ว กรมวิทย พ 2566; 65 (2): 114-124

การเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐานแห้งแบบแช่เยือกแข็งและการควบคุมคุณภาพ

กมลวรรณ กันแต่ง อัจฉรา อยู่คง และ กนกชน สุภาพรหม
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยามีการนำจุลินทรีย์มาตรฐานมาใช้ควบคุมคุณภาพ เพื่อให้ผลการทดสอบที่ได้มีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ ก่อนนำจุลินทรีย์มาตรฐานมาใช้งานต้องผ่านการทดสอบความบริสุทธิ์และคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งขั้นตอนการปฏิบัติงานต้องใช้ระยะเวลา 2-7 วัน ขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละชนิด ดังนั้นเพื่อลดขั้นตอนและระยะเวลาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาการเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐานแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบที่สามารถนำมาละลายใช้งานได้ทันที โดยใช้ 10% skim milk ผสมกับจุลินทรีย์มาตรฐานบรรจุในขวดแก้ว นำเข้ากระบวนการการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และเก็บรักษาในที่มืดที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส โดยทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันที่ 3 สัปดาห์ต่อมา จากนั้นทดสอบความคงตัวทุกสัปดาห์ พบว่าเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* มีความคงตัวนาน 12 และ 16 สัปดาห์ ตามลำดับ โดยใช้เกณฑ์ไม่เกิน 0.5 $\log_{10}$ ที่คงความบริสุทธิ์และคุณสมบัติทางชีวเคมีได้อย่างครบถ้วน เชื้อที่เตรียมได้นี้สามารถพัฒนาเป็นจุลินทรีย์มาตรฐาน เพื่อให้ห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนที่มีความต้องการใช้เชื้อมาตรฐานสำเร็จรูปในการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการต่อไป อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เรื่อง สถานะของการขนส่งและสารที่ทำให้เชื้อมีความคงตัว เพื่อพัฒนาคุณภาพของจุลินทรีย์มาตรฐานแห้งแบบแช่เยือกแข็งให้มีมาตรฐานตามข้อกำหนด ISO Guide 35:2017 (Reference materials-guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability)

คำสำคัญ: การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจุลินทรีย์มาตรฐาน, การควบคุมคุณภาพ, ความเป็นเนื้อเดียวกัน, ความคงตัว

Corresponding author E-mail: kamonwan.k@dmsc.mail.go.th

Received: 18 January 2023 *Revised: 6 June 2023* *Accepted: 15 June 2023*

บทนำ

การควบคุมคุณภาพ (quality control; QC) เป็นกระบวนการที่ใช้ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างของห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ผลการทดสอบที่ได้มีความแม่น (accuracy) ความเที่ยง (precision) และน่าเชื่อถือ (reliability) ดังนั้น การควบคุมคุณภาพจึงสำคัญสำหรับการทดสอบของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ การควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control; IQC)[1] และการควบคุมคุณภาพภายนอก (external quality control)[2]

การควบคุมคุณภาพภายในเป็นกระบวนการในการตรวจสอบการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างของห้องปฏิบัติการ เพื่อควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ เฝ้าระวังการทดสอบ การถ่ายโอนข้อมูล การสุ่มตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่าง การรายงานผลการวิเคราะห์ และปรับปรุงการปฏิบัติงานในแต่ละขั้นตอน ให้ได้มาซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ ซึ่งแผนควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการประกอบด้วย การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (validation of analytical method หรือ method validation) การทวนสอบวิธี (method verification) และการควบคุมคุณภาพสม่ำเสมอ (routine quality control) การควบคุมคุณภาพการทดสอบทำโดยการตรวจวิเคราะห์ซ้ำ (duplicate analysis) ซึ่งเป็นการประเมินความเที่ยงของการวิเคราะห์ ตรวจตัวอย่างเดียวกันสองซ้ำ (2 subsample) อย่างน้อยร้อยละ 5 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจในแต่ละครั้งของการวิเคราะห์ (test run) ซึ่งเป็นการตรวจสอบความสามารถของนักวิเคราะห์ในการตรวจหาเชื้อเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณในตัวอย่าง ว่าให้ผลใกล้เคียงหรือเหมือนกัน ส่วนการเติมเชื้อจุลินทรีย์ (spike sample) ที่ทราบปริมาณเป็นการตรวจสอบความแม่นของการวิเคราะห์ตัวอย่าง การตรวจสอบความถูกต้องระหว่างดำเนินการทดสอบโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานเป็น positive control และ negative control เป็นการควบคุมกระบวนการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งรวมถึงการเตรียมตัวอย่าง ผู้ทดสอบ อาหารเลี้ยงเชื้อ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ และการรายงานผลว่าถูกต้องหรือไม่ เพื่อนำไปใช้ในการประกันคุณภาพผลการทดสอบ[1]

