



การควบคุมคุณภาพภายใน ทางจุลชีววิทยา

Quality Control : เป็นโปรแกรมของกิจกรรมต่าง ๆ ที่ห้องปฏิบัติการจัดทำขึ้นเพื่อให้แน่ใจว่ามีการปฏิบัติที่ดี กิจกรรมต่าง ๆ นี้ ได้แก่ การควบคุมคุณภาพภายในอย่างสม่ำเสมอ , การประเมินภายนอกและมาตรการทั้งหลาย อันจะทำให้เพิ่มความชำนาญและทำให้ผลการวิเคราะห์มีความมั่นใจมากขึ้น



ผลการตรวจวิเคราะห์จะถูกต้องและ ได้รับความเชื่อถือขึ้นกับปัจจัย

✂ วิธีตรวจวิเคราะห์ที่แม่นยำ

✂ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณภาพ

✂ บุคลากรมีความสามารถและความชำนาญ

✂ เครื่องมือเครื่องใช้ชนิดต่าง ๆ มีความน่าเชื่อถือ

✂ เครื่องมือต้องได้รับการควบคุมจากบุคลากรที่ได้รับการอบรม
และได้รับการ มอบหมายงานแล้ว

การควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ ทางจุลชีววิทยา

- I การควบคุมคุณภาพสถานที่และสภาพแวดล้อม
- II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์
- III การควบคุมคุณภาพบุคลากร
- IV การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ อ่างอิงและการควบคุมคุณภาพ
- V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ
- VI การควบคุมคุณภาพวิธีทดสอบ
- VII การควบคุมคุณภาพตัวอย่างทดสอบ



I การควบคุมคุณภาพ สถานที่และสภาพแวดล้อม

สถานที่

ผนังและพื้น

- ผิวเรียบ ง่ายต่อการทำความสะอาด (ไม่ใช่มู่ลี่ เพราะทำความสะอาดยาก ทำการติดฟิล์มแทนเพื่อกันแสงแดด)
- ควรมีพื้นที่ใช้สอยเพียงพอต่อการทำงาน

I การควบคุมคุณภาพ สถานที่และสภาพแวดล้อม



แยกจากกิจกรรมอื่นๆ จำกัดผู้เข้าออก



การจัดการที่จะทำให้ลดการปนเปื้อน



บริเวณ pre-enrichment ควรแยก

จากบริเวณที่ใช้ทดสอบ



I การควบคุมคุณภาพ สถานที่และสภาพแวดล้อม

- ☺ บริเวณที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและฆ่าเชื้อ ควรแยกจากบริเวณทดสอบ
- ☺ reference cultures และ certified reference cultures ต้องแยกเก็บรักษาแยกจากบริเวณ รับเก็บตัวอย่าง
- ☺ บริเวณรับตัวอย่างต้องแยกจากบริเวณที่ใช้ ในการทดสอบ



การควบคุมการเข้าออก



ห้องเปลี่ยนเสื้อผ้า



ห้องเตรียมตัวอย่าง



ช่องส่งตัวอย่างจากห้องเตรียม



ห้องทดสอบ



ห้องทดสอบ



ห้องทดสอบ



ห้องบ่มตัวอย่าง



ห้องบ่มตัวอย่าง



ห้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ



ผนังผิวเรียบ



พื้นผิวเรียบ ไม่มีร่อง สีส่อน



ตู้เย็นเก็บสารเคมี



I การควบคุมคุณภาพ สถานที่และสภาพแวดล้อม



มีการรักษาความสะอาดบริเวณรับตัวอย่างเพื่อ
ป้องกันการปนเปื้อน



เครื่องมือและอุปกรณ์ต้องวางในตำแหน่ง ให้มี
พื้นที่การทำงานมากที่สุด 🏠



I การควบคุมคุณภาพ สถานที่และสภาพแวดล้อม

การรักษาความสะอาด

- 😊 จัดให้มีการทำความสะอาดห้องปฏิบัติการอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งต้องจัดทำเป็นเอกสาร
- 😊 โต๊ะปฏิบัติการต้องมีการฆ่าเชื้อก่อนและหลังการใช้งาน

I การควบคุมคุณภาพ สถานที่และสภาพแวดล้อม

การรักษาความสะอาด (ต่อ)

- ☺ การทำความสะอาดพื้นควรถูด้วยผ้าหมาด ๆ และฆ่าเชื้อด้วยสารทำความสะอาด (ห้ามใช้ไม้กวาด)
- ☺ ไม่ควรมีฝุ่นละอองในห้องปฏิบัติการและควรให้ความสนใจในบริเวณที่ทำความสะอาดยาก ๆ มากที่สุด
- ☺ มีการตรวจสอบ อยู่เป็นประจำ

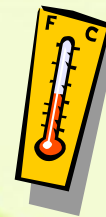
I การควบคุมคุณภาพ สถานที่และสภาพแวดล้อม

สภาพแวดล้อม

คุณภาพอากาศ

ทางกายภาพ

- 👍 มีระบบระบายอากาศเพื่อลดความเสี่ยงในการปนเปื้อน
- ✌ เป็นห้องที่มีเครื่องปรับอากาศเพื่อควบคุมความชื้นและอุณหภูมิ (อุณหภูมิควรอยู่ระหว่าง 18-27 องศาเซลเซียส)
- 👉 ความชื้นสัมพัทธ์ควรอยู่ระหว่าง 45-50 %



I การควบคุมคุณภาพ สถานที่และสภาพแวดล้อม

คุณภาพอากาศ

ทางกายภาพ



แสงสว่าง

- ความเข้มของแสง เพียงพอต่อการทำงาน(100 แสงเทียน)
- แสงจากดวงอาทิตย์โดยตรงมีผลต่อ media/reagent/ตัวอย่าง

I การควบคุมคุณภาพ สถานที่และสภาพแวดล้อม

คุณภาพอากาศ

ทางชีวภาพ



ตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในอากาศภายใน
ห้องทดสอบ อย่างน้อยเดือนละ 1 ครั้ง



ปริมาณจุลินทรีย์ไม่ควรเกิน 15 โคโลนี
ต่อ 15 นาที ต่อ พื้นที่ 160 ตร.ซม.



