การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบทางจุลชีววิทยาด้านสิ่งแวดล้อม

ปวิน งามเลิศ *นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ*
กองบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการสิ่งแวดล้อม มีการทดสอบด้านจุลชีววิทยาเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษา วิเคราะห์ และประเมินคุณภาพสิ่งแวดล้อม เช่น รายการ Standard plate count, *Salmonella* spp., *E. coli* และ Total coliforms ในน้ำ อากาศ และดิน ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องกำหนดปริมาณไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอิโคไล *(Escherichia coli)* และวิธีการเก็บตัวอย่างและการตรวจหาไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอิโคไล *(Escherichia coli)* ในน้ำทิ้งและกากตะกอนที่ผ่านระบบกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้ว พ.ศ. 2561 และประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์และมาตรการในทางวิชาการสำหรับการป้องกันด้านสาธารณสุขและการป้องกันในเรื่องสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ พ.ศ. 2551 และเพื่อให้มั่นใจว่าผลการทดสอบมีความถูกต้อง เชื่อถือได้ ห้องปฏิบัติการทดสอบจึงต้องควบคุมคุณภาพผลการทดสอบทางจุลชีววิทยาด้วยองค์ประกอบหลัก 8 ประการ ดังนี้

1. ภาวะแวดล้อมของห้องปฏิบัติการ

- พื้นที่ที่ใช้ในการทดสอบต้องแยกออกจากกิจกรรมอื่น ๆ ได้แก่ การรับส่งตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่าง และต้องมีการควบคุมการเข้าออกห้องปฏิบัติการทดสอบเพื่อลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอก
- มีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรคในห้องปฏิบัติการทดสอบเป็นประจำ และทำความสะอาดพื้นที่ปฏิบัติงานทั้งก่อนและหลังการปฏิบัติงาน
- มีการควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสม ได้แก่ 18 °C - 27 °C และ 55% ± 15%
- มีแสงส่องสว่างที่เหมาะสม ตามมาตรฐาน APHA, AWWA & WEF 24th ed. ปี 2023 part 9020 B กำหนดให้ห้องปฏิบัติการทดสอบทางจุลชีววิทยา ต้องมีแสงสว่างอย่างน้อย 1,000 ลักซ์
- มีการไหลเวียนของอากาศและมีการตรวจสอบคุณภาพอากาศเป็นประจำ

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องมือและอุปกรณ์ โดยเฉพาะเครื่องมือหลัก ได้แก่ ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) เครื่องแก้ววัดปริมาตร (Volumetric glassware) หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง (Autoclave) เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ (Electronics balance) และ ไมโครปิเปต (Micropipette) ที่ส่งผลกระทบต่อความถูกต้องของผลการทดสอบ ต้องได้รับการสอบเทียบตามวงรอบของการสอบเทียบ มีการตรวจสอบก่อนใช้งาน การทวนสอบระหว่างการใช้งาน (Intermediate check) และการบำรุงรักษา ให้เป็นไปตามแผนการสอบเทียบและแผนการบำรุงรักษาที่ตั้งไว้ มีการเก็บบันทึกการบำรุงรักษาและการสอบเทียบ
- มีการทำความสะอาดเป็นประจำเพื่อป้องกันการปนเปื้อนสำหรับเครื่องมือและอุปกรณ์

ตัวอย่างการสอบเทียบและการตรวจสอบผลการสอบเทียบเครื่องมือ

เครื่องมือ	ช่วงการใช้งาน	MPE	รายการสอบเทียบ	ความถี่	การตรวจสอบผลการสอบเทียบ
Incubator	36 °C ± 1 °C	± 1 °C	อุณหภูมิ	2 ปี/ครั้ง	ตรวจสอบตำแหน่งภายในอย่างน้อย 9 จุด โดย error + UM < MPE
Balance	Vary	Vary	น้ำหนัก	1 ปี/ครั้ง	error + UM ≤ MPE
Micropipette	1 - 10 µL	± 0.1 µL	ปริมาตร	1 ปี/ครั้ง	error + UM ≤ MPE
Autoclave	121 °C ± 1 °C	± 1 °C	อุณหภูมิ	1 ปี/ครั้ง	error + UM ≤ MPE
Volumetric glassware	Vary	Vary	ปริมาตร	5 ปี/ครั้ง แต่ต้องมีแผนการบำรุงรักษาประจำปี	error + UM ≤ MPE

