH meter)**

439 ทำการสอบเทียบอิเล็กโทรด (calibration and standardization) ด้วยสารละลาย
 440 บัฟเฟอร์มาตรฐาน ที่เป็นระดับวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ก่อน
 441 การใช้งานด้วยวัสดุอ้างอิงรับรองอย่างน้อย 2 ชนิด โดยให้ครอบคลุมค่าที่ต้องการวัด ถ้าไม่
 442 ครอบคลุมให้ใช้วัสดุอ้างอิงรับรองอีก 1 ชนิด ตามเอกสารขออนุญาตใช้งานการดูแลรักษา
 443 และการสอบเทียบ pH Meter with electrode assemblies โดยจะต้องเริ่มจากค่า pH เท่ากับ
 444 7.00 หรือตามที่คุณผลิตแนะนำเป็นจุดแรก หลังจากนั้นทำการวัดสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่
 445 เป็น second source หรือ verification buffer อย่างน้อย 1 จุดเพื่อเป็นการตรวจสอบค่าที่อ่าน
 446 ได้จากอิเล็กโทรดเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนดไว้ จากนั้นล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่น ใช้กระดาษทิชชู
 447 ไร้ฝุ่นซับน้ำที่อิเล็กโทรดเพื่อกำจัดน้ำส่วนเกิน นำไปวัดหรือทดสอบตัวอย่างต่อไป ห้องปฏิบัติการ
 448 จะต้องใช้เกณฑ์ที่เหมาะสมกับเครื่อง pH meter และวิธีการทดสอบ

449
 450 **เกณฑ์การยอมรับสำหรับเครื่อง pH meter**

รายการ	เกณฑ์การยอมรับ(หรือตามข้อกำหนดของผู้ผลิต)
offset at pH 7	± 30 mV
ความชัน (% efficiency)	95 % to 105 %
การทวนสอบค่า pH ของ reference buffer solution (secondary source for verification)	± 0.10 pH

451 ในกรณีการสอบเทียบอิเล็กโทรดก่อนการใช้แล้ว % efficiency ไม่ผ่านเกณฑ์ ต้อง
 452 พิจารณาดังนี้

- 453 1. ตรวจสอบอิเล็กโทรดว่าเสื่อมหรือไม่ โดยการเปลี่ยนอิเล็กโทรดใหม่ แล้วทำการสอบ
 454 เทียบใหม่
- 455 2. หากผลยังไม่ผ่านเกณฑ์ ให้ดำเนินการสอบเทียบทางไฟฟ้าให้กับมิเตอร์

456
 457
 458 ข้อแนะนำในการเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานและรายละเอียดอื่น ๆ สามารถ
 459 ศึกษาเพิ่มเติมได้จากเอกสาร ขออนุญาตใช้งาน การดูแลรักษา และการสอบเทียบ pH
 460 meter with electrode assemblies

464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503

เครื่องชั่ง (balance)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ชั่งตัวอย่าง สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ การเลือกเครื่องชั่งให้เหมาะสมกับความต้องการใช้งาน ต้องทราบน้ำหนักต่ำสุดและสูงสุดที่ต้องการชั่ง และความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ไม่ควรเกิน 1 เปอร์เซ็นต์ เช่น ชั่ง 10 กรัม ขึ้นไป ให้ใช้เครื่องชั่ง 1 ตำแหน่ง หรือ 1 กรัม ขึ้นไป ให้ใช้เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง การสอบเทียบและทำ intermediate check ขึ้นอยู่กับข้อกำหนดมาตรฐานที่เกี่ยวข้องที่ใช้อ้างอิง หรือตาม guidance on the calibration of weighing machines used in testing and calibration laboratories (UKAS LAB 14)

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow หรือ biological safety cabinet)

เป็นเครื่องมือควบคุมลมชนิดหนึ่ง ซึ่งอาศัยหลักการการทำงานของมอเตอร์พัดลมและแผ่นกรองอากาศ HEPA เพื่อให้การปกป้องผู้ใช้งาน ตัวอย่าง และสิ่งแวดล้อม โดยใช้กำจัดฝุ่นรวมถึงอนุภาคต่าง ๆ เช่น จุลินทรีย์ในอากาศ

ตู้ปลอดเชื้อควรมีการตรวจสอบการทำงานของแผ่นกรองอากาศ และประสิทธิภาพของหลอด UV ตามคู่มือบริษัทผู้ขายหรือตามความเหมาะสม

ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง (refrigerator and freezer)

- ตู้เย็น (refrigerator) ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่าง อาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำยา สารเคมี และเชื้อแบคทีเรีย โดยตู้เย็นที่ใช้เก็บตัวอย่างแช่อาหารแช่เย็นต้องมีอุณหภูมิ (3 ± 2) องศาเซลเซียส ตามเอกสารอ้างอิงหรือตามฉลากกำหนด ส่วนตู้เย็นที่ใช้เก็บสารอื่น ๆ ต้องมีอุณหภูมิ (5 ± 3) องศาเซลเซียส

การตรวจสอบขณะใช้งาน

1. ตรวจสอบประจำวัน (daily check) อย่างน้อย 1 ครั้ง ในวันทำการ
2. ทำ intermediate check เป็นระยะ ๆ ตามความเหมาะสม

- ตู้แช่แข็ง (freezer) ที่ใช้เก็บตัวอย่างอาหารแช่แข็ง อุณหภูมิต้องเท่ากับหรือต่ำกว่า -15 องศาเซลเซียส หรือ -18 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส ตามเอกสารอ้างอิงหรือตามฉลากกำหนด

การตรวจสอบการใช้งาน

1. ตรวจสอบประจำวัน (daily check) อย่างน้อย 1 ครั้ง ในวันทำการ
2. ทำ intermediate check เป็นระยะ ๆ ตามความเหมาะสม

เทอร์โมมิเตอร์ (thermometers)

เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดอุณหภูมิเครื่องมือที่ต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โดยมี readability ดีกว่าสิ่งที่จะวัดอย่างน้อย 3 เท่า (กรณีที่ไม่สามารถจัดหาได้สามารถใช้ต่างจากนี้ได้) เช่น ตู้บเพาะเชื้อ ตู้เย็น ตู้แช่แข็ง และอ่างน้ำร้อน การตรวจสอบความถูกต้องของการควบคุมอุณหภูมิของเครื่องมือเหล่านี้ จำเป็นต้องใช้เทอร์โมมิเตอร์ในการตรวจสอบ ดังนั้นควรเลือกเทอร์โมมิเตอร์ที่มีความถูกต้องของการวัดให้เหมาะสมกับช่วงอุณหภูมิที่ต้องการควบคุม โดยทั่วไปเทอร์โมมิเตอร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการต้องมีการสอบเทียบ

อุณหภูมิ	รายการ	MPE
อุณหภูมิที่ใช้งาน	temperature accuracy	1/3 ของช่วงอุณหภูมิ ที่ต้องการควบคุม เช่น (5 ± 3) °C MPE = ± 1 °C

505

506

การตรวจสอบผลสอบเทียบ ใช้เกณฑ์ยอมรับ error + UM (Uncertainty of Measurement) ≤ MPE (± 1 องศาเซลเซียส) หรือใช้เกณฑ์ ตาม ISO 7218

507

508

509

การสอบเทียบ

510

1. reference thermometer ความถี่อย่างน้อยทุก 5 ปี และ check ice point หรือจุดน้ำเดือดทุก 1 ปี หรือตามความเหมาะสมตามเอกสารอ้างอิง

511

512

2. reference thermocouple ความถี่อย่างน้อยทุก 5 ปี และ check ice point ทุก 1 ปี หรือตามความเหมาะสมตามเอกสารอ้างอิง

513

514

3. working thermometer ให้ทวนสอบด้วย reference thermometer ที่ ice point หรือจุดน้ำเดือด (ที่อุณหภูมิใช้งาน) หรือทำความถี่อย่างน้อยทุกปี หรือตามความเหมาะสมตามเอกสารอ้างอิง

515

516

517

518

เครื่องแก้วและจานเพาะเชื้อพลาสติก (glassware and petri dish plastic)

519

เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาควรทำจากวัสดุคุณภาพสูงชนิด low – alkali borosilicate เพื่อป้องกันการชะล้างของ alkali ที่ผิวหน้าของแก้ว โดยจะต้องมีลักษณะเรียบ และไม่มีรอยขีดข่วน โดยเครื่องแก้วต้องมีความสะอาด ปราศจากสารตกค้างที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

520

521

522

523

524

3.6.4 วิธีวัด (measurement method)

525

526

นิยามวิธีมาตรฐาน

527

เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติ ระดับสากล หรือระดับภูมิภาค หรือระดับประเทศ หรือระดับที่ได้รับการยอมรับของบุคคลในสาขา

528

529

530

การเลือกวิธี

531

กรณีที่ถูกค่าระบุเป็นลายลักษณ์อักษรให้ใช้วิธีของลูกค้านำดับแรก หากกรณีที่ถูกค่าไม่ได้ระบุให้ใช้วิธีมาตรฐานอาจใช้วิธีทางเลือกอื่นได้ ซึ่งวิธีการเลือกอื่น (alternative method) ที่ใช้ต้องมีข้อมูลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี (validation data) ครอบคลุมกลุ่มของตัวอย่าง (categories) ที่ต้องการทดสอบ (ดู ISO 16140)