Timer ตัวควบคุมการเปิด-ปิด UV



I การควบคุมคุณภาพ สถานที่และสภาพแวดล้อม

คุณภาพอากาศ

ทางชีวภาพ

👍 อากาศหมุนเวียนในตู้ปราศจากเชื้อต้องไม่พบ
แบคทีเรีย / 1 ซม.

✌️ ห้ามสูบบุหรี่ ห้ามทานอาหาร และห้ามดื่มน้ำใน
ห้องปฏิบัติการ

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

- 📄 บันทึกการใช้งานประจำวัน
- 😊 บันทึกการบำรุงรักษา / ซ่อมเครื่องมือ
- 📄 ประวัติการสอบเทียบ / ทวนสอบเครื่องมือ
- 🔧 คู่มือการใช้เครื่องมือ



II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้บ่ม (Incubator)

- ✎ ควรจัดให้มีช่องว่างระหว่างผนังตู้ และ plate, rack , ตะกร้า 2.5 ซม.
- ✎ วาง plate ซ้อนกันไม่เกิน 6 คู่
- ✎ ทำ Intermediate check ทุกเดือน
- ✎ ทำการสอบเทียบปีละครั้ง
- ✎ กรณีใช้อุณหภูมิแบบแห้งแก้ว ควรแช่ลงใน glycerin

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้อบ (Incubator)

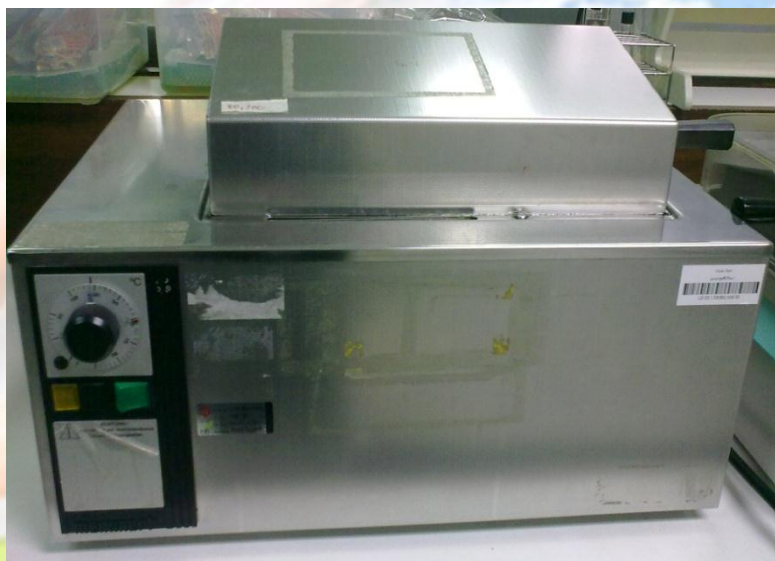
✎ บันทึกอุณหภูมิวันละ 2 ครั้ง (เช้า ,บ่าย)



ลงบันทึกอุณหภูมิด้วยค่า
จาก น้องเครื่องมือ

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

Water bath



ควรมีฝาปิดเพื่อลดการสูญเสีย
น้ำและความร้อน เพื่อรักษา
ระดับอุณหภูมิ



รักษาระดับของน้ำใน Water
bath ให้อยู่ ไม่ต่ำกว่าระดับสูงสุด
ของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอด

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

Water bath

- ✎ ต้องมีการบันทึกอุณหภูมิทุกวันที่ใช้งานและบันทึกอุณหภูมิ ช่วงเช้า – บ่าย
- ✎ ทำ Intermediate check ทุกเดือน
- ✎ ทำการสอบเทียบปีละ 2 ครั้ง

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

Hot air oven



✌ ใช้ heat-indicating tape
ทุกครั้ง

👍 สอบเทียบปีละครั้ง

✌ ใช้ความร้อนแห้งที่ $\geq 170 \pm 10^\circ\text{C}$ อย่างน้อย 2 ชม.

