ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

ฉบับที่ ๕๐๐๙ (พ.ศ. ๒๕๖๐)

ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

พ.ศ. ๒๕๑๑

เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์ - วิธีทั่วไปสำหรับแจงนับสตาฟิโลค็อกไค

ที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก (สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส และสายพันธุ์อื่นๆ) -

เล่ม ๑ เทคนิคการใช้แบร์ด - ปาร์เกอร์อะการ์

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๑๕ แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. ๒๕๑๑ ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (ฉบับที่ ๗) พ.ศ. ๒๕๕๘ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรมออกประกาศกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์ - วิธีทั่วไปสำหรับแจงนับสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก (สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส และสายพันธุ์อื่น ๆ) - เล่ม ๑ เทคนิคการใช้แบร์ด - ปาร์เกอร์อะการ์ มาตรฐานเลขที่ มอก. 2806 เล่ม 1 - 2560 ไว้ ดังมีรายละเอียดต่อท้ายประกาศนี้

ทั้งนี้ ให้มีผลตั้งแต่วันที่ประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๒๐ ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๖๐

อุตตม สาวนายน

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์ - วิธีทั่วไปสำหรับแจงนับสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก (*สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส* และสายพันธุ์อื่น ๆ) –
เล่ม 1 เทคนิคการใช้แบร์ด-ปาร์เกอร์อะการ์

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ กำหนดวิธีแจงนับสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก (*สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส* และสายพันธุ์อื่น ๆ) ในตัวอย่างอาหารสำหรับมนุษย์หรืออาหารสัตว์ด้วยการแจงนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบร์ด-ปาร์เกอร์อะการ์ ภายหลังการบ่มเพาะเชื้อในภาวะมีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 35 °C หรือ 37 °C

2. มาตรฐานอ้างอิง

2.1 เอกสารอ้างอิงต่อไปนี้ใช้ร่วมกับมาตรฐานฉบับนี้ กรณีเอกสารอ้างอิงระบุปีที่ประกาศใช้แล้ว ให้ใช้เฉพาะฉบับที่ระบุ หากไม่ได้ระบุปีที่ประกาศให้ใช้ฉบับล่าสุด (รวมทั้งฉบับที่มีการแก้ไข)

มอก. 2805 เล่ม 1 จุลชีววิทยาของห่วงโซ่อาหาร — การเตรียมตัวอย่างทดสอบ ตัวอย่างแขวนลอยเริ่มต้น และตัวอย่างเจือจางสิบเท่าสำหรับการตรวจสอบจุลินทรีย์ — เล่ม 1 กฎเกณฑ์ทั่วไปสำหรับเตรียมตัวอย่างแขวนลอยเริ่มต้น และตัวอย่างเจือจางสิบเท่า

มอก. 2396 จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์ — ข้อกำหนดทั่วไปและข้อแนะนำสำหรับการทดสอบทางจุลชีววิทยา

ISO 7218 Amd. 1, Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations — Amendment 1

3. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้

3.1 สตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก (coagulase-positive staphylococci) หมายถึง แบคทีเรียที่สร้างโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ (typical) และ/หรือสร้างโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะ (atypical) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเฉพาะและแสดงปฏิกิริยาโคอะกูเลสบวก (positive coagulase reaction) เมื่อปฏิบัติตามวิธีที่กำหนดในมาตรฐานนี้

3.2 การแจงนับสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก หมายถึง การแสดงจำนวนสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกเป็นปริมาณเชื้อที่พบต่อตัวอย่างทดสอบ 1 mL หรือต่อตัวอย่างทดสอบ 1 g เมื่อปฏิบัติตามวิธีที่กำหนดไว้ในมาตรฐานนี้

4. หลักการ

4.1 วิธีนี้เป็นการถ่ายตัวอย่าง (inoculation) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเฉพาะชนิดแข็ง จำนวน 2 จาน (duplicate plates) กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวให้ใช้ปริมาตรตัวอย่างทดสอบตามที่กำหนด หรือกรณีที่ตัวอย่างเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ให้ใช้ปริมาตรตัวอย่างแขวนลอยเริ่มต้นตามที่กำหนด

สำหรับตัวอย่างเจือจางสิบเท่าของตัวอย่างทดสอบหรือตัวอย่างแขวนลอยเริ่มต้น ให้ถ่ายตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 2 จาน ต่อ 1 ระดับการเจือจาง และให้บ่มเพาะเชื้อภายใต้ภาวะเดียวกัน

4.2 บ่มเพาะเชื้อภายใต้ภาวะมีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 35 °C หรือ 37 °C * และตรวจสอบผลภายหลังการบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 h และ 48 h

หมายเหตุ * *อุณหภูมิที่ใช้ต้องได้รับการยอมรับตามข้อตกลงร่วมกันระหว่างผู้เกี่ยวข้อง และต้องระบุอุณหภูมิไว้ในรายงานผลการทดสอบด้วย*

4.3 คำนวณจำนวนสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกต่อตัวอย่างทดสอบ 1 mL หรือต่อตัวอย่างทดสอบ 1 g จากจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและ/หรือโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะที่เจริญบนจานเพาะเชื้อในระดับการเจือจางที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง และทำการทดสอบยืนยันผลโคอะกูเลสบวก

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเจือจาง

5.1 ทั่วไป

หลักการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ ให้ปฏิบัติตาม มอก. 2396

5.2 สารละลายเจือจาง

การเตรียมสารละลายเจือจาง ให้ปฏิบัติตาม มอก. 2805 เล่ม 1 และมาตรฐานผลิตภัณฑ์ที่กำหนด

5.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนประกอบและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปนี้ ให้ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค.

5.3.1 แบร์ด-ปาร์เกอร์อะการ์ (Baird-Parker agar medium) (ข้อ ค.1)

5.3.2 เบรน-ฮาร์ทอินฟิวชั่นบรอท (brain-heart infusion broth) (ข้อ ค.2)

5.3.3 พลาสมากระต่าย (rabbit plasma) (ข้อ ค.3)

6. เครื่องมือและอุปกรณ์

อุปกรณ์ของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาโดยทั่วไป (ดู มอก. 2396) และอุปกรณ์เฉพาะ ดังต่อไปนี้

6.1 เตาอบ (oven) และหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)

ดู มอก. 2396

6.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 35 °C ± 1 °C หรือ 37 °C ± 1 °C สำหรับบ่มเพาะเชื้อ

6.3 ตู้อบแห้ง (drying cabinet) หรือตู้บ่มเพาะเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ตั้งแต่ 25 °C ± 1 °C ถึง 50 °C ± 1 °C

6.4 เครื่องอังน้ำ (water bath) หรืออุปกรณ์ที่มีลักษณะคล้ายกัน ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 47 °C ± 2 °C

6.5 หลอดทดสอบ ขวดรูปชมพู่ หรือขวดฝาเกลียว ใช้สำหรับเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ และฆ่าเชื้อได้ อุปกรณ์เหล่านี้ควรมีขนาดบรรจุที่เหมาะสมกับการทดสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลอดเฮโมไลซิสปราศจากเชื้อ (sterile haemolysis tube) ควรมีขนาดประมาณ 10 mm × 75 mm หรือ ขวดก้นกลม (round-bottom bottle)

6.6 จานเพาะเชื้อ (petri dish) ปลอดเชื้อทำจากแก้วหรือพลาสติก

6.7 เข็มเขี่ยเชื้อ (straight wire) (ดู มอก. 2396) และพาสเจอร์ปิเปตต์ (pasteur pipette)

6.8 ปิเปตต์ ความจุ 1 mL 2 mL และ 10 mL ที่มีขีดแบ่งปริมาตร 0.1 mL 0.1 mL และ 0.5 mL ตามลำดับ

