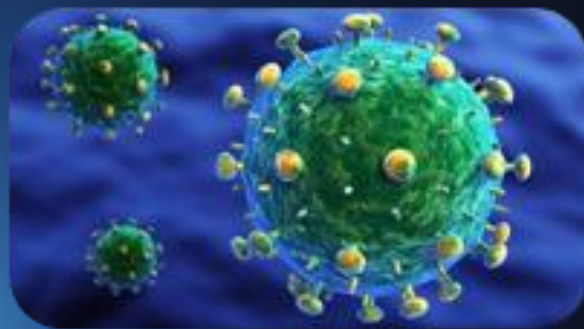
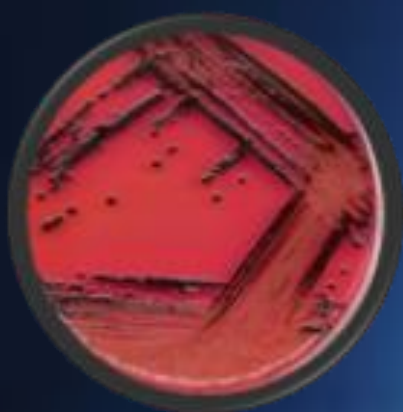


แนวทางการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ
ทางจุลชีววิทยาเชิงคุณภาพ ภายในห้องปฏิบัติการเดียว
โดยการศึกษาเปรียบเทียบวิธี



Practical Guide for Validation of Microbiological
Qualitative Methods in Single Laboratory
by Method Comparison Study

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เอกสารวิชาการ

เรื่อง

แนวทางการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงคุณภาพ

ภายในห้องปฏิบัติการเดียว โดยการศึกษาเปรียบเทียบวิธี

(Practical Guide for Validation of Microbiological Qualitative Methods
in Single Laboratory by Method Comparison Study)

จัดทำโดย

นางดวงดาว วงศ์สมมาตร

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการพิเศษ

และ

นางสาวนันธิดา ดาว พัสกุล

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปฏิบัติการ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ขอบข่ายการนำไปใช้	3
หลักการ	3
วิธีการทดสอบเชิงคุณภาพ : ข้อกำหนดทั่วไป	3
รูปแบบการศึกษา : แบบจับคู่ หรือ ไม่จับคู่	4
การศึกษาความไว	4
การศึกษาค่า Relative level of detection	10
การศึกษา Inclusivity และ Exclusivity	12
ภาคผนวก ก. : ตาราง ก.1 การจำแนกตัวอย่างและรายการจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง ที่ควรทำการทดสอบ	16
ภาคผนวก ข. : ลำดับความนิยมในการเลือกใช้ตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ และตัวอย่างที่เติมเชื้อ ในการศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี	28
ภาคผนวก ค. : วิธีเตรียมตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ด้วยการผสมตัวอย่าง (contamination by mixture) และการเติมเชื้อ (artificial contamination)	29
ภาคผนวก ง. : การคำนวณค่า RLOD โดยใช้ข้อมูลจากการศึกษาเปรียบเทียบวิธี	32
ภาคผนวก จ. : การพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับทดสอบ Inclusivity และ Exclusivity	35
เอกสารอ้างอิง	37

บทนำ

ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ ที่มีการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017⁽¹⁾ เรื่อง “ข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ” ต้องเลือกวิธีวิเคราะห์ที่เป็นไปตามความต้องการของลูกค้าและเหมาะสมสำหรับตัวอย่างทดสอบ ในกรณีที่ลูกค้าไม่ได้ระบุวิธีทดสอบ ห้องปฏิบัติการต้องเลือกวิธีที่เป็นปัจจุบันในระดับวิธีมาตรฐานระหว่างประเทศ ระดับภูมิภาค หรือระดับประเทศ หรือเป็นวิธีในตำราหรือวารสารทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องซึ่งรับรองโดยหน่วยงานด้านวิชาการที่เชื่อถือได้หรือมีชื่อเสียง ถ้าห้องปฏิบัติการต้องการใช้วิธีที่ไม่เป็นมาตรฐาน (non-standard method) วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเอง วิธีที่มีการขยายหรือดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (modified method) รวมทั้งการใช้วิธีมาตรฐานนอกขอบข่ายที่กำหนดไว้ หรือวิธีที่พัฒนาเป็นชุดทดสอบอย่างง่ายและ/หรือให้ผลรวดเร็ว ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบนั้นๆ ที่เรียกว่า วิธีทางเลือก (alternative method) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานหรือวิธีอ้างอิง (reference method) ตามขั้นตอนในวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ เพื่อทดสอบยืนยันว่าวิธีทางเลือกนั้นเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ในขอบเขตการยอมรับว่าผลทดสอบมีความถูกต้องเชื่อถือได้

วิธีทดสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative method) เป็นวิธีตรวจหาชนิดหรือกลุ่มของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในตัวอย่าง รายงานผลว่า พบ หรือ ไม่พบจุลินทรีย์ต่อหน่วยน้ำหนักหรือปริมาตรของอาหาร ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านการตรวจหาจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหาร น้ำ ภาชนะบรรจุ หรือพื้นผิวสัมผัสในสิ่งแวดล้อม ได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องหรือต่อยอดเทคโนโลยีเดิม ด้วยเทคนิควิธีใหม่ๆ ที่ก้าวหน้า ทันสมัย และทำให้ใช้ง่าย หรือได้ผลเร็ว จุลินทรีย์ที่ตรวจหาที่มีทั้งชนิดก่อโรคและไม่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholera*, *Campylobacter* spp., pathogenic *E. coli*, *Bacillus cereus* อย่างไรก็ตาม ก่อนนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปใช้ทดสอบ ต้องได้รับการประเมินโดยการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีด้วยวิธีปฏิบัติตามหลักวิชาการ โดยอ้างอิงเอกสารหรือตำราวิชาการที่เชื่อถือได้และเป็นที่ยอมรับ เมื่อผลประเมินผ่านเกณฑ์ยอมรับว่าวิธีนั้นให้ผลทดสอบที่ถูกต้องหลังจากเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานแล้ว และเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการนำไปใช้แล้ว จึงจะสามารถทำให้ผู้นำไปใช้มีความเชื่อมั่นได้ในผลของวิธีทดสอบนั้นๆ และช่วยให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพของสินค้าในกรณีที่ต้องการปล่อยสินค้าออกจำหน่ายได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งนับว่ามีประโยชน์ต่อเศรษฐกิจและการค้าของประเทศ

ในปัจจุบัน เอกสารอ้างอิงสำหรับการดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาที่นิยมใช้อ้างอิง คือ ISO 16140 ฉบับล่าสุดคือ ISO 16140-2:2016⁽²⁾ ที่ได้ออกมาทดแทนฉบับเดิม ISO 16140:2003⁽³⁾ เอกสารนี้มีชื่อว่า “Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method” ซึ่งเป็นฉบับหนึ่งในกลุ่มวิธีมาตรฐาน ISO 16140 ภายใต้ชื่อเรื่อง “Microbiology of the food chain - Method validation” มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นแนวปฏิบัติในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว (rapid methods) และ/หรือวิธีทดสอบอย่างง่าย (easier methods) ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อการค้า (proprietary methods) หรือ วิธีทดสอบที่จะนำมาใช้ทดแทนวิธีอ้างอิง โดยมีได้หวังประโยชน์ทางการค้า

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงคุณภาพ ตาม ISO 16140-2:2016 มีสาระหลักของการเปลี่ยนแปลงจาก ISO 16140:2003 ซึ่งเป็นฉบับเดิม ดังนี้

1. ISO 16140-2:2016 ในส่วนการศึกษาความไว (sensitivity study) ที่กำหนดให้หาค่าความไว (sensitivity) ทั้งของวิธีทางเลือกและวิธีอ้างอิง ค่า relative trueness และเพิ่มเติมการหาค่า false positive ratio (ISO 16140:2003 กำหนดให้หาร้อยละของค่าสัมพัทธ์ระหว่างวิธีทางเลือกและวิธีอ้างอิงของ ค่าความไว (% relative sensitivity) ความจำเพาะ (% relative specificity) และความถูกต้อง (% relative accuracy) ส่วนการหาค่า relative trueness นั้น ISO 16140:2003 มีการคำนวณหาค่า relative trueness แทนการหาค่า relative accuracy นอกจากนี้ยังมีการกำหนดขีดจำกัดการยอมรับผลทดสอบของการศึกษาแบบจับคู่ (paired study) และการศึกษาแบบไม่จับคู่ (unpaired study) ในการศึกษาใช้ค่าที่ได้จากการคำนวณหาผลรวมและผลต่างระหว่างค่าเบี่ยงเบนทางบวก (positive deviation) และ ค่าเบี่ยงเบนทางลบ (negative deviation) มาเชื่อมโยงกับจำนวนกลุ่มตัวอย่าง (categories) ที่ใช้ศึกษา เพื่อให้ทราบความเทียบเท่าของวิธีทางเลือกและวิธีอ้างอิง
2. การศึกษา Relative level of detection (RLOD study) มีการปรับปรุงรายละเอียดการปฏิบัติ เช่น กำหนดจำนวนครั้งของการทำซ้ำ (replicates) จากเดิมที่ทดสอบหาระดับการปนเปื้อนต่ำสุดที่สามารถตรวจพบเชื้อได้ 50% ในตัวอย่างหรือ LOD₅₀ แบ่งการปนเปื้อนระดับละ 6 ซ้ำ เปลี่ยนเป็นอย่างน้อยระดับละ 20 ซ้ำ ส่วนระดับที่ไม่เติมเชื้อ (negative control level) และระดับที่สูงขึ้น (higher level) ซึ่งคาดว่าจะสูงกว่า LOD₅₀ ควรทดสอบอย่างน้อยระดับละ 5 ซ้ำ นอกจากนี้ มีการกำหนดขีดจำกัดการยอมรับ (Acceptability Limits) ซึ่งบ่งบอกถึงค่าสูงสุดที่ยอมรับได้ของ LOD ของวิธีทางเลือก เมื่อเทียบกับค่า LOD ของวิธีอ้างอิง โดยกำหนดให้มีค่าไม่เกิน 1.5 สำหรับการศึกษาแบบจับคู่ (paired study) และไม่เกิน 2.5 สำหรับการศึกษาแบบไม่จับคู่ (unpaired study)

คณะผู้จัดทำได้จัดทำเอกสารฉบับภาษาไทยนี้ขึ้น เพื่อให้นักวิจัยทั่วไปได้นำไปใช้ประโยชน์เป็นแนวทางในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการเดียว โดยการศึกษาเปรียบเทียบวิธี ตามวิธีที่ระบุในเอกสาร ISO 16140-2:2016 ซึ่งเป็นฉบับปัจจุบัน และนิยมใช้เป็นมาตรฐานสากล ได้เผยแพร่เอกสารฉบับภาษาไทยนี้ในสื่ออิเล็กทรอนิกส์ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และมุ่งหวังว่าจะเป็นประโยชน์แก่นักวิชาการ นักวิจัย และผู้สนใจทั่วไป

**การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงคุณภาพ
ภายในห้องปฏิบัติการเดียว โดยการศึกษาเปรียบเทียบวิธี
(Practical Guide for Validation of Qualitative Microbiological Methods
in a Single Laboratory by Method Comparison Study)**

วัตถุประสงค์

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ (method validation) ทางจุลชีววิทยาเชิงคุณภาพนี้ เป็นแนวปฏิบัติที่จัดทำขึ้นเพื่อให้หน่วยงานที่ตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาในห่วงโซ่อาหาร หรือนักวิจัยที่ดำเนินการภายในห้องปฏิบัติการเดียว สามารถนำไปใช้เพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีทางเลือก (Alternative method) กับวิธีอ้างอิง (Reference method) ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสาร ISO 16140-2:2016