✌ มีการบันทึกเวลาและอุณหภูมิ
ที่ใช้

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

Hot air oven

ทวนสอบ

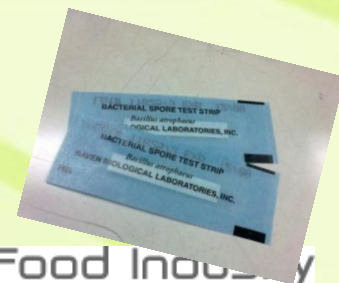
ทางกายภาพ

ทางชีวภาพ

ทวนสอบอุณหภูมิอย่าง
น้อยเดือนละครั้ง

ใช้ biological indicator
spore strips (*B. subtilis*)
อย่างน้อยเดือนละครั้ง

B. atrophaeus



II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

Autoclave



😊 ใช้ heat-indicating tape ทุก
ครั้ง

☞ ควรวางภาชนะให้มีที่ว่างห่าง
จากกันอย่างน้อย 1/2 นิ้ว

📄 มีบันทึก ความดัน อุณหภูมิ
และเวลา ที่ใช้ทุกครั้ง

❤ ทวนสอบเวลา ทุก 3 เดือน

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

Autoclave

ทวนสอบ

ทางกายภาพ

maximum thermometer
ตรวจสอบสัปดาห์ละครั้ง

ทางชีวภาพ

Geobacillus stearothermophilus
spore ampoule, อย่างน้อย
ทุกเดือน



II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

pH meter

- 👍 มีการสอบเทียบปีละครั้ง
- 👍 สอบเทียบด้วย buffer 2 ชนิด ก่อนใช้งาน (pH 4.0, 7.0 หรือ 10.0)
- 👍 ควรมีความแม่นยำอย่างน้อย 0.01
- 👍 สารละลาย buffer ที่ใช้ควรใช้ครั้งเดียว
- 👍 ดูแลรักษา electrode ไม่ให้สูญเสียดegradation ใช้งาน



II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

เครื่องชั่ง

- 👍 สอบเทียบทุกปี ควรมีความละเอียด 1 ถึง 2 ตำแหน่ง
- 👍 ทำความสะอาดก่อนและหลังใช้งาน
- ✌ ทำ daily check เพื่อตรวจสอบความถูกต้องก่อนใช้งานด้วยตุ้มหรือก้อนน้ำหนักที่ไม่เปลี่ยนแปลง (precision)
- 👉 ตรวจสอบเช็คความแม่นยำ(accuracy)ทุกเดือนด้วยตุ้มน้ำหนักมาตรฐานซึ่งสอบกลับได้ถึง NIST



II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

เครื่องชั่ง



วางเครื่องชั่งบนโต๊ะ
ที่แข็งแรง

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้ปราศจากเชื้อ(Laminar Air Flow)

การแบ่งกลุ่มความเสี่ยงในการก่อโรค

⇒ risk category 1 : ไม่มีความเสี่ยงหรือมีน้อยมากต่อผู้บริโภค และชุมชน เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดความเจ็บป่วยในคนและสัตว์ เช่น

Lactobacillus acidophilus

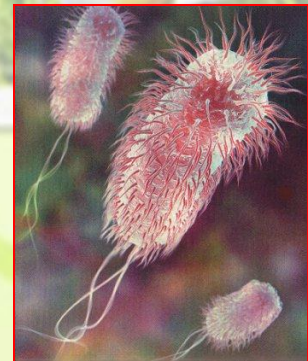


II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้ปราศจากเชื้อ(Laminar Air Flow)

การแบ่งกลุ่มความเสี่ยงในการก่อโรค

⇒ **risk category 2** : มีความเสี่ยงปานกลางต่อผู้ปฏิบัติและมีความเสี่ยงต่ำสำหรับชุมชน เป็นเชื้อโรคที่สามารถทำให้คนและสัตว์เกิดการเจ็บป่วย ไม่เป็นอันตรายที่ร้ายแรงสำหรับผู้ปฏิบัติ ชุมชน และสิ่งแวดล้อม กรณีเกิดการติดเชื้อในคนที่รุนแรงมีวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ และมีวิธีการป้องกันที่ดี สามารถควบคุมการแพร่กระจายของความเสี่ยงได้ เช่น *B. cereus* , *E. coli*

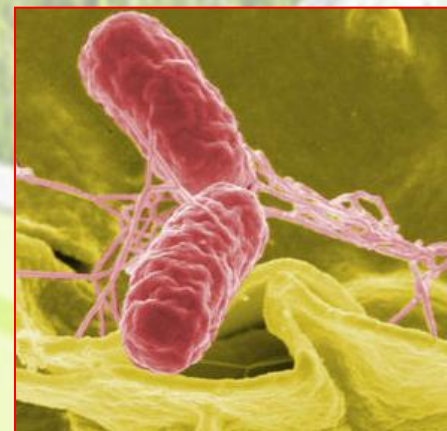


II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้ปราศจากเชื้อ(Laminar Air Flow)

การแบ่งกลุ่มความเสี่ยงในการก่อโรค

⇒ **risk category 3** : มีความเสี่ยงสูงต่อผู้ปฏิบัติ และมีความเสี่ยงต่ำสำหรับชุมชน เป็นเชื้อโรคที่ทำให้เกิดความเจ็บป่วยในคนและสัตว์รุนแรงเป็นประจำ ไม่สามารถแพร่เชื้อจากคนหนึ่งไปอีกคนหนึ่งได้ มีวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ มีวิธีการป้องกัน เช่น *Mycobacterium bovis*



II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้ปราศจากเชื้อ(Laminar Air Flow)

การแบ่งกลุ่มความเสี่ยงในการก่อโรค

⇒ **risk category 4** : มีความเสี่ยงสูงต่อผู้ปฏิบัติ และสำหรับชุมชน เป็นเชื้อโรคที่ทำให้เกิดความเจ็บป่วยในคนและสัตว์รุนแรงเป็นประจำ สามารถแพร่เชื้อจากคนหนึ่งไปอีกคนหนึ่งได้ ทั้งโดยตรง และทางอ้อม ยังไม่มีวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ ไม่มีวิธีการป้องกันที่ดี เช่น **Ebola virus**

