

การพัฒนาการเป็นผู้ดำเนินการแผนทดสอบ ความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา

ลดาวัลย์ จิ่งสมานกุล กมลวรรณ กันแต่ง และอัจฉรา อยู่คง

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาเป็นการประเมินความสามารถในการตรวจวิเคราะห์และพัฒนาระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ให้บริการทดสอบความชำนาญจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพง ปัจจุบันประเทศไทยมีผู้ดำเนินการเพียง 1-2 ราย และไม่ครอบคลุมรายการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาที่จำเป็น ดังนั้นเพื่อเป็นทางเลือกหรือทดแทนการให้บริการจากต่างประเทศและเพิ่มศักยภาพของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการพัฒนาห้องปฏิบัติการ ในปี พ.ศ. 2554 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร (สคอ.) จึงได้เริ่มโครงการการให้บริการทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยา โดยในขั้นแรกได้จัดทำโครงการนำร่องเพื่อศึกษาทดลองเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญและส่งตัวอย่างทดสอบรายการ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* ให้แก่หน่วยงานตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 16 แห่ง และให้ทุกหน่วยงานรายงานผลการตรวจภายในเวลาที่กำหนด ซึ่งจากผลที่ได้รับเป็นการยืนยันว่าตัวอย่างที่เตรียมสามารถใช้ทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาได้ จึงขยายการให้บริการแก่ห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนอย่างต่อเนื่องคือปีงบประมาณ 2555 ให้บริการ 2 รายการทดสอบได้แก่ *Salmonella* spp. และ *S.aureus* แต่ละรายการทดสอบให้บริการรายการละ 2 รอบ รวม 4 รอบ มีสมาชิกรวม 109 ราย ปีงบประมาณ 2556 เพิ่มขอบข่ายการให้บริการอีก 2 รายการทดสอบ ได้แก่ *Listeria monocytogenes* และจำนวนจุลินทรีย์รายการละ 1 รอบ รวม 4 รอบ มีสมาชิกรวม 177 ราย และปีงบประมาณ 2557 ขยายขอบข่ายการให้บริการเป็น 7 รายการทดสอบ โดยเพิ่มรายการทดสอบจำนวนจุลินทรีย์, จำนวน *Bacillus cereus*, จำนวน coliforms และจำนวน *Escherichia coli* รวม 7 รอบ มีสมาชิกรวม 356 ราย เจลีสมีห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบฯ ต่อรอบเพิ่มขึ้นตามลำดับคือ ปีงบประมาณ 2555-2557 เท่ากับ 27, 44 และ 51 รายตามลำดับ ซึ่งห้องปฏิบัติการสมาชิกสามารถนำผลที่ได้ไปประเมินความสามารถในการตรวจวิเคราะห์และปรับปรุงระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ รายการทดสอบทั้ง 7 รายการนี้ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 เมื่อต้นปี พ.ศ. 2558 การเป็นผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาของ สคอ. เป็นการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพห้องปฏิบัติการของประเทศไทยและลดค่าใช้จ่ายของห้องปฏิบัติการต่างๆ ในการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานต่างประเทศ

บทนำ

การทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) หมายถึงการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ เป็นการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่เข้าร่วมในแผนการทดสอบความชำนาญ (Inter-laboratory comparison)⁽¹⁾ โดยผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญ (PT provider, PTP) จัดส่งตัวอย่างที่แบ่งมาจากตัวอย่างเดียวกันไปยังห้องปฏิบัติการสมาชิกในช่วงเวลาเดียวกัน เพื่อให้สมาชิกตรวจวิเคราะห์และส่งผลภายในระยะเวลาที่กำหนด การเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญสามารถนำมาใช้ชี้แจงคุณภาพผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและชี้แจงปัญหาของการปฏิบัติงานที่เป็นต้นเหตุทำให้ผลไม่สอดคล้องกับค่ากำหนด (assigned value) รวมทั้งส่วนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น การรายงานผลที่ชัดเจน การใช้หน่วยที่ถูกต้อง และการส่งผลในระยะเวลาที่กำหนด เป็นต้น

การทดสอบความชำนาญ จัดเป็นเครื่องมือสำคัญอย่างหนึ่งในการประกันคุณภาพผลการทดสอบตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2005 ข้อ 5.9.1 (b)⁽²⁾ โดยเป็นการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการโดยองค์กรภายนอก (external quality assessment) และองค์กรรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการกำหนดเป็นหลักเกณฑ์หรือเงื่อนไขให้ห้องปฏิบัติการที่ประสงค์จะขอการรับรองต้องมีผลการทดสอบนี้⁽¹⁾ แต่เนื่องจากในปัจจุบันประเทศไทยมี PTP ทางจุลชีววิทยาไม่มาก ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารส่วนใหญ่ต้องเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานในต่างประเทศซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงมาก สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร (สคอ.) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ได้รับการยอมรับในความสามารถด้านการตรวจวิเคราะห์อาหาร และมีอำนาจหน้าที่ในการให้การสนับสนุนและพัฒนาระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการด้านสาธารณสุขทั้งหน่วยงานภาครัฐและเอกชน⁽³⁾ ได้รับการร้องขอจากห้องปฏิบัติการต่างๆ ให้เตรียมตัวอย่างสำหรับเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการและนำผลที่ได้ไปประกอบการยื่นขอรับการรับรอง ดังนั้น เพื่อให้ห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถนำผลเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการไปปรับปรุงคุณภาพการตรวจวิเคราะห์และยื่นขอการรับรอง จึงได้พัฒนาการให้บริการด้านการทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาอย่างเป็นระบบ โดยในขั้นแรกได้จัดทำโครงการนำร่องเพื่อทดลองระบบและดำเนินกิจกรรมทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาในเดือนกันยายน 2554 สมาชิกเริ่มต้นได้แก่ห้องปฏิบัติการของกรมฯ ที่มีภารกิจด้านการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา ซึ่งประกอบด้วยห้องปฏิบัติการในส่วนกลาง 2 แห่ง และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 14 แห่ง รายการทดสอบได้แก่ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* จากนั้นเดือนพฤศจิกายน 2554 สคอ. จึงได้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา โดยให้บริการเต็มรูปแบบแก่สมาชิกทั้งจากภาครัฐและเอกชนและนำระบบมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 มาใช้ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ คือ 1) เพิ่มศักยภาพด้านการเป็นผู้ดำเนินการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และของประเทศ ให้สามารถพึ่งพาตนเองได้ และทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ประหยัดเงินตราของประเทศ 2) พัฒนาศักยภาพและเสริมสร้างความเข้มแข็งของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารด้านจุลชีววิทยาของประเทศไทยให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

วิธีการ

การพัฒนาการเป็น PTP ทางจุลชีววิทยาเพื่อให้บริการแก่สมาชิกทั้งภาครัฐและเอกชน แบ่งเป็น 4 ระยะ ได้แก่ การวางแผนขั้นต้น การวางแผนด้านการจัดการ การดำเนินการเป็น PTP และการดำเนินการขอรับรองคุณภาพตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043: 2010

ระยะที่ 1: การวางแผนขั้นต้น (Initial planning)