ขอบข่ายการนำไปใช้

เอกสารฉบับนี้ระบุหลักการทั่วไปและหลักปฏิบัติทางวิชาการในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทางเลือก (ส่วนใหญ่เป็นวิธีที่ผลิตขึ้นเพื่อการค้า) ที่จะนำไปใช้ทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงคุณภาพ เพื่อตรวจหาจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา ที่ปนเปื้อนในอาหารสำหรับการบริโภคของมนุษย์ อาหารสัตว์ ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมในพื้นที่ผลิตหรือประกอบอาหาร รวมทั้งตัวอย่างจากขั้นตอนการผลิตเบื้องต้น และยังสามารถนำไปใช้กับวิธีทดสอบจุลชีพอื่น หรือสารเมตาโบไลต์ที่สร้างจากจุลชีพได้ด้วย

หลักการ

วิธีดำเนินการในการตรวจสอบความถูกต้อง (validation) ของวิธีทดสอบ ประกอบด้วย 2 ระยะ คือ

1. การศึกษาเปรียบเทียบวิธี (Method comparison study) เป็นการเปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีทางเลือก (Alternative method) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อการค้า (proprietary method) กับวิธีอ้างอิง (Reference method) ที่ดำเนินการในห้องปฏิบัติการหลัก
2. การศึกษาระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory study) เป็นการเปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีทางเลือกกับวิธีอ้างอิง ที่ดำเนินการในต่างห้องปฏิบัติการ จำนวนหลายแห่ง

วิธีทดสอบเชิงคุณภาพ

1) ข้อกำหนดทั่วไป

การศึกษาเปรียบเทียบวิธี เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบที่ดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการหลัก (organizing laboratory) ประกอบด้วย 3 ส่วน ดังต่อไปนี้

1. การศึกษาความไว (sensitivity study) เป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก สามารถศึกษาในตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (naturally contaminated samples) หรือ ตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples) ก็ได้

2. การศึกษาค่า **relative level of detection; RLOD (RLOD study)** เป็นการเปรียบเทียบค่าปริมาณต่ำสุดของจุลินทรีย์ที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีทางเลือกและด้วยวิธีอ้างอิง โดยต้องทำการศึกษาในตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples)

3. การศึกษา **Inclusivity/exclusivity** ของวิธีทางเลือก

- **inclusivity study** เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึง ความสามารถของวิธีทางเลือกในการตรวจพบเชื้อเป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ จำนวนหลายๆ สายพันธุ์
- **exclusivity study** เป็นการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ จำนวนหลายๆ สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีทางเลือก ไม่ควรตรวจพบเชื้อเหล่านี้ (เชื้อที่จะคัดเลือกลมาทดสอบ ควรเป็นเชื้อที่มีโอกาสเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อเป้าหมาย หรือมีโอกาสให้ผลทดสอบบวกเช่นเดียวกับเชื้อเป้าหมาย)

หมายเหตุ - ผลการศึกษา (ตารางและการคำนวณผล) ในแต่ละส่วน และการแปลผล รวมทั้งผลที่มีความแตกต่างหรือขัดแย้งกัน (discrepant results) ต้องแสดงไว้ในรายงานการศึกษา
- ปริมาณของตัวอย่างส่วนทดสอบ (test portion) ต้องเป็นไปตามที่ระบุไว้ในวิธีอ้างอิง

2) รูปแบบการศึกษา : แบบจับคู่ (paired) หรือ ไม่จับคู่ (unpaired)

การทดสอบด้วยวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก ให้พยายามใช้ตัวอย่างส่วนทดสอบ (test portion) เดียวกัน (ถ้าทำได้) เว้นแต่บางกรณี เช่น กรณีที่ขั้นตอนแรกของการทดสอบ (หมายถึงขั้นตอน enrichment) วิธีทางเลือกกำหนดให้ใช้ enrichment broth ต่างชนิดกับของวิธีอ้างอิง จึงจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างส่วนทดสอบ (test portion) แยกคนละชุดกัน ด้วยเหตุนี้ ISO 16140 จึงแบ่งการศึกษาเป็น 2 รูปแบบ ดังนี้

2.1 **แบบจับคู่ (Paired study)** หมายถึง ขั้นตอนแรกของการทดสอบด้วยวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก มีการดำเนินการเหมือนกันทุกประการ โดยใช้ตัวอย่างส่วนทดสอบ (test portion) และอาหารเลี้ยงเชื้อ (enrichment broth) ร่วมกัน การปฏิบัติเช่นนี้ มักทำให้ผลการทดสอบทั้ง 2 วิธีมีความสอดคล้องกันมาก เรียกข้อมูลผลการทดสอบจากการศึกษาแบบนี้ว่า “paired หรือ matched”

2.2 **แบบไม่จับคู่ (Unpaired study)** หมายถึง ขั้นตอนแรกของการทดสอบด้วยวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก มีการดำเนินการที่แตกต่างกัน ตั้งแต่การใช้ตัวอย่างส่วนทดสอบ (test portion) คนละชุด (แต่ต้องมาจากผลิตภัณฑ์อาหารในรุ่นการผลิตเดียวกัน) และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ (enrichment broth) ต่างชนิดกัน เรียกข้อมูลผลการทดสอบจากการศึกษาแบบนี้ว่า “unpaired หรือ unmatched”

3) การศึกษาความไว (sensitivity study)

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ทราบว่า วิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือกมีค่าความไว (sensitivity) ที่แตกต่างกันหรือไม่ โดยอาจทดสอบกับตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (naturally contaminated samples) และ/หรือ ตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples) ก็ได้ และต้องทดสอบกับกลุ่มตัวอย่าง (categories) และประเภทตัวอย่าง (types) ที่แตกต่างกัน

ขีดจำกัดการยอมรับ (Acceptability Limits) กำหนดเป็นค่าความแตกต่างที่ยอมรับได้สูงสุด (maximum acceptable difference) ซึ่งขึ้นอยู่กับรูปแบบของการศึกษา (แบบจับคู่/แบบไม่จับคู่) และจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ทำการทดสอบ

ขั้นตอนของการศึกษาความไว ปฏิบัติดังต่อไปนี้

3.1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง (categories)

การคัดเลือกกลุ่ม (categories) และประเภท (types) ของผลิตภัณฑ์อาหาร หรืออื่นๆ เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทางเลือก ขึ้นอยู่กับชนิดหรือกลุ่มของจุลินทรีย์ และขอบเขตของการตรวจสอบความถูกต้องที่ต้องการศึกษา โดยพิจารณาจากหลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้

- 3.1.1 ถ้าต้องการนำวิธีทางเลือกไปใช้ทดสอบอาหารหลากหลายกลุ่ม ต้องคัดเลือกผลิตภัณฑ์อาหารมาตรวจสอบความถูกต้องอย่างน้อย 5 กลุ่ม (ต้องระบุรายชื่อกลุ่มผลิตภัณฑ์ที่ตรวจสอบความถูกต้องไว้ในรายงานการศึกษา) แต่ถ้าต้องการนำวิธีไปใช้ทดสอบอาหารเพียงเฉพาะบางกลุ่ม เช่น ready-to-eat, ready-to-reheat meat products และ heat-processed milk & dairy products ก็ให้ตรวจสอบความถูกต้องในกลุ่มอาหารนั้นๆ เท่านั้น นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบความถูกต้องเพิ่มเติมสำหรับกลุ่มตัวอย่างอื่นๆ ที่นอกเหนือจากอาหารสำหรับการบริโภคของมนุษย์ (food) เช่น ตัวอย่างอาหารสัตว์ (feed samples) ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม (environmental samples) และตัวอย่างจากขั้นตอนการผลิตเบื้องต้น (primary production stage samples) เพื่อขยายขอบข่ายการใช้งานวิธีทางเลือกให้ครอบคลุมถึงกลุ่มเหล่านั้นได้ด้วย
- 3.1.2 ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างที่คัดเลือกมา ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องกับตัวอย่าง 3 ประเภทเป็นอย่างน้อย ดูภาคผนวก ก: ข้อเสนอแนะประเภท/กลุ่มตัวอย่างกับชนิดของจุลินทรีย์ที่ควรทำการศึกษา ตาม ISO 16140-2:2016)

ในการคัดเลือกประเภทตัวอย่าง มีข้อควรคำนึงดังต่อไปนี้

- ควรคัดเลือกตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (natural contamination) ก่อนเป็นอันดับแรก และต้องเก็บตัวอย่างจากหลากหลายแหล่ง โดยกระจายแหล่งเก็บตัวอย่างให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ เพื่อลดความลำเอียง (bias) และเพื่อให้ได้ผลการตรวจสอบความถูกต้องที่มีความครอบคลุมมากขึ้น เหมาะแก่การนำไปใช้งาน
- คัดเลือกประเภทอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ประจำถิ่น (natural background microflora) ในปริมาณแตกต่างกัน ทั้งสูงและต่ำ รวมทั้งคัดเลือกประเภทอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่มีระดับความเครียดแตกต่างกัน เช่น อาหารที่ผ่านกระบวนการ และอาหารดิบซึ่งไม่ผ่านกระบวนการ
- กรณีที่ไม่สามารถหาตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (naturally contaminated samples) ได้ในจำนวนมากพอ สามารถใช้ตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples) แทนได้ (ดูภาคผนวก ข และ ค) ควรระบุวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เติมเชื้อในรายงานการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ศึกษาด้วย

ตัวอย่าง

ถ้าต้องการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจหา *Listeria monocytogenes* ในอาหาร 1 กลุ่ม (category) คือ กลุ่มผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์พร้อมบริโภค (ready-to-eat meat products) / ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ต้องอุ่นหรือให้ความร้อนก่อนบริโภค (ready-to-reheat

meat products) อาจเลือกตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยทดสอบกับตัวอย่าง 3 ประเภท (types) ดังต่อไปนี้

- 1) cooked meat products เป็นตัวแทนประเภทอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระดับต่ำ และเชื่อมีภาวะเครียดเนื่องจากอาหารผ่านการให้ความร้อน
- 2) fermented or dried meat products เป็นตัวแทนประเภทอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระดับสูง และเชื่อมีภาวะเครียดเนื่องจากความเป็นกรด-เบสของอาหาร
- 3) raw cured (smoked) meat products (ค่า a_w น้อยกว่า 0.92) เป็นตัวแทนประเภทอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระดับปานกลาง และเชื่อมีภาวะเครียดเนื่องจากอาหารมีปริมาณน้ำอิสระต่ำ

หมายเหตุ - การจัดกลุ่มผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (meat products) ไม่รวมผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก (poultry products)

- ในบางกรณี เช่น ต้องการนำวิธีทางเลือกไปทดสอบอาหารที่หลากหลาย อาจเลือกศึกษาโดยควรรวมกลุ่มอาหาร (categories) 2 กลุ่ม ระหว่างกลุ่มอาหารพร้อมบริโภค (ready-to-eat) กับกลุ่มอาหารดิบ (raw) ที่ทำจากผลิตภัณฑ์กลุ่มเดียวกัน (same product group) เช่น ศึกษา raw meat และกลุ่ม ready-to-eat meat (products) ควรรวมเป็นกลุ่มเดียว โดยเลือกอาหาร 3 ประเภทที่อยู่ภายใต้ 2 กลุ่มดังกล่าว การตัดสินใจเลือกศึกษาควรรวมระหว่างกลุ่มอาหารใด ขึ้นกับการวิเคราะห์ความเสี่ยง (risk analysis)