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้ปราศจากเชื้อ(Laminar Air Flow)

Horizontal laminar out blow cabinet

ป้องกันงานจากการปนเปื้อน แต่เป่าละอองอากาศที่เกิดขึ้น
เข้าหาผู้ปฏิบัติ ไม่เหมาะสำหรับงานเตรียมเพื่อเพาะเชื้อ หรือ
การเตรียม tissue culture

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้ปราศจากเชื้อ(Laminar Air Flow)

Vertical laminar airflow cabinet

ป้องกันผลิตภัณฑ์ด้วยการใช้ vertical laminar flow ของเครื่องกรอง HEPA filter ป้องกันผู้ปฏิบัติ เหมาะสำหรับงานที่ต้องการสิ่งแวดล้อมที่ปราศจากเชื้อ ไม่แนะนำให้ใช้ gas burner (กระทบต่อการไหลของอากาศ)

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้ปราศจากเชื้อ(Laminar Air Flow)

- ☞ ทำความสะอาดก่อนและหลังใช้งานทุกครั้ง
- ☞ ตรวจสอบ Air flow ทุกครั้งก่อนใช้
- ✈️ ถอดทำความสะอาดหลอด UV ทุกเดือน
- ☞ สอบเทียบประสิทธิภาพ 1 ครั้งต่อปี
- ✈️ ทำ Air test โดยวาง plate 30 นาที หรือ 1 ชม.

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้ปราศจากเชื้อ(Laminar Air Flow)

☞ ทดสอบประสิทธิภาพของหลอด UV ทุก 3 เดือน

- UV light meter หรือ

ใช้เชื้อบน plate 200-300(spread plate technique)

รับแสงUV นาน 2 นาที ต้องทำลายเชื้อไม่น้อยกว่า

99%

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้ปราศจากเชื้อ(Laminar Air Flow)

✌ UV-C : 100-280 nm (Short wave)

มีความเข้มของแสงมากกว่า UV-B ทำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง พบได้น้อย บรรยากาศสามารถกรองไว้ได้

➔ UV-B : 280-315 nm (medium wave)

มีความเข้มของแสงมากกว่า UV-A ทำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง เป็นต่อกระจกได้ ตามัวมองไม่เห็น ชั้นโอโซนสามารถกรองได้ แต่ปัจจุบันชั้นโอโซนถูกทำลาย จึงทำให้แสงผ่านมายังโลกได้

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้ปราศจากเชื้อ(Laminar Air Flow)

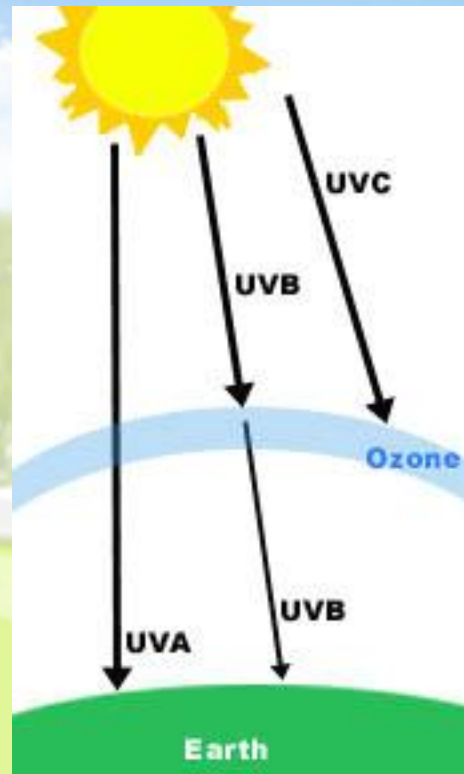
✌ UV-A : 315-400 nm (long wave)(black light)

พลังงานอ่อนที่สุด ทำให้ผิวหนังแก่เร็ว เหี่ยวย่น

ประโยชน์ ใช้ตรวจเอกสารสำคัญ เช่น ธนบัตร บัตรเครดิต

หนังสือเดินทาง

Ultraviolet light



ทดสอบประสิทธิภาพของหลอด UV

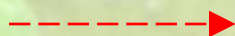
Spike เชื้อ Gram negative Rod จำนวน 200-300 โคโลนี



Spread plate technique

รับแสง UV

นาน 2 นาที



บ่ม 35 องศา / 48 ชั่วโมง



นับจำนวนโคโลนี

★ ประเมินผล ต้องทำลายเชื้อไม่น้อยกว่า 99 %

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้เย็น

👉 ตัวอย่าง และสารมาตรฐาน เชื้ออ้างอิง ควรแยกตู้เก็บ

👉 ต้องมี Thermometer ที่สอบเทียบแล้ว จุ่มอยู่ใน glycerol วางในตู้

👉 มีการบันทึกอุณหภูมิวันละครั้ง

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้เย็น

- 👍 เก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 👍 เชื้อจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 👍 แช่แข็ง อุณหภูมิ $< - 15^{\circ}\text{C}$
 $< - 18^{\circ}\text{C}$

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

Thermometer/thermocouples



- ต้องได้รับการสอบเทียบก่อนนำไปใช้งาน
- ควรมีความละเอียดที่เหมาะสมกับช่วงที่ใช้งาน

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

Thermometer/thermocouples

- การสอบเทียบจะเลือกจากหน่วยงานภายนอกหรือ in-house
- Reference standard ห้ามใช้งานหนัก
- ขดลวดเทอร์โมมิเตอร์แบบแท่งแก้ว ต้องจุ่มอยู่ใน glycerol , liquid paraffin