6.9 แท่งเกลี่ยเชื้อ (spreader) ปลอดเชื้อ ทำจากแก้วหรือพลาสติก

6.10 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส ความละเอียดสูงสุด 0.01 ที่อุณหภูมิ 25 °C และอ่านค่าได้แม่นยำ ± 0.1 pH

หมายเหตุ *สามารถใช้อุปกรณ์ที่ใช้แล้วทิ้งแทนเครื่องแก้วที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ในกรณีที่อุปกรณ์ดังกล่าวมีคุณสมบัติเฉพาะที่เหมาะสม*

7. การชักตัวอย่าง

7.1 การชักตัวอย่างไม่ได้รวมอยู่ในมาตรฐานนี้ ให้ปฏิบัติตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ที่กำหนด หากไม่มีมาตรฐานที่กำหนด แนะนำให้ปฏิบัติตามข้อตกลงระหว่างผู้เกี่ยวข้อง

7.2 ห้องปฏิบัติการควรได้รับตัวอย่างที่เป็นตัวแทนอย่างแท้จริง และตัวอย่างนั้นต้องไม่เสียหายหรือเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการเก็บรักษาหรือขนส่ง

8. การเตรียมตัวอย่าง

8.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบให้ปฏิบัติตาม มอก. 2805 เล่มที่เกี่ยวข้อง หรือปฏิบัติตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ที่กำหนด หากไม่มีมาตรฐานที่กำหนด แนะนำให้ปฏิบัติตามข้อตกลงระหว่างผู้เกี่ยวข้อง

9. วิธีทดสอบ

9.1 ตัวอย่างทดสอบ (test portion) และตัวอย่างแขวนลอยเริ่มต้น (initial suspension) รวมทั้งตัวอย่างเจือจาง (dilutions)

ดู มอก. 2805 เล่ม 1 และมาตรฐานผลิตภัณฑ์ที่กำหนด

9.2 การถ่ายตัวอย่าง

9.2.1 ถ่ายตัวอย่างของเหลวปริมาตร 0.1 mL [กรณีที่ตัวอย่างไม่ใช่ของเหลว ให้ถ่ายตัวอย่างแขวนลอยเริ่มต้น (ระดับการเจือจาง 10^{-1}) ปริมาตร 0.1 mL] ลงบนจานอะการ์ 2 จาน (ข้อ ค.1.4) โดยใช้ปิเปตต์ปลอดเชื้อ (ข้อ 6.8) และปฏิบัติเช่นเดียวกับข้างต้นสำหรับระดับการเจือจาง 10^{-2} และตัวอย่างเจือจางสิบเท่าลำดับถัดไป (ถ้าจำเป็น)

9.2.2 สำหรับผลิตภัณฑ์บางชนิด ถ้าต้องการแจงนับจำนวนสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกที่มีระดับต่ำ สามารถเพิ่มขีดจำกัดการตรวจหา (limits of detection) ให้เพิ่มขึ้นสิบเท่าได้ โดยถ่ายตัวอย่างของเหลวปริมาตร 1.0 mL [กรณีที่ตัวอย่างไม่ใช่ของเหลว ให้ถ่ายตัวอย่างแขวนลอยเริ่มต้น ระดับการเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 0.1 mL] ลงบนผิวหน้าของจานอะการ์ขนาดใหญ่ (ขนาด 140 mm) จำนวน 1 จาน หรือแบ่งใส่จานอะการ์ขนาดเล็ก (ขนาด 90 mm) จำนวน 3 จาน ทั้งสองกรณีให้ทำ 2 ซ้ำ โดยใช้จานอะการ์ขนาดใหญ่จำนวน 2 จาน และจานอะการ์ขนาดเล็กจำนวน 6 จาน

9.2.3 เกลี่ยตัวอย่างบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วอย่างรวดเร็ว พยายามไม่ให้แท่งเกลี่ยเชื้อ (ข้อ 6.9) สัมผัสกับด้านข้างของจานอะการ์ จากนั้นให้ปิดฝาจานอะการ์ และตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 15 min ที่อุณหภูมิห้อง

9.3 การบ่มเพาะเชื้อ (incubation)

คว่ำจานเพาะเชื้อที่เตรียมตามข้อ 9.2.3 แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ (ข้อ 6.2) ที่อุณหภูมิ 35 °C หรือ 37 °C * เป็นเวลา 24 h ± 2 h นำมาอ่านผล จากนั้นบ่มเพาะเชื้อต่ออีก 24 h ± 2 h

หมายเหตุ * *อุณหภูมิที่ใช้ต้องได้รับการยอมรับตามข้อตกลงร่วมกันระหว่างผู้เกี่ยวข้อง และต้องระบุอุณหภูมิไว้ในรายงานผลการทดสอบด้วย*

9.4 การเลือกจานเพาะเชื้อและการแปลผล

9.4.1 เมื่อบ่มเพาะเชื้อครบ 24 h ± 2 h แล้ว ให้ทำเครื่องหมายใต้จานเพาะเชื้อในตำแหน่งที่พบโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ (ดู ***หมายเหตุ*** *1*)

บ่มเพาะเชื้อต่ออีก 24 h ± 2 h ในตู้บ่มเพาะเชื้อ (ข้อ 6.2) ที่อุณหภูมิ 35 °C หรือ 37 °C * และทำเครื่องหมายให้กับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะที่เกิดขึ้นใหม่ รวมทั้งโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะที่เกิดขึ้นด้วย (ดู ***หมายเหตุ*** *1*)

หมายเหตุ * *อุณหภูมิที่ใช้ต้องได้รับการยอมรับตามข้อตกลงร่วมกันระหว่างผู้เกี่ยวข้อง และต้องระบุอุณหภูมิไว้ในรายงานผลการทดสอบด้วย*

แจงนับโคโลนีเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญสูงสุดไม่เกิน 300 โคโลนี (ดู ***หมายเหตุ*** *2*) ซึ่งโคโลนีเหล่านี้ต้องเป็นโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและ/หรือโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะจำนวน 150 โคโลนี ที่ระดับการเจือจาง 2 ระดับที่ติดกัน (successive dilution) โดยจานเพาะเชื้ออย่างน้อย 1 จาน ต้องมีโคโลนีอย่างน้อย 15 โคโลนี

เลือกโคโลนีเพื่อทดสอบยืนยันผล (ข้อ 9.5) จำนวน A โคโลนี (ในจานเพาะเชื้อแต่ละจาน ถ้ามีเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ให้เลือกมา 5 โคโลนี หรือถ้ามีเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะ ให้เลือกมา 5 โคโลนี หรือถ้ามีทั้งโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะ ให้เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ 5 โคโลนี และโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะอีก 5 โคโลนี)

ถ้ามีโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและ/หรือโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะน้อยกว่า 15 โคโลนี บนจานเพาะเชื้อของตัวอย่างทดสอบที่เป็นของเหลวที่ไม่ได้ทำการเจือจางหรือบนจานเพาะเชื้อของตัวอย่างที่ไม่ใช่ของเหลวที่ระดับการเจือจางต่ำสุด ให้ประมาณจำนวนเชื้อด้วยวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 9.4.3 และข้อ 10.2

หมายเหตุ 1 *โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ มีลักษณะเป็นสีดำหรือสีเทา โคโลนีมันวาวและนูน (หลังจากบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 h จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm ถึง 1.5 mm และหลังจากบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 48 h จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 mm ถึง 2.5 mm) และล้อมรอบด้วยโซนใส (clear zone) ที่อาจจะมีความขุ่นเล็กน้อย*

หลังบ่มเพาะเชื้ออย่างน้อย 24 h โคโลนีจะปรากฏวงขุ่นล้อมรอบติดกับโคโลนีที่อยู่ด้านในของโซนใส