เป็นการศึกษาความพร้อมด้านเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ เช่น รายการทดสอบและความถี่หรือรอบการทดสอบที่จะให้บริการ ชนิดของตัวอย่างทดสอบ ระดับหรือปริมาณของจุลินทรีย์ รวมทั้งการจัดเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการที่เหมาะสม เป็นต้น มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1.1 จัดตั้งทีมงาน ได้แก่ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ส่วนหนึ่ง ซึ่งมีประสบการณ์ด้านการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาเป็นอย่างดี ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005⁽²⁾ จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

1.2 สำรวจและเตรียมความพร้อมของสถานที่ โดยใช้พื้นที่ของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา

1.3 สำรวจความพร้อมของเครื่องมือ ได้แก่ เครื่องทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) และวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นต้องใช้สำหรับการทำแห้งเยือกแข็ง ได้แก่ ขวดแก้วพร้อมฝาชนิดมาเชื่อมต่อ (สามารถเข้าเครื่อง autoclave ได้) และทนต่อความเย็นที่อุณหภูมิต่ำๆ (ต่ำกว่า -40 องศาเซลเซียส) สำหรับเครื่องมือพื้นฐานอื่นๆ ใช้เครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ autoclave, balance (sensitivity 0.1 กรัม), glass bottle with screw cap, glass spreading rod, glass slide, incubator, loop, needle, pH-meter, petri dishes, pipette, safety cabinet, stomacher, stomacher bag, test tube, vortex mixer, water bath

1.4 ศึกษาเอกสารเกี่ยวกับข้อกำหนดทั่วไปของการทดสอบความชำนาญ เช่น ISO/IEC 17043: 2010⁽⁴⁾, ISO/TS 22117: 2010⁽⁵⁾, ISO 13528: 2005⁽⁶⁾ เป็นต้น เพื่อให้เกิดความเข้าใจและสามารถจัดทำเอกสารคุณภาพให้สอดคล้องกับระบบได้

1.5 ศึกษาคู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง สถิติที่ใช้ในการทดสอบความชำนาญ⁽⁷⁾ (SOP PT 20 T4 401) และเลือกใช้สถิติเฉพาะส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยา เช่น

- ◆ การทดสอบความแปรปรวนภายในตัวอย่าง (within sample variation) เพื่อศึกษาความแปรปรวน (variation) หรือความแตกต่างของการตรวจวิเคราะห์ซ้ำโดยใช้สถิติ Cochran's test

- ◆ การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของตัวอย่างทดสอบ โดยทดสอบความแปรปรวนระหว่างตัวอย่าง (between sample variation) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (One-way ANOVA)

- ◆ การหาค่ากำหนด (assigned value) และ z-score หรือ z'-score เป็นต้น

1.6 ศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยาจาก ISO 16140: 2003 / Amd.2011⁽⁸⁾

1.7 ศึกษาการสุ่มตัวอย่างโดยใช้โปรแกรมจาก <http://www.randomizer.org/form.htm>⁽⁹⁾

1.8 จัดหาจุลินทรีย์มาตรฐานต่างๆ เช่น *Salmonella* Typhimurium (DMST 562), *E. coli* (DMST 4212), *S. aureus* (DMST 8840), *S. epidermidis* (DMST 15505), *Listeria monocytogenes* (DMST 17303), *L. innocua* (DMST 9011), *B. cereus* (DMST 6228) เป็นต้น แหล่งของจุลินทรีย์มาตรฐานคือ ศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยจุลินทรีย์ที่รับมาจะต้องทดสอบก่อนนำมาใช้งานเพื่อให้แน่ใจว่าเป็นจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์ (pure) มีชีวิต (survive) และมีคุณสมบัติตรงตามต้องการ (characteristic) หรือที่กำหนดในวิธีวิเคราะห์

1.9 ทดลองเตรียมตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยา ซึ่งตัวอย่างทดสอบที่เตรียมรอบแรกเป็นการตรวจแบบคุณภาพ (Qualitative) คือ รายการ *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ตรวจแบบพบ/ไม่พบ โดยเตรียมตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์เติมจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganisms) เช่น *Salmonella* spp., *S. aureus* และจุลินทรีย์แข่งขัน (non target หรือ competitive microorganisms) และทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง

1.10 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test) และความคงตัว (stability) ของตัวอย่างทดสอบ (test material) โดยใช้วิธีมาตรฐานที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005⁽²⁾ จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขทะเบียน 4043/50

1.11 ส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ด่วนพิเศษให้ห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีกิจกรรมตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา รวม 16 แห่ง ประกอบด้วย ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 14 แห่ง และ สคอ. 2 แห่งเพื่อวิเคราะห์และส่งผลกลับภายในเวลาที่กำหนด

ระยะที่ 2: การวางแผนด้านการจัดการ (Management planning)

เป็นการศึกษาความเหมาะสมของขั้นตอนการดำเนินงานในแต่ละขั้นตอน รวมทั้งระยะเวลาและเอกสารต่าง ๆ ที่จำเป็น เพื่อให้สอดคล้องกับระบบคุณภาพ ISO/IEC 17043: 2010⁽⁴⁾ มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

2.1 ทบทวน/จัดทำมาตรฐานการปฏิบัติงาน (standard operating procedure: SOP) เพื่อกำหนดระเบียบปฏิบัติงานให้เป็นไปตามขั้นตอนและสามารถนำไปปฏิบัติได้

2.2 ทบทวน/จัดทำแบบฟอร์ม (forms) ที่ใช้บันทึกผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและอื่น ๆ เพื่อใช้เก็บไว้เป็นหลักฐานและการทวนสอบ

2.3 เข้ารับการอบรมเพิ่มเติมเรื่อง ISO/IEC 17043: 2010, ISO 13528: 2005

2.4 จัดระบบฐานข้อมูลในส่วนของการจัดเก็บข้อมูลสมาชิก ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ การประเมินผล ฯลฯ

2.5 กำหนดระยะเวลาดำเนินการต่าง ๆ เช่น วันเตรียมตัวอย่างทดสอบ (ก่อนวันส่งตัวอย่างประมาณ 1 เดือน กรณีที่เป็นรายการทดสอบใหม่ ๆ จะเริ่มเตรียมตัวอย่างทดสอบก่อนวันส่งตัวอย่าง 2-3 เดือน) วันที่ส่งตัวอย่าง ช่วงเวลาตรวจวิเคราะห์ของสมาชิก วันสุดท้ายของการส่งรายงานผล วันส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ การกำหนดระยะเวลาต่าง ๆ ต้องมีการวางแผนล่วงหน้าอย่างน้อย 3 เดือน ซึ่งต้องพิจารณาให้เหมาะสมกับวันทำการของห้องปฏิบัติการด้วย เช่น ไม่ตรงกับวันหยุดยาว หรือช่วงเทศกาลประจำปี

2.6 ศึกษาและคัดเลือกบรรจุภัณฑ์ บรรจุหีบห่อที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างทดสอบที่เป็นจุลินทรีย์

ระยะที่ 3: การดำเนินการเป็น PTP (PTP operation) มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