การควบคุมคุณภาพภายนอกเป็นการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์จากหน่วยงานภายนอก เพื่อให้เกิดความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ โดยการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการหรือการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นข้อกำหนดของหน่วยงานที่ให้การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025[2] การควบคุมภาพทั้งภายในและภายนอกมีการนำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานมาใช้ควบคู่กับการปฏิบัติงานหรือการทดสอบเสมอ

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหารใช้เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานที่เก็บรักษาไว้ในรูปแบบของ reference stock cryobeads หรือ 15% glycerol broth ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า[3] ส่วน stock culture หรือ working culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดแข็งเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้งานต้องมีการนำเชื้อถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ส่วนยีสต์และราใช้เวลาบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ 5-7 วัน[4] ผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาการเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐานแห้งแบบแช่เยือกแข็งใช้ในการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถลดระยะเวลาและขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยละลายด้วย buffer peptone water (BPW) แล้วใช้งานได้ทันทีและสามารถทราบค่าปริมาณเชื้อตั้งต้นต่อมิลลิลิตรของสารละลายที่ละลายได้ เพื่อง่ายต่อการเจือจางในระดับที่ต้องการใช้งานต่อไป การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้เชื้อ *Escherichia coli* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ และ *Staphylococcus aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้ควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการ

วัสดุและวิธีการ

จุลินทรีย์มาตรฐาน

จุลินทรีย์มาตรฐานใช้ควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ เป็นจุลินทรีย์จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นำมาเก็บ

เป็น reference stock ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร โดยเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็งแบบพิเศษ (deep freezer) (Haier รุ่น DW-86L 728D, China) อุณหภูมิต่ำกว่า -70 องศาเซลเซียส จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *E.coli* DMST 24373 Lot. Es63085 และ *S. aureus* DMST 8013 Lot. St63041

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilizer; Martin Christ, รุ่น EPSILON 2-10D LSCplus, Germany), เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave; Getinge getting group, รุ่น GE L600 series, Sweden), เครื่องนับโคโลนี (colony counter; model 3328, USA), ตู้อบเพาะเชื้อ 35±1°C (incubator; SANYO, รุ่น MIR 252, Japan), ตู้อบเพาะเชื้อ 36±1°C (SANYO, รุ่น MIR 553, Japan), กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา (microscope; Leica, Germany), อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ 47±2°C (water bath; MEMMERT, Germany), เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.1 และ 0.01 กรัม (electronic balance; Sartorius, รุ่น BP2100, Germany), เครื่องผสม (vortex mixer; LABNET, รุ่น VX100, USA), ขวดแก้วฝาเกลียว (glass bottle with screw cap; Schott, Germany), หลอดทดลอง (test tube, Kimble, Mexico), จานเพาะเชื้อ (petri dishes) ขนาด 15×90 มิลลิเมตร หรือ 15×100 มิลลิเมตร, (Micro QA, China), ปิเปต 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร (pipette; Witeg, Germany), loop และ needle เขี่ยเชื้อ, glass slide, hot plate with magnetic stirrer (Stuart , USA), automatic pipette step volume (BrandTech, Germany), Tip (Axygen, China), ถาด stainless สำหรับบรรจุขวดแก้ว (vial), จุกยางและฝาอะลูมิเนียมพร้อมที่ปิดฝาอะลูมิเนียม

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Brain heart infusion broth (BHI; Oxoid, England), Tryptic Soy Agar (TSA) (Scharlau, Spain) และ Buffered Peptone Water (BPW; Scharlau, Spain) วัตถุดิบสำหรับการทำแห้ง ได้แก่ 10% skim milk (Oxoid, England) การตรวจวิเคราะห์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ : Plate Count Agar (PCA) (Scharlau, Spain) *E. coli*: Levine eosin methylene blue (L-EMB) agar (Scharlau, Spain), tryptone broth, methyl red-Voges Proskauer broth (MR-VP), Simmons citrate agar และ lauryl sulphate tryptose broth (LST) (Oxoid, England) ส่วน *S. aureus*: Baird-Parker (BP) Agar (Scharlau, Spain), Brain heart infusion broth (BHI) (Oxoid, England), coagulase rabbit plasma with EDTA (BBL, USA)

น้ำยาและสารเคมี

Gram stain reagents (BIOTECH, Biotech reagent co., Ltd., Thailand), Kovacs' reagent (Scharlau, Spain) สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) 0.1% peptone water (Oxoid, England), 10% skim milk ในขวดแก้ว ปริมาตร 400 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (อุณหภูมิและเวลาที่ใช้อ้างอิงตามบริษัทผู้ผลิตกำหนด) ตรวจสอบการปนเปื้อนหลังการฆ่าเชื้อ ผลจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่า 1 cfu ต่อมิลลิลิตร

การเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐานโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและการแบ่งบรรจุ

เตรียมจุลินทรีย์มาตรฐาน ทดสอบความบริสุทธิ์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อโดยนำจุลินทรีย์มาตรฐานภายในห้องปฏิบัติการที่อยู่ในรูปของ reference stock ขีด (streak) บน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีบริสุทธิ์ (purity) คือ เชื้อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวและมีลักษณะเดียวกันทั้งจานเพาะเชื้อ จากนั้นเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวลงในหลอด BHI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ควบคู่ไปการ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งของเชื้อแต่ละชนิดและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะ

ซึ่งต้องให้ลักษณะโคโลนีเฉพาะ (typical colony) และผลการตรวจยืนยันตรงตามวิธีการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์แต่ละชนิด

การเตรียมเชื้อ *E. coli* โดย streak ลงบน L-EMB agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีแบนและมีสีดำตรงกลาง มีหรือไม่มี metallic sheen นำไปทดสอบทางชีวเคมีดังนี้ ดูลักษณะ รูปร่าง และการติดสีแกรม *E. coli* เป็นแบคทีเรียท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ, tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48±2 ชั่วโมง, MR-VP broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง และบ่มต่ออีก 48±2 ชั่วโมง, Simons citrate agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง และ LST บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48±2 ชั่วโมง

การเตรียมเชื้อ *S. aureus* โดย streak ลงบน PB agar บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 45-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีกลม นูน ผิวเรียบ สีเทาถึงดำ ขนาด 2-3 มิลลิเมตร รอบโคโลนีมีโซนขุ่นล้อมรอบด้วยโซนใส นำไปทดสอบทางชีวเคมีดังนี้ ดูลักษณะ รูปร่าง และการติดสีแกรม *S. aureus* เป็นแบคทีเรียรูปกลม ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก เขี่ยโคโลนีลักษณะเฉพาะลงใน BHI บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เติม coagulase rabbit plasma with EDTA ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส สังเกตการเกิดลิ่ม (clot) เป็นระยะ ๆ ภายใน 6 ชั่วโมง

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI มานับจำนวน โดย *E. coli* มีปริมาณเชื้อตั้งต้น 2.9×10^9 cfu/ml และ *S. aureus* มีปริมาณเชื้อตั้งต้น 2.2×10^9 cfu/ml เติม *E. coli* DMST 24373 (ชุดที่ 1) และ *S. aureus* DMST 8013 (ชุดที่ 2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน 10% skim milk ปริมาตร 395 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้แท่งกวน (magnetic stirrer) ตลอดเวลาขณะแบ่งบรรจุ แบ่งบรรจุใน vial ปริมาตรขวดละ 2 มิลลิลิตร ชุดละ 150 ขวด ปิดฝาขวดด้วยจุกยางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยปิดแบบหลวม ๆ เพียงครึ่งหนึ่งของความยาวทั้งหมดของจุกยาง นำไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งในเครื่องระเหิดให้แห้งด้วยความเย็น (lyophilizer) โดยใช้โปรแกรมและสภาวะเดียวกัน ตั้งโปรแกรมกำหนดให้อุณหภูมิแช่แข็งเท่ากับ -30 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นขั้นปฐมภูมิของกระบวนการทำให้แห้ง (primary drying process) ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วปรับอุณหภูมิเป็น 0 องศาเซลเซียส ความดันเท่ากับ 1.65 mbar นาน 18 ชั่วโมง และขั้นทุติยภูมิของกระบวนการทำให้แห้ง (secondary drying process) ปรับอุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส ความดันเท่ากับ 1.65 mbar นาน 4 ชั่วโมง เมื่อกระบวนการทำให้แห้งเสร็จสมบูรณ์ทำการปิดฝาขวดด้วยจุกยางให้สนิท นำออกมาปิดทับด้วยฝาอลูมิเนียม ปิดหมายเลขบนขวดจุลินทรีย์มาตรฐานที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เรียงลำดับตามการเตรียม เก็บใส่กล่องที่มีฝาปิดสนิท ทนการกระแทก เก็บรักษาในที่มืดอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และนำออกมาทดสอบความคงตัวเป็นระยะ ๆ ทุกสัปดาห์

การสุ่มตัวอย่าง

สุ่มขวดเชื้อที่เตรียมได้แบบสุ่มอิสระ (random sampling) โดยใช้โปรแกรมจากเว็บไซต์ https://www.randomizer.org[5]