หมายเหตุ 2 *โคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะ มีขนาดเท่ากับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและอาจปรากฏลักษณะใดลักษณะหนึ่งดังต่อไปนี้*

- *โคโลนีมีสีดำมันวาว ที่อาจมีขอบสีขาวขนาดเล็ก ไม่มีโซนใสและวงขุ่นหรือมีโซนใสแต่สังเกตเห็นได้ยาก*
- *โคโลนีมีสีเทาและไม่มีโซนใส*

โคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะส่วนใหญ่จะเกิดจากสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์นม กุ้ง และเครื่องในสัตว์ปีก (giblet) เป็นต้น และลักษณะดังกล่าวจะพบได้น้อยในสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ

หมายเหตุ 3 *โคโลนีอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อที่ไม่แสดงลักษณะของโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีลักษณะไม่เฉพาะ ตามที่อธิบายไว้ใน* ***หมายเหตุ*** *1 และ 2 ให้พิจารณาโคโลนีเหล่านั้นเป็นเชื้อประจำถิ่น (background flora)*

9.4.2 กรณีที่ถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1.0 mL และเกลี่ยบนจานเพาะเชื้อ 3 จาน (ข้อ 9.2.2) ให้นับจำนวนโคโลนีรวมและทดสอบยืนยันผลจากจานเพาะเชื้อทั้งหมด

9.4.3 ในการประมาณค่าการตรวจหาเชื้อในปริมาณต่ำของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก ให้เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะจากทุกจานเพาะเชื้อตามจำนวนที่กำหนดไว้ข้างต้นมาทดสอบยืนยันผล

9.5 การทดสอบยืนยันผล (การทดสอบโคอะกูเลส)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลอดเชื้อ (ข้อ 6.7) เขี่ยตัวอย่างเชื้อจากโคโลนีที่เลือกมาทดสอบยืนยันผล (ข้อ 9.4) แล้วถ่ายตัวอย่างเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเบรน-ฮาร์ทอินฟิวชั่นบรอท (ข้อ 5.3.2) จากนั้นบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C หรือ 37 °C * เป็นเวลา 24 h ± 2 h

ถ่ายตัวอย่างเชื้อปริมาตร 0.1 mL ลงในหลอดเฮโมไลซิสหรือขวดปลอดเชื้อ (ข้อ 6.5) ที่บรรจุด้วยพลาสมากระต่ายปริมาตร 0.3 mL (ข้อ 5.3.3) (พลาสมากระต่ายอาจใช้ปริมาตรอื่น ๆ ตามที่ผู้ผลิตกำหนด) แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C หรือ 37 °C *

หมายเหตุ * *อุณหภูมิที่ใช้ต้องได้รับการยอมรับตามข้อตกลงร่วมกันระหว่างผู้เกี่ยวข้อง และต้องระบุอุณหภูมิไว้ในรายงานผลการทดสอบด้วย*

เอียงหลอดทดสอบเพื่อตรวจสอบการจับตัวเป็นก้อน (clotting) ของพลาสมาหลังจากบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 4 h ถึง 6 h ถ้าการทดสอบให้ผลเป็นลบ ให้ตรวจสอบอีกครั้งหลังบ่มเพาะเชื้อต่อจนครบ 24 h หรือตรวจสอบตามเวลาบ่มเพาะเชื้อที่ผู้ผลิตระบุ

ให้รายงานผลการทดสอบโคอะกูเลสเป็นบวก เมื่อปริมาตรของก้อนพลาสมาเกิดขึ้นมากกว่าครึ่งหนึ่งของปริมาตรของเหลวเดิมที่มีอยู่

สำหรับตัวควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) ในแต่ละรุ่นของพลาสมา ให้เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเบรน-ฮาร์ทอินฟิวชั่นบรอท ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ข้อ 5.3.2) ปริมาตร 0.1 mL ลงในพลาสมากระต่าย (ข้อ 5.3.3) ปริมาตรตามคำแนะนำของผู้ผลิต แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อโดยไม่ต้องเติมเชื้อ พลาสมาที่ใช้ควบคุมนี้ต้องไม่เกิดการจับตัวเป็นก้อน จึงจะถือว่าผลทดสอบถูกต้อง

10. การแสดงผล

10.1 ทั่วไป

10.1.1 คำนวณหาจำนวนโคโลนีของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกในแต่ละจานเพาะเชื้อที่ถูกเลือกมา (a) ตามสมการดังต่อไปนี้

$$a = \frac{b_{\mathrm{c}}}{A_{\mathrm{c}}} \times c_{\mathrm{c}} + \frac{b_{\mathrm{nc}}}{A_{\mathrm{nc}}} \times c_{\mathrm{nc}}$$

เมื่อ

A_{c} คือ จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะที่นำมาทดสอบโคอะกูเลส (ข้อ 9.5)

A_{nc} คือ จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะที่นำมาทดสอบโคอะกูเลส (ข้อ 9.5)

b_{c} คือ จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก

b_{nc} คือ จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก

c_{c} คือ จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะทั้งหมดที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ (ข้อ 9.4)

c_{nc} คือ จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะทั้งหมดที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ (ข้อ 9.4)

ผลการคำนวณให้ปัดเป็นเลขจำนวนเต็ม (ดู มอก. 2396)

10.1.2 การคำนวณหาจำนวนโคโลนีของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกที่ปรากฏอยู่ในตัวอย่างทดสอบ (N)

(1) สำหรับจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีสูงสุดไม่เกิน 300 โคโลนี ซึ่งในจำนวนนี้มีโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและ/หรือโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะจำนวน 150 โคโลนี ที่ระดับการเจือจาง 2 ระดับที่ต่อเนื่องกัน การคำนวณจำนวนโคโลนีของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกในแต่ละจานเพาะเชื้อระบุไว้ในข้อ 10.1.1 และคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ระดับการเจือจางที่ติดกัน ซึ่งจำนวน N ของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกที่ปรากฏอยู่ในตัวอย่างทดสอบสามารถคำนวณได้จากสมการ ดังต่อไปนี้

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

เมื่อ

$\sum a$ คือ จำนวนโคโลนีของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกทั้งหมดที่พบจากจานเพาะเชื้อที่ถูกเลือกมาทุกจาน

V คือ ปริมาตรตัวอย่างทดสอบที่นำมากระจายบนจานเพาะเชื้อ ในหน่วยมิลลิลิตร

n_1 คือ จำนวนจานเพาะเชื้อที่เลือกมาของระดับการเจือจางแรก

n_2 คือ จำนวนจานเพาะเชื้อที่เลือกมาของระดับการเจือจางที่สอง

d คือ ระดับการเจือจางแรกที่ถูกเลือกมา

ผลการคำนวณให้เป็นเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง (ดู มอก. 2396)

(2) รายงานผลการทดสอบเป็นจำนวนโคโลนีของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกต่อตัวอย่างทดสอบ 1 mL (กรณีตัวอย่างเป็นของเหลว) หรือต่อตัวอย่างทดสอบ 1 g (กรณีตัวอย่างเป็นตัวอย่างอื่น ๆ) และให้แสดงผลเป็นเลขจำนวนระหว่าง 1.0 ถึง 9.9 แล้วคูณด้วย 10^x เมื่อ x เป็นเลขยกกำลัง