3.1 เปิดรับสมัครสมาชิกโดยทำหนังสือเชิญส่งไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา ทั้งภาครัฐและเอกชน และประชาสัมพันธ์โครงการผ่านแผ่นพับและ website ของ สคอ. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.2 เตรียมตัวอย่างทดสอบ (test material) โดยเติมจุลินทรีย์ในตัวอย่างและทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งบรรจุในขวดแก้ว (vial) นำเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) ปิดฝาขวดด้วยจุกยางและฝาจุกนิย่ม ระบุหมายเลขกำกับแต่ละขวด เก็บตัวอย่างทดสอบไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตัวอย่างทดสอบมีความคงตัว^(5, 10) การเติมจุลินทรีย์ต้องพิจารณาปริมาณให้เหมาะสมต่อรายการทดสอบแต่ละรายการและเป็นไปตามหลักวิชาการ^(5, 8) โดยทั่วไปการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาสามารถแบ่งเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ การตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพ (qualitative test) คือ การตรวจหาแบบพบหรือไม่พบ (detection) เช่น *L. monocytogenes* (พบ/ไม่พบ ต่อ 25 กรัม), *Salmonella* spp. (พบ/ไม่พบ ต่อ 25 กรัม), *S. aureus* (พบ/ไม่พบ ต่อ 0.1 กรัม) และการตรวจวิเคราะห์แบบปริมาณ (quantitative test) คือ การตรวจแบบนับจำนวน (enumeration) เช่น จำนวนจุลินทรีย์ (cfu/กรัม), จำนวน *B. cereus* (cfu/กรัม), จำนวน coliforms (MPN/กรัม) และจำนวน *E. coli* (MPN/กรัม) เป็นต้น

การเติมจุลินทรีย์ในการตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพและแบบปริมาณจะแตกต่างกัน ดังนี้

การตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพ

เติมจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganism) ให้เหลือรอดปริมาณต่ำๆ คือ ประมาณ 10-100 cfu ต่อหน่วยทดสอบ และเติมจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายหรือจุลินทรีย์แข่งขัน (non-target microorganisms หรือ competitive microorganisms) ให้เหลือรอดในปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์เป้าหมายอย่างน้อย 100 เท่า^(8, 11) จุลินทรีย์เป้าหมายเช่น

- ◆ *S. aureus* เติมปริมาณ 10-100 cfu ต่อ 0.1 กรัม
- ◆ *L. monocytogenes* เติมปริมาณ 10-100 cfu ต่อ 25 กรัม
- ◆ *Salmonella* spp. เติมปริมาณ 10-100 cfu ต่อ 25 กรัม

การตรวจวิเคราะห์แบบปริมาณ

เติมจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganism) ให้เหลือรอดในปริมาณที่อยู่ในช่วงของการนับของแต่ละวิธี และเติมจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายหรือจุลินทรีย์แข่งขัน (non-target microorganisms หรือ competitive microorganisms) ให้เหลือรอดใกล้เคียงตัวอย่างอาหารในธรรมชาติมากที่สุด⁽⁷⁾ เช่น จำนวนจุลินทรีย์เป้าหมายเป็น

◆ จำนวนจุลินทรีย์ เติมจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (ครอบคลุมแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ) ปริมาณ 10^2 ถึง 10^6 cfu ต่อกรัม

◆ *B. cereus* เติม *B. cereus* ปริมาณ 10^2 ถึง 10^6 cfu ต่อกรัม และจุลินทรีย์แข่งขันปริมาณมากกว่า *B. cereus* อย่างน้อย 100 เท่า

◆ coliforms, *E. coli*, *S. aureus* เติมจุลินทรีย์ดังกล่าวปริมาณ 3-110,000 MPN ต่อกรัมและจุลินทรีย์แข่งขันปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์เป้าหมายอย่างน้อย 100 เท่า

3.3 สุ่มตัวอย่างเพื่อทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว โดยใช้โปรแกรมจาก <http://www.randomizer.org/form.htm>⁽⁹⁾

3.4 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test) ของตัวอย่างทดสอบ

การตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพ

สุ่มตัวอย่างทดสอบที่มีจุลินทรีย์เป้าหมายและตัวอย่างทดสอบที่ไม่มีจุลินทรีย์เป้าหมาย (มีจุลินทรีย์อื่นๆ) ที่แบ่งบรรจุแล้วอย่างละ 10 ขวด ตรวจวิเคราะห์หาจุลินทรีย์เป้าหมายโดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน (standard method) โดยได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005⁽²⁾ จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขทะเบียน 4043/50 ได้แก่

- ◆ *L. monocytogenes* (พบ/ไม่พบ ต่อ 25 กรัม) ใช้วิธี ISO 11290-1: 1996/Amd.1: 2004⁽¹²⁾
- ◆ *Salmonella* spp. (พบ/ไม่พบ ต่อ 25 กรัม) ใช้วิธี ISO 6579: 2002/ Cor.1: 2004⁽¹³⁾
- ◆ *S. aureus* (พบ/ไม่พบ ต่อ 0.1 กรัม) ใช้วิธี BAM 2001, Chapter 12⁽¹⁴⁾

ตัวอย่างทดสอบที่เติมจุลินทรีย์เป้าหมายทุกขวดต้องตรวจพบจุลินทรีย์เป้าหมายและตัวอย่างทดสอบที่เติมจุลินทรีย์อื่นทุกขวดต้องตรวจไม่พบจุลินทรีย์เป้าหมาย

การตรวจวิเคราะห์แบบปริมาณ

สุ่มตัวอย่างทดสอบที่แบ่งบรรจุแล้วจำนวน 10 ขวด ตรวจตัวอย่างละ 2 ข้าง (duplicate) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานฯ ได้แก่

- ◆ coliforms (MPN/กรัม) ใช้วิธี BAM 2002, updated 2013 Chapter 4⁽¹⁵⁾
- ◆ *E. coli* (MPN/กรัม) ใช้วิธี BAM 2002, updated 2013 Chapter 4⁽¹⁵⁾

- ◆ จำนวนจุลินทรีย์ (cfu/กรัม) ใช้วิธี APHA, Compendium 2001, Chapter 6&7⁽¹⁶⁾
- ◆ *B. cereus* (cfu/กรัม) ใช้วิธี BAM 2001, updated 2013 Chapter 4⁽¹⁷⁾

นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาเปลี่ยนค่าจากหน่วย cfu หรือ MPN เป็น $\log_{10}$ cfu หรือ $\log_{10}$ MPN ทดสอบความแตกต่างภายในตัวอย่าง (within sample variation) โดยใช้สถิติ Cochran's test เพื่อศึกษาความแตกต่างของการวิเคราะห์ซ้ำ (precision)

$$\text{คำนวณค่า } C = D_{\max}^2 / \sum D_i^2$$

เมื่อ D_i คือ ค่าแตกต่างของค่าซ้ำ คู่ที่ i
 $D_{\max}$ คือ ค่าแตกต่างของค่าซ้ำ คู่ที่มากที่สุด