532

533

534

535

ก่อนที่ห้องปฏิบัติการจะนำวิธีทดสอบต่าง ๆ ไปใช้ ห้องปฏิบัติการต้องมีการทวนสอบวิธีเพื่อยืนยันความสามารถของห้องปฏิบัติการ

536

537

538

539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577

การสอบกลับได้ทางการวัด

การสอบเทียบเครื่องมือกรณีสอบเทียบโดยหน่วยงานภายนอก ให้ห้องปฏิบัติการเลือกผู้ให้บริการที่สามารถให้ผลการวัดที่สามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา และมีความไม่แน่นอนของการวัดที่ยอมรับได้ กรณีสอบเทียบโดยบุคลากรหรือหน่วยงานภายใน ผู้สอบเทียบต้องมีความสามารถและต้องมีค่าความแน่นอนของการวัดประกอบมาด้วย

เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

ให้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทราบระดับสกุล (genus) และระดับชนิด (species) ที่ได้มาจากแหล่งที่น่าเชื่อถือและสอบกลับได้ เช่น

- ศูนย์เก็บเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง เช่น American Type Culture Collection (ATCC) หรือ World Data Center for Microorganisms (WDCM) เป็นต้น
- จากการทดสอบความชำนาญ โดยองค์กรทดสอบความชำนาญที่น่าเชื่อถือ เช่น องค์กรที่ได้ ISO/IEC 17043 เป็นต้น
- จากการทดสอบของห้องปฏิบัติการ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์นั้นจะต้องได้รับการยืนยันตามวิธีทดสอบ (คู่มือการเลือกวิธี) โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ห้องปฏิบัติการใช้ต้องเป็นเชื้อบริสุทธิ์ มีคุณสมบัติตรงตามการใช้งาน

อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำที่ใช้ในการทดสอบ

ต้องมีคุณสมบัติตรงตามที่ห้องปฏิบัติการต้องการใช้งาน โดยให้ปฏิบัติตามเอกสารที่จัดทำขึ้น และ/หรือตาม ISO 11133 กำหนด

การวัด ทดสอบ หรือสอบเทียบบางสาขา มีวิธีวัดที่ได้รับการศึกษาพัฒนามาก่อนหน้าและปรากฏในมาตรฐานเชิงเอกสารหรือข้อกำหนดเชิงกฎหมาย ในกรณีที่มีทรัพยากรเพียงพอในการดำเนินการตามวิธีนั้นทั้งหมด ห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีดำเนินการวัดเหล่านี้ไปใช้ได้โดยตรง ไม่ต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี แต่ในกรณีที่มีทรัพยากรไม่เพียงพอ สามารถทำตามวิธีวัดมาตรฐานได้บางส่วน และจะต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในส่วนที่เบี่ยงเบนไปจากมาตรฐาน

อนึ่งหากการวัด ทดสอบ หรือสอบเทียบนั้น ไม่มีระบุไว้ในมาตรฐานเชิงเอกสารหรือข้อกำหนดอื่นใด ห้องปฏิบัติการต้องออกแบบและพัฒนาวิธีการวัด โดยอาศัยหลักการจากงานวิจัยหรือการศึกษาที่มีมาก่อน และต้องคำนึงถึงการได้มาซึ่งผลการวัดที่ยอมรับได้ คือ มีความคลาดเคลื่อนและความไม่แน่นอนการวัดในกรอบที่ตั้งเป้า ผลการวัดต้องสามารถสอบกลับทางมาตรวิทยา และก่อนนำวิธีการวัดที่พัฒนานี้ไปใช้งานจริงต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวัดนั้นก่อน

ทั้งนี้วิธีการวัดทางจุลชีววิทยามีวิธีการวัดมาตรฐาน (standard method) ยกตัวอย่าง เช่น การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์จาก Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online, Chapter 12 หรือ *Listeria monocytogenes* ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์จาก ISO 11290-1: Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method เป็นต้น ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องทำการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method verification)

578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617

การควบคุมคุณภาพ (quality control)

ห้องปฏิบัติการต้องจัดทำขั้นตอนสำหรับการตรวจติดตามความถูกต้องของผลการทดสอบ มีแผนการตรวจติดตามและมีการประเมินอย่างต่อเนื่อง รวมถึงมีบันทึกข้อมูลการตรวจติดตามตามความเหมาะสม ซึ่งวิธีวัดทางจุลชีววิทยาเกี่ยวข้องกับการดำเนินการที่ซับซ้อนหลายอย่าง ตั้งแต่การสุ่มตัวอย่างไปจนถึงการคำนวณและการรายงานผล ครอบคลุมถึงเครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อและรีเอเจนต์ ซึ่งทั้งหมดนี้ต้องดำเนินการโดยผู้ปฏิบัติงานที่มีความรู้ความสามารถเพื่อให้มั่นใจว่าผลการทดสอบมีความถูกต้องน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ ยังมีองค์ประกอบหลักที่สำคัญที่ใช้ในการประกันคุณภาพผลการทดสอบ ได้แก่ การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control; IQC) ที่ดำเนินการควบคุมไปกับการตรวจตัวอย่างและการควบคุมคุณภาพภายนอก (External Quality Control; EQC)

1. การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control; IQC)

วัตถุประสงค์หลักของการควบคุมคุณภาพภายใน คือ เพื่อให้แน่ใจว่าผลการทดสอบในแต่ละรอบของการทดสอบที่มีความสม่ำเสมอ ถูกต้อง แม่นยำ และสอดคล้องกับเกณฑ์ที่กำหนดไว้ แผนในการควบคุมคุณภาพภายใน ควรเลือกวิธีการและความถี่ตามความเหมาะสมขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์ทดสอบ โดยต้องสามารถยืนยันความถูกต้องของผลการทดสอบได้ ซึ่งการทำการควบคุมคุณภาพภายในจะใช้ในการตรวจสอบแนวโน้มการปฏิบัติงาน และเฝ้าระวังไม่ให้เกิดความผิดพลาด ซึ่งช่วยบ่งชี้ผลการทดสอบที่ไม่อยู่ภายใต้การควบคุม หากพบว่า มีผลการทดสอบอยู่นอกการควบคุม ต้องวิเคราะห์สาเหตุที่แท้จริง และดำเนินการแก้ไข โดยห้องปฏิบัติการสามารถเลือกทำการควบคุมคุณภาพภายในได้หลายวิธีตามความเหมาะสม ดังนี้

- การใช้ blank samples หรือ ตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาทดสอบ เพื่อประกันคุณภาพว่า การดำเนินการทดสอบทั้งระบบปลอดการปนเปื้อนของเชื้อจากสิ่งแวดล้อม

- การใช้ positive control organisms จะใช้สำหรับการทดสอบเชิงคุณภาพ โดยการเติมเชื้อ target organisms ในระดับที่ไม่เกิน 100 CFU ต่อปริมาณของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (test portion) เท่ากันหรือมากกว่า 10^4 CFU ต่อปริมาณของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการทดสอบดำเนินการได้อย่างถูกต้อง โดยผลการทดสอบของเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกต้องเป็นคุณลักษณะที่กำหนด

- การใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ผลลบหรือเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย (negative control organisms) เพื่อให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกกับที่ใช้ผลลบได้ โดยผลการทดสอบของเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ผลลบ ต้องเป็นคุณลักษณะแตกต่างจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกหรือเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

- การทดสอบซ้ำ (replicate testing) เป็นการทดสอบเพื่อตรวจสอบความสอดคล้องของผลการทดสอบ ดำเนินการโดยซ้งตัวอย่าง 2 ซ้ำ จากตัวอย่างเดียวกัน (split samples) จะใช้สำหรับการทดสอบเชิงปริมาณ โดยทำซ้ำทุก 10 เพอร์เซ็นต์ ของการทดสอบตัวอย่างหรือตามความถี่ที่เหมาะสม (APHA) เพื่อบ่งชี้ถึงความสามารถในการทำซ้ำและประสิทธิภาพของบุคลากรในห้องปฏิบัติการ โดยสามารถใช้ผลการทดสอบซ้ำในการหาค่าความไม่แน่นอนในการวัดได้ เกณฑ์การพิจารณาผลการทดสอบสามารถใช้ค่า $\pm 0.5 \log$

618 ตามเกณฑ์การประเมินของหน่วยงาน PT Provider หรือต่อน้อยกว่าค่า precision
619 criteria โดยดำเนินการดังนี้

620
621 1. ทำการทดสอบซ้ำ 2 ซ้ำ อย่างน้อย 15 ตัวอย่าง (n) จากนั้นนำผลการทดสอบมา
622 แปลงเป็นค่า \log_{10} เมื่อ L = decimal logarithms of counts , R = Range of
623 logarithms
624