3.2 จำนวนตัวอย่าง

ในแต่ละกลุ่มอาหารที่คัดเลือกมาศึกษา ให้ทำการทดสอบกับอาหาร 60 ตัวอย่าง เป็นอย่างน้อย โดยแบ่งเป็น อย่างน้อย 3 ประเภท และประเภทละอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง (3 ประเภท x 20 ตัวอย่าง/ประเภท = 60 ตัวอย่าง) ในการทดสอบตัวอย่างแต่ละประเภท ต้องพบสัดส่วนของผลบวก (fractional positive results) ด้วยวิธีอ้างอิงหรือวิธีทางเลือก (ตัวอย่างที่ทดสอบไม่ควรให้ผลบวกทั้งหมด หรือผลลบทั้งหมด) ในทางอุดมคติ 10 ตัวอย่าง (50%) ที่ทดสอบ/ประเภท ควรให้ผลบวกและอีก 10 ตัวอย่าง ให้ผลลบ แต่ยอมรับได้ หากพบผลบวกอยู่ในช่วง 25% - 75% ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างจะต้องมีอย่างน้อย 30 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธีอ้างอิง และ/หรือวิธีทางเลือก

3.3 ผลการทดสอบด้วยวิธีทางเลือกและการยืนยันผล

วิธีทางเลือกจำนวนมาก มักมี 2 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนที่ 1 ประกอบด้วย การเพิ่มจำนวนเชื้อ (enrichment) ตามด้วยการตรวจหาเชื้อ (detection) ส่วนขั้นตอนที่ 2 เป็นการยืนยันผลการตรวจหาเชื้อ (detection result) จากขั้นตอนที่ 1 ผลที่ได้หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนที่ 2 จะเป็นผลสุดท้ายของวิธีทางเลือก แต่ในกรณีที่วิธีทางเลือกมีเพียงขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนเดียว (ไม่มีขั้นตอนยืนยันผล) ผลสุดท้ายของวิธีทางเลือกจะเหมือนกับผลการทดสอบของขั้นตอนที่ 1

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในส่วนของการศึกษาความไว ตาม ISO 16140-2:2016 กำหนดว่า ผล (สุดท้าย) ของวิธีทางเลือกจะต้องได้รับการตรวจยืนยันซ้ำ เพื่อตัดสินว่า เป็นผลบวกจริงหรือผลบวกปลอม โดยให้ปฏิบัติดังนี้

- การศึกษาแบบไม่จับคู่ (Unpaired study): ให้ทดสอบยืนยันซ้ำ ไม่ว่าวิธีทางเลือกจะให้ผลบวกหรือลบ

- การศึกษาแบบจับคู่ (Paired study): ให้ทดสอบยืนยันซ้ำ เมื่อวิธีทางเลือกให้ผลบวก แต่วิธีอ้างอิงให้ผลลบ
- วิธีทดสอบยืนยันซ้ำที่นำมาใช้ (≥ 1 วิธีทดสอบ) ต้องเป็นวิธีที่สามารถทำให้เชื้อพื้นตัวและยืนยันได้ว่าเชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อเป้าหมายที่แท้จริงของวิธีทดสอบ โดยอาจทำตามขั้นตอนยืนยันผลของวิธีอ้างอิง หรือของวิธีทางเลือกก็ได้ (ถ้าวิธีทางเลือกสามารถแยกเชื้อเป้าหมายและยืนยันชนิดของเชื้อได้) หรือใช้ขั้นตอนยืนยันของทั้ง 2 วิธีร่วมกัน หรือใช้วิธีอื่นใดก็ได้ที่สามารถแยกเชื้อและยืนยันชนิดของเชื้อเป้าหมายได้

นอกจากนี้ กรณีที่วิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก มีขั้นตอน enrichment ที่แตกต่างกัน ทั้งในแง่ของจำนวนขั้นตอน enrichment ที่ไม่เท่ากัน (ตามปกติขั้นตอน enrichment มักประกอบด้วย 2 ขั้นตอนย่อย คือ primary/non-selective enrichment ตามด้วย secondary/selective enrichment) หรือ ระยะเวลาบ่มโดยรวม (total duration of incubation) ที่ต่างกัน จำเป็นต้องมีวิธีการยืนยันผลเพิ่มเติม (additional confirmation pathway) โดยต้องปฏิบัติตามทั้ง 2 วิธีการต่อไปนี้

- 1) ทดสอบตามขั้นตอน/สภาวะปกติที่ระบุไว้ในวิธีปฏิบัติของวิธีทางเลือก (ไม่รวมการทดสอบเสริม (complementary tests) ที่อาจทำในช่วงการศึกษาค้นคว้าตรวจสอบความถูกต้องของวิธี)
- 2) ทดสอบโดยปรับเปลี่ยนส่วนหนึ่งของขั้นตอน enrichment ของวิธีทางเลือก ให้เป็นไปตามของวิธีอ้างอิงเป็นอย่างน้อย หรือให้ใช้ระยะเวลาบ่มโดยรวม (total duration of incubation) ของขั้นตอน enrichment ตามวิธีอ้างอิง

ให้รายงานผลการยืนยันเพิ่มเติมแยกกันระหว่าง 2 วิธีการ

3.4 การคำนวณและการแปลผลความไว (sensitivity)

ในเอกสารรายงานผลการศึกษาความไว ต้องแสดงข้อมูลต่อไปนี้

- 1) รูปแบบของการปนเปื้อนเชื้อของตัวอย่าง: ใช้การปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ หรือการเติมเชื้อ หากใช้การเติมเชื้อ ต้องระบุขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วย (ดูภาคผนวก ค)
- 2) รูปแบบการศึกษา: เป็นแบบจับคู่ (paired study) หรือแบบไม่จับคู่ (unpaired study)
- 3) วิธีทดสอบยืนยันที่ใช้: เพื่อยืนยันผลของวิธีทางเลือกซ้ำ

ผลการทดสอบของวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก: สามารถใส่ในตาราง ตามรูปแบบดังต่อไปนี้

- ผลการทดสอบแต่ละตัวอย่าง: ใช้ตารางที่ 1 (ศึกษาแบบจับคู่) หรือ 2 (ศึกษาแบบไม่จับคู่)
- สรุปผลรวม: ใช้ตารางที่ 3 สำหรับสรุปผลรวมของทุกกลุ่ม (all categories) แต่ละกลุ่ม (per category; ≥ 60 ตัวอย่าง) และแต่ละประเภท (per type; ≥ 20 ตัวอย่าง)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก และการแปลผล สำหรับการศึกษาแบบจับคู่

ผลการทดสอบของวิธีอ้างอิงหรือวิธีทางเลือก/ตัวอย่าง			
วิธีอ้างอิง	วิธีทางเลือก (รวมการยืนยันตามที่วิธีระบุ)	ผลยืนยันซ้ำ ของวิธีทางเลือก (ด้วยวิธีใดๆ) ^a	การแปลผล (พิจารณาจากผลยืนยันซ้ำ ของวิธีทางเลือก)
+	+	ไม่จำเป็น ^b	Positive Agreement (PA)
-	-	ไม่จำเป็น ^b	Negative Agreement (NA)
+	-	ไม่จำเป็น ^b	Negative Deviation (ND) (เนื่องจากวิธีทางเลือกให้ผลลบปลอม)
-	+	+	Positive Deviation (PD)
-	+	-	Negative Agreement (NA) ^c (เนื่องจากวิธีทางเลือกให้ผลบวกปลอม)

^a การยืนยันซ้ำสำหรับผลของวิธีทางเลือก ปฏิบัติตามข้อ 3.3

^b ไม่จำเป็นต้องยืนยันเพิ่มเติม เพราะผลยืนยันซ้ำของวิธีทางเลือก ให้ผลเหมือนกับผลการทดสอบของวิธีทางเลือก

^c ผลบวกปลอมนี้ ต้องถูกนำมาใช้ในการคำนวณอัตราส่วนการเกิดผลบวกปลอม (false positive ratio)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก และการแปลผล สำหรับการศึกษาแบบไม่จับคู่

ผลการทดสอบของวิธีอ้างอิงหรือวิธีทางเลือก/ตัวอย่าง			
วิธีอ้างอิง	วิธีทางเลือก (รวมการยืนยันตามที่ระบุในวิธี)	ผลยืนยันซ้ำ ของวิธีทางเลือก (ด้วยวิธีใดๆ) ^a	การแปลผล (พิจารณาจากผลยืนยันซ้ำ ของวิธีทางเลือก)
+	+	+	Positive Agreement (PA)
+	+	-	Negative Deviation (ND) ^b (เนื่องจากวิธีทางเลือกให้ผลบวกปลอม)
-	-	-	Negative Agreement (NA)
-	-	+	Negative Agreement (NA) (เนื่องจากวิธีทางเลือกให้ผลลบปลอม)
+	-	-	Negative Deviation (ND)
+	-	+	Negative Deviation (ND) (เนื่องจากวิธีทางเลือกให้ผลลบปลอม)
-	+	+	Positive Deviation (PD)
-	+	-	Negative Agreement (NA) ^b (เนื่องจากวิธีทางเลือกให้ผลบวกปลอม)

^a การยืนยันซ้ำสำหรับผลของวิธีทางเลือก ปฏิบัติตามข้อ 3.3

^b ผลบวกปลอมนี้ จะต้องถูกนำมาใช้ในการคำนวณอัตราส่วนการเกิดผลบวกปลอม (false positive ratio)

ตารางที่ 3 สรุปผลการทดสอบของวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก สำหรับตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละกลุ่ม

วิธีทดสอบ	วิธีอ้างอิง (ผลบวก)	วิธีอ้างอิง (ผลลบ)
วิธีทางเลือก (ผลบวก)	+/+ Positive Agreement (PA)	-/+ Positive Deviation (PD)
วิธีทางเลือก (ผลลบ)	+/- Negative Deviation (ND)	-/- Negative Agreement (NA)

จากข้อมูลสรุปผลการทดสอบในตารางที่ 3 สำหรับการศึกษาในผลิตภัณฑ์อาหาร แต่ละกลุ่ม และแต่ละประเภท นำข้อมูลมาคำนวณค่าต่อไปนี้

$$(1) \text{ Sensitivity ของวิธีทางเลือก: } SE_{alt} = \frac{(PA + PD)}{(PA + ND + PD)} \times 100\%$$

$$(2) \text{ Sensitivity ของวิธีอ้างอิง: } SE_{ref} = \frac{(PA + ND)}{(PA + ND + PD)} \times 100\%$$

$$(3) \text{ Relative trueness: } RT = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$$

$$(4) \text{ False positive ratio ของวิธีทางเลือก: } FPR = \frac{FP}{NA} \times 100\%$$

เมื่อ N คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด ($NA + PA + PD + ND$) และ FP คือ ผลบวกปลอม

หมายเหตุ - ต้องใช้ผลของวิธีทางเลือกที่ได้รับการยืนยันซ้ำแล้ว ในการตัดสินใจเปรียบเทียบของวิธี
ทางเลือกกับวิธีอ้างอิง

การตัดสินใจผลการทดสอบของวิธีทางเลือก

คำนวณความแตกต่างระหว่าง ($ND-PD$) สำหรับทั้งการศึกษาแบบจับคู่และไม่จับคู่ และคำนวณผลรวมของ ($ND+PD$) สำหรับการศึกษาแบบจับคู่ แล้วนำค่าที่คำนวณได้ ไปตรวจสอบว่า อยู่ในช่วงของขีดจำกัดการยอมรับ (Acceptability Limit; AL) หรือไม่ ค่า AL ในตารางที่ 4 กำหนดขึ้นตามรูปแบบการศึกษา (แบบจับคู่ หรือแบบไม่จับคู่) และจำนวนของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินผล

หมายเหตุ - ขีดจำกัดการยอมรับนี้ ขึ้นอยู่กับข้อมูลและความเห็นของกลุ่มผู้เชี่ยวชาญ มิได้มาจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การแปลผลการศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ให้ปฏิบัติดังนี้

- จะต้องแปลผลทั้งแบบแยกรายกลุ่ม (per category) และแบบรวมทุกกลุ่ม (all categories)
- ในการทดสอบอาหารต่างประเภท ถ้าขั้นตอน enrichment มีวิธีปฏิบัติที่แตกต่างกัน จะต้องแปลผลแยกกันสำหรับ enrichment แต่ละแบบด้วย
- ถ้าค่าที่คำนวณได้ ($ND-PD$) และ ($ND+PD$) สูงกว่าขีดจำกัดการยอมรับ ถือว่าไม่ผ่านเกณฑ์ กรณีนี้ต้องสืบสวนหาต้นเหตุของปัญหาเพื่อหาคำอธิบายผลที่ได้ การตัดสินใจว่าวิธีทางเลือกไม่เหมาะสมใน

การนำไปใช้ทดสอบกลุ่มตัวอย่างใดบ้าง ขึ้นอยู่กับค่าขีดจำกัดการยอมรับและข้อมูลเพิ่มเติมอื่นๆ และกรณีที่ยอมรับวิธีทางเลือก แม้ค่าไม่ผ่านขีดจำกัดการยอมรับ ต้องระบุเหตุผลไว้ในรายงานการศึกษาด้วย

ตารางที่ 4 parameter และค่ากำหนดของขีดจำกัดการยอมรับ (AL) สำหรับการศึกษาแบบจับคู่ และแบบไม่จับคู่ สัมพันธ์กับจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

จำนวนกลุ่มตัวอย่าง (categories)	การศึกษาแบบจับคู่		การศึกษาแบบไม่จับคู่
	(ND ^a – PD ^b)	(ND + PD)	(ND – PD)
1	3	6	3
2	4	8	4
3	5	10	5
4	5	12	5
5	5	14	5
6	6	16	6
7	6	18	7
8	6	20	7

^a ND = จำนวนตัวอย่างที่ให้ผล Negative Deviation (ให้ผลลบด้วยวิธีทางเลือก แต่ให้ผลบวกด้วยวิธีมาตรฐาน)
^b PD = จำนวนตัวอย่างที่ให้ผล Positive Deviation (ให้ผลบวกด้วยวิธีทางเลือก แต่ให้ผลลบด้วยวิธีมาตรฐาน)

หมายเหตุ ในเอกสารรายงานการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ควรแสดงข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับความแตกต่างของผลการทดสอบก่อนและหลังการตรวจยืนยันผลของวิธีทางเลือก (ปฏิบัติตามขั้นตอนที่ 1 และ 2 ของวิธีทางเลือก) แต่ข้อมูลนี้มิได้นำมาใช้ในการประเมินผลโดยรวมของวิธีทางเลือก

4) การศึกษาค่า Relative level of detection (Relative level of detection study)

ทำการศึกษาเปรียบเทียบ เพื่อประเมินค่าปริมาณจุลินทรีย์ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (level of detection; LOD) ของวิธีทางเลือกเทียบกับของวิธีอ้างอิง โดยคำนวณเป็นค่า Relative level of detection (RLOD) การศึกษานี้ให้ใช้ตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples) ≥ 3 ระดับๆ ละหลายซ้ำ หากทราบระดับการปนเปื้อน จะสามารถคำนวณค่า LOD ได้ด้วย แต่อาจไม่จำเป็น

ขั้นตอนการปฏิบัติในการหาค่า RLOD ดังต่อไปนี้

4.1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และจำนวนซ้ำ ที่จะนำมาทดสอบ

- 4.1.1 การคัดเลือกกลุ่มและประเภทของตัวอย่าง ทำตามข้อ 3.1 โดยให้คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเดียวกันกับการศึกษาความไว (sensitivity study) และในแต่ละกลุ่ม ให้คัดเลือกตัวอย่างเพียง 1 ประเภท และควรคัดเลือกประเภทที่ต่างจากการศึกษาความไว (ถ้าเป็นไปได้) เพื่อจะได้เป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างที่กว้างขวางยิ่งขึ้น
- 4.1.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา RLOD ต้องเป็นตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples) และตัวอย่างแต่ละประเภท ควรเติมเชื้อต่างสายพันธุ์ (ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่เติมเชื้อดูในภาคผนวก ค)

- 4.1.3 การเติมเชื้อ ให้ทำอย่างน้อย 3 ระดับต่อประเภทของตัวอย่าง ประกอบด้วย
- 4.1.3.1 ระดับที่ 1 ไม่เติมเชื้อ (negative control level)
- 4.1.3.2 ระดับที่ 2 เติมเชื้อระดับต่ำ (low level) ซึ่งเป็นปริมาณจุลินทรีย์ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ในทางทฤษฎี (theoretical detection level) อยู่ที่ประมาณที่ 0.7 cfu/test portion
- 4.1.3.3 ระดับที่ 3 เติมเชื้อระดับสูงขึ้น (higher level) ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าระดับต่ำเล็กน้อย เช่น 1 ถึง 1.5 cfu/test portion
- 4.1.4 ตัวอย่างที่เติมเชื้อในระดับต่ำ ควรให้ผลบวก (fractional recovery) จำนวน 25-75% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ทดสอบ โดยอย่างน้อยต้องให้ผลบวกด้วยวิธีอ้างอิง (วิธีทางเลือกจะให้ผลบวกหรือไม่ก็ได้) ดังนั้นจึงต้องประมาณการในการเติมเชื้อที่ระดับต่ำให้พอเหมาะ
- 4.1.5 จำนวนซ้ำที่ทดสอบในแต่ละระดับการปนเปื้อน (ทุกระดับ ทดสอบทั้ง 2 วิธี)
- 4.1.5.1 ระดับที่ 1 (negative control level) ควรทดสอบอย่างน้อย 5 ซ้ำ (ต้องไม่พบผลบวก หากพบผลบวก ต้องทำการทดสอบใหม่ ทุกระดับ)
- 4.1.5.2 ระดับที่ 2 (theoretical detection level) ควรทดสอบอย่างน้อย 20 ซ้ำ
- 4.1.5.3 ระดับที่ 3 (higher level) ควรทดสอบอย่างน้อย 5 ซ้ำ
- 4.1.6 ผลการทดสอบของวิธีทางเลือก หากเป็น positive deviation (ให้ผลบวกด้วยวิธีทางเลือก แต่ให้ผลลบด้วยวิธีอ้างอิง) จะต้องทำการยืนยันซ้ำ (ดูตามข้อ 3.3) หลังจากนั้นจึงจะสามารถนำผลไปใช้ในการประเมินค่า RLOD ได้

หมายเหตุ - ในการเตรียมตัวอย่างและทดสอบ ควรเพิ่มจำนวนระดับการปนเปื้อนเชื้อให้มากขึ้น เพื่อให้มั่นใจว่า จะพบตัวอย่างที่ให้ผลบวก อยู่ในช่วง fractional recovery ที่ยอมรับ

- ระดับการปนเปื้อนเชื้อ ให้ประมาณการจากค่า LOD ของวิธีอ้างอิง ในกรณีที่วิธีทางเลือกมีค่า LOD ต่ำกว่าวิธีอ้างอิง

4.2 การคำนวณและการแปลผลค่า RLOD

RLOD หมายถึง อัตราส่วนระหว่างค่า LOD ของวิธีทางเลือก และค่า LOD ของวิธีอ้างอิง

$$\text{RLOD} = \frac{\text{LOD}_{\text{alt}}}{\text{LOD}_{\text{ref}}}$$

ตัวอย่างการคำนวณ แสดงในภาคผนวก ง การคำนวณทำได้ด้วย Excel[®] spreadsheet ของ ISO 16140-2:2016 ซึ่งสามารถดาวน์โหลดได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ที่

<http://standards.iso.org/iso/16140> จากนั้นเลือก RLOD file

ในการคำนวณโดยใช้ Excel[®] spreadsheet ต้องใช้ตัวเลือก (option) “unknown concentration” คำนวณค่า RLOD_i ของแต่ละ item , กรอกผลลงในตารางที่ 5

หมายเหตุ Excel เป็นเพียงตัวอย่างหนึ่งของโปรแกรมที่เหมาะสมและมีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับอำนวยความสะดวกให้แก่ผู้ใช้เอกสารนี้

ตารางที่ 5 ค่า RLOD ก่อนและหลังการยืนยันผลซ้ำของวิธีทางเลือก

	ค่า RLOD คำนวณจาก ผลของวิธีทางเลือก	ค่า RLOD คำนวณจาก ผลของวิธีทางเลือกที่ยืนยันซ้ำแล้ว
item (category) (i)	$RLOD_i$	$RLOD_i$
1		
2		
.....		
k		
combined		

ขีดจำกัดการยอมรับ (Acceptability Limit; AL) ของค่า RLOD ขึ้นอยู่กับ ผลทดสอบของวิธีทางเลือก (ที่ยืนยันซ้ำแล้ว) ซึ่งเกณฑ์นี้จะบ่งบอกถึง ค่าสูงสุดที่ยอมรับได้ของ LOD ของวิธีทางเลือก เมื่อเทียบกับค่า LOD ของวิธีอ้างอิง แต่ไม่สามารถนำไปพิจารณาถึงความเหมาะสมในการนำวิธีทางเลือกไปใช้งาน (fitness for purpose) โดยทั่วไปค่าขีดจำกัดการยอมรับ จะมากกว่า 1 และควรแปลผลแยกกันสำหรับตัวอย่างแต่ละชนิด (item)

ขีดจำกัดการยอมรับค่า RLOD

- **การศึกษาแบบจับคู่** กำหนดไว้ที่ 1.5 หมายถึง ค่า LOD ของวิธีทางเลือกจะต้องไม่เกิน 1.5 เท่าของค่า LOD ของวิธีอ้างอิง และเป็นที่ยอมรับ หากค่า LOD ของวิธีทางเลือกต่ำกว่าค่า LOD ของวิธีอ้างอิง เพราะนั่นหมายถึง วิธีทางเลือกมีโอกาสตรวจพบเชื้อได้ในระดับการปนเปื้อนที่ต่ำกว่าวิธีอ้างอิง
- **การศึกษาแบบไม่จับคู่** กำหนดไว้ที่ 2.5 หมายถึง ค่า LOD ของวิธีทางเลือกจะต้องไม่เกิน 2.5 เท่าของ LOD ของวิธีอ้างอิง และเป็นที่ยอมรับ หากค่า LOD ของวิธีทางเลือกต่ำกว่าค่า LOD ของวิธีอ้างอิง เพราะนั่นหมายถึง วิธีทางเลือกมีโอกาสตรวจพบเชื้อได้ในระดับการปนเปื้อนที่ต่ำกว่าวิธีอ้างอิง

กรณีที่ค่า RLOD สูงกว่าขีดจำกัดการยอมรับ ถือว่าไม่ผ่านเกณฑ์ กรณีนี้ต้องสืบสวนหาต้นเหตุของปัญหา เพื่อหาคำอธิบายผลที่ได้ การตัดสินใจ วิธีทางเลือกไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ทดสอบรายการหรือกลุ่มตัวอย่างที่เลือกมาศึกษา พิจารณาจากค่าเกณฑ์ยอมรับและข้อมูลเพิ่มเติมอื่นๆ กรณีที่ยอมรับวิธีทางเลือก แม้ค่าไม่ผ่านขีดจำกัดการยอมรับ จะต้องระบุเหตุผลไว้ในรายงานการศึกษาด้วย