เปรียบเทียบค่า C ที่คำนวณได้กับค่าวิกฤติในตาราง Cochran's test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (5%) โดยจำนวนซ้ำคือค่า n จำนวนตัวอย่างคือค่า k ในตาราง ซึ่งในที่นี้ค่า $n = 2$, $k = 10$ ถ้าค่าที่คำนวณได้น้อยกว่าค่าวิกฤติ แสดงว่าไม่มีความแตกต่างของการวิเคราะห์ซ้ำ ให้ทดสอบขั้นตอนต่อไป ถ้าค่า C ที่คำนวณได้มากกว่าค่าวิกฤติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ให้เปรียบเทียบค่า C ที่คำนวณได้กับค่าวิกฤติในตาราง Cochran's test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 (1%) ถ้าค่าที่คำนวณได้น้อยกว่าค่าวิกฤติให้ใช้ข้อมูลทั้งหมดในการทดสอบขั้นตอนต่อไป ถ้าค่าที่คำนวณได้มากกว่าค่าวิกฤติ ถือว่าค่าคู่่นั้นเป็น outlier และให้ตัดค่าทิ้งไปก่อนจึงทดสอบขั้นตอนต่อไป นั่นคือทดสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (between sample variation) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน one-way ANOVA คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (sampling standard deviation; S_s) ถ้าค่า F ที่คำนวณได้ น้อยกว่า $F_{crit.}$ (ค่าจากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) แสดงว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าค่า F ที่คำนวณได้มากกว่า $F_{crit.}$ ให้คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (sampling standard deviation; S_s) เปรียบเทียบกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ (standard deviation for proficiency assessment; σ_p) ถ้า S_s ไม่เกิน 0.3 เท่าของ σ_p แสดงว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

3.5 บรรจุตัวอย่างทดสอบในภาชนะและหีบห่อที่เหมาะสมพร้อมเอกสารที่เกี่ยวข้องให้สมาชิกทางไปรษณีย์ลงทะเบียน

3.6 ทดสอบความคงตัวของ (stability) ของตัวอย่างทดสอบภายหลังวันสุดท้ายที่กำหนดให้สมาชิกตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบ และตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีเดียวกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

การตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพ

สุ่มตัวอย่างทดสอบที่มีจุลินทรีย์เป้าหมายและตัวอย่างทดสอบที่ไม่มีจุลินทรีย์เป้าหมาย (มีจุลินทรีย์อื่น ๆ) ที่แบ่งบรรจุแล้วอย่างละ 5 ขวดเพื่อตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างทดสอบที่เติมจุลินทรีย์เป้าหมายทุกขวดต้องตรวจพบจุลินทรีย์เป้าหมายและตัวอย่างทดสอบที่เติมจุลินทรีย์อื่นทุกขวดต้องตรวจไม่พบจุลินทรีย์เป้าหมาย

การตรวจวิเคราะห์แบบปริมาณ

สุ่มตัวอย่างทดสอบที่แบ่งบรรจุแล้วจำนวน 5 ขวดตรวจตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (duplicate) นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาเปลี่ยนค่าจากหน่วย cfu หรือ MPN เป็น $\log_{10}$ cfu หรือ $\log_{10}$ MPN หาค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (A) และค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ทดสอบความคงตัว (B) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยนำค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (A) ลบด้วยค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ทดสอบความคงตัว (B) ตัวอย่างทดสอบมีความคงตัวต่อเมื่อ $|A-B|$ ต้องไม่เกิน 0.3 เท่าของ σ_p ($|A-B| \leq 0.3 \sigma_p$)

3.7 หาค่ากำหนด (assigned value) ของตัวอย่างทดสอบ

การตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพ

ค่ากำหนดสำหรับตัวอย่างที่เติมจุลินทรีย์เป้าหมายคือพบต่อหน่วยทดสอบ (เช่น 0.1 กรัม หรือ 25 กรัม)

ค่ากำหนดสำหรับตัวอย่างที่ไม่เติมจุลินทรีย์เป้าหมายคือไม่พบต่อหน่วยทดสอบ

การตรวจวิเคราะห์แบบปริมาณ

ค่ากำหนดสำหรับการทดสอบความชำนาญฯ นี้ ใช้ค่าเฉลี่ยโรบัสต์ (robust average) ของผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ได้รับการประเมินทั้งหมด (participants' consensus) คำนวณโดยใช้ robust analysis: Algorithm A⁽⁶⁾

3.8 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ (PT standard deviation: $\hat{\sigma}_p$)

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญเป็นค่าที่บอกการกระจายของข้อมูลในกลุ่ม ใช้ตัดสินผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบของห้องปฏิบัติการ ซึ่ง PTP เลือกใช้ $\hat{\sigma}_p$ เท่ากับ $0.50 \log_{10} \text{MPN/g}$ หรือ $0.25 \log_{10} \text{cfu/g}$ มาใช้ในการประเมินค่า z-score ของห้องปฏิบัติการทั้งหมดที่ได้รับการประเมิน

3.9 หาค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด (Standard uncertainty of the assigned value) เนื่องจากการหาค่ากำหนดของตัวอย่างทดสอบ (X^*) คำนวณโดยใช้ robust analysis: Algorithm A ดังนั้นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด (u_x) ซึ่งติดมากับค่ากำหนดเสมอ จึงคำนวณได้จาก

$$u_x = 1.25 \times S^* / \sqrt{n}$$

$$u_x = \text{ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด}$$

$$S^* = \text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโรบัสต์ (robust standard deviation)}$$

$$n = \text{จำนวนผลการทดสอบที่นำมาประเมิน}$$

เพื่อป้องกันข้อผิดพลาดในการประเมินผลซึ่งมาจากความไม่ถูกต้อง (inaccuracy) ในการคำนวณค่ากำหนด ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด (u_x) ควรจะน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ ($\hat{\sigma}_p$) ในกรณีที่ u_x มากกว่า 0.3 เท่าของ $\hat{\sigma}_p$ ต้องนำค่า u_x มาใช้ในการประเมินผลด้วยโดยนำค่า u_x ไปรวม $\hat{\sigma}_p$

3.10 รวบรวมผลการตรวจวิเคราะห์ของสมาชิก ประเมินผลโดยหาค่า z-score ของห้องปฏิบัติการ (Individual z-score)

3.11 จัดทำรายงานผลเบื้องต้น (interim report) สมาชิกจะได้รับรายงานเบื้องต้น ที่ประกอบด้วยค่า assigned value และผลของสมาชิก

3.12 จัดทำรายงานผลฉบับสมบูรณ์ (final report) ส่งให้สมาชิก

ระยะที่ 4: การขอรับรองตามระบบมาตรฐานสากล (Implementation for international accreditation)
มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

4.1 ตรวจติดตามภายใน (internal audit) วันที่ 10 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557

4.2 ยื่นขอการรับรองและจัดส่งเอกสารให้หน่วยรับรอง (กรมวิทยาศาสตร์บริการ) วันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2557

4.3 ประชุมทบทวนการบริหารงาน (management review) วันที่ 20 มีนาคม พ.ศ. 2557

4.4 รับการตรวจประเมินจากหน่วยรับรองกรมวิทยาศาสตร์บริการ วันที่ 24-25 กรกฎาคม พ.ศ. 2557

4.5 แก้ไขข้อบกพร่องและข้อสังเกตภายในระยะเวลาที่หน่วยรับรองกำหนด (1 เดือน)

ผล

1. การวางแผนขั้นต้น

สมาชิกทุกรายส่งผลภายในเวลาที่กำหนด และทุกรายมีผลการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. และ *S. aureus* อยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ (ผลตรงกับค่ากำหนด) คิดเป็นร้อยละ 100 จากผลที่ได้รับสรุปได้ว่าตัวอย่างทดสอบที่เตรียมนี้สามารถใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาได้ เป็นการยืนยันว่าวิธีการที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างนี้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีการในการพัฒนาการดำเนินการต่อไป