การทดสอบและวิธีวิเคราะห์

ละลายตัวอย่างด้วย BPW ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางตัวอย่างตามลำดับ ๆ ละ 10 เท่า จนถึงลำดับที่ต้องการ ปิเปตตัวอย่างที่แต่ละระดับการเจือจาง 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ 2 จาน (duplicate) เท PCA 12-15 มิลลิลิตร ผสมให้ตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเนื้อเดียวกันทั่วทั้งจาน ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งแล้วคว่ำจาน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อปริมาตรตาม APHA 2015[6,7] สำหรับ *S. aureus* เลือกโคโลนีนำมาย้อมสีแกรมและ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ BP agar บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โคโลนีลักษณะเฉพาะ คือ มีสีเทาดำและโซนทึบ นำไปทดสอบ coagulase test ตาม FDA BAM Online. 2016 (Chapter 12)[8] ส่วน *E. coli* เลือกโคโลนีนำมาย้อมสีแกรมและ streak ลงบนอาหาร

เลี้ยงเชื้อจำเพาะ L-EMB agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โคโลนีลักษณะเฉพาะ คือ แบนและมีสีดำตรงกลาง มี metallic sheen นำไปทดสอบทางชีวเคมี (tryptone broth, MR-VP, Simmons citrate agar; IMViC test และ LST) ตาม FDA BAM Online. 2020 (Chapter 4)[9]

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test)

สุ่มขวดเชื้อที่จัดเตรียมไว้ จำนวน 11 ขวด[10] ตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ ขวดละ 2 ซ้ำ (repeatability) ด้วยวิธี APHA 2015[6,7] โดยห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017[2] จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขทะเบียน 4043/50 ทดสอบความแปรปรวนภายในของเชื้อแต่ละขวด โดยใช้ Cochran's test จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณทางสถิติตาม ISO 13528:2022[11] และ ISO Guide 35:2017[10] โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one way ANOVA single factor for homogeneity test ได้ค่า mean squre between ($M_{between}$) และ mean squre within (M_{within}) คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างขวดตัวอย่าง the between-unit standard deviation (S_{bb}) โดยใช้สูตร:

$$S_{bb} = \frac{M_{between} - (M_{within})}{n_o}$$

*n_o = จำนวนของการทำซ้ำ ($n_o = 2$)

โดยใช้เกณฑ์ยอมรับ คือ S_{bb} ควรมีค่าน้อยกว่า $0.3S_{IR}$ (ค่า S_{IR} เท่ากับ 0.118 ได้มาจากการหาค่า interlaboratory reproducibility standard deviation (S_R) ของ technique uncertainty[12] ด้วยวิธี APHA 2015[6,7] ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร) และมีการนำ F test เพื่อเปรียบเทียบค่า F_{cal} น้อยกว่า F_{crit} มาพิจารณาร่วม

การทดสอบความคงตัว (stability test)

โดยสุ่มขวดเชื้อซึ่งเก็บรักษาในที่มืดอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นำมาวิเคราะห์หลังจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว 2 สัปดาห์ โดยใช้วิธีการทดสอบเดียวกันกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการทดสอบความคงตัวทุกสัปดาห์ๆ ละ 3 ขวดๆ ละ 2 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบความคงตัวในแต่ละสัปดาห์เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความป็นเนื้อเดียวกันในหน่วย $\log_{10}$ โดยเกณฑ์การยอมรับ คือ ค่าสัมบูรณ์ของผลต่างของค่าเฉลี่ยผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ($|mean_{homo} - mean_{sta}|$) มีค่าน้อยกว่า 0.5 $\log_{10}$[13] และยุติการทดสอบเมื่อผลการทดสอบความคงตัวมีค่าผลต่างมากกว่า 1.0 $\log_{10}$

ผล

เชื้อจุลินทรีย์ผสม 10% skim milk ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีลักษณะทางกายภาพเป็นก้อนสีขาวนวลแห้ง อัดแน่น ไม่มีรูพรุน เมื่อนำมาบดพบเป็นเนื้อละเอียดลักษณะคล้ายนมผง ตรวจสอบการละลาย พบว่าในระยะเวลา 0-3 เดือน มีความสามารถในการละลาย BPW ได้ดีภายใน 1 นาที หลังจากละลายมีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นสีขาวเป็นเนื้อเดียวกัน แต่หลังจาก 3 เดือน การละลายต้องอาศัยการใช้เครื่องผสม (vortex mixer) ร่วมด้วยและมีลักษณะของตะกอนหรือผลึกสีขาวเล็กน้อยในของเหลวขุ่นสีขาว