625 2. คำนวณหาผลต่างระหว่างค่าทำซ้ำของแต่ละตัวอย่าง
626 $absolute R_{log} = (L_{1log} - L_{2log})$ และหาผลรวมของผลต่าง ($\sum of R_{log}$)
627
628

629 3. คำนวณค่า \bar{R}

$$\bar{R} = \frac{\sum R_{log}}{n}$$

630
631 4. Precision criteria = 3.27 \bar{R}

632

633 2. การควบคุมคุณภาพภายนอก (External quality control; EQC)

634 เป็นการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์จากภายนอกเพื่อให้เกิดความมั่นใจในผลการ
635 วิเคราะห์ โดยการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่ง
636 ของการประกันคุณภาพสำหรับห้องปฏิบัติการ โดยมีรายละเอียดดังนี้

637 - การเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing; PT) จาก
638 หน่วยงานที่จัดโปรแกรม (PT provider) โดยหน่วยงานที่จัดโปรแกรม ต้องได้รับการรับรอง
639 ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043 เพื่อให้มั่นใจถึงความสามารถในการจัดโปรแกรม และ
640 ประเมินผลโดยใช้หลักการทางสถิติที่เหมาะสม และมั่นใจในความเหมาะสมของตัวอย่างที่
641 ต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความเสถียรตลอดช่วงเวลาของการดำเนินการทดสอบ
642 ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมผลการเข้าร่วมผ่านเกณฑ์ที่กำหนด โดยมีค่า $|z| \leq 2$ หรือ ในกรณี
643 ที่เป็นการทดสอบเชิงปริมาณต้องมีความสอดคล้องกับค่า assign

644 - การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter Laboratory Comparison;
645 ILC) เป็นการประเมินความสามารถและการประเมินผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการสอง
646 ห้องปฏิบัติการหรือมากกว่า ในการวัดตัวอย่างเดียวกัน ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนดไว้แล้ว

647 ห้องปฏิบัติการต้องมีการจัดทำแผนการควบคุมคุณภาพภายนอก โดยเลือกเข้าร่วม
648 โปรแกรมทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน
649 ISO/IEC 17043 และเลือกตัวอย่างทดสอบที่มีระดับการปนเปื้อนและประเภทของเมทริกซ์
650 ที่เหมาะสม สำหรับวิธีทดสอบเชิงคุณภาพควรทดสอบทั้งตัวอย่างที่เป็น positive และ
651 negative สิ่งสำคัญไม่เพียงแต่ต้องดูที่ผลการประเมินในการเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความ
652 ชำนาญหรือการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการของแต่ละรายการทดสอบเท่านั้น
653 แต่ยังคงตรวจสอบแนวโน้มเพื่อประเมินและแก้ไขการเบี่ยงเบนที่อาจเกิดขึ้นด้วย

654

655

656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691

3.6.5 ผู้ให้บริการสอบเทียบ (calibration service provider)

เมื่อห้องปฏิบัติการใช้ผู้ให้บริการสอบเทียบหรือทดสอบภายนอก ต้องพิจารณาเลือกผู้ให้บริการที่สามารถให้ผลการวัดที่มีความสามารถในการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา และมีค่าความไม่แน่นอนการวัดที่ยอมรับได้ ซึ่งเกณฑ์การยอมรับต้องกำหนดให้สอดคล้องกับค่าขององค์ประกอบความไม่แน่นอนการวัด

3.6.6 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (preservation of reference culture)

การทดสอบทางจุลชีววิทยาจำเป็นต้องมีเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (reference culture) เพื่อยืนยันผลการทดสอบ รวมทั้งเป็นการสร้างความน่าเชื่อถือให้กับการทดสอบของห้องปฏิบัติการ จุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง หากมีการเก็บรักษาที่ไม่ถูกต้องอาจส่งผลให้ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไป หรือเกิดการตายของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงได้ ดังนั้น การเลือกวิธีการเก็บรักษาและสภาวะที่ใช้ในการเก็บรักษาที่เหมาะสม จะทำให้สามารถเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและสามารถควบคุมคุณสมบัติต่าง ๆ ของเชื้อจุลินทรีย์ได้นาน

โดยปกติในห้องปฏิบัติการ เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) จะถูกถ่าย/เปลี่ยนไปยังอาหารใหม่เป็นระยะเวลาที่แน่นอน เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์เติบโตและมีชีวิตอย่างต่อเนื่อง เรียกว่า การจัดเก็บเชื้อจุลินทรีย์ระยะสั้น (short-term storage) เช่น การเก็บรักษาเชื้อภายในน้ำมัน การเก็บในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ การแช่เย็น เป็นต้น การถ่ายเชื้อ (subculture) นี้จำเป็นต้องปราศจากเชื้อสะสมเพื่อป้องกันการปนเปื้อน แต่เนื่องจากการถ่ายเชื้อข้างต้นซ้ำ ๆ กันใช้เวลานาน การรักษาเชื้อบริสุทธิ์จำนวนมากจึงเป็นเรื่องยาก นอกจากนี้ยังมีความเสี่ยงของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและการปนเปื้อน ดังนั้น ปัจจุบันได้มีการแทนที่ด้วยวิธีที่ทันสมัย ทำให้ไม่ต้องทำการถ่ายเชื้อบ่อยครั้ง เรียกว่า การจัดเก็บเชื้อจุลินทรีย์ระยะยาว (long-term storage) เช่น การแช่แข็ง (freezing) การแช่แข็งบนผิวเม็ดแก้ว การการแห้งเย็น (lyophilization หรือ freeze-drying) เป็นต้น ขั้นตอนการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง แบ่งออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้

1. เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ที่มาตรฐานการทดสอบอ้างอิงกำหนด ซึ่งส่วนใหญ่กำหนดเป็นรหัสของสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) หรือสายพันธุ์ที่เป็นตัวแรกของชื่อสกุล (genus) และชนิด (species) นั้น ๆ ส่วนรหัสของสายพันธุ์บอกถึงแหล่งที่เก็บรักษาสายพันธุ์ต้นแบบนี้ ทั้งนี้สายพันธุ์ต้นแบบดังกล่าวสามารถมีรหัสที่แตกต่างกันตามศูนย์เก็บเชื้อจุลินทรีย์แต่เป็นเชื้อเดียวกัน สามารถสังเกตได้ว่าเชื้อไหนเป็นสายพันธุ์ต้นแบบได้จากสัญลักษณ์ (T) ต่อท้ายรหัสของสายพันธุ์นั้น ทำให้สามารถสอบกลับไปถึงสายพันธุ์ต้นแบบนั้น ๆ ได้ โดยสามารถขอรับบริการได้จากศูนย์เก็บเชื้อจุลินทรีย์ (culture collection center) ในประเทศไทยที่ได้ขึ้นทะเบียนกับ World Federation of Culture Collections (WFCC) ซึ่งอาจได้รับเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแบบหลอด lyophilization ที่สามารถเก็บในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส ถึง 10 องศาเซลเซียส) ได้เป็นเวลานานหรือรูปแบบเชื้อสด ซึ่งจะมีอายุการเก็บได้ไม่นาน

2. เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (reference stock/reference culture/stock culture) เป็นชุดของเชื้อที่แยกมาจาก reference strain ในห้องปฏิบัติการหรือผู้จัดจำหน่าย

692
693
694
695
696
697

3. เชื้อใช้งานประจำ (working culture) เป็นเชื้อที่เตรียมมาจาก reference culture หรือ stock culture หรือ reference material

เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่เตรียมจากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิง (ดูรูปภาพที่ 1) ควรเก็บรักษาไว้ ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อลดโอกาสในการปนเปื้อนหรือการกลายพันธุ์ หากเก็บที่อุณหภูมิสูงขึ้น เช่น อุณหภูมิตู้เย็น 2 องศาเซลเซียส ถึง 8 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส จะทำให้ระยะเวลาของการมีชีวิตลดลง