MPE : Maximum permissible error
UM : Uncertainty of measurement

(ที่มา : P113-A2LA, 2018 และมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข 2551)

3. บุคลากร

◆ บุคลากรที่ทำงานในห้องปฏิบัติการต้องได้รับการฝึกอบรมเกี่ยวกับวิธีการทดสอบ มีการประเมินประสิทธิภาพหลังการฝึกอบรมหากผ่านเกณฑ์การยอมรับ จึงมอบหมายให้บุคลากรคนดังกล่าวเป็นเจ้าหน้าที่ทดสอบในรายการนั้น

◆ บุคลากรควรปฏิบัติตามแนวทางปฏิบัติที่ดีในการปฏิบัติงาน (Good laboratory practice, GLP)

◆ บุคลากรที่เกี่ยวข้องกับเชื้อก่อโรคมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับ Biosafety and Biosecurity ตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558

4. การจัดการตัวอย่างทดสอบ

◆ ตัวอย่างทดสอบต้องเก็บรักษาในภาวะที่เหมาะสม เช่น ตัวอย่างน้ำ ต้องควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °C ± 2 °C และขนส่งอย่างถูกต้อง

◆ วิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบภายในระยะเวลาที่กำหนดไว้ในเอกสารวิธีทดสอบ หรือเอกสารมาตรฐาน

◆ มีการบันทึกภาวะการเก็บรักษา การขนส่ง และการวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบ

5. เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและการควบคุมคุณภาพ

◆ ให้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทราบระดับสกุล (genus) และสปีชีส์ (species) ที่ได้มาจากแหล่งที่น่าเชื่อถือและสอบกลับได้ เช่น American Type Culture Collection (ATCC) หรือ World Data Center for Microorganisms (WDCM) และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นต้น

◆ เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงเก็บรักษาไว้ในภาวะที่เหมาะสม

◆ ควรมีการควบคุมคุณภาพเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงเป็นประจำ และมีการบันทึกการเก็บรักษาและการควบคุมคุณภาพ

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ

◆ มีการตรวจสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่รับเข้ามาใหม่ก่อนนำไปใช้งาน ผลการทดสอบต้องผ่านเกณฑ์การยอมรับตามเอกสารอ้างอิง เช่น ISO/TS 11133

◆ มีการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกต้องเหมาะสม ดังนี้

- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่เปิดใช้งาน เก็บรักษาตามเอกสารที่ผู้ผลิตแนะนำ
- อาหารเลี้ยงเชื้อที่เปิดใช้งานแล้ว ต้องปิดภาชนะบรรจุให้แน่น เก็บไว้ในที่แห้ง มีการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นประจำตามคู่มือการใช้งานของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละประเภท และต้องมั่นใจว่าไม่นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่หมดอายุแล้วมาใช้งาน
- อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว ต้องบรรจุในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท เก็บไว้ในที่เย็น ไม่โดนแสง และเก็บรักษาภายในระยะเวลาที่กำหนด

◆ เก็บบันทึกการเตรียมและการควบคุมคุณภาพ

7. วิธีทดสอบ

◆ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

กรณีห้องปฏิบัติการนำวิธีทดสอบที่ไม่ใช่วิธีมาตรฐาน หรือเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นมาเอง จะต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบก่อนการนำวิธีทดสอบมาใช้งาน มาตรฐาน APHA, AWWA & WEF, 24th ed. ปี 2023 part 9020 B กำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ดังนี้