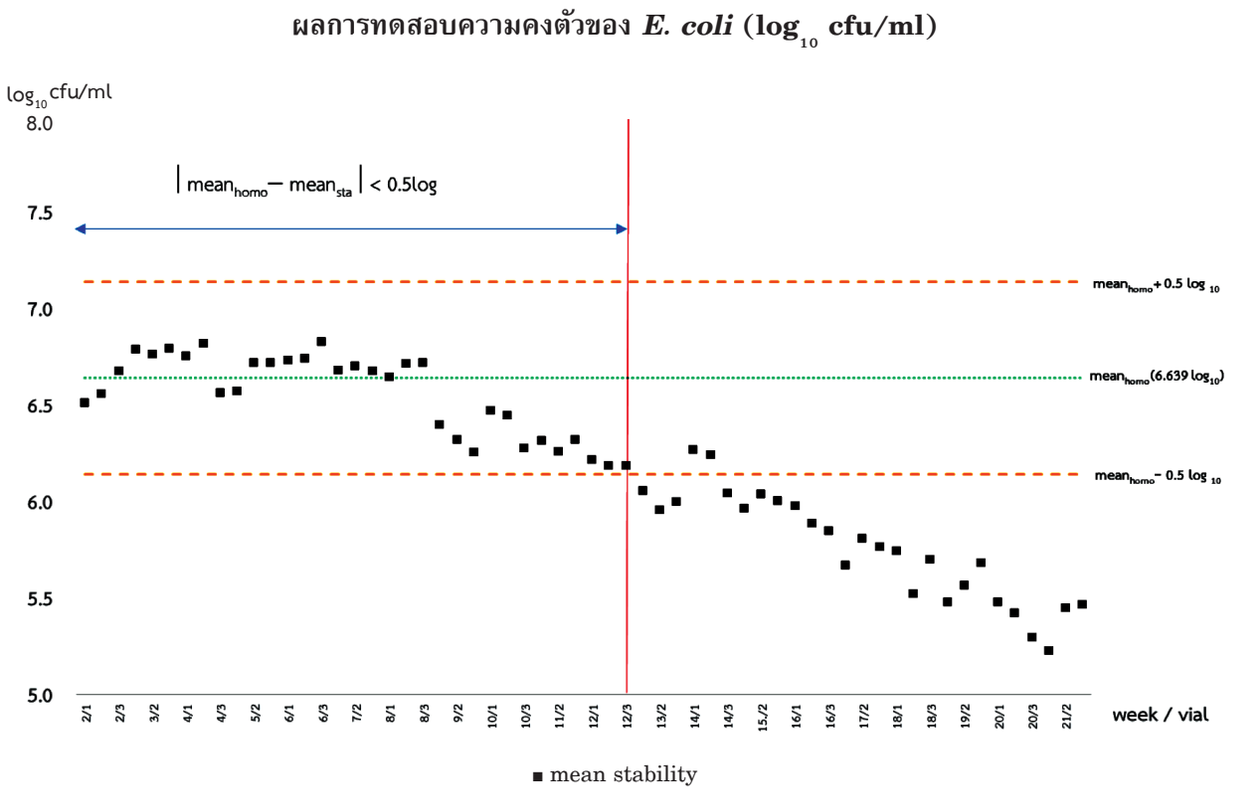
ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของเชื้อ *E. coli* ปริมาณเชื้อตั้งต้นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.639 $\log_{10}$ cfu/ml ส่วน *S. aureus* ปริมาณเชื้อตั้งต้นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.062 $\log_{10}$ cfu/ml (โดยมีค่าจากการเติมเชื้อก่อนผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งของเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 6.860 $\log_{10}$ cfu/ml และ *S. aureus* เท่ากับ 6.740 $\log_{10}$ cfu/ml) การประเมินผลความเป็นเนื้อเดียวกันทางสถิติ พบว่าค่า F_{cal} มีค่าน้อยกว่า F_{crit} ค่า S_s น้อยกว่า $0.3\sigma_{pt}$ ตาม ISO 13528:2022[11] แสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกันทั้งสองเชื้อ แต่กรณีใช้เกณฑ์ตาม ISO Guide 35:2017[10] เชื้อ *E. coli* ค่า S_{bb} มีค่าน้อยกว่า $0.3S_{IR}$ แสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนเชื้อ *S. aureus* ค่า S_{bb} มีค่ามากกว่า $0.3S_{IR}$ แสดงว่าตัวอย่างไม่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการทดสอบความคงตัว พบว่าความคงตัวของเชื้อ *E. coli* มีปริมาณของเชื้อลดลงไม่เกิน 0.5 $\log_{10}$ ในระยะตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-12 ดังแสดงในภาพที่ 1 ส่วนความคงตัวของเชื้อ *S. aureus* มีปริมาณของเชื้อลดลงไม่เกิน 0.5 $\log_{10}$ ในระยะตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-16 ดังแสดงในภาพที่ 2