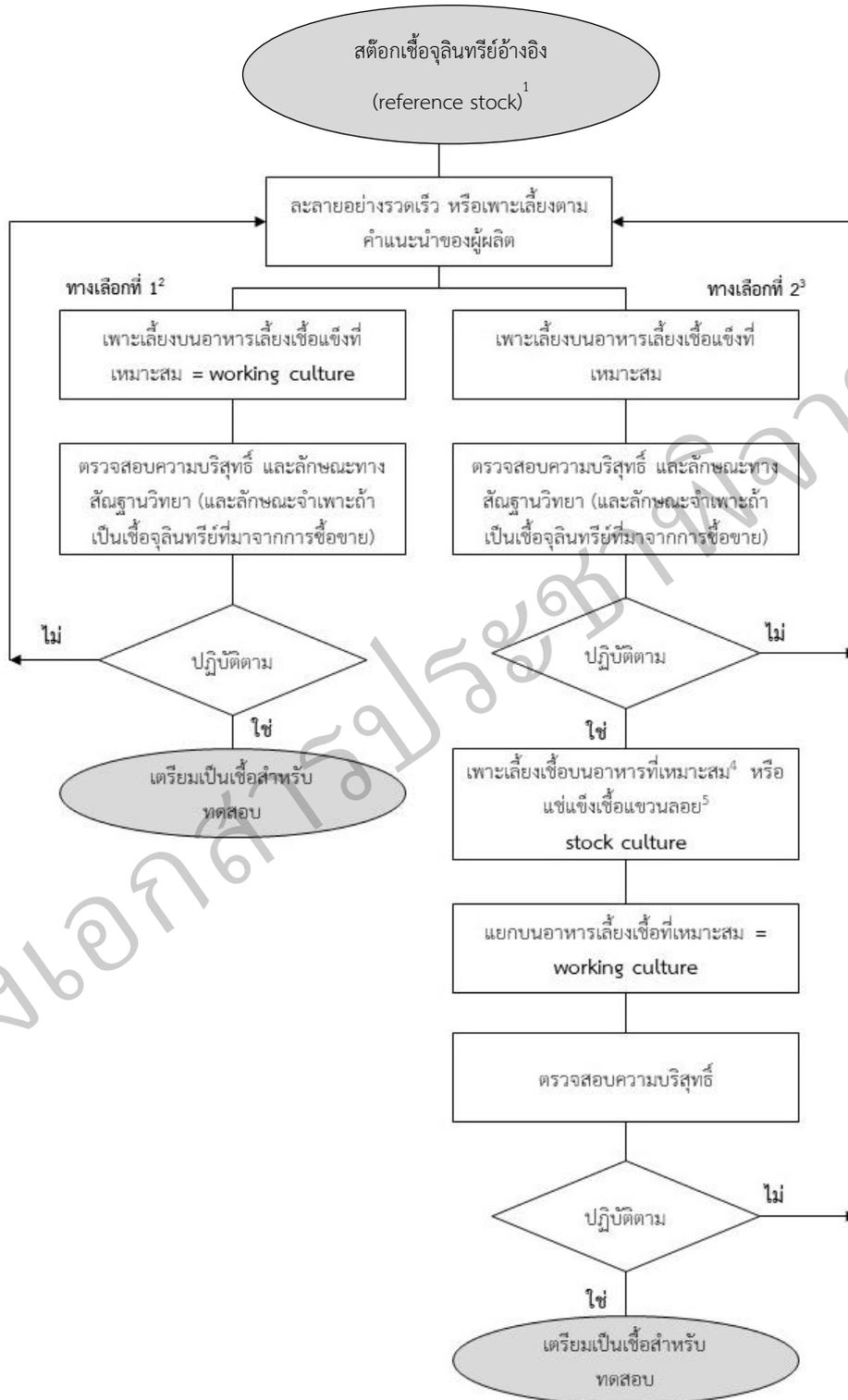
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734

รูปภาพที่ 1 การเตรียมสต็อกเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (reference stock) จากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิง (reference strain)

- ¹ โดยทั่วไปจะนำเชื้อจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงอีกครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth และให้เวลาในการฟื้นฟูเชื้อจุลินทรีย์
- ² ตรวจสอบลักษณะโคโลนี และย้อมสีแกรม หรือจำแนกโดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี (biochemical tests)
- ³ ตัวอย่างเช่น อาหารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง ได้แก่ TSB ที่เติมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ ถึง 15 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอลต่อปริมาตร
- ⁴ หลอดแช่แข็งอาจประกอบไปด้วยเม็ดปิด (bead)
- ⁵ แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานาน อายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะสั้นลง
- ⁶ อาจจะใช้เป็นเชื้อใช้งานประจำโดยตรง

735
736
737
738
739

เชื้อใช้งานประจำเตรียมจากสต็อกของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (รูปภาพที่ 2) เพื่อนำไปใช้ในการเตรียมหัวเชื้อสำหรับการทดสอบ



740
741
742

รูปภาพที่ 2 การเตรียมเชื้อใช้งานประจำ (working culture) จากเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (reference stock)

743 ¹ ตรวจสอบและจัดเก็บเอกสาร รวมถึงตรวจสอบการสอบกลับได้ไปยังเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิงและ
744 ลักษณะที่เกี่ยวข้อง หากได้รับเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิงจากภายนอก

745 ² วิธีการนี้เป็นที่นิยมมากกว่า

746 ³ วิธีการนี้อาจจำเป็นสำหรับจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ เช่น สำหรับการทดสอบเชิงปริมาณ ให้จัดทำ
747 เอกสารทุกขั้นตอน

748 ⁴ ยกตัวอย่างการเพาะเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อเอียง TSA (TSA slant) หรือ sheep blood TSA หรือ
749 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (18 องศา
750 เซลเซียส ถึง 25 องศาเซลเซียสหรือ 2 องศาเซลเซียส ถึง 8 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์)

751
752 ยกตัวอย่างอาหารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง ได้แก่ TSB ที่เติมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ ถึง 15
753 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอลต่อปริมาตร แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -70 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้
754 เป็นเวลานาน อายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจะสั้นลง

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

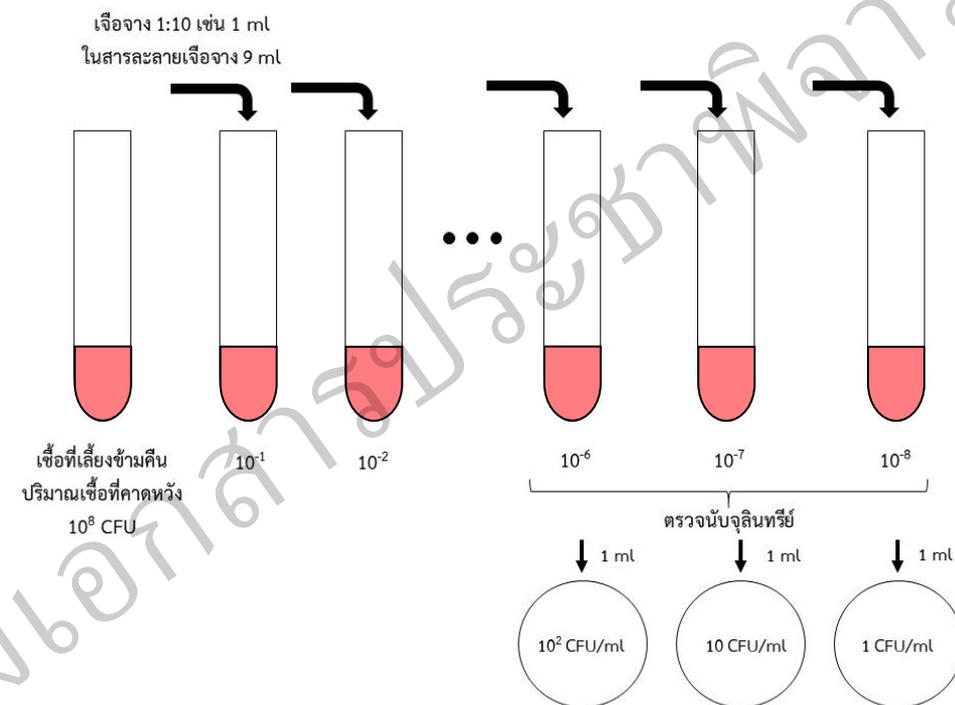
781

การเตรียมเชื้อที่เติม (inoculation culture)

การเตรียมเชื้อโดยการนับจำนวนจุลินทรีย์จากเซลล์แขวนลอย ที่จะนำไปใช้สำหรับการทวนสอบวิธีหรือใช้เป็นเชื้อทดสอบเพื่อหาจำนวนจุลินทรีย์ ดำเนินการโดยการประมาณความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่จะใช้ มีขั้นตอนดังนี้

- เพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้เงื่อนไขการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อนั้น ๆ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ ถ้าเชื้อไม่บริสุทธิ์ให้ทำการคัดแยกใหม่และทดสอบความบริสุทธิ์ของโคโลนีของเชื้อ และเริ่มเพาะเชื้อใหม่ตาม ISO 11133, 5.4