10.1.3 ตัวอย่างการคำนวณ

การนับจำนวนโคโลนีเป้าหมายหลังจากการถ่ายตัวอย่างปริมาตร 0.1 mL ให้ผลดังต่อไปนี้

- ที่ระดับการเจือจางแรกที่เลือกมา (10^{-2}) : มีโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ 65 โคโลนีและ 85 โคโลนี และไม่มีโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะ
- ที่ระดับการเจือจางที่สองที่เลือกมา (10^{-3}) : มีโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ 3 โคโลนีและ 7 โคโลนี และไม่มีโคโลนีที่มีลักษณะไม่เฉพาะ

จำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อต่อไปนี้ ถูกนำมาทดสอบโคอะกูเลส

- จาก 65 โคโลนี นำมา 5 โคโลนี และทั้ง 5 โคโลนี นั้นได้รับการพิสูจน์แล้วว่าให้ผลโคอะกูเลสบวก ดังนั้นจึงได้ค่า a = 65
- จาก 85 โคโลนี นำมา 5 โคโลนี และในจำนวนนั้นมี 3 โคโลนี ที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าให้ผลโคอะกูเลสบวก ดังนั้นจึงได้ค่า a = 51

- จาก 3 โคโลนี นำมา 3 โคโลนี และทั้ง 3 โคโลนี นั้นได้รับการพิสูจน์แล้วว่าให้ผลโคอะกูเลสบวก ดังนั้นจึงได้ค่า a = 3
- จาก 7 โคโลนี นำมา 5 โคโลนี และทั้ง 5 โคโลนี นั้นได้รับการพิสูจน์แล้วว่าให้ผลโคอะกูเลสบวก ดังนั้นจึงได้ค่า a = 7

$$N = \frac{65 + 51 + 3 + 7}{0.22 \times 10^{-2}} = 57\ 272$$

ผลการคำนวณได้จำนวนโคโลนีของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกทั้งหมดเท่ากับ 5.7×10^4

10.2 การประมาณค่าการตรวจหาเชื้อในปริมาณต่ำ (estimation of low number, N_e)

10.2.1 กรณีที่จานเพาะเชื้อสองจานสอดคล้องกับตัวอย่างทดสอบ (ผลิตภัณฑ์ของเหลว) หรือตัวอย่างแขวนลอยเริ่มต้น (ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ) และจานเพาะเชื้อแต่ละจานมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 15 โคโลนี ให้รายงานดังนี้

(1) สำหรับผลิตภัณฑ์ของเหลว ให้ประมาณจำนวนสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกต่อตัวอย่างทดสอบ 1 mL

$$N_{\mathrm{e}} = \frac{\sum a}{V \times 2}$$

เมื่อ

$\sum a$ คือ จำนวนโคโลนีของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกทั้งหมดที่ตรวจพบบนจานเพาะเชื้อ 2 จานที่ถูกเลือกมา (ข้อ 10.1.1)

V คือ ปริมาตรตัวอย่างทดสอบที่นำมากระจายบนแต่ละจานเพาะเชื้อ เป็นมิลลิลิตร

(2) สำหรับผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ให้ประมาณจำนวนสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกต่อตัวอย่างทดสอบ 1 g

$$N_{\mathrm{e}} = \frac{\sum a}{V \times 2 \times d}$$

เมื่อ

$\sum a$ คือ จำนวนรวมของโคโลนีของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกที่ตรวจพบ บนจานเพาะเชื้อ 2 จานที่ถูกเลือกมา (ข้อ 10.1.1)

d คือ ระดับการเจือจางตัวอย่างแขวนลอยเริ่มต้น

V คือ ปริมาตรตัวอย่างทดสอบที่นำมากระจายบนแต่ละจานเพาะเชื้อ เป็นมิลลิลิตร

10.2.2 กรณีไม่มีโคโลนีของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกอยู่เลยในจานเพาะเชื้อทั้ง 2 จานในตัวอย่างทดสอบ (ผลิตภัณฑ์ของเหลว) หรือตัวอย่างแขวนลอยเริ่มต้น (ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ) ให้รายงานผลการทดสอบ ดังต่อไปนี้

กรณีผลิตภัณฑ์ของเหลว

ถ้าใช้ตัวอย่าง 0.1 mL ให้รายงานผลเป็นน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

ถ้าใช้ตัวอย่าง 1 mL ให้รายงานผลเป็นน้อยกว่า 1 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

กรณีเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ

ถ้าใช้ตัวอย่าง 0.1 mL ให้รายงานผลเป็นน้อยกว่า $10/d$ โคโลนีต่อกรัม

ถ้าใช้ตัวอย่าง 1 mL ให้รายงานผลเป็นน้อยกว่า $1/d$ โคโลนีต่อกรัม

เมื่อ d คือ ระดับการเจือจางตัวอย่างแขวนลอยเริ่มต้น

11. ความเที่ยง

11.1 ทั่วไป

11.1.1 ความเที่ยงของวิธีเชิงปริมาณสามารถแสดงได้ในเทอมของการทวนซ้ำ (repeatability) และการทำซ้ำ (reproducibility) ตามที่กำหนดไว้ใน ISO 5725-2 ซึ่งวิธีการคำนวณที่ใช้ใน ISO 5725-2 เป็นการคำนวณโดยใช้ค่าเฉลี่ย ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับการทดสอบทางจุลชีววิทยา ที่ข้อมูลมักไม่มีการกระจายตัวแบบปกติ (เกาส์เซียน) [Normal distribution (Gaussian)] ดังนั้นเมื่อ ISO 16140 ได้พัฒนาวิธีการคำนวณสำหรับข้อมูลด้านจุลชีววิทยาขึ้นมาโดยเฉพาะ เพื่อใช้สำหรับการคำนวณค่าการทวนซ้ำ และการทำซ้ำ ค่าสถิติเหล่านี้มีข้อดี คือ มีความไวน้อยต่อค่าที่มีการเปลี่ยนแปลงสูง ซึ่งยินยอมให้ใช้ค่าผิดปกตินั้นมาคำนวณได้ ดังนั้นจึงได้นำตัวประมาณค่าเหล่านี้มาเป็นส่วนหนึ่งของมาตรฐานนี้

11.1.2 รายละเอียดการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการต่อความเที่ยงของวิธีการทดสอบได้สรุปไว้ใน ภาคผนวก ก. ซึ่งค่าคำนวณที่ได้จากการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการอาจจะไม่สามารถประยุกต์ใช้กับช่วงความเข้มข้นและชนิดของอาหาร (matrices) ที่ค่าอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากที่กำหนดไว้ได้ ข้อมูลด้านความเที่ยงได้จากอาหาร 3 ชนิด ที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระดับต่าง ๆ และวัสดุอ้างอิง ปัจจัยอื่น ๆ เช่น สายพันธุ์ของเชื้อที่พิจารณา การแข่งขันของเชื้อประจำถิ่น (competitive flora) และสภาพเชื้อเป้าหมาย (target) และเชื้อแข่งขัน (competitors) ที่มีผลต่อค่าความเที่ยง

11.2 การทวนซ้ำ

11.2.1 ขีดจำกัดการทวนซ้ำ

ความแตกต่างสัมบูรณ์ (absolute difference) ระหว่างผลการทดสอบสองค่าในรูปของลอกการิทึมฐานสิบ (จำนวนของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก ต่อตัวอย่างทดสอบ 1 g หรือ ต่อตัวอย่างทดสอบ 1 mL) หรืออัตราส่วนของค่าสูงกว่าต่อค่าต่ำกว่าของสองผลการทดสอบในสเกลปกติ ที่ได้รับจากการทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน ใช้ตัวอย่างเดียวกัน โดยผู้ทดสอบคนเดียวกันซึ่งใช้อุปกรณ์ชุดเดียวกันภายในช่วงเวลาที่สั้นที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ จำนวนครั้งทดสอบที่ให้ผลการทดสอบเกินขีดจำกัดของการทวนซ้ำ (r) ต้องไม่เกิน 5 % ของจำนวนครั้งที่ทดสอบ