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

Thermometer/thermocouples

- Reference thermometer สอบเทียบทุก 5 ปี
- Working thermometer สอบเทียบทุก 1 ปี
- Ice point (0°C) ทุก 6 เดือน

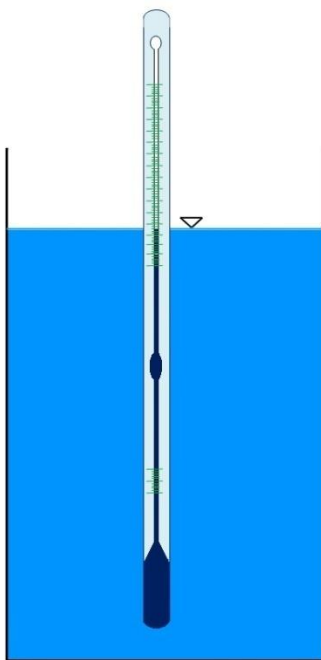
II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

Thermometer/thermocouples

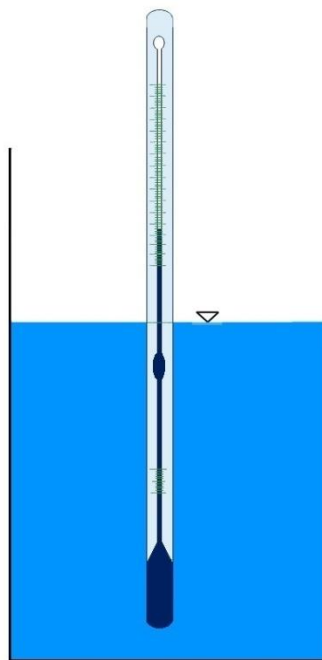
♠ ประเภทปรอทแก้ว แบ่งการใช้งาน 3 แบบ

1. **Total immersion** (จุ่มถึงปลายอ่าน) ต้องทำการจุ่มปรอทแก้วให้ของเหลวอยู่ในอุณหภูมิที่ทำการวัด
2. **Partial immersion** (จุ่มบางส่วน) ต้องทำการจุ่มปรอทแก้วลงไปถึงตำแหน่งที่ mark เอาไว้
3. **Complete immersion** (จุ่มทั้งหมด) ต้องทำการจุ่มปรอทแก้วลงไปในของที่จะทำการวัดทั้งหมด (ไม่ค่อยพบการใช้ทั่วไปในปัจจุบัน)

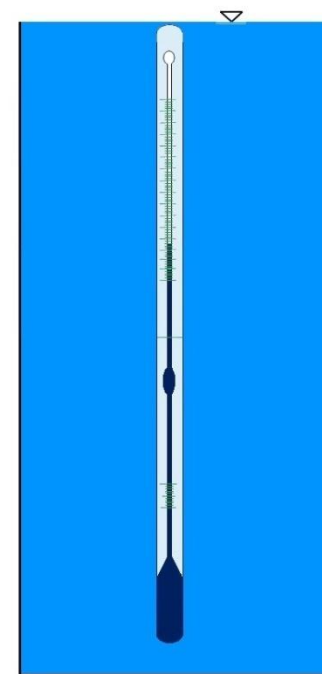
ปรอทแบบต่างๆ



Total Immersion Thermometer
Immersed to top of mercury column



Partial Immersion Thermometer
Immersed to a specific depth



Complete Immersion Thermometer
Entire thermometer immersed

II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

นาฬิกาจับเวลา

- เทียบเวลากับกรมอุทกศาสตร์ โทร 1811
- ทำทวนสอบ ทุก 1 ปี



II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

เครื่องแก้ว

⇒ เครื่องแก้วควรทำจากวัสดุคุณภาพสูง

- ชนิด borosilicate glass และ heat-resistant plastic materials



II การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ/อุปกรณ์

เครื่องแก้ว

- ⇒ ควรตรวจสอบความเป็นกรด-ด่าง หลังการล้าง
เครื่องแก้วทุกครั้งด้วย 0.04% BTB (bromthymol blue)
โดยผลของ BTB ต้องเป็นสีเขียวอมน้ำเงิน
(อยู่ในสภาวะเป็น กลาง)
- ⇒ ควรตรวจสอบสารตกค้างในเครื่องแก้วที่มีผลยับยั้ง
การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบสารตกค้างใน petri dish

★ group A, B , C และ D(ทำอย่างละ 6 plate)



group A

ล้างแบบปกติ

group B

ล้างแบบปกติและ rinse น้ำกลั่น
12 ครั้ง

group C

ล้างแบบปกติ rinse ด้วยน้ำยา
ที่ล้างในห้องปฏิบัติการแล้วปล่อย
ให้แห้ง

group D

plate พลาสติก



การทดสอบสารตกค้างใน petri dish (ต่อ)

- นำ petri dish group A, B, C ไปทำให้ปราศจากเชื้อตามขั้นตอนของห้องปฏิบัติการ

ใส่ *Enterobacter aerogenes* 50-150 cfu/ml

0.1 ml/3 plate

A, B, C, D

1.0 ml/3 plate

A, B, C, D

บ่มที่ 35 องศา / 48 ชั่วโมง

การทดสอบสารตกค้างใน petri dish

★ การอ่านและแปลผล

- ถ้า group A กับ group B นับแล้วเฉลี่ยได้ต่างกันน้อยกว่า 15% ($B > A < 15\%$) และ group A กับ group C นับแล้วเฉลี่ยได้ต่างกันมากกว่า 15% ($A > C > 15\%$)