5) การศึกษา Inclusivity และ exclusivity (Inclusivity/exclusivity study)

5.1 การคัดเลือกเชื้อและจำนวนสายพันธุ์ที่จะศึกษา

ต้องศึกษาโดยใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ (range of strains) หลักเกณฑ์การคัดเลือกสายพันธุ์ (ดูในภาคผนวก จ.) ให้คำนึงถึงหลักการของวิธีทางเลือก (เช่น วิธีเพาะเชื้อ วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา และ วิธีทางอณูชีววิทยา เป็นต้น) หลักการของวิธีที่ต่างกัน อาจทดสอบกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน

แต่ละสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้ ต้องได้รับการตรวจสอบยืนยันเอกลักษณ์ของเชื้อเพื่อความแน่ใจ โดยทดสอบทางชีวเคมี และ/หรือทางน้ำเหลืองวิทยา และ/หรือทางพันธุศาสตร์ และถ้าทำได้ ควรใช้สายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารสำหรับการบริโภคของมนุษย์ อาหารสัตว์ สิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตอาหาร หรือในการผลิตขั้นต้น (primary production) ซึ่งขึ้นอยู่กับขอบข่ายการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี อย่างไรก็ตามสามารถใช้เชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย สิ่งแวดล้อม และจากศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ควรทราบแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ที่นำมาใช้ และควรเก็บรักษาไว้ที่ศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ระดับท้องถิ่น (เช่น ห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ) ระดับชาติ หรือระดับนานาชาติ เพื่อสามารถนำจุลินทรีย์มาใช้ทดสอบในอนาคต (ถ้าต้องการ)

การทดสอบ Inclusivity ต้องใช้เชื้อบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย จำนวนอย่างน้อย 50 สายพันธุ์ ยกเว้นการทดสอบวิธีวิเคราะห์ *Salmonella* ต้องใช้เชื้อบริสุทธิ์ต่าง serotype จำนวนอย่างน้อย 100 สายพันธุ์ (หมายถึงอย่างน้อย 100 serovars) ส่วนการทดสอบ Exclusivity ต้องใช้เชื้อบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย จำนวนอย่างน้อย 30 สายพันธุ์

จุลินทรีย์บางชนิดอาจเพาะเลี้ยงได้ยาก หรือเพาะเลี้ยงไม่ได้ เช่น ไวรัส หรือ โปรโตซัว กรณีที่เชื้อเป้าหมายเพาะเลี้ยงไม่ได้ ควรใช้วิธีเติมเชื้อสายพันธุ์ทดสอบ (test strains) ที่เป็นเชื้อแขวนลอยบริสุทธิ์ (pure suspension) ลงในขั้นตอนแรกๆ ที่เหมาะสมของวิธีทดสอบ (the earliest appropriate step)

หมายเหตุ

- จุลินทรีย์บางชนิด อาจไม่สามารถหาเชื้อได้ครบตามจำนวนที่ต้องการ เพื่อนำมาศึกษา inclusivity และ exclusivity กลุ่มผู้ศึกษาความถูกต้องของวิธีจะต้องตกลงกันในการคัดเลือกชนิดเชื้อและกำหนดจำนวนเชื้อที่เหมาะสม
- แนวทางในการเก็บและรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศึกษาได้จากเอกสาร ISO 11133⁽⁴⁾

5.2 การเติมเชื้อเป้าหมาย (Inclusivity)

ทำการทดสอบกับจุลินทรีย์เป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) เพียงครั้งเดียว ด้วยวิธีทางเลือกเท่านั้น (ทดสอบจนถึงขั้นตอนยืนยัน หากมีการกำหนดไว้ในวิธีทางเลือก) โดยเติมเชื้อบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์ที่ระดับการเจือจาง 1 ระดับลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (ไม่ต้องเติมตัวอย่าง)

เริ่มจากเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวไม่จำเพาะ (non-selective broth) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแต่ละเชื้อ จนกระทั่งได้เชื้อปริมาณสูง (ที่ stationary phase) ปริมาณเชื้อที่เติมจะต้องมากกว่า 10 ถึง 100 เท่าของระดับเชื้อต่ำสุดที่ตรวจพบได้ด้วยวิธีทางเลือกที่ศึกษา และวิธีปฏิบัติของวิธีทางเลือกจะต้องมีขั้นตอน enrichment ทุกขั้นตอนตามที่ระบุไว้ในวิธี กรณีที่วิธีทางเลือกประกอบด้วยขั้นตอน enrichment มากกว่า 1 ขั้นตอน (เช่น วิธีทดสอบสำหรับอาหารต่างประเทศ) ให้เลือกใช้วิธีที่มีขั้นตอนที่ทำหายมากที่สุด ทดสอบกับเชื้อครบทุกสายพันธุ์ที่เลือกไว้ หากการทดสอบให้ผลลบ

หรือผลน่าสงสัย ให้ทำการทดสอบซ้ำด้วยทั้งวิธีทางเลือกและวิธีอ้างอิง เพื่อตรวจสอบว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ถูกตรวจพบได้ด้วยวิธีอ้างอิงที่เหมาะสม ถ้ายังคงให้ผลเป็นลบ ให้ทำการทดสอบซ้ำโดยเติมตัวอย่างอาหารลงไปด้วย และหากวิธีทางเลือกมีขั้นตอนยืนยัน ใน การทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์ที่เลือกมา จะต้องทำการทดสอบจนถึงขั้นตอนยืนยันด้วย

5.3 การเติมเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย (exclusivity)

ทำการทดสอบกับจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) โดย ทดสอบเพียงครั้งเดียว ด้วยวิธีทางเลือกเท่านั้น (ทดสอบจนถึงขั้นตอนยืนยัน หากมีการกำหนดไว้ ในวิธีทางเลือก) โดยเติมเชื้อบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (ไม่ต้องเติม ตัวอย่าง)

เริ่มจากเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดเหลว (non-selective broth) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแต่ละเชื้อ จนกระทั่งได้เชื้อ ปริมาณสูง (ที่ stationary phase) และสำหรับการศึกษา exclusivity ถ้าวิธีทดสอบมีขั้นตอน การทำให้เชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective medium) ก่อนขั้นตอนการตรวจพบ เชื้อ ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะ (non-selective medium) แทนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective medium) หากวิธีทางเลือกให้ผลบวกหรือผลน่าสงสัย ควรทำการทดสอบซ้ำโดยใช้ วิธี enrichment ครบทุกขั้นตอน ตามที่กำหนดในวิธีทางเลือก ซึ่งรวมถึงขั้นตอน selective enrichment ตรงตามทีระบุในวิธีปฏิบัติของวิธีทางเลือก กรณีที่วิธีทางเลือกประกอบด้วย ขั้นตอน enrichment มากกว่า 1 ขั้นตอน (เช่น วิธีทดสอบสำหรับอาหารต่างประเทศ) ในแต่ละ ขั้นตอนควรทดสอบกับเชื้อครบทุกสายพันธุ์ที่เลือกไว้ และควรทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธีอ้างอิง เพื่อ ตรวจสอบว่า เชื้อทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ตรวจไม่พบ (หรือให้ผลลบ) ด้วยวิธีอ้างอิง

5.4 การแสดงผลและการแปลผล

จัดทำตารางบันทึกผลตามรูปแบบตารางที่ 6 การแปลผลต้องทำโดยห้องปฏิบัติการ ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเปรียบเทียบวิธี และการรายงานผลควรระบุความผิดปกติจากผลที่ไม่ เป็นไปตามที่คาดหวัง

ตารางที่ 6 ตารางบันทึกผลการทดสอบ Inclusivity และ Exclusivity

จุลินทรีย์	วิธีการเลือก	
	ผลการทดสอบ	ผลการทดสอบที่ยืนยันซ้ำแล้ว
Inclusivity (เชื้อเป้าหมาย)		
1.		
2.		
อื่นๆ		
Exclusivity (เชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย)		
1.		
2.		
อื่นๆ		

ภาคผนวก ก.

ตาราง ก.1 การจำแนกตัวอย่างและรายการจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง ที่ควรทำการทดสอบ

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid Bacte- ria	Yeasts and moulds	Entero- bacteria- ceae	Esche- richia coli	Coagu- lase positive stypyllo cocci	Salmo- nella spp.	Liste- ria spp.	L.mono- cytoge- nase	Shiga toxin produ- cing <i>E.coli</i> (STEC)	Crono- bacter spp.	Cam- pylo- bacter	(Patho- genic) <i>Yersinia</i> <i>enterocoli- ca</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>Bacillus</i> - <i>cereus</i> (vegeta- tive cells or spores)	<i>Clostri- dium</i> <i>perfrin- gens</i> (vegeta- tive cells or spores)	<i>Clostri- dium</i> <i>botuli- num</i> (vegeta- tive cells or spores)
Raw milk and dairy products	Raw milks and/or fermented/a- cidified milks (not heat treated)	Raw milk	Y				Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y				
		Raw fermented/a- cidified, raw milk yoghurts, raw dairy- based drinks					Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				
	Raw milk based products, with high fat content and/or high background microflora	Raw butters					Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				
		Raw creams					Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				
		Hard and semi hard cheeses (e.g. Comte', Beaufort)					Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				
		Blue cheeses (Roquefort)					Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				
		Soft cheeses (e.g. Brie, Munster)					Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y				

ตาราง ก.1 (ต่อ)

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Coagulase positive staphylococci	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogenes	Shiga toxin producing E.coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (vegetative cells or spores)	Clostridium perfringens (vegetative cells or spores)	Clostridium botulinum (vegetative cells or spores)
Heat-processed milk and dairy products	Pasteurized dairy products	Milk-based desserts, ice creams, drinks, creams	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
	Sterilized or UHT dairy products	UHT milks, canned milks or creams															Y		
	Pasteurized milk-based products	Fermented / acidified pasteurized milk, yoghurts, dairy-based products			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
		Pasteurized milks	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
		Butters			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y								
		Creams			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y								
		Hard and semi-hard cheeses (heat processed) (e.g. Comte', Emmental, Gouda)			Y		Y	Y	Y	Y	Y								
		Blue cheeses (Bleu de Bresse)					Y	Y	Y	Y	Y								
		Soft cheeses (e.g. Brie, Munster)					Y	Y	Y	Y	Y								
		Milk powders	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
	Dry	Powder for milk-based desserts	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		

ตาราง ก.1 (ต่อ)

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid bacteria	Yeasts and moulds	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	Coagulase positive staphylococci	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	Shiga toxin producing <i>E. coli</i> (STEC)	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>Campylobacter</i>	(Pathogenic) <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>Bacillus cereus</i> (vegetative cells or spores)	<i>Clostridium perfringens</i> (vegetative cells or spores)	<i>Clostridium botulinum</i> (vegetative cells or spores)
Raw meat and ready-to-cook meat products (except poultry)	Fresh meats (unprocessed)	Carcasses, meat cuts, Carpaccio's	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y				
		Minced meat, meat preparations, Carpaccio's	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y				
		Carcasses, swabs, rinsates	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y				
	Ready-to-cook (processed)	Frozen burger patties, marinated beef shish-kabobs	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y				
Ready-to-eat, ready-to-reheat meat products meat products	Cooked meat products	Cooked ham, pate'	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y
	Fermented or dried meat products	Salami	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y
	Raw cured (smoked) ($a_w > 0.92$)	Filet de saix, lard	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y
	Raw cured (smoked) ($a_w < 0.92$)	Cobourg ham, dry cured ham	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y	Y	Y
	Canned meat (ambient stable)	Corned beef															Y	Y	Y