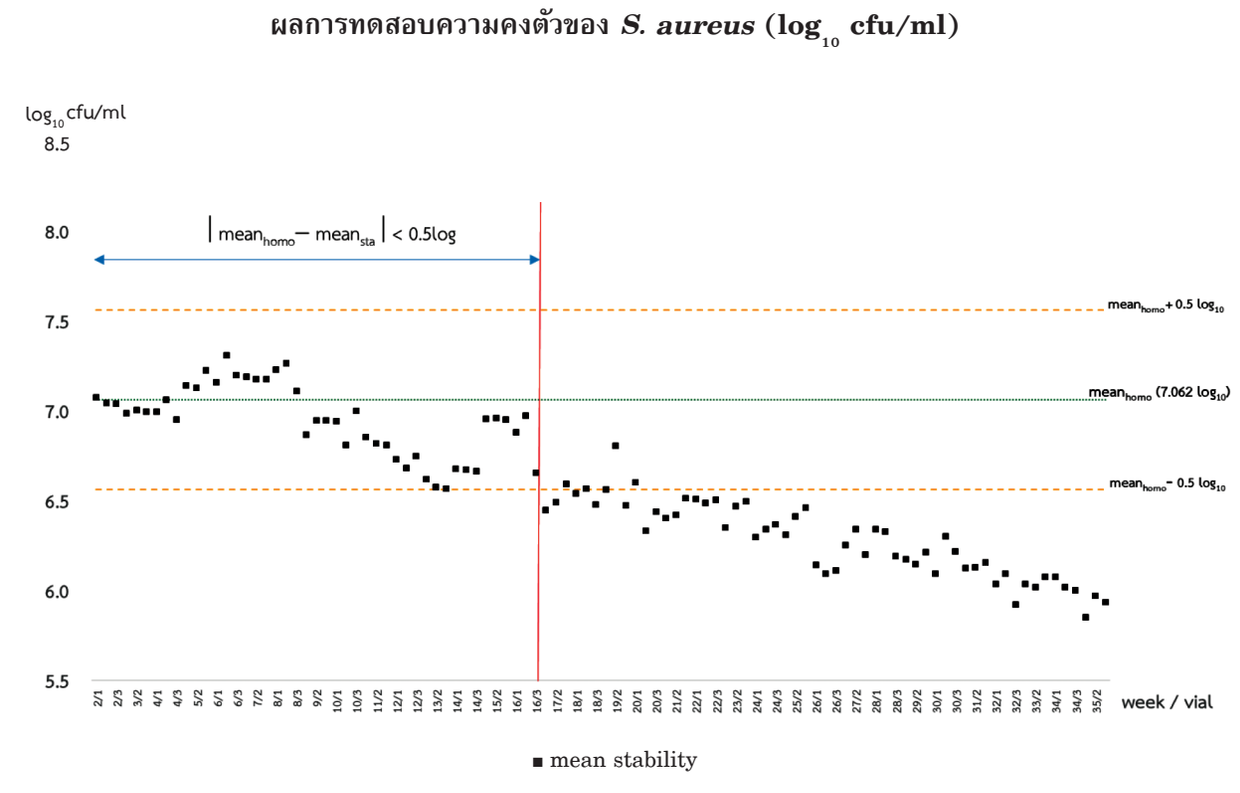
ตารางที่ 1 การตรวจวิเคราะห์ความเป็นเนื้อเดียวกันของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus*

ขวดที่	*E. coli*		*S. aureus*	
	Duplicate 1 ($\log_{10}$ cfu/g)	**Duplicate 2 ($\log_{10}$ cfu/g)**	**Duplicate 1 ($\log_{10}$ cfu/g)**	**Duplicate 2 ($\log_{10}$ cfu/g)**
1	6.799	6.756	7.079	6.991
2	6.792	6.602	7.000	7.041
3	6.690	6.544	7.000	6.934
4	6.531	6.602	7.000	7.114
5	6.643	6.580	7.000	7.041
6	6.623	6.643	7.041	7.114
7	6.663	6.690	7.079	7.000
8	6.672	6.491	7.041	7.176
9	6.477	6.732	7.114	7.176
10	6.643	6.477	6.973	7.079
11	6.699	6.716	7.146	7.230
$mean_{homogeneity}$	6.639		7.062	
$Cochran_{critical}$	0.570		0.570	
$Cochran_{calulation}$	0.333		0.226	
$F_{critical}$	2.854		2.854	
$F_{calulation}$	1.031		2.201	
S_{bb} หรือ S_s	0.012		0.047	
S_{IR}	0.118		0.118	
σ_{pt}	0.250		0.250	
$F < F$	Passed		Passed	
$S_s < 0.3\sigma_{pt}$ [(a)]	Passed		Passed	
$S_{bb} < 0.3S_{IR}$ [(b)]	Passed		Not passed	

หมายเหตุ : เกณฑ์การตัดสิน (a) ตาม ISO 13528:2022[11], (b) ตาม ISO Guide 35:2017[10]
The between-unit standard deviation (S_{bb} หรือ S_s)
Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR})