การทดสอบเชิงคุณภาพ เช่น Detected or not detected/100 mL

- Specificity and selectivity เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของวิธีทดสอบต่อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบว่าเหมาะสมหรือไม่
- Detection limit เพื่อระบุปริมาณเชื้อต่ำสุดที่สามารถทดสอบได้ตามที่วิธีกำหนด โดยการเจือจางเชื้ออ้างอิงหลายช่วงความเข้มข้นแล้วเปรียบเทียบ % Recovery ที่ช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ
- Robustness เพื่อตรวจสอบความสามารถในการให้ผลการทดสอบของวิธีทดสอบในภาวะการทดสอบที่เปลี่ยนไป
- Repeatability เพื่อทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของวิธีภายใต้ภาวะการทดสอบที่เหมือนกัน

การทดสอบเชิงปริมาณ เช่น CFU/mL, MPN/100 mL

- Accuracy เพื่อยืนยันความน่าเชื่อถือระหว่างค่าที่ทดสอบได้กับค่าจริง
- Repeatability precision เพื่อทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของวิธีภายใต้ภาวะการทดสอบที่เหมือนกัน
- Reproducibility precision เพื่อทดสอบความสามารถในการทดสอบซ้ำของวิธีภายใต้ภาวะการทดสอบที่ต่างกัน เช่น ผู้ทดสอบต่างกัน พื้นที่ทดสอบที่ต่างกันในห้องปฏิบัติการ หรือการใช้เครื่องมือทดสอบเครื่องอื่น เป็นต้น
- Recovery (sensitivity) เพื่อยืนยันความสามารถของวิธีในการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ที่สนใจใน matrix ต่าง ๆ ที่นำมาทดสอบ
- Detection limit เพื่อระบุปริมาณเชื้อต่ำสุดที่สามารถทดสอบได้ตามที่วิธีกำหนด โดยการเจือจางเชื้ออ้างอิงหลายช่วงความเข้มข้น แล้วเปรียบเทียบ % Recovery ที่ช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ
- Upper limit เพื่อกำหนดระดับของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์สูงสุดที่เริ่มให้ผลการทดสอบที่ไม่น่าเชื่อถือ

◆ การทวนสอบวิธีมาตรฐาน

กรณีที่ห้องปฏิบัติการทดสอบตามวิธีทดสอบที่เป็นวิธีมาตรฐาน จะต้องมียืนยันความสอดคล้องตามเกณฑ์ที่ระบุไว้วิธีทดสอบดังกล่าว ดังนี้

- Accuracy เพื่อยืนยันความน่าเชื่อถือระหว่างค่าที่ทดสอบได้กับค่าจริง
- Repeatability เพื่อทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของวิธีภายใต้ภาวะการทดสอบที่เหมือนกัน
- Reproducibility precision เพื่อทดสอบความสามารถในการทดสอบซ้ำของวิธีภายใต้ภาวะการทดสอบที่ต่างกัน เช่น ผู้ทดสอบต่างกัน พื้นที่ทดสอบที่ต่างกันในห้องปฏิบัติการ หรือการใช้เครื่องมือทดสอบเครื่องอื่น เป็นต้น