2. การวางแผนด้านการจัดการ

เพื่อให้การดำเนินการเป็นไปตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043: 2010 และเพื่อให้บริการห้องปฏิบัติการสมาชิกเป็นการทั่วไป (ห้องปฏิบัติการภายในและภายนอก) PTP ทางจุลชีววิทยาจึงเตรียมความพร้อมด้านการจัดการ โดยจัดเตรียมเอกสารคุณภาพที่จำเป็นต้องใช้จำนวน 3 ฉบับ ได้แก่ การสุ่มตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยา การจัดการตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยา การบรรจุหีบห่อพัสดุภัณฑ์ และแบบฟอร์มจำนวน 26 ฉบับ (ตารางที่ 1) จัดทำแผนการทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา (protocol) โดยระบุหัวข้อให้ครอบคลุมข้อกำหนด ISO/IEC 17043: 2010 เช่น ชนิดตัวอย่างทดสอบ (PT items) การบริหารจัดการตัวอย่าง (handling of PT items) การติดต่อสื่อสารกับสมาชิก (communication participant) เป็นต้น จัดทำแผนพับประชาสัมพันธ์ สำหรับบรรจุภัณฑ์และหีบห่อที่ใช้บรรจุและส่งตัวอย่างทดสอบที่เป็นจุลินทรีย์พบว่าต้องบรรจุด้วยพัสดุสามชั้น (triple packaging system) เช่น กรณีตัวอย่างทดสอบเป็น lyophilized cultures จะนำตัวอย่างทดสอบที่บรรจุในขวดแก้ว (vial) ปราสจากเชื้อ ปิดฝาขวดด้วยจุกยางและฝอะลูมิเนียม บรรจุในถุงพลาสติกพร้อมวัสดุกันกระแทก ซ้อนอีกชั้นใส่ในกล่องพลาสติกชนิดทนแตกไม่รั่ว และบรรจุในกล่องพัสดุดีกชั้น การบรรจุด้วยพัสดุสามชั้น เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดของกฎหมาย⁽¹⁸⁾ และองค์การอนามัยโลกเรื่องการขนส่งเชื้อโรคติดต่อ^(11, 12) ทั้งนี้จะติดฉลากบนขวดแก้วและกล่องพลาสติก ซึ่งระบุรหัสตัวอย่าง เดือน/ปี ที่ดำเนินงาน ชื่อรายการทดสอบ ตราสัญลักษณ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และเครื่องหมายระวางอันตรายจากเชื้อโรค (danger biological hazard)^(18, 19, 20)

3. การดำเนินการเป็น PTP ทางจุลชีววิทยา

ปีงบประมาณ 2555-2557 มีการรับสมาชิกภายนอกรวมทั้งเพิ่มจำนวนรอบและหรือเพิ่มรายการทดสอบอย่างต่อเนื่องดังนี้

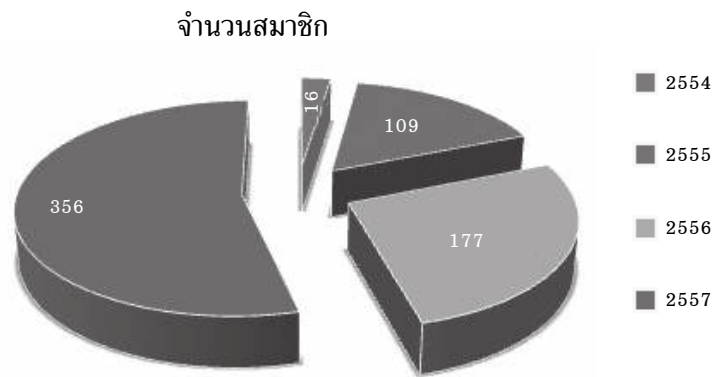
ปีงบประมาณ 2555 ดำเนินการเป็น PTP ทางจุลชีววิทยา 2 รายการทดสอบได้แก่ *Salmonella* spp. และ *S. aureus* เป็นการตรวจหาแบบพบหรือไม่พบโดยแต่ละรายการดำเนินการปีละ 2 รอบ มีสมาชิกเข้าร่วมรายการละ 61 และ 48 ราย รวม 109 ราย ปีงบประมาณ 2556 เพิ่มขอบข่ายการให้บริการเป็น 4 รายการทดสอบได้แก่ *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L.monocytogenes* และจำนวนจุลินทรีย์รายการทดสอบละ 1 รอบ รวม 4 รอบ โดย 3 รายการแรกเป็นการตรวจหาแบบพบหรือไม่พบ ส่วนจำนวนจุลินทรีย์เป็นการตรวจแบบปริมาณ (enumeration) มีหน่วยเป็น colony forming unit (cfu) ต่อกรัม มีสมาชิกจำนวน 58, 44, 26 และ 59 ราย ตามลำดับ รวม 187 ราย สำหรับปีงบประมาณ 2557 ดำเนินการ 7 รายการทดสอบ ได้แก่ *Salmonella* spp., *S.aureus*, *L.monocytogenes*, จำนวนจุลินทรีย์, *B. cereus* (cfu ต่อกรัม), จำนวน coliforms (Most Probable Number: MPN ต่อกรัม) และจำนวน *E. coli* (MPN ต่อกรัม) โดยมีสมาชิกเข้าร่วมจำนวน 70, 66, 27, 69, 40, 38 และ 46 ราย ตามลำดับ รวม 356 ราย รวม 4 ปี (ปีงบประมาณ 2554-2557) มีสมาชิกสะสมเข้าร่วมการทดสอบจำนวน 668 ราย เฉลี่ยมีห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบฯ ต่อรอบเพิ่มขึ้นตามลำดับคือ ปีงบประมาณ 2555-2557 เท่ากับ 27, 44 และ 51 ราย ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 1, 2)

ตารางที่ 1 รายชื่อเอกสารคุณภาพ (แบบฟอร์ม)