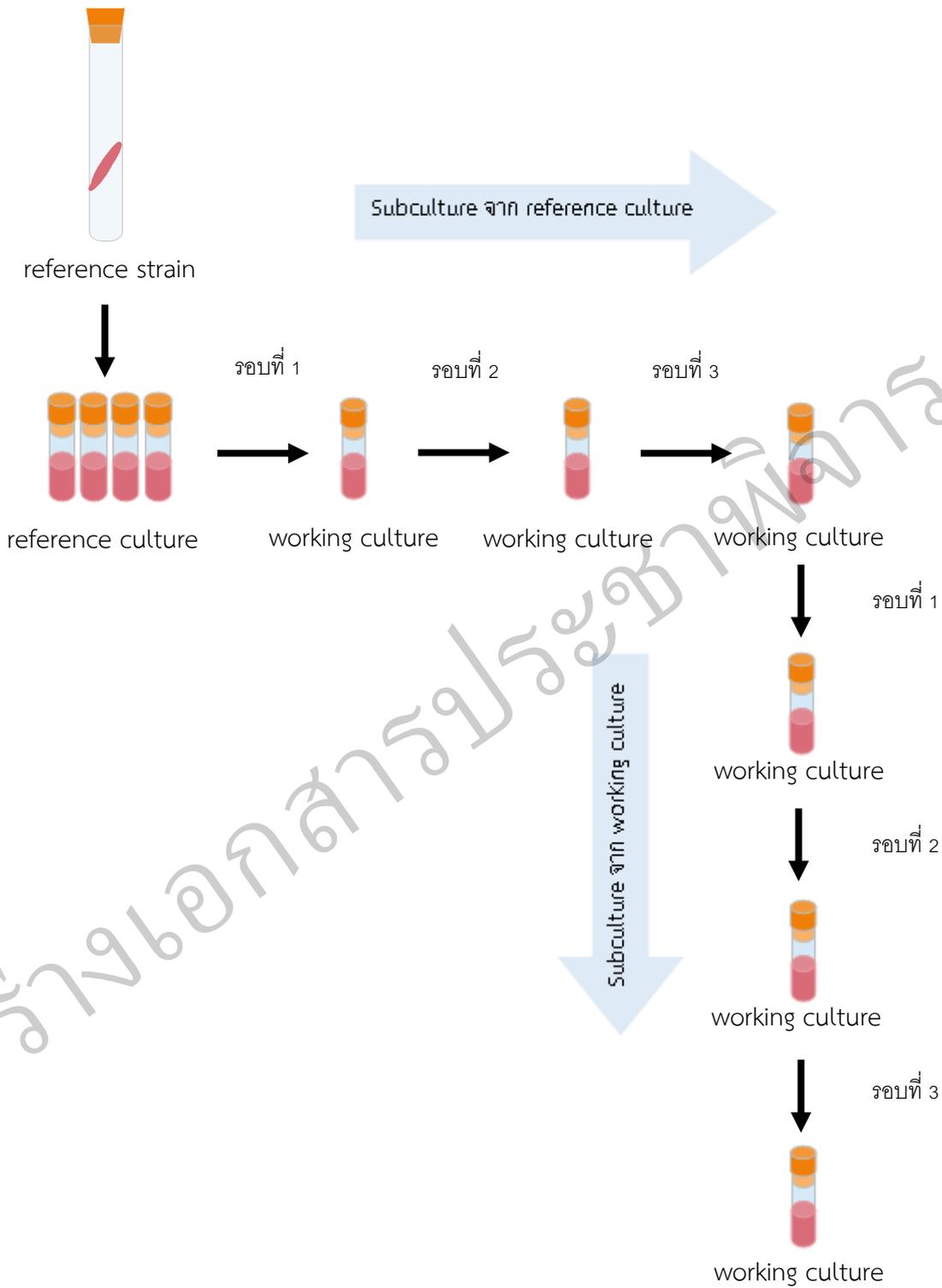
- นับจำนวนโคโลนีของเชื้อบน non-selective media เพื่อกำหนดความเข้มข้นในหน่วย CFU/mL ผลของการนับจำนวนโคโลนี จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเจือจางเพื่อเป็นเชื้อที่เติมสำหรับการทดสอบ การเตรียมเชื้อทดสอบ (ดูรูปภาพที่ 3)



รูปภาพที่ 3 การเตรียมเชื้อสำหรับเติม หรือเพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) แนะนำว่า การถ่ายเชื้อที่มาจากเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (reference culture) ทำได้มากที่สุด 3 รอบ และเชื้อใช้งานประจำ (working culture) ก็สามารถถ่ายเชื้อได้มากที่สุด 3 รอบเช่นเดียวกันตามตัวอย่าง (ดูรูปภาพที่ 4) แผนผังการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ ตามมาตรฐาน CLSI ซึ่งรวมกันเป็น 7 รอบ นับตั้งแต่เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) จนถึงเชื้อใช้งานประจำ (โดยเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิงนำมาทำเป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงนับเป็นรอบที่ 1)

818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854

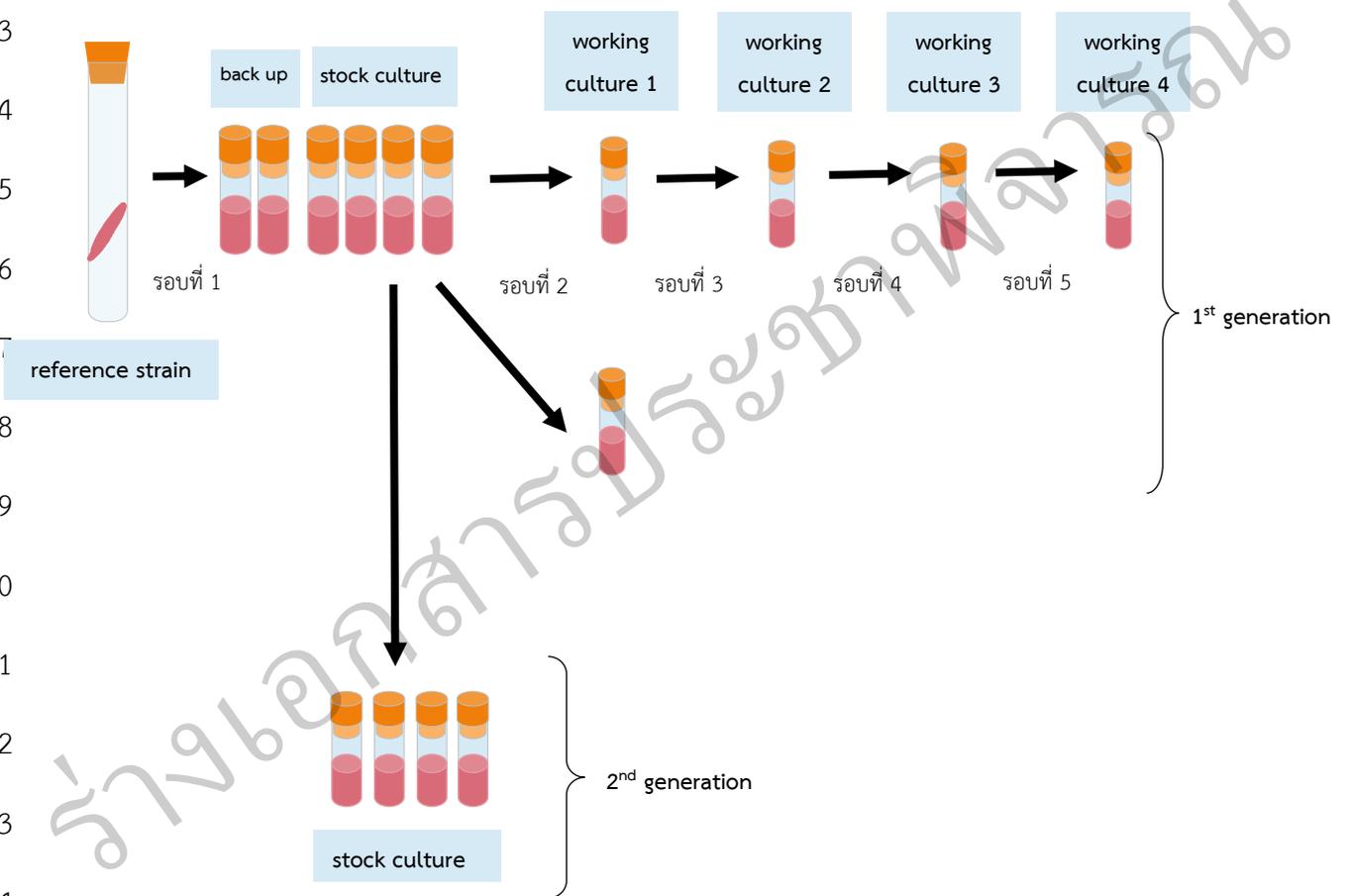


รูปภาพที่ 4 แผนผังการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน CLSI

855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880

ในส่วนของมาตรฐาน United States Pharmacopeia (USP) มีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้น
บททั่วไปเรื่อง microbiological best laboratory practices ระบุว่า จำนวนการถ่ายเชื้อต้อง
ควบคุมเพื่อป้องกันความเสี่ยงในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมหรือการกลายพันธุ์ จึงมีการ
ระบุไว้ชัดเจนว่าเชื้อใช้งานประจำ (working culture) ที่นำมาใช้ในการทดสอบไม่ควรเกิน 5 รอบ นับ
จากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) ตามตัวอย่าง (ดู

รูปภาพที่ 5)



รูปภาพที่ 5 แผนผังการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ ตามมาตรฐาน USP

881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916

3.6.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media)

การปฏิบัติงานด้านการทดสอบจุลชีววิทยา มีปัจจัยที่สำคัญของกระบวนการทดสอบ จุลินทรีย์ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยคุณภาพและความถูกต้องของผลการทดสอบจุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในงานนั้น ๆ การใช้และการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการทดสอบด้านจุลชีววิทยา เพื่อให้การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อถูกต้อง มีประสิทธิภาพ และให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำ นำเชื้อถือ ตามมาตรฐานสากลสามารถแบ่งประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการเตรียมได้ดังนี้