ตัวอย่างการทวนสอบวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

<table>
<tr><th>รายการที่ทดสอบ</th><th>ช่วงการทวนสอบวิธีมาตรฐาน</th><th>รายการทวนสอบวิธีมาตรฐาน
(ระบุวิธีการทวนสอบ เกณฑ์ และผลการทวนสอบ)</th></tr>
<tr><td>Total coliforms ในน้ำ</td><td>MPN/100 mL</td><td>
การทวนสอบวิธีทดสอบหาปริมาณ Total Coliforms โดยวิธี Multiple - Tube Fermentation Technique ที่มีปริมาณต่ำสุดที่วัดได้ 1.1 MPN/100 mL (ระบบ 10 หลอด)
1. การยืนยัน Reproducibility ด้วยการหาค่า Intralaboratory Reproducibility Standard deviation (S_{IR}) สำหรับการทดสอบเชิงปริมาณ
เกณฑ์การตัดสิน
- ค่า Intralaboratory Reproducibility Standard deviation (S_{IR}) สำหรับการทดสอบเชิงปริมาณ $S_{IR} \leq 2$ X lowest S_R mean value determined in validation study; (ISO 21528-2) $S_R = 0.20$
เกณฑ์คือ $S_{IR} = \leq 0.40$
ผลการทวนสอบ
วิธีทวนสอบเชิงปริมาณ สำหรับการตรวจหาเชื้อ Total Coliforms (แบบ 10 หลอด) ในตัวอย่างน้ำ จำนวน 60 ตัวอย่าง และทำการหาค่า Intralaboratory Reproducibility Standard deviation (S_{IR}) ได้ค่าเท่ากับ 0.064
0.064 ≤ 0.40 ดังนั้น ผ่านเกณฑ์
2. การยืนยัน Accuracy ด้วยการหาค่า Estimated bias (eBias) สำหรับการทดสอบเชิงปริมาณโดยการ Spike เชื้อ K. aerogenes DMST8841 ลงในตัวอย่างน้ำ แบ่งเป็น 3 ระดับ (ระดับเชื้อต่ำ กลาง และสูง) จำนวน 60 ตัวอย่าง
เกณฑ์การตัดสิน
- ค่า Estimated bias (eBias) ≤ 0.5 log10
ผลการทวนสอบ
วิธีทวนสอบเชิงปริมาณ สำหรับการตรวจหาเชื้อ Total Coliforms (แบบ 10 หลอด) ในตัวอย่างน้ำ จำนวน 60 ตัวอย่าง และทำการหาค่า eBias
<table>
<tr><th>Level</th><th>Spike level</th><th>Mean Result</th><th>Log Spike level</th><th>Log Mean Result</th><th>eBias</th></tr>
<tr><td>Low</td><td>3</td><td>2.8889</td><td>0.4771</td><td>0.4607</td><td>0.0164</td></tr>
<tr><td>Medium</td><td>12</td><td>10.9125</td><td>1.0792</td><td>1.0379</td><td>0.0413</td></tr>
<tr><td>High</td><td>24</td><td>21.3223</td><td>1.3802</td><td>1.3288</td><td>0.0514</td></tr>
</table>
สรุปผลการทวนสอบวิธีทดสอบ
Total Coliforms ในตัวอย่าง โดยรายงานผลเชิงปริมาณ MPN/100 mL ด้วยวิธี Multiple-Tube Fermentation Technique พบค่าที่ได้สอดคล้องกับเกณฑ์ที่ตั้งไว้คือ
Intralaboratory Standard deviation (S_{IR}) = $S_{IR} \leq 2$ X lowest S_R
mean value determined in validation study คือค่า $S_R \leq 0.40$
และค่า Estimated bias (eBias) ≤ 0.5 log10
</td></tr>
</table>

(ที่มา : ISO 16140-3, 2021)

8. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ

◆ การควบคุมคุณภาพภายในผลการทดสอบ

- การทดสอบ sterility check ของอาหารเลี้ยงเชื้อและเครื่องแก้วที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีการปนเปื้อน โดยสุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากการเตรียม และบ่มตามอุณหภูมิและเวลาที่วิธีทดสอบกำหนด และตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (ต้องไม่มีการเจริญเติบโต)
- มีการใช้ตัวอย่างควบคุมบวกและลบ คือ การเติมตัวอย่างด้วยจุลินทรีย์เป้าหมาย (positive/target microorganism) และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย (non-target/negative microorganism) สำหรับวิธีทดสอบนั้น ๆ ซึ่งการใช้ตัวอย่างควบคุมต้องมีผลการทดสอบสอดคล้องตามที่กำหนด
- การใช้ blank sample โดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วแทนตัวอย่าง และทดสอบพร้อมกับตัวอย่าง ซึ่งผลการทดสอบต้องไม่มีการเจริญเติบโต
- การทำซ้ำ เพื่อตรวจสอบความสอดคล้องของผลการทดสอบที่ทำซ้ำในตัวอย่างเดียวกัน
- การประเมินความสามารถในการนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยผู้ทดสอบทำการนับซ้ำจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เกณฑ์การยอมรับ ผู้นับคนเดิม (repeatability) ไม่เกิน 5%, ผู้นับต่างคน (reproducibility) ไม่เกิน 10% (APHA, AWWA & WEF, 24th ed. ปี 2023 part 9020 B)
- มีการทวนสอบความถูกต้องของการถ่ายโอนข้อมูล