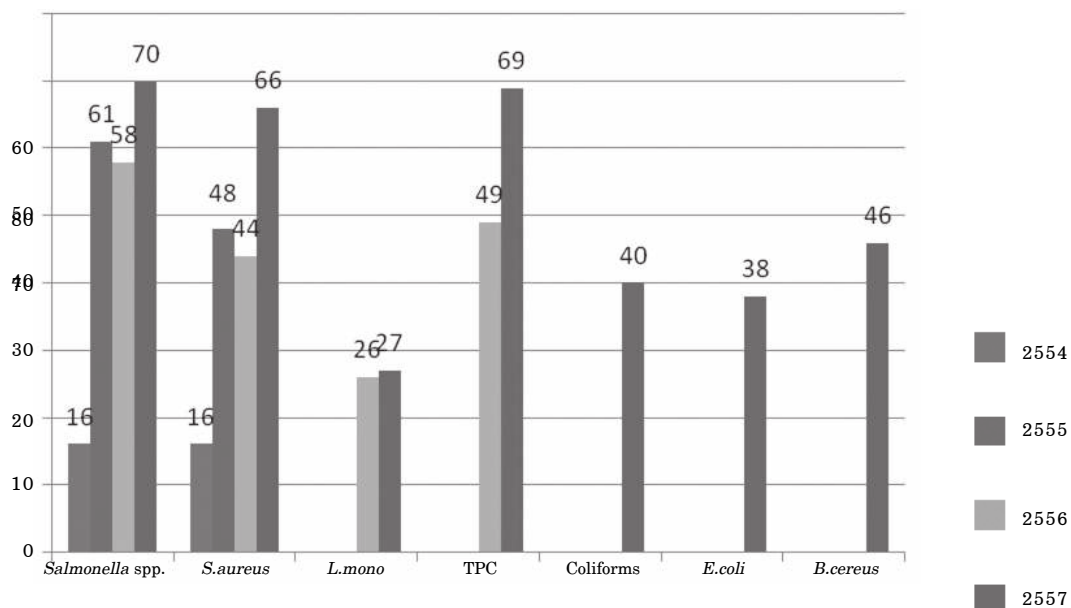
ลำดับ	ชื่อเอกสาร	เลข SOP
1.	บันทึกการตรวจสอบปริมาตร	F PT 20 T3 001
2.	บันทึกการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน	F PT 20 T4 002
3.	บันทึกการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์	F PT 20 T4 014
4.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>L. monocytogenes</i> (MPN/g)	F PT 20 T4 015
5.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>L. monocytogenes</i> /25 กรัม (พบ/ไม่พบ)	F PT 20 T4 016
6.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)	F PT 20 T4 017
7.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. /25 กรัม (พบ/ไม่พบ)	F PT 20 T4 018
8.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>S. aureus</i>	F PT 20 T4 019
9.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ Coliforms และ <i>Escherichia coli</i>	F PT 20 T4 020
10.	บันทึกการเตรียมตัวอย่าง	F PT 20 T4 021
11.	บันทึกการทดสอบจุลินทรีย์มาตรฐาน	F PT 20 T4 022
12.	Sterility Test	F PT 20 T4 023
13.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>B. cereus</i>	F PT 20 T4 024
14.	ใบสมัครเข้าร่วมแผนฯ ทางจุลชีววิทยา	F PT 20 T6 012
15.	แบบตอบรับตัวอย่าง	F PT 20 T6 014
16.	คำแนะนำสำหรับห้องปฏิบัติการ	F PT 20 T6 015
17.	แบบรายงานผลทางห้องปฏิบัติการ	F PT 20 T6 016
18.	บันทึกการทดสอบ ประจำปี	F PT 20 T6 031
19.	สรุปผลการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการสมาชิก (Detection)	F PT 20 T6 032
20.	บันทึกการทำลายตัวอย่างทดสอบความชำนาญ	F PT 20 T6 033
21.	รายชื่อสมาชิกประจำปี	F PT 20 T6 034
22.	สรุปผลการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการสมาชิก (Enumeration)	F PT 20 T6 035
23.	บันทึกการตอบรับตัวอย่างของสมาชิก	F PT 20 T6 037
24.	การประเมินผลห้องปฏิบัติการสมาชิก (Enumeration)	F PT 20 T7 001
25.	รายงานเบื้องต้น (Detection)	F PT 20 T7 002
26.	รายงานเบื้องต้น (Enumeration)	F PT 20 T7 003

ตารางที่ 2 ผลการเป็นผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยา

รายการ	ปีงบประมาณ			
	2554	2555	2556	2557
รายการทดสอบ	2	2	4	7
รอบการทดสอบ	1	4	4	7
จำนวนสมาชิก	16	109	177	356
จำนวนสมาชิกเฉลี่ยต่อรอบ	16	27	44	51



ภาพที่ 1 แผนภูมิแสดงจำนวนสมาชิกระหว่างปีงบประมาณ 2554-2557



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงรายการทดสอบและจำนวนสมาชิกการทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาระหว่างปีงบประมาณ 2554-2557

4. การขอรับรองตามระบบมาตรฐานสากล

ได้รับการตรวจประเมินเมื่อวันที่ 24-25 กรกฎาคม พ.ศ. 2557 พบข้อบกพร่องทางวิชาการจำนวน 4 ข้อ ข้อสังเกต 1 ข้อ ซึ่งข้อบกพร่องได้แก่ 1) ไม่พบบันทึกการประเมินผลฝึกอบรมความสามารถในการปฏิบัติงาน 2) ไม่พบข้อมูลของสมาชิก 1 รายในกราฟแท่ง (histogram) 3) มีการเลือกใช้วิธีการหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ (PT standard deviation: $\hat{\sigma}_p$) ไม่เหมาะสม คือเลือกใช้ค่า $0.50 \log_{10}$ MPN/g หรือ $0.30 \log_{10}$ MPN/g มาประเมินค่า Z-score 4) การหาค่ากำหนดในโปรแกรม excel ไม่ได้นำค่าคงที่มาใช้ในการคำนวณ ทำให้ค่า robust SD เปลี่ยนจากค่า 0.157 เป็น 0.154 สำหรับข้อสังเกตได้แก่ บันทึกหลายฉบับลงข้อมูลไม่ครบถ้วน เช่น บันทึกการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกการทำลายตัวอย่าง ซึ่งผู้ดำเนินการฯ แก้ไขส่งให้หน่วยงานรับรองตามระยะเวลาที่กำหนดและได้รับการรับรองเรียบร้อยแล้วเมื่อวันที่ 26 มกราคม พ.ศ. 2558

วิจารณ์

การพัฒนาการเป็น PTP ทางจุลชีววิทยาให้เป็นไปตามมาตรฐานสากลนั้น โดยปกติผู้ดำเนินการฯ จะต้องจัดทำเอกสารคุณภาพจำนวนมากเพื่อให้สอดคล้องกับทุกกิจกรรมตามข้อกำหนดที่จำเป็นต้องดำเนินการคือ ISO/IEC 17043: 2010⁽⁴⁾ ซึ่งเป็นข้อกำหนดทั่วไปเกี่ยวกับความสามารถในการจัดการแผนการทดสอบความชำนาญ (ด้านวิชาการ 10 ข้อ ด้านบริหาร 15 ข้อ) และ ISO/TS 22117: 2010⁽⁵⁾ ซึ่งเป็นข้อกำหนดเฉพาะของการทดสอบความชำนาญของการตรวจวิเคราะห์อาหารและอาหารสัตว์ทางจุลชีววิทยา มีข้อกำหนดทางวิชาการ 18 ข้อ บางกิจกรรมหรือบางข้อกำหนดอาจต้องเตรียมหรือจัดทำเอกสารคุณภาพหลายฉบับและบางฉบับอาจมีการบันทึกหลายลักษณะ เช่น การควบคุมสภาวะแวดล้อม (อากาศภายในห้องปฏิบัติการ โต๊ะทำงาน) ในระหว่างปฏิบัติงาน (เตรียมตัวอย่างทดสอบตัวอย่าง) ต้องสะอาด มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนน้อยหรือไม่มี เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ รวมถึงวิธีตรวจวิเคราะห์และวิธีทางสถิติ ต้องควบคุมให้เป็นไปตามข้อกำหนด แต่เนื่องจากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาของ สคอ. ได้รับการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตาม ISO/IEC 17025: 2005⁽²⁾ ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2551 และการให้บริการทดสอบความชำนาญทางเคมีบางรายการได้รับการรับรองตาม ISO/IEC 17043: 2010⁽⁴⁾ ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2555 PTP ทางจุลชีววิทยาจึงได้ศึกษา ทบทวน และนำเอกสารคุณภาพในระบบดังกล่าวมาใช้ทำให้ลดภาระด้านการจัดทำเอกสารคุณภาพลงได้จำนวนมาก