สรุป : ☞ สารที่ใช้ล้าง(detergent) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อ

☞ แต่การล้างตามปกติสามารถกำจัดสารยับยั้งได้หมด

การทดสอบสารตกค้างใน petri dish

★ การอ่านและแปลผล (ต่อ)

- ถ้า group B และ group D ต่างกันมากกว่า 15%

สรุป : แสดงว่า plate plastic มีสารตกค้างที่มีคุณสมบัติ
ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

- ถ้า group A-D นับแล้วเฉลี่ยได้ต่างกันน้อยกว่า 15 %

สรุป: ไม่มีผลกระทบจากสารพิษหรือสารยับยั้ง

Loops

- Nickel alloy หรือ platinum-iridium สามารถเผาไฟได้
- ขนาดอย่างน้อย 3 mm



การทดสอบ Sterility อุปกรณ์ต่าง ๆ

★ ถุงพลาสติกใส่ตัวอย่าง

★ กรรไกร

★ ช้อน

★ ปิเปต

★ โถปั่น



III การควบคุมคุณภาพบุคลากร

✌ ต้องมีความรู้ความสามารถ มีประสบการณ์

✌ ได้รับการฝึกอบรมให้รู้หน้าที่ เพื่อคุณภาพของผลการ

วิเคราะห์ทดสอบ

✌ ต้องเลือกบุคลากรจาก

- ประวัติการศึกษา

- ประสบการณ์



III การควบคุมคุณภาพบุคลากร

บุคลากรใหม่

ฝึกอบรมขั้นตอนการดำเนินงานและวิธีการทดสอบที่
เกี่ยวข้องตามลักษณะงาน



ให้ผู้รับการฝึกเฝ้าดูการทำงานของผู้ทดสอบที่ได้รับการ
ฝึกอบรมผ่านแล้ว



III การควบคุมคุณภาพบุคลากร

บุคลากรใหม่



ผู้ควบคุมงานเฝ้าดูการปฏิบัติงานทดสอบของผู้รับการ
ฝึกอบรม



ผ่านและ
มอบหมายงาน

ไม่ผ่านและมี
ขั้นตอนการ
ดำเนินงานต่อ

III การควบคุมคุณภาพบุคลากร

บุคลากรเก่า

⇒ เพราะวิธีการตรวจวิเคราะห์มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว
ต้องการความรู้ใหม่ ๆ เพิ่มเติม และฝึกฝนให้เกิด
ประสบการณ์อย่างต่อเนื่อง

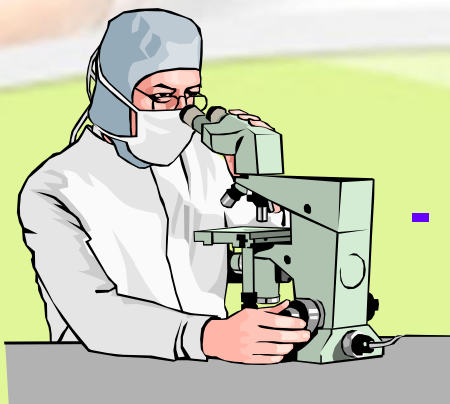
- การดูงานที่อื่น
- ฝึกงานที่อื่น
- การเข้าฟังสัมมนาทางวิชาการ

III การควบคุมคุณภาพบุคลากร

บุคลากรเก่า

⇒ วิธีการทดสอบประสิทธิภาพเจ้าหน้าที่

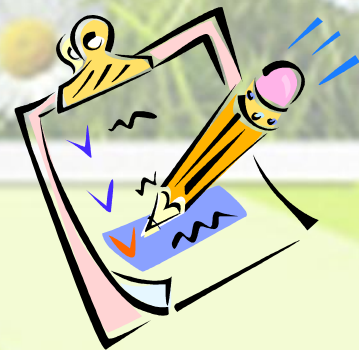
- การใช้ certified reference material
- การใช้ spiked sample
- การวิเคราะห์แบบ replicate พร้อม ๆ กับเจ้าหน้าที่ที่ผ่านการอบรมแล้ว
- การเข้าร่วมทำ PT



III การควบคุมคุณภาพบุคลากร

การประเมินผล

- 👍 ตั้งข้อกำหนดว่าเจ้าหน้าที่ทำการทดสอบตัวอย่างจำนวนเท่าใดจึงจะบอกได้ว่า **ผ่าน**
- ✌ กำหนดว่าต้องได้ค่าที่ถูกต้องใกล้เคียงกับเจ้าหน้าที่ที่ผ่านการอบรมแล้วแค่ไหนจึง **ยอมรับ**



III การควบคุมคุณภาพบุคลากร

สุขลักษณะของบุคลากร

- ✎ สวมเสื้อกราว์สีอ่อน สะอาด สภาพดี
- ✎ ไม่สวมเสื้อกราว์ออกนอกบริเวณปฏิบัติงาน
- ✎ สวมหมวกปกคลุมผม หากจำเป็น
- ✎ การล้างมือ : ก่อนและหลังการปฏิบัติงาน และทันทีที่ออกจากห้องน้ำ
- ✎ หลีกเลี่ยงการพูดคุย ไอ ขณะปฏิบัติงาน
- ✎ ห้ามสูบบุหรี่ กินอาหาร ดื่มน้ำ บริเวณทดสอบ