ตาราง ก.1 (ต่อ)

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Coagulase positive staphylococci	Salmonella spp.	Listeria spp.	L.monocytogenes	Shiga toxin producing E.coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (vegetative cells or spores)	Clostridium perfringens (vegetative cells or spores)	Clostridium botulinum (vegetative cells or spores)
Ready-to-eat, ready-to-reheat fishery products)	Cooked fishery products	Shelled and shucked products of cooked crustaceans, fish and seafood terrines	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y	Y	Y	Y
	Acidified and marinated fishery products	Roll herring, anchovy	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
	Smoked or cured, and other processed products (aw>0.92)	Smoked fish	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y	Y		Y
	Smoked or cured, and other processed products (aw<0.92)	Smoked fish, dried (salted) fish	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y	Y		
	Canned (ambient stable fish)	Canned fish, canned crab															Y	Y	Y

ตาราง ก.1 (ต่อ)

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	Coagulase positive staphylococci	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	Shiga toxin producing <i>E. coli</i> (STEC)	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>Campylobacter</i>	(Pathogenic) <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>Bacillus cereus</i> (vegetative cells or spores)	<i>Clostridium perfringens</i> (vegetative cells or spores)	<i>Clostridium botulinum</i> (vegetative cells or spores)
Fresh produce and fruits	Cut ready-to-eat fruits	Fruit mixes	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y		Y			
	Cut ready-to-eat vegetables	Bagged pre-cut leafy vegetables, salads, shredded carrot	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			
	Produce grown in or in contact with the ground	Potatoes, yams, sweet potatoes, cassava, dahlia, carrots, cruciferous vegetables					Y		Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			
	Sprouts	Soy, fennel, alfalfa, mung	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			
	Raw fruit/vegetable juices (unpasteurized)	Freshly squeezed strawberry juice, smoothies, carrot juice	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			Y
	Leafy greens	Basil, cilantro, green onions, lettuce and parsley				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			
	Vegetables and fruits (unprocessed) not described above	Crops				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			

ตาราง ก.1 (ต่อ)

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	Coagulase positive staphylococci	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	Shiga toxin producing <i>E. coli</i> (STEC)	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>Campylobacter</i>	(Pathogenic) <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>Bacillus cereus</i> (vegetative cells or spores)	<i>Clostridium perfringens</i> (vegetative cells or spores)	<i>Clostridium botulinum</i> (vegetative cells or spores)
Processed fruits and vegetables	Heat-processed fruit/vegetables juices	Pasteurized apple juice	Y						Y	Y	Y						Y	Y	Y
	Canned fruits and vegetables (ambient stable)	Canned pineapples															Y	Y	Y
	Heat-processed vegetables and fruits	Blanched spinach, frozen vegetables blanched	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y
	Fermented/acidified vegetables	Fermented cabbage, pickle	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y
Dried cereals, fruits, nuts, seeds and vegetables	Low and IMF fruits ($a_w < 0.85$)	Syrups, concentrates, jams, semi-dried prunes	Y		Y			Y	Y								Y		
	Seasonings	Spices, herbs, peppers	Y		Y			Y	Y								Y		
	Nuts and seeds	Nuts, nut meats, nut butters, seeds	Y		Y			Y	Y	Y	Y						Y		
	Dried fruits and vegetables ($a_w < 0.60$)	Freeze-dried vegetables	Y		Y				Y	Y	Y						Y		

ตาราง ก.1 (ต่อ)

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	Coagulase positive staphylococci	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	Shiga toxin producing <i>E. coli</i> (STEC)	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>Campylobacter</i>	(Pathogenic) <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>Bacillus cereus</i> (vegetative cells or spores)	<i>Clostridium perfringens</i> (vegetative cells or spores)	<i>Clostridium botulinum</i> (vegetative cells or spores)
Infant formula and infant cereals	Probiotic ingredients	Pre-blend, spray dried, culture powders	Y			Y	Y	Y	Y				Y				Y	Y	
	Non-probiotic ingredients	Dehydrated milk, dehydrated yoghurt, dehydrated berries	Y			Y	Y	Y	Y				Y				Y	Y	
	Non-probiotic infant formula	Whey-based (dairy), soy-based (vegetables) fortification formulation	Y			Y	Y	Y	Y				Y				Y	Y	
	Probiotic infant formula	Whey-based (dairy), soy-based (vegetables) fortification formulation	Y			Y	Y	Y	Y				Y				Y	Y	

ตาราง ก.1 (ต่อ)

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Coagulase positive staphylococci	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogenes	Shiga toxin producing E.coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (vegetative cells or spores)	Clostridium perfringens (vegetative cells or spores)	Clostridium botulinum (vegetative cells or spores)
Chocolate, bakery products and confectionary	Pastries	Bakery products with custard, confectionaries	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
	Dry powdered	Cake mixes	Y		Y			Y	Y	Y	Y						Y		
	Low moisture	Crackers, breads, cookies	Y		Y			Y	Y								Y		
	Dry and sugared low moisture (aw < 0.85)	Cake, pralines, marzipan	Y		Y			Y	Y								Y		
	Dry and sugared low moisture (aw < 0.65)	Biscuits, chocolate, confectionary, honey, sugar, candy syrups	Y		Y			Y	Y								Y		

ตาราง ก.1 (ต่อ)

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Coagulase positive staphylococci	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogenes	Shiga toxin producing E.coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (vegetative cells or spores)	Clostridium perfringens (vegetative cells or spores)	Clostridium botulinum (vegetative cells or spores)
Multi-component foods or meal components	Composite foods with substantial raw ingredients (excluding patisserie)	Refrigerated pasta salads, sandwiches, chocolate mousse, bavaois	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y
	Composite processed foods (cooked)	Hot meals	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y
	Ready to (re)heat food: refrigerated	Cooked chilled foods, boiled rice or pasta, vol-au-	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y

ตาราง ก.1 (ต่อ)

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	<i>Entero- Bacte- riaceae</i>	<i>Esch- erichia coli</i>	Coagu- lase positive stypyllo- cocci	<i>Salmo- nella spp.</i>	<i>Liste- ria spp.</i>	<i>L.mo- nocyto- genase</i>	Shiga toxin produ- cing <i>E.coli</i> (STEC)	<i>Cro- nobacter spp.</i>	<i>Campy- lobacter</i>	(Patho- genic) <i>Yersinia entero- liñica</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Bacillus cereus</i> (vegeta- tive cells or spores)	<i>Clostri- dium perfrin- gens</i> (vegeta- tive cells or spores)	<i>Clostri- dium botuli- num</i> (vegetat- ive cells or spores)
Multi- component foods or meal components	Ready to (re)heat food: ambient stable (canned)	Vol-au- vent in glass bottles															Y	Y	Y
	Ready to (re)heat food: dry	Dehydrat- ed (instant) soups	Y						Y	Y	Y						Y	Y	Y
	Mayonnaise based delicats: (acid) with raw ingredients	Raw vegetable salads with dressing	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y		Y
	Mayonnaise based delicats: (acid) with processed ingredients	Sandwich spreads	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		Y
	Ambient stable acid foods (pH < 4.5)	Ketchup, sauces, dressings, mayou- naises, mustard	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		Y

ตาราง ก.1 (ต่อ)

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Coagulase positive staphylococci	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogenes	Shiga toxin producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (vegetative cells or spores)	Clostridium perfringens (vegetative cells or spores)	Clostridium botulinum (vegetative cells or spores)
Pet food and animal feed	Animal origin ingredients	Meat and bone meal, chicken and feather meal, fish meal, animal digest	Y		Y	Y	Y	Y	Y						Y		Y		
	Plant origin ingredients	Corn meal, soybean meal, vegetables	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Other ingredients	Microbial products such as yeast extracts, probiotics	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Dry food (aw < 0.7)	Pellets, treats	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Wet food (aw > 0.7)	Fresh meat, sausages, croquettes	Y		Y	Y	Y	Y	Y						Y		Y	Y	Y
	Canned	Meat, fish	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Animal feeds (bovine, ovine, pig)	Cereals, flours	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Animal feeds (poultry)	Cereals, flours	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Animal feeds (fish)	Cereals, flours	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		

ตาราง ก.1 (ต่อ)

Categories	Types	Items (some examples)	Total Viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	<i>Enter- Bacte- riaceae</i>	<i>Esch- erichia coli</i>	Coagu- lase positive stypyllo cocci	<i>Sal- monella spp.</i>	<i>Listeria spp.</i>	<i>L.mo- nocyto- genase</i>	Shiga toxin produci- ng <i>E.coli</i> (STEC)	<i>Cro- nobacte- r spp.</i>	<i>Campy- lobacter</i>	(Patho- genic) <i>Yersi- nia entero- litica</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Bacil- lus cereus</i> (vegeta- tive cells or spores)	<i>Clostri- dium perfrin- gens</i> (vegeta- tive cells or spores)	<i>Clostri- dium botuli- num</i> (vegeta- tive cells or spores)
Environmental samples (food or feed production)	Equipment or production environment	Swabs, dusts	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y
	Waters used in the manufacturing process	(Recycled) washing water, process water	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y
Primary production sample (PPS)	Animal faeces	Swab samples (boot socks), faeces rectal							Y			Y		Y	Y				
	Environmental samples and non-faeces	Dust samples, hygiene swabs, water from drinkers, litters, hatchery samples							Y			Y		Y	Y				

ภาคผนวก ข.

ลำดับความนิยมในการเลือกใช้ตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติและตัวอย่างที่เติมเชื้อ ในการศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

ภาคผนวกนี้ ให้ข้อมูลเกี่ยวกับลำดับความนิยมและข้อมูลในการใช้ตัวอย่างที่แตกต่างกัน ทั้งในการศึกษาเปรียบเทียบวิธีและการศึกษาระหว่างห้องปฏิบัติการ

ทางเลือกที่ 1: ตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (Naturally contaminated samples)

ตัวอย่างปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในทางอุดมคติ จะมีระดับการปนเปื้อนเชื้อเป้าหมายใกล้เคียงกับค่า level of detection; LOD (ที่คาดหวัง)

ทางเลือกที่ 2: Contamination by mixture

ถ้าตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ มีเชื้อเป้าหมายปนเปื้อนในระดับที่สูงมาก สามารถลดความเข้มข้นของเชื้อเป้าหมายได้ โดยทำการเจือจางตัวอย่างด้วยอาหารชนิดใกล้เคียงกัน (similar item) ที่มีจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระดับปกติ (normal background microflora) ตัวอย่างที่ผสมกันควรทำให้เข้ากันอย่างทั่วถึง เพื่อให้มีเชื้อเป้าหมายกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอ

ทางเลือกที่ 3: Artificially contaminated samples

จุลินทรีย์เป้าหมายสายพันธุ์ต่างๆ ที่จะนำมาเติมลงในตัวอย่าง ควรเป็นเชื้อที่แยกได้จากอาหารชนิดเดียวกัน (same item) และการเลือกสายพันธุ์ ควรคำนึงถึงความหลากหลายในธรรมชาติของเชื้อเป้าหมายนั้นๆ เช่น serotype, genotype และ phenotype

ระดับของเชื้อเป้าหมาย ควรเป็นตัวแทนของการปนเปื้อนที่มักพบในอาหารนั้นๆ ในธรรมชาติ และอาหารชนิดนั้น ควรจะมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระดับปกติ

ทางเลือกที่ 4: Reference materials

สามารถนำจุลินทรีย์อ้างอิง (reference materials) เช่น certified reference material ที่มีเชื้อเป้าหมายในระดับพอเหมาะและทราบค่า มีความคงตัว แต่อยู่ในภาวะเครียด มาเติมลงในตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ทั้งโดยวิธีเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