การเตรียมตัวอย่างทดสอบนั้นนับเป็นหัวใจสำคัญ เนื่องจากตัวอย่างทดสอบต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัวตลอดระยะเวลาของการตรวจวิเคราะห์^(4, 5) ซึ่งการเตรียมตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยาส่งผลให้ต้องเติมจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganism) และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายหรือจุลินทรีย์แข่งขัน (non-target microorganisms หรือ competitive microorganisms) และมีขั้นตอนหรือกระบวนการต่าง ๆ เช่น การทำให้แห้ง (dry) หรือการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilized) เพื่อเก็บรักษาจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่ให้เจริญเพิ่มจำนวนและต้องให้เหลือรอดชีวิตในปริมาณที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เช่น ในกรณีการตรวจหา (detection) คือตรวจแบบพบหรือไม่พบ ควรมีจุลินทรีย์เป้าหมายให้เหลือเท่ากับหรือน้อยกว่า 100 เซลต่อหน่วยน้ำหนักของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ (เช่น ต่อตัวอย่าง 0.1 กรัม หรือ 1 กรัม หรือ 25 กรัม) และควรมีจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายมากกว่าจุลินทรีย์เป้าหมายอย่างน้อย 100 เท่า เพื่อให้เกิดการเจริญแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด ส่วนกรณีการตรวจแบบปริมาณ (enumeration) คือ ตรวจแบบนับจำนวนเป็น cfu ต่อกรัมหรือ MPN ต่อกรัม ต้องเติมจุลินทรีย์เป้าหมายให้เหลือปริมาณที่เหมาะสมต่อการนับ เช่น จำนวนแบคทีเรีย ควรมีค่าในการนับจำนวนระหว่าง 25 ถึง 250⁽¹⁶⁾ หรือ 10 ถึง 300⁽²²⁾ ส่วนจำนวน *S. aureus* หรือ *B. cereus* ควรมีค่าระหว่าง 20 ถึง 200^(14, 17) หรือ 10 ถึง 150⁽²²⁾ และต้องมีจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายในตัวอย่างทดสอบ 10^4 ถึง 10^6 เซล เป็นต้น ซึ่งปัญหาการเตรียมตัวอย่างทดสอบให้มีจุลินทรีย์เป้าหมาย และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายให้เหลือในปริมาณที่เหมาะสมต่อการนำไปเป็นตัวอย่างทดสอบสำหรับแต่ละรายการจึงอาจต้องเติมในปริมาณที่แตกต่างกัน เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดเมื่อนำมาผ่านกระบวนการเก็บรักษาจะมีอัตราการตายไม่เท่ากัน ดังนั้นการเติมจุลินทรีย์ในปริมาณที่เท่ากันจึงอาจเหลือรอดชีวิตไม่เท่ากัน ซึ่งโดยปกติแบคทีเรียแกรมบวก (เช่น *S. aureus* และ *B. cereus* เป็นต้น) จะทนต่อสภาพแวดล้อมดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (เช่น coliforms, *E. coli*, *Salmonella* spp.) ขณะที่แบคทีเรียที่สร้างสปอร์จะทนกว่าแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ ส่วนยีสต์หรือราจะทนความแห้งแล้งได้ดีกว่าแบคทีเรีย ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างอาหารแต่ละประเภทโดยการเติมจุลินทรีย์เป้าหมายและจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายแต่ละชนิดเพื่อใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยา จึงต้องทำการศึกษาการตายหรือการบาดเจ็บของจุลินทรีย์นั้น ๆ เพื่อที่จะได้เติมปริมาณจุลินทรีย์ได้อย่างถูกต้อง โดยปกติจุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งจะมีปริมาณลดลงอย่างน้อย $0.5 \log_{10}$ cfu หรือ MPN⁽¹⁰⁾ เช่น ต้องการให้มีจุลินทรีย์เป้าหมาย 100 เซลต่อ 25 กรัม ($2.0 \log_{10}$ cfu

ต่อ 25 กรัม) จากการทดลองพบว่า เมื่อผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ปริมาณจุลินทรีย์จะลดลง $1.0 \log_{10}$ cfu ดังนั้นจึงต้องเติมจุลินทรีย์ $3.0 \log_{10}$ cfu เป็นต้น

การได้รับข้อบกพร่องจากการตรวจประเมินในเรื่องไม่พบบันทึกการประเมินผลการอบรมความสามารถ และข้อมูลของสมาชิกที่แสดงในกราฟแท่ง (histogram) ผู้ดำเนินการได้จัดทำบันทึกและข้อมูลพร้อมทั้งแจ้งผู้เกี่ยวข้องทราบ สำหรับเรื่องของการหาค่ากำหนดและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ โดยใช้ robust analysis algorithm A ซึ่งผู้ดำเนินการและเจ้าหน้าที่เข้าใจคลาดเคลื่อน ไม่ได้นำค่าคงที่ในรอบที่ 1 (iteration 1) แต่นำค่าเริ่มต้น (iteration 0) มาใช้ในการคำนวณรอบที่ 2 (iteration 2) จึงเพิ่มการอบรมในเรื่องดังกล่าว ส่วนการที่ผู้ดำเนินการเลือกค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญแบบคงที่ $0.3 \log_{10}$ MPN หรือ $0.5 \log_{10}$ MPN โดยไม่ใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบที่คำนวณได้ robust analysis algorithm A เพราะผู้ดำเนินการต้องการพัฒนาห้องปฏิบัติการสมาชิกให้สามารถตรวจได้ค่าที่ใกล้เคียงกัน (precision) และแม่นยำ (accuracy) มากขึ้นแบบคงที่ โดยไม่ขึ้นกับผลการตรวจวิเคราะห์ของสมาชิกในแต่ละรอบ ปัจจุบันผู้ดำเนินการใช้ค่า $0.25 \log_{10}$ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่มีหน่วยเป็น cfu และ $0.5 \log_{10}$ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่มีหน่วยเป็น MPN