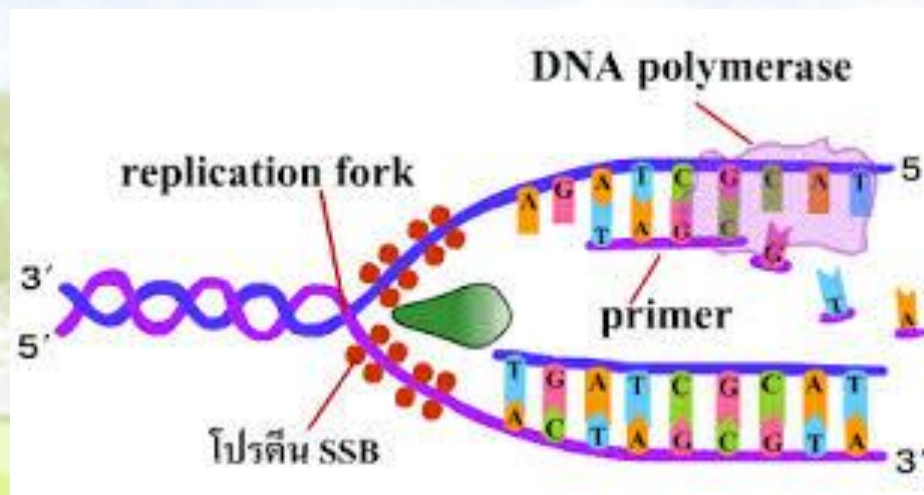
IV การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและ การควบคุมคุณภาพ

ความสำคัญของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

- ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานสำหรับการทดสอบ
- ใช้ในการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ
- ใช้ในการทำ *method validation*
- ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพภายใน

IV การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและ การควบคุมคุณภาพ

👉 รักษาสมบัติทางพันธุกรรม



👉 รักษา viability ของเชื้อ

IV การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและ การควบคุมคุณภาพ

การเก็บเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงให้เป็นไปตามข้อกำหนด

- เลือกใช้วิธีการเก็บวิธีใดก็ได้ตามความเหมาะสม
- ต้องใช้เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงจากหน่วยงานระดับ
ชาติที่เป็นที่ยอมรับหรือองค์กรที่เป็นที่ยอมรับ
จากหน่วยรับรอง



IV การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและ การควบคุมคุณภาพ

ขั้นตอนการเก็บเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

♣ ขอครอบครองเชื้อจุลินทรีย์

♣ บันทึกการรับเชื้อ

- ชื่อเชื้อ

- lot number

- code ของเชื้อ เช่น *E. coli* :ATCC 25922

- วันที่รับ

- วันที่เตรียม

- ผลการทดสอบ ความบริสุทธิ์ รูปร่าง ชีวเคมี



IV การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและ การควบคุมคุณภาพ

ขั้นตอนในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์



IV การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและ การควบคุมคุณภาพ

ระดับของเชื้อมาตรฐาน

- Master Culture

- เชื้อที่เป็น freeze dried ampoule หรือ frozen glycerol bead
- ใช้ในการเตรียม stock culture
- จะใช้ต่อเมื่อ stock culture หมด หรือ stock culture สูญเสีย viability หรือแยก contamination



IV การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและ การควบคุมคุณภาพ

- Stock Culture

- เก็บในรูปของ frozen glycerol beads มีอายุประมาณ 2 - 5 ปี
- ใช้ในการเตรียม working culture สำหรับใช้ในงาน routine



IV การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและ การควบคุมคุณภาพ

- Working Culture

- จะต้องไม่นำ subculture มาเป็น ref. Culture อีก
- ไม่มีการสูญเสีย viability
- ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเซลล์
- ไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางชีวเคมี
- มีการบันทึกการนำไปใช้



IV การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงและ การควบคุมคุณภาพ

- Working Culture (ต่อ)

- มีอายุประมาณ 1 - 4 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับความถี่ในการใช้งาน ชนิดของเชื้อ
- เลี้ยงเชื้อใน agar plate or agar slant
- เก็บในตู้เย็น
- นำมาใช้สำหรับ QC test method, QC media, Validation



V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 👍 ตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025 ถือว่า media เป็น critical material ต้องมีการทวนสอบก่อนนำไปใช้ในการทดสอบ
- ✌ ห้อง lab จะต้องจัดให้มีวิธีการปฏิบัติเกี่ยวกับการจัดซื้อ การยอมรับ การเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 👉 ต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพและมีการบันทึกผล

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ

♣ Simple media /Non-selective media

เช่น Peptone water , TSB, PCA, NA, PDA

♠ Selective enrichment media

เช่น TT broth, RVS broth, Alkaline peptone water ,

TSB 10%NaCl

♣ Differential selective media

เช่น XLD, EMB, MSEY, TCBS

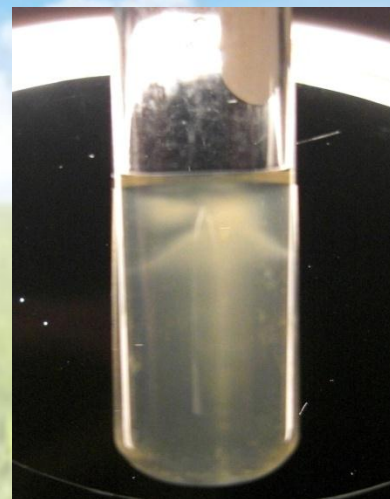
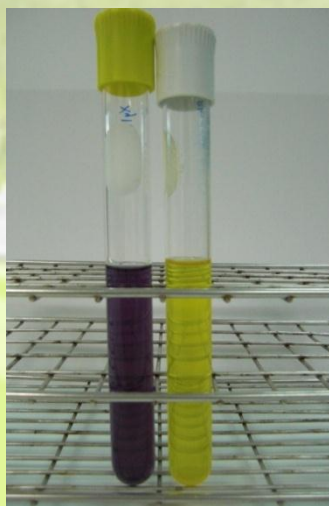