สำหรับการศึกษาเชิงคุณภาพ ควรนำ certified reference material มาใช้ เพียงในกรณีที่เชื้ออ้างอิงของจุลินทรีย์เป้าหมายที่แยกจากอาหารหาได้ยาก คือ มีจำนวนสายพันธุ์ หรือจำนวน serotype น้อย

ภาคผนวก ค

วิธีเตรียมตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ด้วยการผสมตัวอย่าง (contamination by mixture) และการเติมเชื้อ (artificial contamination)

ค.1 ข้อกำหนดทั่วไป

การเตรียมตัวอย่างอาหารที่ไม่ได้ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ไม่ได้จำกัดให้ใช้เฉพาะวิธีที่แสดงไว้ในนี้ ในการทำให้ตัวอย่างปนเปื้อนโดยการเติมเชื้อ (artificial contamination) ทำได้ 2 วิธี คือ วิธี seeding และ วิธี spiking สำหรับวิธี seeding เป็นการนำตัวอย่างธรรมชาติมาเติมเชื้อที่เจือจางไว้ แล้วนำตัวอย่างไปเก็บไว้ระยะเวลาหนึ่ง เพื่อให้จุลินทรีย์ปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมของอาหารนั้น ส่วน spiking เป็นการนำจุลินทรีย์ที่เจือจางไปทำให้เกิดสภาวะเครียด (stress) ล้อตามสภาวะจริงของอาหารนั้นๆ แล้วจึงนำไปเติมในตัวอย่างอาหาร ศึกษาวิธี spiking เพิ่มเติมในเอกสารอ้างอิง⁽⁵⁾

ค.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ด้วยวิธีผสมตัวอย่าง Contamination by mixture

นำตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ ตามธรรมชาติจำนวน x กรัม ผสมกับตัวอย่างที่ไม่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ (ชนิดที่สนใจ) จำนวน y กรัม เพื่อเตรียมตัวอย่างที่มีระดับการปนเปื้อนตามต้องการ จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เตรียมแล้วนี้ ไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับอาหารชนิด (item) นั้นๆ อย่างน้อย 1 วันก่อนนำไปวิเคราะห์เชื้อ เพื่อให้จุลินทรีย์ปรับตัวสู่สภาวะสมดุล ในอาหารนั้น

ค.3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอาหารให้ปนเปื้อนจุลินทรีย์ โดยวิธี Seeding

ขั้นตอน seeding มุ่งเน้นให้ตรวจพบเชื้อเป้าหมาย ในจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบตามช่วงสัดส่วนที่ยอมรับ (fractional recovery)

ค.3.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารชนิดความเข้มข้นสูง ด้วยเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

เป็นการเตรียมตัวอย่าง โดยเติมจุลินทรีย์ในอาหารตัวอย่างเดียว (single sample inoculation)

- การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป้าหมาย (Culture target strain): นำจุลินทรีย์ที่ต้องการมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่จำเพาะชนิดเหลว (non-selective enrichment broth) บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์นั้น แล้วนับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น (starting culture)
- การปรับระดับจุลินทรีย์โดยการเจือจาง (Adjust level by dilution): ถ้าจำเป็น หลังการบ่มเพาะเชื้อ เจือจางจุลินทรีย์เริ่มต้นด้วยสารละลายเจือจางที่เหมาะสม จนได้ระดับจุลินทรีย์ที่ต้องการ ระดับการเจือจางขึ้นอยู่กับชนิดอาหาร จุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาศึกษา ระดับจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ต้องการ ปริมาณจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่คาดว่าจะมีอยู่ในอาหาร (background microflora level) และสภาวะการเก็บรักษาอาหาร
- การทำให้จุลินทรีย์เกิดภาวะเครียดด้วยความร้อน (Thermal stress): จุลินทรีย์ที่จะใช้เติมในอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน ควรทำให้เกิดสภาวะเครียดด้วยความร้อนด้วยเช่นกัน เช่น ใช้อุณหภูมิ 50°C นาน 15 นาที ก่อนนำจุลินทรีย์ไปเติมในอาหาร

- d) การเติมจุลินทรีย์ในอาหาร (Inoculation of the food): ปิเปตหรือพ่นจุลินทรีย์ที่ระดับเจือจางที่เลือกไว้ลงในอาหาร โดยต้องทราบปริมาตรของสารแขวนลอยเชื้อที่นำไปเติมหรือพ่น อาจแยกเติมจุลินทรีย์ลงในแต่ละตัวอย่าง หรือเติมจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างรวม แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อน จากนั้นจึงมาแบ่งเป็นแต่ละตัวอย่าง ปริมาตรของจุลินทรีย์ที่จะนำมาเติม ควรใช้น้อยที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ เพื่อไม่ให้มีผลกระทบต่อค่า a_w ในอาหาร โดยทั่วไปใช้ปริมาตรเชื้อ 0.25 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 25 กรัม (1%)
- e) การผสมจุลินทรีย์ให้เป็นให้กระจายตัวทั่วถึงและสม่ำเสมอ (Mix to ensure homogeneity): หลังการเติมเชื้อลงในตัวอย่าง ผสมและคลุกเคล้าอาหารให้ทั่วถึงจนแน่ใจว่าเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าเติมเชื้อในหลายขั้นตอน ควรผสมและคลุกเคล้าตัวอย่าง หลังจากเติมเชื้อในแต่ละขั้นตอน
- f) การทำให้จุลินทรีย์ในตัวอย่างคงตัวภายใต้สภาวะเครียด (Sample stabilization/stress): เก็บตัวอย่างอาหารที่อุณหภูมิปกติที่ใช้เก็บอาหารนั้น แต่ควรคำนึงถึงการเจริญหรือการอยู่รอดของจุลินทรีย์ระหว่างเวลาที่เก็บ เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิที่ใช้เก็บมีความแตกต่างกัน เก็บอาหารที่เติมเชื้อแล้วนานอย่างน้อยตามระยะเวลาต่อไปนี้

- 1) อาหารแช่แข็ง: อย่างน้อย 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ -20°C
- 2) เก็บแช่เย็น: อย่างน้อย 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ $2 - 8^{\circ}\text{C}$
- 3) เก็บอุณหภูมิห้อง: อย่างน้อย 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ $20 - 25^{\circ}\text{C}$

ตัวอย่าง เช่น nutmeat ควรเก็บที่อุณหภูมิห้อง น้ำส้มเก็บที่อุณหภูมิ $2 - 8^{\circ}\text{C}$ และไอศกรีมเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

- g) การทวนสอบระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ (Verification of contamination level): ถ้าจำเป็นให้ตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์หลังจากเก็บตัวอย่างในระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำให้เชื้อคงตัว

ค.3.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารชนิดความชื้นต่ำที่ไม่ได้ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ โดยใช้จุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็ง (lyophilized culture)

- a) การเตรียมจุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็ง (prepare a lyophilized culture): เติมจุลินทรีย์ที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดเหลว (non-selective enrichment broth) บ่มเพาะเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม หลังการบ่มทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียด้วยการนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifugation) และล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเจือจางบัฟเฟอร์ปราศจากเชื้อ ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วทิ้งส่วนที่เป็นของเหลว และละลายตะกอนเชื้อด้วย 10% NFDM (non-fat dried milk) หรือ นมผงไม่มีไขมันปราศจากเชื้อ ใส่สารแขวนลอยเชื้อในภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการทำจุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็ง
- b) การประเมินระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เป้าหมาย (Assess level of target organism): ใส่จุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็งในภาชนะปราศจากเชื้อ ทำการบดเชื้อให้เป็นผงละเอียดและเป็นเนื้อเดียวกัน ตรวจหาระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ด้วยวิธีที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่จำเพาะ และบ่มจานเพาะเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญ
- c) การเติมจุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็งในอาหารให้ได้ระดับที่ต้องการ: ผสมจุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็ง 0.1 กรัม กับตัวอย่างอาหารที่ไม่ปนเปื้อนเชื้อเป้าหมาย 10 กรัมในภาชนะ เช่น ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เขย่าจนจุลินทรีย์กระจายในอาหารทั่วถึงกัน ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilutions โดยใช้ตัวอย่างอาหาร (เช่น ใช้ 1 กรัมจากขั้นตอนแรกรวมกับอาหาร 9 กรัม เป็นต้น) เพื่อให้ได้ระดับการปนเปื้อนที่เหมาะสม ต้องแน่ใจว่าได้ผสมเชื้อกับอาหารอย่างเหมาะสมในแต่ละระดับการเจือจาง

- d) การเก็บตัวอย่างอาหารที่อุณหภูมิเหมาะสม (ควรเก็บที่อุณหภูมิปกติที่ใช้เก็บอาหารนั้น) ปั่นทิ้งไว้เพื่อให้จุลินทรีย์ในอาหารเข้าสู่สภาวะสมดุลนานอย่างน้อย 2 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้
- e) การทวนสอบระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ (Verification of contamination): ถ้าจำเป็น การตรวจสอบระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์สามารถทำได้หลังจากตัวอย่างผ่านการเก็บไว้ในเวลาที่เหมาะสม

ค.4 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอาหารให้ปนเปื้อนจุลินทรีย์ โดยวิธี Spiking

- a) การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป้าหมาย (Culture target strain): นำจุลินทรีย์ที่ต้องการใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดเหลว (non-selective enrichment broth) บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์
- b) การปรับระดับจุลินทรีย์โดยการเจือจาง (Adjust level by dilution): หลังการบ่ม เจือจางจุลินทรีย์เริ่มต้นด้วยสารละลายเจือจางที่เหมาะสม จนได้ระดับจุลินทรีย์ที่ต้องการ ในขั้นตอนการทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บปกติใช้เชื้อบริสุทธิ์เข้มข้น $10^4 - 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- c) ขั้นตอนการทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บ (Apply an injury protocol): ใช้วิธีการที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่างที่ 1 การใช้ความร้อน (เช่น เวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 50°C) โดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

ตัวอย่างที่ 2 การแช่แข็ง (เช่น เก็บนาน 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ -20°C)

ตัวอย่างที่ 3 การใช้สารเคมี (เช่น ใช้ความเข้มข้นเกลือสูง หรือ pH ต่ำ)

ตัวอย่างที่ 4 การเก็บที่อุณหภูมิ 4°C (เช่น เก็บนานอย่างน้อย 1 สัปดาห์)

สภาวะที่ใช้ในการทำให้จุลินทรีย์เครียดขึ้นอยู่กับประเภทจุลินทรีย์ และสายพันธุ์ที่เลือก วิธีการทำให้จุลินทรีย์เครียด ควรเลือกวิธีการที่เลียนแบบสภาวะความเครียดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารที่ใช้ทดสอบ

- d) การวัดอาการบาดเจ็บของจุลินทรีย์ (Injury measurement): ประเมินโดยการนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agar) กับอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดแข็ง (non-selective agar) ถ้าจำนวนเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดแตกต่างกันมากกว่า $0.5 \log_{10} \text{CFU/ml}$ แสดงว่าจุลินทรีย์มีสภาวะเครียดเพียงพอที่จะนำไปใช้ทดสอบ
- e) การปรับระดับจุลินทรีย์โดยการเจือจาง (Adjust level by dilution): ถ้าจำเป็น หลังการบ่มเพาะเชื้อเจือจางจุลินทรีย์เริ่มต้นด้วยสารละลายเจือจางที่เหมาะสม จนได้ระดับจุลินทรีย์ที่ต้องการให้ปนเปื้อนในอาหาร
- f) การเติมจุลินทรีย์ในอาหาร (Inoculation of the food): ปิเปตหรือพ่นจุลินทรีย์ที่ระดับเจือจางที่เลือกไว้ลงในอาหาร โดยต้องทราบปริมาตรของสารแขวนลอยเชื้อที่นำไปเติมหรือพ่น ควรแยกเติมจุลินทรีย์ลงในแต่ละตัวอย่าง ปริมาตรของจุลินทรีย์ที่เติมควรน้อยที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ เพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบกับค่าปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ในอาหาร โดยทั่วไปใช้ปริมาตรเชื้อ 0.25 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 25 กรัม (1%)
- g) การผสมจุลินทรีย์ให้เป็นเนื้อเดียวกันกับอาหาร (Mix to ensure homogeneity): หลังการเติมเชื้อตัวอย่าง ผสมและคลุกเคล้าอาหารให้ทั่วถึงจนแน่ใจว่าเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าเติมเชื้อในหลายขั้นตอน ควรผสมและคลุกเคล้าตัวอย่างหลังจากเติมเชื้อในแต่ละขั้นตอน

ภาคผนวก ง.