สำหรับปัญหาอื่นที่ PTP ทางจุลชีววิทยาประสบเช่น ผู้ดำเนินงานตรวจสอบการชำระเงินได้ยากเนื่องจากสมาชิกบางรายชำระเงินแล้วแต่ไม่ได้แจ้งให้ผู้ดำเนินงานทราบ ทั้งที่กำหนดให้สมาชิกส่งสำเนาการชำระเงินให้ผู้ดำเนินการด้วย ทำให้ต้องตรวจสอบทุกรอบก่อนที่จะส่งผลให้สมาชิก แต่ในขณะนี้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้พัฒนาการจ่ายเงินเป็นระบบ electronic payment ทำให้การชำระเงินของสมาชิกและการตรวจสอบของผู้ดำเนินการง่ายขึ้น นอกจากนี้การรายงานผลของสมาชิก ส่วนใหญ่จะรายงานผลทาง e-mail ซึ่งในระยะแรกใช้ e-mail เฉพาะของผู้ดำเนินการ ทำให้ทีมงานไม่สามารถตอบหรือรับ e-mail ได้อย่างรวดเร็ว และมี mail อื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการทดสอบความชำนาญ ผู้ดำเนินการจึงขอ e-mail address ใหม่กับกรมฯ เป็นกรณีพิเศษ (ปกติข้าราชการ 1 คนจะได้รับเพียง 1 e-mail address) และได้รับอนุมัติแล้วเมื่อต้นปี พ.ศ. 2558 ซึ่งจะทำให้การตอบหรือรับการติดต่อจากสมาชิกสะดวกเร็วขึ้น เนื่องจากทีมงานที่กำหนดไว้ทุกคนสามารถได้ตอบทาง e-mail ใหม่นี้ได้ นอกจากนี้บางครั้งผู้ดำเนินการไม่ได้รับผลหรือได้รับผลล่าช้า (โดยเฉพาะการส่ง Fax) เนื่องจากเครื่องแฟกซ์ที่เป็นสายตรงจะมีประจำที่ฝ่ายบริหารงานทั่วไปของ สคอ. ดังนั้น ผู้ดำเนินงานต้องสอบถามจากสมาชิกเป็นราย ๆ

สรุป

การพัฒนาการเป็นผู้ดำเนินการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง จาก 2 รายการทดสอบ จำนวนสมาชิก 109 ราย เป็น 7 รายการทดสอบ จำนวนสมาชิก 356 รายภายใน 3 ปี และได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 แสดงถึงความสำเร็จและการบรรลุวัตถุประสงค์ ทำให้ลดค่าใช้จ่ายของสมาชิกและของประเทศ นอกจากนี้ยังทำให้สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประเมินผลความสามารถรวมทั้งพัฒนาระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้เขียนขอขอบคุณนายปรีชา จิงสมานกุล ที่กรุณาให้คำแนะนำด้านเทคนิคและวิชาการ นางสาวทิพวรรณ นิงน้อย ให้คำแนะนำด้านสถิติ และนางกนกพร อธิสุข ผู้จัดการคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 ซึ่งทุกท่านสนับสนุนการดำเนินงานทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาจนได้รับการรับรองทุกรายการที่ขอรับการรับรอง

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. นโยบายและหลักเกณฑ์การทดสอบความชำนาญ การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการและการประเมินความสามารถการทดสอบ. SOP No. N 07 15 003 แก้ไขครั้งที่ 08 วันที่ออกเอกสาร 3 ธันวาคม 2557.
2. ISO/IEC 17025: 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2nd ed. Geneva, Switzerland: ISO; 2005.
3. กฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนที่ 98 ก (ลงวันที่ 28 ธันวาคม 2552).
4. ISO/IEC 17043: 2010. Conformity assessment -- General requirements for proficiency testing. Geneva, Switzerland: ISO; 2010.
5. ISO/TS 22117: 2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva, Switzerland: ISO; 2010.
6. ISO 13528: 2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Geneva, Switzerland: ISO; 2005.
7. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สถิติที่ใช้ในการทดสอบความชำนาญ. SOP PT 20 T4 401 แก้ไขครั้งที่ 05 วันที่ออกเอกสาร 19 สิงหาคม 2557.
8. ISO 16140:2003/Amd.1:2011. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative method. Geneva, Switzerland: ISO; 2011.
9. Research randomizer. 2008. [cited 2011 Aug 24]: [1 screen]. Available from: URL: <http://www.randomizer.org/form.htm>
10. National Association of Testing Authorities (NATA). Maintenance and preservation of microbial cultures in a laboratory culture collection. Australia; 1992. Technical note 14.
11. ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. Geneva, Switzerland: ISO; 2014.
12. ISO 11290-1:1996/Amd. 1:2004. Microbiological of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method/Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusive of precision data. Geneva, Switzerland; ISO 2004.
13. ISO 6579:2002/Cor.1:2004(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland: ISO; 2004.
14. Bennett RW, Lancette GB. Bacteriological Analytical Manual: chapter 12 *Staphylococcus aureus*. 2001. [cited 2011 Aug 24]: [6 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>
15. Bacteriological Analytical Manual: chapter 4 enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. 2002. [cited 2011 Aug 24]: [18 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>
16. Downes FP, Ito K, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2001. p. 53-68.
17. Bacteriological Analytical Manual: chapter 14 *Bacillus cereus*. 2001. [cited 2011 Aug 24]: [5 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070875.htm>

18. กฎกระทรวงสาธารณสุข เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์การปฏิบัติของหน่วยงานที่ได้รับยกเว้นไม่ต้องขออนุญาตในการผลิต ครอบครอง จำหน่าย นำเข้า ส่งออก หรือนำผ่านซึ่งเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2552. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนที่ 86 ก (ลงวันที่ 20 พฤศจิกายน 2552).
 19. Introduction to the transport of infectious substances. In: World Health Organization. Laboratories biosafety manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: WHO; 2004. p. 94-7.
 20. Safety in the laboratory. In: World Health Organization. Quality assurance in bacteriology and immunology. 3rd ed. New Delhi, India: WHO; 2012. p. 77-85.
 21. Food Examination Performance Assessment Scheme. FEPAS assessment 89. Sand Hutton: Central Science Laboratory; 2004.
 22. ISO 7218:2007/Amd.1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations. Geneva, Switzerland: ISO; 2013.
-

Development of Proficiency Testing Providing for Food Microbiological Testing Laboratory

Ladawan Chungsamankool Kamonwan Kantaeng and Atchara Ukong

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Microbiological Proficiency testing (PT) is an external assessment of the performance of microbiological laboratories. It is also a tool for the quality system development. Many laboratories participated in the expensive PT schemes organized from abroad due to the lack of local PT provider. The few local providers existing in Thailand do not cover all necessary test items in food microbiological testing. In order to increase the capability of the Department of Medical Sciences in strengthening the performance of food testing laboratories in Thailand as well as to help laboratories improve their quality and reduce the cost of using the PT provider from abroad, in 2011, the Bureau of Quality and Safety of food (BQSF) launched the project on food microbiological PT. At the initial phase, test materials for *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* were prepared and sent to 16 food analysis laboratories of DMSc to analyze and submit the result within the established timeframe. The results confirmed that the prepared test materials were appropriate and could be used as PT microbiological samples. Therefore, the PT schemes were operated to service other government and private laboratories. In 2012, two PT schemes were provided for 2 rounds with two test items on *Salmonella* spp. and *S. aureus*, and with 109 laboratories participating. In 2013, the scope of service extended to include the 2 new tests of *L. monocytogenes*, and total plate count, and each test was for one round. The total of participants were 177. In 2014, the PT schemes for *B. cereus*, coliforms and *E. coli* were introduced and the total schemes become 7 with 356 participants. The number of participating laboratories increased continuously from 2012 to 2014, (27, 44 and 51 laboratories per round, respectively). In early 2015, all PT schemes were ISO/IEC 17043: 2010 accredited. In conclusion, the development of the PT schemes in microbiological testing of food at the BQSF has facilitated the improvement and development of testing laboratory quality in many laboratories in Thailand and reduced the cost from participation with PTP in foreign countries.

Key words: Proficiency Testing, Microbiology, Laboratory evaluation