11.2.2 ค่าโดยรวม (overall value)

ค่าขีดจำกัดการทวนซ้ำ (r) ต่อไปนี้สามารถนำไปใช้ได้เมื่อทดสอบตัวอย่างอาหารทั่วไป ซึ่ง r เป็นค่าเฉลี่ยทั่วไปสำหรับทุกชนิดอาหาร ที่นำมาพิจารณา

r = 0.28 (ใช้แสดงเป็นค่าความแตกต่างสัมบูรณ์ระหว่างผลการทดสอบ 2 ผลการทดสอบในรูปลอกการิทึมฐานสิบ) หรือ

r = 1.9 (ใช้แสดงเป็นอัตราส่วนของค่าสูงกว่าต่อค่าต่ำกว่าของผลการทดสอบ 2 ผลการทดสอบในสเกลปกติ)

สำหรับ วัสดุอ้างอิง (แคปซูลที่มีความจุประมาณ 5 000 CFU ให้ดู ภาคผนวก ก) ค่าต่อไปนี้สามารถนำไปใช้ได้

r = 0.19 (ใช้แสดงเป็นค่าความแตกต่างสัมบูรณ์ระหว่างผลการทดสอบ 2 ผลการทดสอบในรูปลอกการิทึมฐานสิบ) หรือ

r = 1.55 (ใช้แสดงเป็นอัตราส่วนของค่าสูงกว่าต่อค่าต่ำกว่าของผลการทดสอบ 2 ผลการทดสอบในสเกลปกติ)

ตัวอย่าง ผลการทดสอบแรกพบสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก 10 000 หรือ 1.0×10^4 ต่อตัวอย่างทดสอบ 1 g ภายใต้ภาวะการทวนซ้ำ ซึ่งอัตราส่วนของค่าสูงกว่าต่อค่าต่ำกว่าไม่ควรมากกว่า 1.9 ดังนั้นค่าของผลการทดสอบที่สองควรมีสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกต่อตัวอย่างทดสอบ 1 g อยู่ระหว่าง 5 263 (= 10 000/1.9) และ 19 000 (=10 000 x 1.9)

11.3 การทำซ้ำ

11.3.1 ขีดจำกัดการทำซ้ำ

ความแตกต่างสัมบูรณ์ระหว่างผลการทดสอบสองค่าในรูปของลอกการิทึมฐานสิบ (จำนวนของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกต่อตัวอย่างทดสอบ 1 g หรือ ต่อตัวอย่างทดสอบ 1 mL) หรืออัตราส่วนของค่าสูงกว่าต่อค่าต่ำกว่าของสองผลการทดสอบในสเกลปกติ ที่ได้รับจากการทดสอบด้วยวิธีเดียวกันและตัวอย่างเดียวกัน แต่ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ผู้ทำการทดสอบ และใช้อุปกรณ์ที่ต่างกัน จำนวนครั้งทดสอบที่ให้ผลการทดสอบเกินขีดจำกัดของการทำซ้ำ (R) ต้องไม่เกิน 5 % ของจำนวนครั้งที่ทดสอบ

11.3.2 ค่าโดยรวม

ค่าขีดจำกัดการทำซ้ำ (R) ต่อไปนี้สามารถนำไปใช้เมื่อทดสอบตัวอย่างอาหารทั่วไป ซึ่ง R เป็นค่าเฉลี่ยทั่วไปสำหรับอาหารทุกชนิด ที่นำมาพิจารณา

R = 0.43 (ใช้แสดงเป็นค่าความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบ 2 ผลการทดสอบในรูปลอกการิทึมฐานสิบ) หรือ

R = 2.7 (ใช้แสดงเป็นอัตราส่วนของค่าสูงกว่าต่อค่าต่ำกว่าของผลการทดสอบ 2 ผลการทดสอบในสเกลปกติ)

สำหรับวัสดุอ้างอิง (แคปซูลที่มีความจุประมาณ 5 000 CFU ให้ดู ภาคผนวก ก.) ค่าต่อไปนี้สามารถนำไปใช้ได้

R = 0.39 (ใช้แสดงเป็นค่าความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบ 2 ผลการทดสอบในรูปลอกการิทึมฐานสิบ) หรือ

R = 2.4 (ใช้แสดงเป็นอัตราส่วนของค่าสูงกว่าต่อค่าต่ำกว่าของผลการทดสอบ 2 ผลการทดสอบในสเกลปกติ)

ตัวอย่างที่ 1 ผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการแรก พบสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก 1.0×10^4 ต่อตัวอย่างทดสอบ 1 g ของผลิตภัณฑ์อาหาร

ภายใต้ภาวการณ์ทำซ้ำ อัตราส่วนของผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการที่ 1 และ 2 ควรมีค่าไม่เกิน 2.7 (ในรูปแบบอัตราส่วน R = 2.7) ดังนั้น ผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการที่สองควรมีสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกต่อตัวอย่างทดสอบ 1 g อยู่ระหว่าง 3.7×10^3 (= 1.0×10^4 / 2.7) และ 2.7×10^4 (=$1.0 \times 10^4 \times 2.7$)

ตัวอย่างที่ 2 เมื่อห้องปฏิบัติการที่ต้องการทราบว่าปริมาณเชื้อสูงสุดที่ยอมรับได้ยังอยู่ภายใต้ขีดจำกัดการทำซ้ำที่กำหนดไว้ล่วงหน้าหรือไม่ [สำหรับตัวอย่างนี้กำหนดค่าขีดจำกัดการทำซ้ำเท่ากับ 10^5 หรือ 5 เมื่ออยู่ในรูปของลอกการิทึมฐานสิบ ($5 \log_{10}$)]

สำหรับค่า R [ในรูปค่าลอกการิทึมฐานสิบ R = 0.43] ให้คูณด้วยแฟคเตอร์ 0.59 จะได้ผลคูณเท่ากับ 0.25 (0.25 = 0.43 × 0.59) ซึ่งค่า 0.25 ที่ได้คือค่าความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบที่อยู่ในรูปลอกการิทึมฐานสิบ หรือเท่ากับ $10^{0.25}$ เมื่ออยู่ในรูปอัตราส่วนระหว่างผลการทดสอบ

ดังนั้นผลการทดสอบที่ได้จะต้องมีค่าขีดจำกัดการทำซ้ำได้มากสุด ไม่เกิน 5.25 เมื่ออยู่ในรูปของรูปลอกการิทึมฐานสิบ ($5.25 = 5 + 0.25 = 5 \log_{10} + 0.25 \log_{10}$) หรือเท่ากับ 1.8×10^5 CFU ($1.8 \times 10^5 = 10^{5.25}$)

สำหรับแฟคเตอร์ 0.59 แสดงถึงการทดสอบว่าเกินค่าขีดจำกัดการทำซ้ำหรือไม่แบบทางเดียว (one-sided) ที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแฟคเตอร์ 0.59 สามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$0.59 = \frac{1.64}{1.96 \times \sqrt{2}}$$

ดังนั้นถ้าห้องปฏิบัติการกำหนดค่าขีดจำกัดการทำซ้ำเท่ากับ 10^X หรือ X เมื่ออยู่ในรูปของลอกการิทึมฐานสิบ

ผลการทดสอบที่ได้จะต้องมีค่าขีดจำกัดการทำซ้ำได้มากสุด ไม่เกิน X.25 เมื่ออยู่ในรูปของรูปลอกการิทึมฐานสิบ หรือเท่ากับ 1.8×10^X CFU

12. การรายงานผล

ในรายงานผลการทดสอบต้องระบุรายละเอียด ดังต่อไปนี้

12.1 ข้อมูลทั้งหมดที่จำเป็นสำหรับการบ่งชี้ตัวอย่างให้สมบูรณ์

12.2 วิธีชักตัวอย่างที่ใช้ (ถ้ามีข้อมูล)