1. ready-to-use medium
 - 1.1 พร้อมใช้เลี้ยงเชื้อ (finished culture medium) เช่น XLD plate, Half Fraser
 - 1.2 ต้องหลอมใหม่จึงจะพร้อมใช้ (ready-to-use medium after remelting) เช่น TPC
 - 1.3 ต้องหลอมใหม่/เติม supplement จึงจะพร้อมใช้ (ready-to-use medium after remelting and supplement) เช่น Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) , Baird-Parker (BP) + Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก commercially dehydrated formulations
 - 2.1 ไม่ต้องเติม supplement (completed medium)
 - 2.2 ต้องเติม supplement (in-completed medium)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องเติมจากสารประกอบเดี่ยว ๆ (prepared from individual components)
4. อาหารเลี้ยงเชื้ออ้างอิง (reference medium) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ประเมินความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น โดยปกติจะเป็น non selective medium เช่น Trypticase Soy Agar (TSA)

อาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีการตรวจสอบก่อนนำไปใช้ในการทดสอบ โดยห้องปฏิบัติการจะต้องมีวิธีการในการดำเนินงานเกี่ยวกับการจัดซื้อ การยอมรับ และการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในแต่ละชนิดโดยรายละเอียดสามารถศึกษาเพิ่มเติมได้จาก ISO 11133: Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media

3.7 การควบคุมเงื่อนไขคงที่

การควบคุมเงื่อนไขคงที่ในทางมาตรวิทยาหมายถึงการควบคุมบางตัวแปรของสภาวะแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อารวัดอย่างมีนัยสำคัญให้คงที่ภายใต้ข้อจำกัดเฉพาะ โดยการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับวิธีที่เลือกใช้ เช่น แบคทีเรียควรนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ถึง 35 องศาเซลเซียส \pm 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา (48 ± 2) ชั่วโมง ก่อนการนำมาตรวจนับปริมาณ เป็นต้น

917

918 **4 วัสดุอ้างอิง/วัสดุอ้างอิงรับรองที่ได้รับการยอมรับในการทดสอบด้านจุลินทรีย์ สำหรับ**
919 **ห้องปฏิบัติการทดสอบในประเทศไทย**

920
921 วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ตามข้อกำหนดต้องเป็นวัสดุที่สามารถสอบ
922 กลับได้ และต้องมีค่ากำหนด/ค่ารับรอง รวมทั้งการแสดงค่าความไม่แน่นอนของวัสดุอ้างอิงนั้น ค่ากำหนด/ค่า
923 รับรองนั้น ในกรณีที่เป็นการวัดเชิงคุณภาพอาจแสดงเป็นคุณสมบัติหรือคุณลักษณะ (identity หรือ
924 characteristics) และในกรณีที่เป็นการวัดเชิงปริมาณอาจแสดงในหน่วยของโคโลนี (Colony forming unit;
925 CFU) ทั้งนี้ วัสดุอ้างอิงรับรองต้องเป็นวัตถุที่มีลักษณะที่เป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) มีความคงสภาพ
926 (stable) และสามารถทนทานต่อการทดสอบเพื่อที่ใช้ในการทวนสอบในตัวอย่าง

927

928 **4.1 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงในลักษณะเชื้อบริสุทธิ์**

929 การทดสอบด้านจุลชีววิทยา เช่น การทวนสอบความถูกต้องของการทดสอบ การควบคุมคุณภาพ
930 ภายใน การตรวจสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จะมีการระบุชื่อและชนิดของสายพันธุ์
931 จุลินทรีย์อ้างอิงในลักษณะสายพันธุ์บริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในขั้นตอนต่าง ๆ โดยระบุเป็นชื่อ
932 วิทยาศาสตร์สกุล (genus) และชนิด (species) ของสายพันธุ์ที่ใช้อ้างอิง และอาจระบุถึงรหัสของสาย
933 พันธุ์จุลินทรีย์เป็นชื่อสถานที่เก็บ (culture collection) ตามด้วยเลขรหัสต่อท้าย เพื่อให้ทราบถึงที่มา
934 ของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้อ้างอิง เช่น ATCC (American Type Culture Collection), WDCM
935 (World Data Center for Microorganisms), NCTC (National collection of Type
936 Cultures) TISTR (Thailand Institute of Scientific and Technological Research) เป็นต้น
937 สำหรับหน่วยงานในประเทศไทยที่มีการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์มาตรฐานอ้างอิงมีหลายแห่ง ได้แก่

- 938 1. ศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
939 กระทรวงสาธารณสุข (DMST culture collection) เป็นแหล่งเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์
940 เพื่อใช้ในการวิจัยและการควบคุมคุณภาพ ทางด้านการแพทย์และสาธารณสุข
- 941 2. ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR culture
942 collection) เป็นศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์ จุลินทรีย์นอกถิ่นกำเนิด ที่มีประโยชน์
943 ในการเกษตร อุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม
- 944 3. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BCC และ TBRC) เป็นการเก็บรักษา
945 จุลินทรีย์ จำพวกราและยีสต์
- 946 4. กรมวิชาการเกษตร (DOA) เป็นแหล่งการเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการเกษตร

947

948 **4.2 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงในตัวกลาง**

949 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่เป็นวัสดุอ้างอิงและวัสดุอ้างอิงรับรอง มีบริษัทที่จัดจำหน่าย ตัวอย่างตาม
950 ภาคผนวก

951

952

953

954

955

956 5 บทสรุปการสถาปนาความสามารถสอกลับได้ทางมาตรวิทยา

957

958 ห้องปฏิบัติการทดสอบทางจุลชีววิทยาใช้เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (reference culture) เพื่อตรวจสอบ
959 ความถูกต้อง ควบคุมการตรวจหาเชื้อ และรับรองความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ โดยเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง
960 สามารถมาได้จากหลายแหล่งที่มา นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการอ้างอิงไปยังเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่
961 สากลยอมรับ และรู้จักเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่เหมาะสม

962 การสอกลับได้ทางมาตรวิทยาของผลการวัดด้านจุลชีววิทยา หมายถึง ความสามารถในการอ้างอิงผล
963 การทดสอบไปยังตัวอ้างอิงที่เป็นที่ยอมรับสากล ผ่านกระบวนการเทียบมาตรฐานกับเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง ซึ่ง
964 จะต้องอาศัยการติดตามและจัดทำเอกสารในทุก ๆ ขั้นตอนตั้งแต่จุดกำเนิด สร้างบันทึกที่ชัดเจนเกี่ยวกับประวัติ
965 ใช้เป็นข้อมูลสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตและสนับสนุนด้านการควบคุมคุณภาพ
966 การสอกลับได้ของผลการวัดทางด้านเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงจึงเป็นสิ่งสำคัญ ทำให้ผลการทดสอบจากต่าง
967 ห้องปฏิบัติการ สามารถเปรียบเทียบกันได้หากมีการอ้างอิงไปยังตัวอ้างอิงเดียวกัน

969 ความสามารถสอกลับได้ทางมาตรวิทยาทางด้านจุลชีววิทยา จะต้องอาศัยองค์ประกอบดังต่อไปนี้

970 - มีการเลือกใช้วัสดุอ้างอิงที่ผลิตโดยผู้ผลิตวัสดุอ้างอิงที่ปฏิบัติตาม/สอดคล้องตามข้อกำหนดใน
971 มาตรฐาน ISO 17034

973 - การวัดมวลและการวัดอุณหภูมิ โดยใช้เครื่องมือที่ผ่านการสอบเทียบหรือทวนสอบ สามารถสอบ
974 กลับได้ไปยังหน่วยเอสไอ (SI units) โดยผู้ใช้บริการจากห้องปฏิบัติการสอบเทียบที่มีระบบ
975 คุณภาพสอดคล้องตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO/IEC 17025 และมีการระบุความสามารถสอบ
976 กลับได้ในใบรับรองผลการสอบเทียบ

978 - เครื่องมือในห้องปฏิบัติการจะต้องได้รับการสอบเทียบโดยใช้วัสดุอ้างอิงรับรองที่มีความสามารถ
979 สอกลับได้ไปยังระดับชาติหรือระดับนานาชาติ หรือ เทียบเท่า และมีการนำค่าความไม่แน่นอน
980 ที่เกี่ยวข้องไปคำนวณเป็นองค์ประกอบค่าความไม่แน่นอนรวมในการรายงานผลการทดสอบ

982 - อาหารเลี้ยงเชื้อ (media) ผ่านการทวนสอบตามมาตรฐาน ISO 11133

984 ในหัวข้อนี้ จะเน้นการสอกลับได้ของผลการวัดด้านจุลชีววิทยาไปยังตัวอ้างอิง ซึ่งคือค่าที่ระบุ
985 ในวัสดุอ้างอิงรับรองที่ห้องปฏิบัติการนำมาใช้การทดสอบ โดยศูนย์เก็บเชื้อจุลินทรีย์ (Culture
986 collection center) ที่เป็นที่ยอมรับ World Federation for Culture Collections (WFCC) มี
987 หน่วยงานของไทย (ดูตารางที่ 1) ตัวอย่างหน่วยงานของไทยที่เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ขึ้นทะเบียน
988 กับของ WFCC

990 ตารางที่ 1 ตัวอย่างหน่วยงานของไทยที่เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ขึ้นทะเบียนกับ WFCC