การคำนวณค่า RLOD โดยใช้ข้อมูลจากการศึกษาเปรียบเทียบวิธี

ง.1 ข้อกำหนดทั่วไป

Level of Detection (LOD) เป็นระดับการปนเปื้อนต่ำสุด ที่เชื่อถือได้ว่าจะตรวจพบจุลินทรีย์ ตามเอกสาร ISO 16140 ใช้ค่า LOD₅₀ ซึ่งหมายถึง ระดับการปนเปื้อนที่คาดหวังว่าจะพบตัวอย่างที่ให้ผลบวก 50% ค่า RLOD เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า LOD ของวิธีทางเลือก กับค่า LOD ของวิธีอ้างอิง วิธีการหาค่า RLOD มิได้ขึ้นอยู่กับระดับการปนเปื้อนที่ให้ผลบวกที่เลือกมาศึกษา

ตาราง ง.1 เป็นตัวอย่างข้อมูลที่ต้องการ เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณค่า LOD และ RLOD ซึ่งประกอบด้วย

- ระดับการปนเปื้อน (levels of contamination)
- จำนวน replicate ที่ทำการทดสอบ (n_{tot})
- จำนวนผลบวกของวิธีอ้างอิง ($n_{pos\ ref}$)
- จำนวนผลบวกของวิธีทางเลือก ($n_{pos\ alt}$)

จำนวนผลบวก อธิบายได้ด้วย binomial distribution ส่วนจำนวนเชื้อในหน่วย cfu/test portion ซึ่งเป็นปริมาณเชื้อจริงที่นำมาตรวจวิเคราะห์ อธิบาย (โดยทางทฤษฎี) ได้ด้วย Poisson distribution

ตาราง ง.1 ตัวอย่างข้อมูลที่ต้องการ ในการคำนวณค่า LOD และ RLOD

กลุ่มตัวอย่าง (category)	ระดับที่ ของการ ปนเปื้อน	x (cfu/g)	n_{tot}	$n_{pos\ ref}$	$n_{pos\ alt}$
Milk and Dairy products	1	(negative control) 0	5	0	0
	2	0.0224	20	12	10
	3	0.3733	5	5	5

ค่า LOD และ RLOD คำนวณจากข้อมูล จำนวนผลบวก และจำนวนเชื้อ cfu/test portion

การคำนวณทำได้ด้วย Excel[®] spreadsheet ของ ISO 16140-2:2016

โดยดาวน์โหลดได้ที่ <http://standards.iso.org/iso/16140> แล้วเลือก RLOD file

- จะพบคำอธิบายการใช้ RLOD calculation program
- กรอกข้อมูลลงในตาราง และเลือก unknown concentration ที่ drop-down menu
- กด compute RLOD เพื่อให้โปรแกรมทำการคำนวณ

ตัวอย่างการคำนวณค่า RLOD

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
RLOD calculation program - version 3, 2015-08-15.														
This Excel program computes the relative level of detection (RLOD) of two measurement methods. This program is distributed in the hope that it will be useful, but without any warranty. It can be downloaded at: www.wiwiiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich/index.html where you can also subscribe to a newsletter informing about available updates. It requires Excel 2003 (Version 11) or younger versions. For assistance, contact wilrich@wiwiiss.fu-berlin.de To start using the program, select the sheet called "DataSheet". The first part of the header section (grey bar covering the first two lines of the sheet) consists of fields for general information about the experiment: - Date: date of the experiment - Name: name of the experiment - Sample size: size of the examined probes (in g or ml) - # matrices: number of analyzed matrices. When increasing this number, the already entered data is not affected. When decreasing this number, matrices (including data) will be removed. - # samples: maximum number of analyzed concentration levels for one matrix. When modifying this number, the already entered data will be deleted. Drop-down menu From the available drop-down menu, the correct type of input data needs to be selected: - Known concentrations: the sample concentrations need to be introduced in the first column of each input matrix (yellow) - Known dilution factors: the first column of each input matrix needs to contain the dilution factors - Unknown concentrations: the first column of each input matrix needs to contain the concentration levels (1, 2, 3, ...) Data Input The header of the input matrices should contain the name of the analyzed material in order to be able to match the results with the data. - CFU concentration / Dilution factor / Level: the first column of the data needs to be filled according to the input data type chosen in the drop-down menu. - n1: number of samples analyzed with reference method (method1) - n2: number of samples analyzed with alternative method (method2) - y1: number of positive results obtained with reference method (method1) - y2: number of positive results obtained with alternative method (method2) Buttons - Compute RLOD: starts the RLOD computation - Clear Results: clears all the result fields - Clear Input: clears all the input fields Results - RLOD: the estimated relative level of detection value - RLODU: the upper limit of the 95% confidence interval for RLOD - RLODL: the lower limit of the 95% confidence interval for RLOD - b=ln(RLOD): logarithm of the RLOD value - sd(b): standard deviation of b - z-Test statistic: absolute value of the test statistic of the z-Test with the null hypothesis $H_0: b=0$ - p-value: p-value of the z-Test The computed RLOD is the ratio of LOD of method 2 (alternative method) to LOD of method 1 (reference method): if the obtained RLOD value is larger than one, then the LOD of alternative method is larger than LOD of the reference method, thus the alternative method is less sensitive than the reference method, and vice versa.														

Date:	d/m/yy	Name:	<description>		
Sample size:	375	# matrices:	3	# samples:	3
Name: <milk1>					
Level	n₁	n₂	y₁	y₂	
0.32	20	20	4	6	
2	5	5	5	5	
Name: <milk2>					
Level	n₁	n₂	y₁	y₂	
1.8	20	20	18	15	
18	5	5	5	5	
Name: <milk3>					
Level	n₁	n₂	y₁	y₂	
0.022	20	20	12	10	
0.037	5	5	5	5	

Unknown concentrations ▼		Compute RLOD		Clear Results		Clear Input	
Name	RLOD	RLODL	RLODU	b=ln(RLOD)	sd(b)	z-Test statistic	p-value
<milk1>	0.626	0.171	2.285	-0.469	0.648	0.724	1.531
<milk2>	1.661	0.741	3.724	0.507	0.404	1.257	0.209
<milk3>	1.322	0.549	3.186	0.279	0.440	0.635	0.526
Combined	1.150	0.691	1.914	0.140	0.255	0.549	0.583

ภาคผนวก จ.

การพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับทดสอบ Inclusivity และ Exclusivity

จ.1 ข้อกำหนดทั่วไป

ภาคผนวกนี้กล่าวถึงข้อกำหนดทั่วไปขั้นต่ำสุด ในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่จะนำมาทดสอบ **Inclusivity** และ **Exclusivity** สายพันธุ์ส่วนใหญ่ต้องเป็นเชื้อที่แยกได้จากกลุ่มตัวอย่าง (categories) ที่ทำการทดสอบในการศึกษานั้น และต้องครอบคลุมขอบเขตที่กำหนดของเชื้อเป้าหมาย ได้แก่ ความหลากหลายของคุณลักษณะของเชื้อ เช่น คุณลักษณะทางชีวเคมี serotype phage type การกระจายทางภูมิศาสตร์ อุบัติการณ์ของเชื้อ และการกล่าวอ้าง (claims) อื่นใดของผู้ผลิตคิดค้นวิธีทางเลือก

จ.2 กลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมาย

- กลุ่มที่ไม่ระบุชนิดจุลินทรีย์ เช่น total count, coliforms, yeast, lactic acid bacteria
- family เช่น Enterobacteriaceae
- genus เช่น *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Listeria*
- species เช่น *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*;
- Serotype หรือ phage type เช่น *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

จ.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์เป้าหมายสำหรับทดสอบ Inclusivity

- a) กลุ่มที่ไม่ระบุชนิดจุลินทรีย์: ต้องคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากเชื้อจำพวกที่สามารถแสดง typical growth ด้วยวิธีอ้างอิง
- b) families: ใช้จุลินทรีย์ genera ต่างๆ ใน family นั้น และหากเป็นไปได้ ให้เลือกตัวแทนหนึ่งสายพันธุ์จากแต่ละ genera ใน family นั้น
- c) genera: ใช้จุลินทรีย์ species ต่างๆ ใน genus นั้น และหากเป็นไปได้ ให้ทดสอบกับ species ในแต่ละ genus ให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้
- d) species: ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ จาก species นั้น และการคัดเลือกสายพันธุ์จำเป็นต้องพิจารณาถึง วิธีการต่างๆ สำหรับ subtyping ด้วย เช่น *Salmonella* และ *Listeria* ถูกจำแนกโดย serotype และ phage type ในอนาคตอาจมีการคัดเลือกด้วยวิธีการ typing อื่นๆ (เช่น genetic) ในการกำหนดสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกที่จะนำมาใช้ ห้องปฏิบัติการหลัก (organizing laboratories) ควรใช้ข้อมูลที่เป็นปัจจุบัน เพื่อให้มั่นใจว่าสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกที่จะเลือกใช้นั้น มีความเกี่ยวข้องกับกลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมาย ในช่วงเวลาที่ศึกษา
- e) sero หรือ phage specific strains: ใช้จุลินทรีย์ serotype หรือ phage type นั้นๆ จากแหล่งที่มาต่างๆ

จ.4 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายสำหรับทดสอบ Exclusivity

- a) กลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย (non-target group) คาดว่าให้ผลลบ และใช้สำหรับการทดสอบ ปฏิกริยาข้าม (cross reactivity) ควรกำหนดตามกลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมาย (target group)
- b) กรณีที่กลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมายเป็น 1 family: สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย ต้องรวมถึง families อื่น

ที่มีความใกล้เคียงกัน

- c) กรณีที่กลุ่มเป้าหมายเป็น 1 genus: สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย ต้องรวมถึง genera อื่นที่มีคุณลักษณะทางชีวเคมี หรือทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกับ genus เป้าหมาย
- d) กรณีที่จุลินทรีย์เป้าหมายเป็น 1 species: สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย ต้องรวมถึง species อื่นที่อยู่ใน genus เป้าหมาย
- e) กรณีที่กลุ่มเป้าหมายเป็น sero หรือ phage specific: สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย ต้องรวมถึง serotype หรือ phage type อื่นๆ ที่อยู่ใน species เดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva; 2017.
2. ISO 16140-2:2016 (E). Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva; 2016.
3. ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods. Geneva; 2003.
4. ISO 11133:2014/AMD 1:2018. Microbiology of food, animal feeding and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media. Geneva; 2018.
5. JASSON. V., UYTENDAELE, M., RAJKOVIC, A., DEBEVERE, J. Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 to serve method performance testing. Int. J. Food Microbiol. 2007, 118 (3) pp. 241-249.