12.3 วิธีทดสอบ ให้ระบุเลขหมาย มอก. และหมายเลขข้อที่ใช้ในการทดสอบ (ถ้ามี)

12.4 อุณหภูมิการบ่มเพาะเชื้อที่ใช้

12.5 รายละเอียดการดำเนินการทดสอบทั้งหมด ที่ไม่ได้กำหนดไว้ในมาตรฐานฉบับนี้ รวมถึงรายละเอียดของสิ่งที่อาจเกิดขึ้น ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทดสอบ

12.6 ผลการทดสอบที่ได้

ภาคผนวก ก.
ตัวอย่างผลการศึกษาระหว่างห้องปฏิบัติการ
(ให้ไว้เป็นข้อมูล)

ผลการศึกษาระหว่างห้องปฏิบัติการนานาชาตินี้ ดำเนินการโดย Laboratory for Study and Research on Hygiene and Quality of Food (LERHQA) ของ French Food Safety Agency (AFSSA) ในปี 1999 ในขอบข่ายของ European project SMT CT 96 2098 (ดูอ้างอิง [8]) โดยความร่วมมือจากห้องปฏิบัติการระดับนานาชาติ 24 แห่ง จาก 16 ประเทศในทวีปยุโรปที่ได้ดำเนินการศึกษาเนยแข็ง เนื้อ ไข่ผง (egg powder) และวัสดุอ้างอิง โดยศึกษาตัวอย่างอาหารที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิดข้างต้น ที่ระดับการปนเปื้อนของสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวกที่แตกต่างกัน 3 ระดับ พร้อมทั้งมีตัวควบคุมที่ให้ผลลบ

ความเที่ยงของข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาระหว่างห้องปฏิบัติการครั้งนี้ แสดงไว้ในตารางที่ ก.1 ถึง ตารางที่ ก.4 ตามชนิดตัวอย่างที่คำนวณตามวิธีการทางสถิติที่ระบุใน ISO 16140 ข้อมูลที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการบางแห่งจะถูกตัดทิ้งไปเนื่องจากข้อมูลนั้น ๆ เบี่ยงเบนไปจากวิธีที่กำหนด

ตารางที่ ก.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างเนยแข็ง
(ข้อ 11.1.2 ข้อ 11.2.2 และข้อ 11.3.2)

ตัวอย่าง/ระดับการปนเปื้อน	เนยแข็ง/ระดับต่ำ	เนยแข็ง/ระดับกลาง	เนยแข็ง/ระดับสูง
Number of laboratories having returned results	22	22	22
Number of samples per laboratory	2	2	2
Number of participating laboratories after eliminating outliers	19	19	19
Number of accepted samples	38	38	38
Median value (in $\log_{10}$ CFU/g)	3.33	5.12	6.06
Repeatability standard deviation, s_r (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.18	0.06	0.12
Repeatability relative standard deviation (%)	5.36	1.16	1.96
Repeatability limit (r), as difference on $\log_{10}$ scale (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.50	0.17	0.33
Reproducibility standard deviation, s_R (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.19	0.16	0.24
Reproducibility relative standard deviation (%)	5.61	3.24	3.91
Reproducibility limit (R), as difference on $\log_{10}$ scale (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.52	0.47	0.66

ตารางที่ ก.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างเนื้อ

(ข้อ 11.1.2 ข้อ 11.2.2 และข้อ 11.3.2)

ตัวอย่าง/ระดับการปนเปื้อน	เนื้อ/ ระดับต่ำ	เนื้อ/ ระดับกลาง	เนื้อ/ ระดับสูง
Number of laboratories having returned results	23	23	23
Number of samples per laboratory	2	2	2
Number of participating laboratories after eliminating outliers	18	18	18
Number of accepted samples	36	36	36
Median value (in $\log_{10}$ CFU/g)	3.27	4.20	6.19
Repeatability standard deviation, s_r (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.12	0.07	0.10
Repeatability relative standard deviation (%)	3.64	1.58	1.67
Repeatability limit (r), as difference on $\log_{10}$ scale (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.33	0.19	0.29
Reproducibility standard deviation, s_R (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.17	0.17	0.14
Reproducibility relative standard deviation (%)	5.25	3.99	2.26
Reproducibility limit (R), as difference on $\log_{10}$ scale (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.48	0.47	0.39

ตารางที่ ก.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างไข่ผง

(ข้อ 11.1.2 ข้อ 11.2.2 และข้อ 11.3.2)

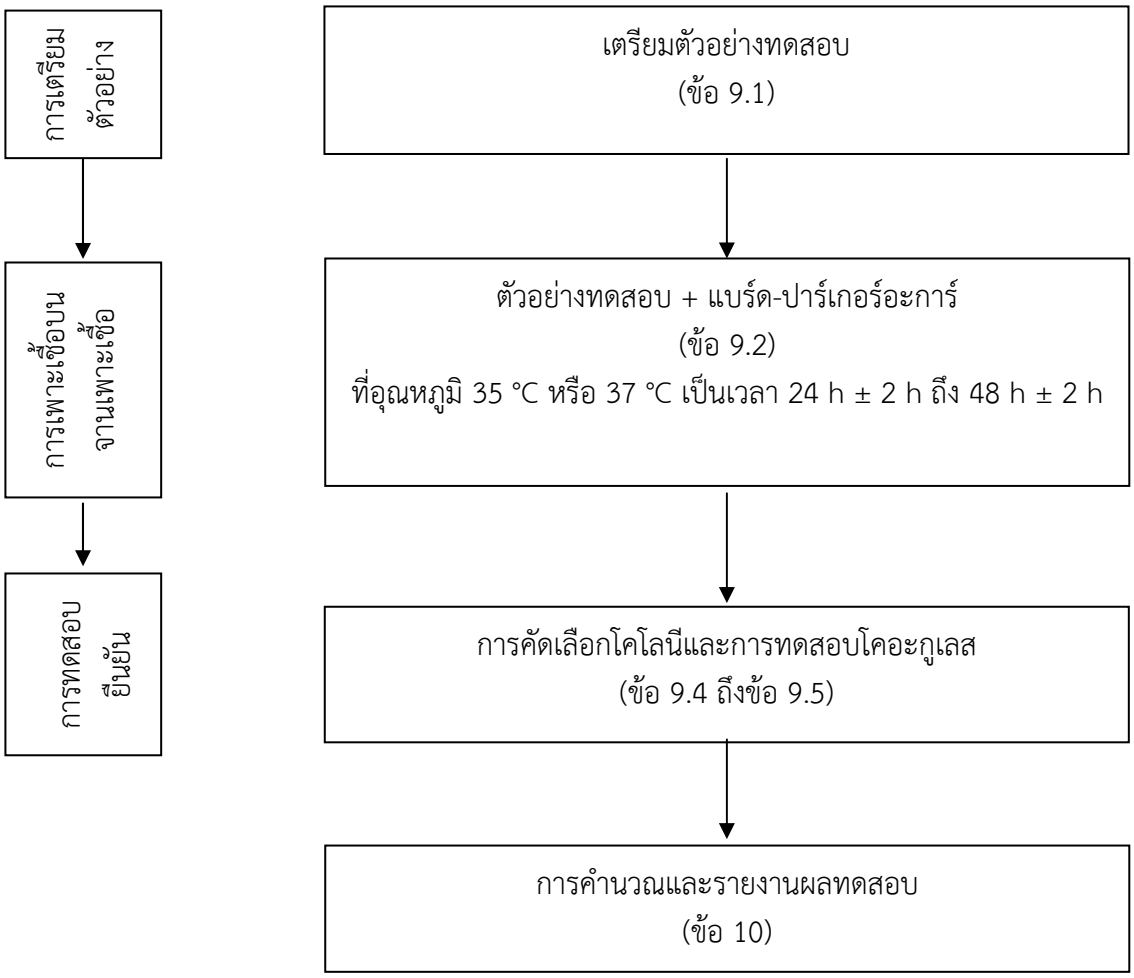
ตัวอย่าง/ระดับการปนเปื้อน	ไข่ผง/ ระดับต่ำ	ไข่ผง/ ระดับกลาง	ไข่ผง/ ระดับสูง
Number of laboratories having returned results	23	23	23
Number of samples per laboratory	2	2	2
Number of participating laboratories after eliminating outliers	20	20	20
Number of accepted samples	40	40	40
Median value (in $\log_{10}$ CFU/g)	3.17	4.10	5.23
Repeatability standard deviation, s_r (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.09	0.09	0.07
Repeatability relative standard deviation (%)	2.78	2.17	1.41
Repeatability limit (r), as difference on $\log_{10}$ scale (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.25	0.25	0.21
Reproducibility standard deviation, s_R (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.11	0.10	0.11
Reproducibility relative standard deviation (%)	3.57	2.55	2.08
Reproducibility limit (R), as difference on $\log_{10}$ scale (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.32	0.29	0.30