ภาพที่ 1 การทดสอบความคงตัวของเชื้อ *E. coli* ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-21



ภาพที่ 2 การทดสอบความคงตัวของเชื้อ *S. aureus* ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-35

วิจารณ์

เชื้อที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งหลังเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0-3 เดือน โดยตรวจสอบการละลายด้วย BPW มีความสามารถในการละลายภายใน 1 นาที หลังจากละลายมีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นสีขาวเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งผลการศึกษาความคงตัวในช่วง 0-3 เดือน พบ $|mean_{homo} - mean_{sta}|$ มีค่าไม่น้อยกว่า 0.5 log_{10} แต่หลังจาก 3 เดือน การละลายต้องอาศัยการใช้เครื่อง vortex mixer ร่วมด้วยและมีลักษณะของตะกอนหรือผลึกสีขาวเล็กน้อยในของเหลวขุ่นสีขาว ลักษณะทางกายภาพเห็นของเหลวที่ละลายได้มีความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน พบปริมาณเชื้อลดลงจากปริมาณเชื้อตั้งต้นเกินกว่า 0.5 log_{10} ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลกระทบกับความคงตัวของเชื้อมาตรฐานที่เตรียมได้

จากผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของเชื้อมาตรฐานที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของเชื้อ *E. coli* พบมีความเป็นเนื้อเดียวกันในทุกเกณฑ์การพิจารณา คือ ค่า S_s เท่ากับ 0.012 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า $0.3\sigma_{pt}$ (มีค่าเท่ากับ 0.075) ตาม ISO 13528:2022[11] และค่า S_{bb} มีค่าน้อยกว่า $0.3S_{IR}$ (มีค่าเท่ากับ 0.035) เมื่อพิจารณาโดยใช้เกณฑ์ตาม ISO Guide 35:2017[10] สำหรับเชื้อ *S. aureus* เมื่อพิจารณาโดยใช้เกณฑ์ตาม ISO 13528:2022[11] พบว่าผ่านเกณฑ์ เนื่องจากค่า S_s เท่ากับ 0.047 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า $0.3\sigma_{pt}$ (มีค่าเท่ากับ 0.075) แต่กรณีใช้เกณฑ์ตาม ISO Guide 35:2017[10] พบผลการประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันไม่ผ่านเกณฑ์กำหนด โดยค่า S_{bb} มีค่ามากกว่า $0.3S_{IR}$ อาจเพราะค่า intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR}) ที่นำมาใช้เป็นตัวเลขที่ได้จากการหาค่า S_{IR} ของ technique uncertainty ด้วยวิธี APHA 2015[6,7] ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร อาจทำให้ค่าที่ได้ค่อนข้างน้อยกว่าความเป็นจริง ซึ่งตาม ISO Guide 35:2017[11] ต้องเป็นค่า interlaboratory reproducibility standard deviation (S_R) ของวิธีวิเคราะห์นั้น ๆ ซึ่งวิธี APHA 2015[6,7] ไม่มีการระบุการหาค่า S_R เนื่องจากไม่มีข้อมูล interlaboratory study ของวิธี จึงจำเป็นต้องใช้ค่า S_{IR} ของห้องปฏิบัติการแทนในการประเมินผล แต่การทวนสอบวิธี (method verification) ตาม ISO 16140-3:2021[14] หากมีข้อมูลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) กำหนด $2S_{IR}$ ของการทวนสอบของวิธีต้องไม่เกิน S_R ซึ่งในกรณีนี้ S_{bb} มีค่า 0.470 มีค่าน้อยกว่า $0.3S_R$ หรือ $(0.3)2S_{IR}$ ซึ่งเท่ากับ 0.070 ซึ่งอาจแสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

การทดสอบความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อพิจารณาโดยใช้เกณฑ์ค่าสัมบูรณ์ของผลต่างของค่าเฉลี่ยผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ($|mean_{homo} - mean_{sta}|$) มีค่าน้อยกว่า 0.5 log_{10} พบว่าเชื้อ *E. coli* ในสัปดาห์ที่ 12 มีค่าเฉลี่ยของผลต่างเท่ากับ 0.442 log_{10} ส่วน *S. aureus* ในสัปดาห์ที่ 16 มีค่าเฉลี่ยของผลต่างเท่ากับ 0.225 log_{10} ดังนั้น *S. aureus* มีความคงตัวนานกว่า *E. coli* ประมาณ 4 สัปดาห์ จากข้อมูลพิจารณาได้ว่าเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ องค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เป็น peptidoglycan ถึงร้อยละ 90 ในด้านความหนาของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกหนากว่า โดยทั่วไปลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีความทนทานสูงกว่าแบคทีเรียแกรมลบ[15,16] ดังนั้นการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานในรูปแบบของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปัจจัยหลักของการพิจารณา คือ ความทนทานของเชื้อแต่ละชนิด