Acronym	Collection or Institute	Country and Region	WDCM CCINFO No.
TISTR	Thailand Institute of Scientific and Technological Research	Thailand	383
DMST	Department of Medical Sciences Culture Collection	Thailand	707
BCC	BIOTEC Culture Collection	Thailand	783

991 6 ภาคผนวก: ตัวอย่างใบรับรองของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

- 992 ตัวอย่างใบรับรองของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง ที่จัดจำหน่ายโดยบริษัทเอกชน ตัวอย่างเช่น
- 993 - บริษัท Millipore ชื่อผลิตภัณฑ์ The VITROIDS™ (ดูรูปภาพที่ 6) และผลิตภัณฑ์ LENTICULE®
- 994 discs (ดูรูปภาพที่ 7)
- 995 - บริษัท LGC ชื่อผลิตภัณฑ์ easi-tab™ (ดูรูปภาพที่ 8) เป็นต้น
- 996



Certificate of Analysis – Vitroids™ (microbiological CRM)

Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus WDCM 00159 VT001596

Product no.: VT001596
Lot no.: BCCG6159
Description of CRM: Vitroids™ are disc-shaped, microbiological reference materials. Each disc contains a quantified number of microorganisms (colony forming units; cfu), immobilized in a solid water soluble matrix.
Expiry date: NOV 2023
Storage: -20 ± 5 °C; store the mylar bag containing the plastic vials with the Vitroids™ unopened
Starting material: CECT 235 batch 22-11-2016 (freeze-dried microorganism in a glass ampoule)
No. of passages: 2 (upon receipt from cell culture collection CECT)

Sample: <i>Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus</i> WDCM 00159 VT001596		
Certified value (geometric mean value)	Expanded uncertainty (log ₁₀ value)	Expected range
6.3E+03 cfu per disc	0.034	3.1E+03 - 1.3E+04 cfu per disc
Conditions:	Trypcase Soy agar / aerobic / 37 °C / 48 hrs	
Date of testing:	22 NOV 2021	
cfu: colony forming units The reference values are calculated by (US EPA Environmental Systems Monitoring Laboratory in Cincinnati) EMSL-CIN's computer program "BIWEIGHT". The measurement of uncertainty originates from the generated biweight standard deviation (SD) resulting from the biweight geometric mean value obtained during homogeneity testing. The expected range takes into account media batch to batch variability, which is done by multiplying the biweight standard deviation by 1.6.		

Metrological traceability: Details see "Certification process details" on page 2.
Measurement method: The certified value is established by plate counting.
Intended, correct use & handling instructions: Please follow the instructions given in "General instructions for intended uses of this reference material" on page 3.
Health and safety information: Please refer to the Safety Data Sheet (link on page 3) for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.
Accreditation: Sigma-Aldrich Production GmbH is accredited by the Swiss accreditation authority SAS as registered reference material producer SRMS 0001 in accordance with ISO 17034 [2] and registered testing laboratory STS 0490 according to ISO/IEC 17025 [1].

Certificate issue date: 22 DEC 2021


 ISO 17034
SRMS 0001


 ISO/IEC 17025
STS 0490


 ISO 9001
005356 QM08


 Dr. Thomas Bühner – CRM Operations


 Dr. Philipp Zell – Approving Officer

Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, 9471 Buchs, Switzerland; Tel +41-81-755-2511
 www.sigmaaldrich.com
 Sigma-Aldrich Production GmbH is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 1 of 3 Certificate version 01



Packaging: Vitroids™ are filled into plastic vials containing a self-indicating silica gel desiccant. Ten vials are enclosed in a sealed mylar bag.

Starting material details: Organisms supplied by Spanish Type Culture Collection (CECT)
Tel: +34 96 354 46 12, Email: pedidos@cect.org,
Website: <https://www.uv.es/cect>

Expanded uncertainty:

The expanded uncertainty U_{CRM} is calculated as $U_{CRM} = k \cdot u_{CRM}$, where $k = 2$ is the coverage factor for a 95% coverage probability and u_{CRM} is the combined standard uncertainty in accordance with ISO 17034 [2]. In addition to the certified values on page 1, the following values are calculated, taking into account media batch to batch variability, which is done by multiplying the biweight standard deviation by 1.6.:

Geometric mean-3SD	Geometric mean+3SD
2.7E+03 cfu per disc	1.5E+04 cfu per disc

Certification process details:

The counts were undertaken by surface inoculation and incubation as described above. This is in accordance with the technique described in Sigma-Aldrich's Standard Operating Procedures, which are based on ISO 4833 Part 2 [4]. The certified value is determined under double accreditation in accordance with ISO/IEC 17025 [1] and ISO 17034 [2].

Metrological traceability chain - biological (qualitative):

This strain is traceable back to the CECT seed stock (refer to page 1 for starting material details), ensuring that the characteristics are retained. This strain has been verified by process controls based on classical microbiological or biochemical tests and MALDI-TOF-MS analysis.

Metrological traceability to a measurement unit (quantitative):

The viable organism level per Vitroids™ is measured by Sigma-Aldrich as colony forming units (cfu). This is carried out using plate culturing techniques based on ISO 4833 Part 2 [4].

Where the reference material contains a high level of organisms ($>5 \times 10^3$), a serial diluter and plater (interscience easySpiral Dilute®) may be used to enumerate the seed stock and the reference material produced as Vitroids™. The cfu are counted per plate and the cfu per disc is calculated.

The plates and plate counts are photographically documented using a plate counter (interscience Scan® 1200). The viable organism level per Vitroids™ is reconfirmed as colony forming units (cfu) after packaging.

CECT ampoules used for the starting material are not quantified.

Homogeneity assessment: The QC batch size (14 Vitroids™) was used to confirm batch homogeneity according to ISO Guide 35 [3]. This reference material was prepared in accordance with Sigma-Aldrich's Standard Operating Procedures (which have been shown to produce a homogeneous product).

Homogeneity calculations include (but are not limited to):

- The geometric mean: the reverse log of the biweight mean of the log values of the 2 x 7 samples from the first and last discs produced
- Expanded uncertainty using 95 % Confidence Intervals (CI): batch is accepted if the value is < 0.05
- Within batch variation is calculated using the biweight 2SD of the log values: batch is accepted if the value is ≤ 0.2
- Anova (one way): is used to test that there is no difference of the means and variance of the 2 x 7 samples from the first and last discs produced. A batch is accepted if the P value returned is > 0.05 or if the overall mean log variation of the counts between the groups is ≤ 0.1

Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, 9471 Buchs, Switzerland; Tel +41-81-755-2511
www.sigmaaldrich.com
Sigma-Aldrich Production GmbH is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 2 of 3

Certificate version 01



998

999

รูปภาพที่ 6 ตัวอย่างใบรับรองวัสดุอ้างอิง

1000

(ที่มา: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/products/analytical-chemistry/reference-materials/microbiology-standards>)

1001

Certified reference material – LENTICULE® discs Reference material certificate

Bacillus cereus CRM07464M

Product no.: CRM07464M
Lot no.: BCCJ3271
Description of CRM: Bacteria in a pure culture preserved in a tablet format (LENTICULE® discs)
Expiry date: MAR 2024
Storage: -20 ± 5 °C; store the mylar bag containing the plastic vials with the LENTICULE® discs unopened
Starting material: NCTC 7464 batch SQNL (freeze-dried microorganism in a glass ampoule)

Sample: <i>Bacillus cereus</i> CRM07464M		
Certified value (geometric mean value)	Expanded uncertainty (log ₁₀ value)	Expected range
1.2E+04 cfu per disc	0.014	6.4E+03 - 2.3E+04 cfu per disc
Conditions:	Columbia agar + 5 % horse blood / aerobic / 30 °C / 24 hrs	
Date of testing:	19 SEP 2022	
<small>cfu: colony forming units The measurement of uncertainty (MoU) originates from the standard deviation (SD) resulting from the geometric mean value obtained during homogeneity testing. The expected range takes into account media batch to batch variability, which is done by multiplying within batch standard deviation by 1.6.</small>		

Metrological traceability: Details see "Certification process details" on page 2.
Measurement method: The certified value is established by plate counting in accordance with ISO/IEC 17025^[1].
Intended, correct use & handling instructions: Please follow the instructions given in "General instructions for intended uses of this reference material" on page 3.
Health and safety information: Please refer to the Safety Data Sheet (link on page 3) for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.
Accreditation: Sigma-Aldrich Production GmbH is accredited by the Swiss Accreditation Service SAS as reference material producer under no. SRMS 0001 in accordance with international standard ISO 17034^[2].
Certificate issue date: 12 OCT 2022



ISO 17034
SRMS 0001

Dr. Thomas Bühner – CRM Operations

Dr. Philipp Zell – Approving Officer



Packaging: LENTICULE® discs are filled into plastic vials containing a self-indicating silica gel desiccant. Ten vials are enclosed in a sealed mylar bag.