ตารางที่ ก.4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างวัสดุอ้างอิง
(ข้อ 11.1.2 ข้อ 11.2.2 และข้อ 11.3.2)

ตัวอย่าง/ระดับการปนเปื้อน	**วัสดุอ้างอิง* (แคปซูลที่สามารถบรรจุได้ประมาณ 5 000 CFU)**
Number of laboratories having returned results	23
Number of samples per laboratory	2
Number of participating laboratories after eliminating outliers	20
Number of accepted samples	40
Median value (in $\log_{10}$ CFU/g)	3.79
Repeatability standard deviation, s_r (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.07
Repeatability relative standard deviation (%)	1.76
Repeatability limit (r), as difference on $\log_{10}$ scale (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.19
Reproducibility standard deviation, s_R (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.14
Reproducibility relative standard deviation (%)	3.68
Reproducibility limit (R), as difference on $\log_{10}$ scale (in $\log_{10}$ CFU/g)	0.39
หมายเหตุ * *วัสดุอ้างอิงเตรียมโดย RIVM ประเทศเนเธอร์แลนด์*	

ภาคผนวก ข.
แผนภูมิการทดสอบเชื้อ
(ให้ไว้เป็นข้อมูล)

แผนภูมิที่ 1. การทดสอบสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก (*สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส* และสายพันธุ์อื่น ๆ) ด้วยเทคนิคการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบร์ด-ปาร์เกอร์อะการ์



ภาคผนวก ค.
ส่วนประกอบและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเจือจาง
(ข้อ 5.3)

ค.1 แบร์ด-ปาร์เกอร์อะการ์ (Baird-Parker agar medium) (ข้อ 5.3.1)

หมายเหตุ *1 หากสงสัยว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบร์ด-ปาร์เกอร์อะการ์ (ดูบรรณานุกรม [3]) อาจจะมีการเจริญของโปรเตียส (Proteus) ร่วมด้วย ให้เติมสารซัลฟาเมซาทีน (sulfamezathine) (ดูบรรณานุกรม [4])*

2 กรณีเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (commercially available media) ให้ปฏิบัติตามวิธีการของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

ค.1.1 เบสมีเดียม (base medium)

ค.1.1.1 ส่วนประกอบ

แพนครีเอติกไดเจสต์ของเคซีน (pancreatic digest of casein)	10.0 g
ยีสต์เอกซ์แทรกต์ (yeast extract)	1.0 g
มีทเอกซ์แทรกต์ (meat extract)	5.0 g
โซเดียมไพรูเวต (sodium pyruvate)	10.0 g
แอล-ไกลซีน (L-glycine)	12.0 g
ลิเทียมคลอไรด์ (lithium chloride)	5.0 g
อะการ์ (agar)	12 g ถึง 22 g*
น้ำ (ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย)	1 000 mL

หมายเหตุ * *ขึ้นอยู่กับความแข็งของอะการ์ (gel strength)*

ค.1.1.2 วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดหรืออาหารสำเร็จรูปแบบแห้งในน้ำ ต้มจนวุ้นละลายหมด เทอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 mL ลงในขวดรูปชมพู่ หรือขวดที่มีปริมาตรเหมาะสม (ข้อ 6.5) นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 min (กรณีจำเป็น ให้ปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนการฆ่าเชื้อ เพื่อให้ค่าความเป็นกรด-เบสสุดท้ายเป็น 7.2 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 °C)

ค.1.2 สารละลาย

ค.1.2.1 สารละลายโพแทสเซียมเทลลูไรต์ (potassium tellurite solution)

(1) ส่วนประกอบ

โพแทสเซียมเทลลูไรต์ * (potassium tellurite, K_2TeO_3)	1.0 g
น้ำ	100 mL

หมายเหตุ * *แนะนำให้ทำการเตรียมโพแทสเซียมเทลลูไรต์ ไว้ล่วงหน้าก่อนการทดสอบ [ดูข้อ ค.1.2.1 (2)]*

(2) วิธีเตรียม

ละลายโพแทสเซียมเทลลูไรต์ในน้ำ ถ้าพบว่ามีส่วนที่ไม่ละลายน้ำให้แยกออก ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีการกรองด้วยกระดาษกรองชนิดปลอดเชื้อขนาดรูผ่าน 0.22 µm สารละลายนี้อาจเก็บรักษาได้นานสุด 1 เดือนที่อุณหภูมิ 3 °C ± 2 °C และแนะนำให้ทิ้งสารละลายถ้าพบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น

ค.1.2.2 อีมัลชันไข่แดง (egg yolk emulsion) (ความเข้มข้นประมาณ 20% หรือตามคำแนะนำของผู้ผลิต)

หมายเหตุ *ควรเลือกใช้ชนิดเตรียมสำเร็จทางการค้า (commercial preparation)*

ในกรณีที่ต้องเตรียมสามารถใช้ส่วนประกอบ ดังต่อไปนี้

(1) ใช้ไข่ไก่สดและมีเปลือกครบถ้วนไม่บุบสลาย ทำความสะอาดไข่ด้วยสารชะล้างชนิดเหลว (liquid detergent) ล้างไข่โดยปล่อยให้น้ำไหลผ่าน จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวไข่โดยการแช่ในเอทานอล (70% โดยปริมาตร) เป็นเวลา 30 s และปล่อยให้แห้งในอากาศ หรืออาจพ่นแอลกอฮอล์บนเปลือกไข่แล้วฆ่าเชื้อด้วยไฟ

(2) ปฏิบัติงานภายใต้ภาวะปราศจากเชื้อ เมื่อตอกไข่แล้วให้แยกไข่แดงออกจากไข่ขาวโดยการถ่ายไข่แดงไปมาระหว่างเปลือกไข่ทั้งสอง ถ่ายไข่แดงสู่ภาชนะปลอดเชื้อ และเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรไข่แดง แล้วจึงผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 47 °C เป็นเวลา 2 h แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 3 °C ± 2 °C เป็นเวลา 18 h ถึง 24 h เพื่อให้ตกตะกอน จากนั้นให้ถ่ายของเหลวด้านบน (supernatant liquid) ใส่ขวดรูปชมพู่ปลอดเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

(3) สารละลายอีมัลชันที่เตรียมขึ้นนี้สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 3 °C ± 2 °C ได้นาน 72 h

ค.1.2.3 สารละลายซัลฟาเมซาทีน (sulfamethazine, sulfadimidine solution)