หากขยายขอบข่ายการให้บริการไปศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์หรือหน่วยงานภาครัฐหรือเอกชนอื่น ๆ ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของความคงตัวในสภาวะการขนส่งและความคงตัวที่นานกว่านี้ เช่น การเติม stabilizer อื่น ๆ และการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น เช่น 0.85% NSS, SDW (sterile distilled water) เป็นต้น เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปใช้งานของแต่ละห้องปฏิบัติการ

สรุป

การเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐานแห้งแบบแช่เยือกแข็งของเชื้อทั้งสองชนิด พบว่ามีความเป็นเนื้อเดียวกัน

และมีความคงตัวอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ค่าสัมบูรณ์ของผลต่างของค่าเฉลี่ยผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ($|meanh_{omo} - mean_{sta}|$) มีค่าน้อยกว่า 0.5 log_{10} ในระยะตั้งแต่ 12 สัปดาห์ สำหรับเชื้อ *E. coli* และ 16 สัปดาห์ สำหรับเชื้อ *S. aureus* โดยยังคงความบริสุทธิ์และคุณสมบัติทางชีวเคมี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ช่วยงานวิจัยนี้ให้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Laboratory quality management systems. In: Salfinger Y, Tortorello ML, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2015. p. 3-11.
2. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
3. Cabri. Preservation of bacteria by freezing and low temperature store below -70°C on glass beads. [online]. 1998; [cited 2020 Nov 9]; [2 screens]. Available from: URL: http://www.cabri.org/guidelines/micro-organisms/M300Ap505.html.
4. ISO 11133:2014/Amd 1:2018, Amd 2:2020. Microbiology of food, animal feed and water-preparation, production, storage and performance testing of culture media - Amendment 1, 2. Geneva: International Organization for Standardization; 2020.
5. Research Randomizer. [online]. [cited 2020 Nov 9]; [2 screens]. Available from: URL: https://www.randomizer.org.
6. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Salfinger Y, Tortorello ML, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th ed. Washington DC: American Public Health Association 2015. p. 75-87.
7. Mesophilic aerobic plate count. In: Salfinger Y, Tortorello ML, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th ed. Washington DC: American Public Health Association; 2015. p. 95-101.
8. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual (BAM) Chapter 12: Staphylococcus aureus. [online]. 2016; [cited 2021 Jan 14]; [6 screens]. Available from: URL: https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-staphylococcus-aureus.
9. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual (BAM) Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the coliform bacteria. [online]. 2020; [cited 2021 Apr 1]; [17 screens]. Available from: https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria.
10. ISO GUIDE 35:2017. Reference materials - guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
11. ISO 13528:2022. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: International Organization for Standardization; 2022.
12. ISO 19036:2019. Microbiology of the food chain - estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Geneva: International Organization for Standardization; 2019.
13. ISO 22117:2019. Microbiology of the food chain - specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: International Organization for Standardization; 2019.

14. ISO 16140-3:2021. Microbiology of the food chain-method validation-Part 3: protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Geneva: International Organization for Standardization; 2021.
15. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, ปรีชา สุวรรณพินิจ. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2544.
16. Differences between Gram positive and Gram negative bacteria. [online]. 2019; [cited 2019 Aug 14]; [26 screens]. Available from: URL: https://microbiologyinfo.com/differences-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/.

Lyophilization of Reference Microorganisms Preparations and Its Quality Control

Kamonwan Kantaeng, Atchara Ukhong and Kanokchon Supaprom
Bureau of Quality and safety of food, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Microbiology laboratories use reference microorganisms to ensure the accuracy, precision and reliability of their analytical results. Prior to routine work, reference microorganisms must be tested for purity and biochemical properties. This step can take 2-7 days, depending on the strains of bacteria being used. In order to reduce processing time, we developed lyophilized reference microorganisms preparations, which can be used immediately after rehydration. Skimmed milk (10% w/v) was mixed with each reference microorganism and then aliquoted into glass vials. The vials were lyophilized and stored in a dark place at 2-8°C. The lyophilized microorganisms were tested for homogeneity at three weeks later. For stability study in terms of purity and biochemical characteristics, the results showed that Escherichia coli and Staphylococcus aureus remained stable for 12 weeks and 16 weeks, respectively using 0.5 $\log_{10}$ as a criteria. These lyophilized products can be used as reference microorganisms for quality control in microbiology laboratories of both government and private sections. However, further studies are needed to determine the optimal transportation conditions and stabilizers for lyophilized reference microorganisms in order to meet the reference materials-guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability according to ISO Guide 35:2017

Keywords: Lyophilized reference microorganisms, Quality control, Homogeneity, Stability