Starting material details: Organisms supplied by Culture Collections, Public Health England, Tel: +44 (0)1980 612512, Email: culturecollections@phe.gov.uk, Website: www.phe-culturecollections.org.uk

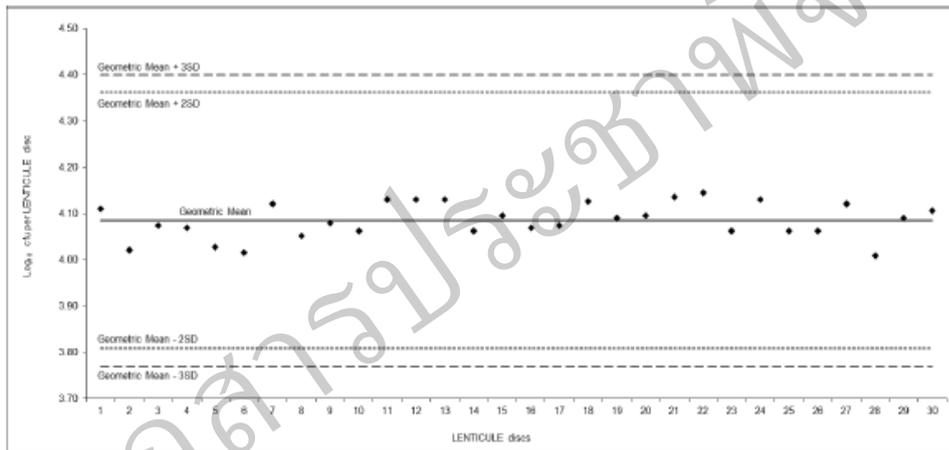
Expanded uncertainty:

The expanded uncertainty U_{CRM} is calculated as $U_{CRM} = k \cdot u_{CRM}$, where $k = 2$ is the coverage factor for a 95% coverage probability and u_{CRM} is the combined standard uncertainty in accordance with ISO 17034 [2]. In addition to the certified values on page 1, the following values are calculated, taking into account media batch to batch variability, which is done by multiplying within batch standard deviation by 1.6.:

Geometric mean - 3SD	Geometric mean + 3SD
5.9E+03 cfu per disc	2.5E+04 cfu per disc

Certification process details:

The counts were undertaken by surface inoculation and incubation as described above. This is in accordance with the technique described in Sigma-Aldrich's Standard Operating Procedures, which are based on ISO 4833 Part 2 [3]. The whole workflow follows the ISO 17034 guidelines. The certificate is designed in accordance with ISO Guide 31[4].



Metrological traceability chain - biological (qualitative):

This strain is traceable back to the NCTC seed stock (refer to page 1 for Starting Material details), and is manufactured from one sub-culture, ensuring that the characteristics are retained. This strain has been verified by process controls based on classical microbiological or biochemical tests and MALDI-TOF-MS analysis.

Metrological traceability to a measurement unit (quantitative):

The viable organism level per LENTICULE® disc is measured by Sigma-Aldrich as colony forming units (cfu). This is carried out using plate culturing techniques based on ISO 4833 Part 2 [3].

Where the reference material contains a high level of organisms ($>5 \times 10^3$), a serial diluter and plater (interscience easySpiral Dilute®) may be used to enumerate the seed stock and the reference material produced as LENTICULE® discs. The cfu are counted per plate and the cfu per disc is calculated.

Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, 9471 Buchs, Switzerland; Tel +41-81-755-2511
www.sigmaaldrich.com
 Sigma-Aldrich Production GmbH is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 2 of 5

Certificate version 01



1004

1005

รูปภาพที่ 7 ตัวอย่างใบรับรองวัสดุอ้างอิงรับรอง

1006

(ที่มา: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/products/analytical-chemistry/referencematerials/microbiology-standards>)

1007

GENERAL INFORMATION

Product Information

*easi-tabs*TM are lyophilised microorganisms provided in an easy-to-use format of either a small tablet in a 2ml plastic tube or lyophilised material sealed under vacuum in a 2ml glass vial. All *easi-tabs*TM are supplied with a statement of measurement giving the origin, level and range (95% confidence) of the organism in each unit. *easi-tabs*TM can be used for a wide range of microbiology laboratory applications such as:

- Microbiological internal quality control (IQC) testing
- Training and competence testing of analysts
- Research projects
- Method comparison
- Method validation and method verification

Storage and expiry

*easi-tabs*TM should ideally be stored at -20°C or lower and used before the stated expiry date. However, some products may still be suitable for use after the expiry date if the levels of microorganism are still within the minimum and maximum limits given on the Statement of Measurement, or if the organism is used for qualitative testing only.

Reconstitution and use

*easi-tabs*TM are extremely versatile and the levels can easily be adapted to suit your own requirements by adjusting the volume of diluent used during initial preparation. Both vials and tablet formats can be resuscitated using Method A, or Method B (see pages 3 and 4).

Further uses

Once resuscitated, the material can be tested directly or can be used to 'spike' other products e.g. food, pharmaceutical, to provide a realistic test sample. However, consideration must be given to the potential inhibitory effects of any other matrix used. LGC do provide a selection of sterile 'food' matrices to complement *easi-tabs*TM.

The final sample can be enumerated using any suitable routine method e.g. direct count, serial dilution, pour or spread plates, rapid tests, PCR, membrane filtration, MPN, etc.

If mixed thoroughly the resuscitated material can be sub-divided for multiple uses if

1009

1010

1011

1012

1013

required. For example, one tablet added to 100ml of diluent can be used to provide 100 x 1ml aliquots.

Stability during period of use

The material is intended to be used immediately or soon after resuscitation. Once resuscitated the level of organism present should remain stable for at least 4 hours but may then enter the normal microbial growth cycle and the levels stated may increase. If you need to use the resuscitated *easi-tabs*TM material over more than 4 hours, then please store in a fridge to reduce this growth. If you wish to keep the resuscitated material for longer than 24 hours, then we would suggest freezing to preserve the levels. Please note that LGC do not guarantee the levels if the product is not used within 4 hours, and it may be useful to validate in-house if using for extended periods.

Stability during transport

Each microorganism used in *easi-tab*TM products will have been validated for stability under a range of different temperatures and times. The products are packaged and transported in such a way as to minimise the effects of environmental conditions on the viability of the microorganisms. If on receipt and testing of the *easi-tab*TM product, you find that the levels have fallen below the limits given in the Statement of Measurement, please report immediately to your local office or ptcustomerservices@lgcgroup.com

Safety information

All reference materials must be regarded as containing potentially pathogenic microorganisms and must be handled by, or under the supervision of, competent persons who have received training in microbiological techniques. The responsibility for ensuring the safe handling of reference materials after receipt rests with the recipient. LGC Ltd. cannot accept responsibility for any event resulting from the mishandling of reference material. For Safety Data information, please refer to the Material Safety Data Sheet.

If you need any help at all, please do not hesitate to contact our support team using the details below or your local LGC representative.

Tel: +44(0)161 762 2500 **Email:** axiopt@lgcgroup.com

1014

1015

รูปภาพที่ 8 ตัวอย่างใบรับรองวัสดุอ้างอิง

1016

(ที่มา: <https://www.lgcstandards.com/GB/en/Environmental/Microbiology/easi-tab-/cat/31511>)

1017

1018

1019

1020

1021

1022 7 เอกสารอ้างอิง

- 1023 7.1 BIPM. International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and
1024 associated terms (VIM), JCGM.
1025
- 1026 7.2 ISO/IEC 17025 General Requirements for the Competence of Testing and
1027 Calibration Laboratories.
1028
- 1029 7.3 National Association of Testing Authorities (NATA), General Equipment- Calibration
1030 and checks. Australia.
1031
- 1032 7.4 ISO 7218: Microbiology of food and animal feeding stuff – General requirements
1033 and guidance for microbiological examinations.
1034
- 1035 7.5 คู่มือมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์
1036 สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2560.
1037
- 1038 7.6 ข้อเสนอวิธีการใช้งาน การดูแลรักษา และการสอบเทียบ pH Meter with electrode
1039 assemblies ก่อนการใช้งาน, 18 มีนาคม 2564.
1040
- 1041 7.7 United Kingdom Accreditation Service (UKAS), UKAS LAB 14, Guidance on the
1042 calibration of weighing machines used in testing and calibration laboratories.
1043
- 1044 7.8 ISO 11133: Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production,
1045 storage, and performance testing of culture media.
1046
- 1047 7.9 ISO 16140 series – standards for validation and verification of microbiology
1048 methods.
- 1049 7.10 Analytical Manual (BAM) Online, Chapter 12 - *Staphylococcus aureus*.
1050
- 1051 7.11 ISO 11290-1: Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection
1052 and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. –
1053 Part 1: Detection method.
1054
- 1055 7.12 ATCC. REFERENCE STRAINS: HOW MANY PASSAGES ARE TOOMANY? - ATCC
1056 Connection 23 (2): 6-7, 2003.
1057
- 1058 7.13 Standard Method for the Examination of Water and Waste water: Microbiological
1059 Examination 9020. Intralaboratory quality control guidelines. 2023. 24th edition.
1060 Prepared by American Public Health Association, American Water Works
1061 Association, and Water Environment Federation. Edit by E.W. Rice, R.B. Baird and
1062 A.D. Eaton. American Public Health Association, Washington DC.