◆ การควบคุมคุณภาพภายนอกผลการทดสอบ

- การเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการในรายการทดสอบที่เกี่ยวข้อง โดย ตัวอย่างทดสอบและช่วงการทดสอบที่เข้าร่วมฯ จะต้องสอดคล้องกับตัวอย่างทดสอบและช่วงการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการให้บริการทดสอบ
- การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการทดสอบ โดยห้องปฏิบัติการที่เปรียบเทียบผลการทดสอบควรเป็นห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025 เพื่อความเชื่อมั่นของผลการทดสอบที่ได้

การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบทางจุลชีววิทยาด้านสิ่งแวดล้อม นับเป็นหัวใจสำคัญในการสร้างความมั่นใจของผลการทดสอบ เพื่อเป็นข้อมูลให้กับผู้ที่เกี่ยวข้องนำไปใช้ศึกษา วิเคราะห์ และประเมินคุณภาพสิ่งแวดล้อม นำไปสู่การควบคุมคุณภาพสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน กรมวิทยาศาสตร์บริการ โดยกองบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ มีภารกิจในการยกระดับและพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการทดสอบด้วยการให้การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบ ทางด้านสิ่งแวดล้อม อาหาร อาหารสัตว์ วัสดุสัมผัสอาหาร เคมีภัณฑ์ และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ท่านสามารถศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมและสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทดสอบ ได้ที่ https://bla.dss.go.th อีเมล bla@dss.go.th โทรศัพท์ 0 2201 7178

เอกสารอ้างอิง

1. กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2551). ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์และมาตรการในทางวิชาการสำหรับการป้องกันด้านสาธารณสุขและการป้องกันในเรื่องสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ พ.ศ. 2551
2. กระทรวงสาธารณสุข. (2561). ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องกำหนดปริมาณไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล *(Escherichia coli)* และวิธีการเก็บตัวอย่างและการตรวจหาไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล *(Escherichia coli)* ในน้ำทิ้งและกากตะกอนที่ผ่านระบบกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้ว พ.ศ. 2561
3. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. (2551). มาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข. [เข้าถึงเมื่อ 15 มิถุนายน 2567] http://narst.dmsc.moph.go.th/manuals/standard_manual_2560.pdf
4. ศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (2564). การควบคุมคุณภาพ. [เข้าถึงเมื่อ 15 มิถุนายน 2567] https://nms.kku.ac.th/home/index.php/control/
5. สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม. (2564). การควบคุมคุณภาพภายในทางจุลชีววิทยา. [เข้าถึงเมื่อ 15 มิถุนายน 2567] https://www.nfi.or.th/training-list-detail.php?id=596
6. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2560). คู่มือมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข. [เข้าถึงเมื่อ 8 กรกฎาคม 2567] http://narst.dmsc.moph.go.th/manuals/standard_manual_2560.pdf
7. The Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA, AWWA & WEF, 24th ed., 2023.
8. National Association of Testing Authorities (NATA). General Equipment – Calibration and checks. Australia: NATA; 2015.
9. Policy on Measurement Traceability for Life Sciences Testing Laboratories, P113-A2LA, American Association for Laboratory Accreditation, 2018.
10. ISO. (2021). ISO 16140-3: Microbiology of the food chain – Method validation- Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory, (1st ed).