หมายเหตุ *ใช้เฉพาะเมื่อคาดว่าอาจมี โปรเตียส สปีชีส์ (Proteus* species*) ในตัวอย่างทดสอบ*

(1) ส่วนประกอบ

สารซัลฟาเมซาทีน (sulfamezathine)	0.2 g
สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide solution, 0.1 mol/L NaOH)	10 mL
น้ำ	90 mL

(2) วิธีเตรียม

(2.1) ละลายสารซัลฟาเมซาทีนในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำ

(2.2) ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองชนิดปลอดเชื้อขนาดรูผ่าน 0.22 µm

สารละลายนี้สามารถเก็บรักษาได้นานสุด 1 เดือนที่อุณหภูมิ 3 °C ± 2 °C

ค.1.3 คอมพลีตมีเดียม (complete medium)

ค.1.3.1 ส่วนประกอบ

เบสมีเดียม (ข้อ ค.1.1)	100 mL
สารละลายโพแทสเซียมเทลลูไรต์ (ข้อ ค.1.2.1)	1.0 mL
อีมัลชันไข่แดง (ข้อ ค.1.2.2)	5.0 mL
สารละลายซัลฟาเมซาทีน (ข้อ ค.1.2.3)	2.5 mL

ค.1.3.2 วิธีเตรียม

(1) ละลายเบสมีเดียม แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 47 °C โดยใช้เครื่องอังน้ำ (ข้อ 6.4)

(2) เติมสารละลายอีก 2 ชนิด (ข้อ ค.1.2.1 และ ข้อ ค.1.2.2) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วจึงผสมให้เข้ากัน ทั้งนี้ควรทำการอุ่นสารละลายแต่ละชนิดก่อนผสมโดยอุ่นในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 47 °C

(3) ถ้าสงสัยว่ามี *โปรเตียส* สปีชีส์ (*Proteus* species) ในตัวอย่างทดสอบให้เติมสารละลายซัลฟาเมซาทีน (ข้อ ค.1.2.3)

ค.1.4 การเตรียมจานอะการ์ (agar plate)

(1) เทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (ข้อ ค.1.3) ปริมาตรที่เหมาะสมลงในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ ให้มีความหนาประมาณ 4 mm และปล่อยทิ้งไว้ให้แข็งตัว
สามารถเก็บจานอะการ์ที่เตรียมสำเร็จไว้ที่อุณหภูมิ 3 °C ± 2 °C เป็นเวลา 24 h ได้ ก่อนทำให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

หมายเหตุ *อาหารในจานเพาะเชื้อที่เตรียมเชิงอุตสาหกรรมควรปฏิบัติตามข้อแนะนำของผู้ผลิตโดยคำนึงถึงระยะเวลาการเก็บรักษา*

(2) ทำให้ผิวหน้าจานอะการ์ที่เตรียมสำเร็จแห้งก่อนใช้ โดยเปิดฝาแล้วคว่ำหน้าจานเพาะเชื้อ (agar surface downward) และฝาภายในเตาอบหรือตู้บ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิระหว่าง 25 °C ถึง 50 °C จนกระทั่งหยดน้ำหายไปจากผิวหน้าอาหาร

ค.2 เบรน-ฮาร์ทอินฟิวชั่นบรอท (brain-heart infusion broth) (ข้อ 5.3.2)

ค.2.1 ส่วนประกอบ

เนื้อเยื่อสัตว์ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic digest of animal tissues)	10.0 g
ดีไฮเดรต คาล์ฟ เบรน อินฟิวชั่น (dehydrated calf brain infusion)	12.5 g
ดีไฮเดรต บีฟ ฮาร์ท อินฟิวชั่น (dehydrated beef heart infusion)	5.0 g
กลูโคส (glucose)	2.0 g
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl)	5.0 g
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส (disodium hydrogenphosphate anhydrous, Na_2HPO_4)	2.5 g
น้ำ	1 000 mL

ค.2.2 วิธีเตรียม

(1) ละลายส่วนประกอบทั้งหมดหรืออาหารสำเร็จรูปชนิดแห้งในน้ำ ถ้าจำเป็นอาจให้ความร้อนภายหลังจากการฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความเป็นกรด-เบส เพื่อให้ได้ค่าความเป็นกรด-เบสภายหลังการฆ่าเชื้อเท่ากับ 7.4 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 °C

(กรณีจำเป็น เพื่อให้ค่าความเป็นกรด-เบสสุดท้ายเท่ากับ 7.4 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 °C ต้องปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนการฆ่าเชื้อ)

(2) จากนั้นเทอาหารที่เตรียมสำเร็จแล้ว ปริมาตร 5 mL ถึง 10 mL ใส่ลงในหลอดทดสอบหรือขวดที่มีปริมาตรเหมาะสม (ข้อ 6.5)

(3) การฆ่าเชื้อทำโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 min

ค.3 พลาสมากระต่าย (rabbit plasma) (ข้อ 5.3.3)

ค.3.1 ผสมพลาสมากระต่ายชนิดแห้ง (dehydrated rabbit plasma) ที่มีจำหน่ายทั่วไปกับน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อตามคำแนะนำของผู้ผลิต

ค.3.2 ถ้าไม่มีพลาสมากระต่ายชนิดแห้ง ให้เจือจางพลาสมากระต่ายสดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (fresh sterile rabbit plasma) 1 ส่วนกับน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ส่วน
แบ่งเงื่อนไขการเตรียมเป็น 3 กรณี ดังต่อไปนี้

(1) ถ้าพบว่ามีการใช้โพแทสเซียมซิเทรต (potassium citrate) หรือโซเดียมซิเทรต (sodium citrate) ที่เป็นแอนติโคอะกูแลนต์ (anticoagulant) ให้เติมสารละลาย อีดีทีเอ (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) ความเข้มข้น 0.1% ลงในพลาสมากระต่ายที่ผ่านการเติมน้ำหรือที่เจือจางแล้วจากข้างต้น หากใช้ออกซาเลต (oxalate) หรือเฮปาริน (heparin) เป็นแอนติโคอะกูแลนต์ไม่ต้องเติม EDTA (ดูอ้างอิง [5])

(2) หากผู้ผลิตไม่ได้แจ้งไว้ พลาสมาที่ผ่านการเติมน้ำหรือที่เจือจางแล้ว ต้องนำมาใช้ทันที

(3) ก่อนนำมาใช้ควรทำการทดสอบพลาสมาแต่ละรุ่นด้วยสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสบวก และสตาฟิโลค็อกไคที่ให้ผลโคอะกูเลสลบ

บรรณานุกรม

[1] ISO 6888-2, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Past 2 : Technical using rabbit plasma fibrinogen agar medium.*

[2] KLOOS W.E. Systematics and the natural history of staphylococci. In: Staphylococci, *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl*., **69**, 1990, pp. 25 s – 37 s; and *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edn., 1994.

[3] BAIRD-PARKER, A.C. J. Appl. Bacteriol., **25** (1), 1962, pp. 12-19.

[4] SMITH, B.A. and BAIRD-PARKER, A.C. J. *Appl. Bacteriol*., **27** (1),1964, pp. 78-82.

[5] BAIRD-PARKER, A.C. *The Staphylococci*, (ed. Cohen, J.O.), Wiley-Interscience, New York, London, 1972, p.11.

[6] ISO 5725-2, *Accuracy (trueness and precision) of measurement method and results – Part 2; Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*

[7] ISO 16140, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods*

[8] DE BUYSER, M.L., LOMBARD, B., SHULTEN, S.M., IN'T VELD, P.H., SCOTTER, S.L., ROLLIER, R., LAHELLEC, C. Validation of EN ISO standard method 6888 part 1 and part 2:1999, Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. *Int. J. Food Microbiol*., **83**(2), 2003, pp. 185-194