V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ

- Biochemical media

เช่น TSI, LIM, น้ำตาลต่าง ๆ



V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

การซื้อและการตรวจรับอาหารเลี้ยงเชื้อ



- มีระบบการประเมิน supplier และขั้นตอนการจัดซื้อ
- ขอใบ certificate สำหรับ lot no. ที่สั่งซื้อ
- เมื่อได้รับมาแล้วควรตรวจดูว่ายังอยู่ในช่วงที่ไม่เกินวันหมดอายุ
- ขวดไม่ชำรุด ฝายังอยู่ในสภาพที่ปิดผนึก

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

การซื้อและการตรวจรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- ★ รุ่น วันเดือนปีที่ผลิต วันเดือนปีที่หมดอายุ
- ★ จำนวนและขนาดที่ได้รับ
- ★ วัน เดือน ปี ที่ได้รับ
- ★ สถานที่เก็บ
- ★ ชื่อผู้รับ
- ★ วัน เดือน ปี ที่เปิดใช้
- ★ ผลการทดสอบ(Productivity และ/ หรือ Selectivity)

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

☎ การปราศจากเชื้อ(Sterility)

☎ การเจริญของเชื้อ(Growth)

☎ การยับยั้งและสนับสนุนการเจริญของเชื้อ
(Positive & Negative)

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตรวจสอบการปราศจากเชื้อ(Sterility check)

- ทำการสุ่ม 1 หลอด/plate /ขวด ต่อ Lot
- หรือ ทำการสุ่ม 1 -4 % จากจำนวนที่เตรียม
- นำไปบ่มตามวิธี

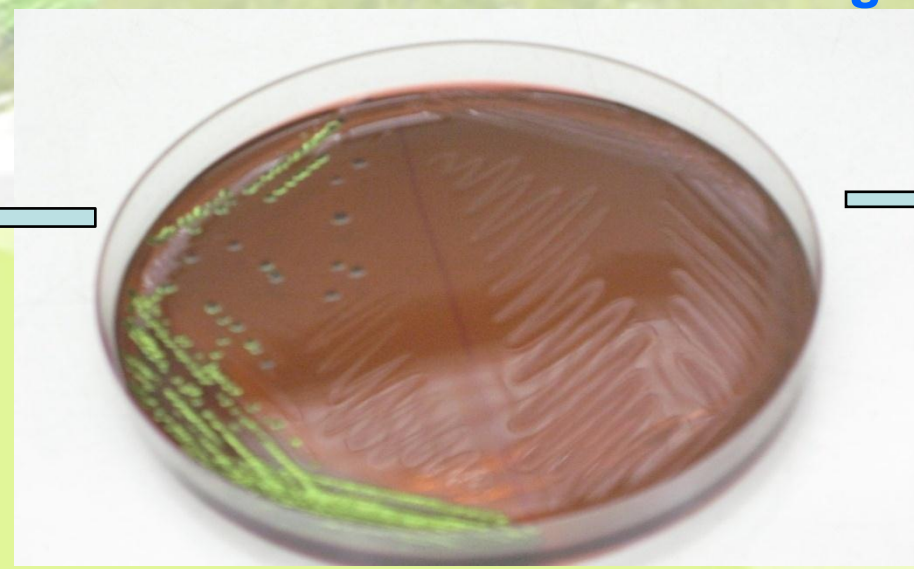
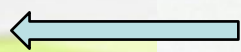
V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

การยับยั้งและสนับสนุนการเจริญของเชื้อ

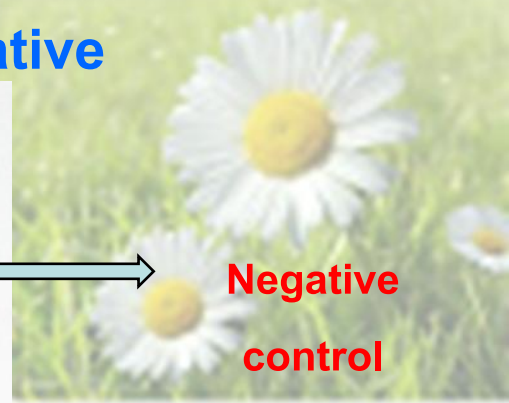
(Positive & Negative)

- ไม่ได้กำหนด ความถี่
- แต่ละ media ต้องทดสอบกับเชื้อ Positive & Negative

Positive
control
: *E. coli*



Negative
control
: *S. aureus*



V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทางกายภาพ

- วัดค่าความเป็นกรดด่าง ที่ 25°C
- ตรวจพินิจอาหารเลี้ยงเชื้อ



☯ ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ

☯ สี

☯ ความใส/สิ่งปลอมปน

☯ ความข้น/ความคงตัว/ความชื้น

- ทวนสอบปริมาตร dilution buffer 2 %

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

- Ready-to-use media

มีใบ Certificate จากผู้ผลิตที่ได้รับการรับรอง
มาตรฐาน ISO



* อาจไม่จำเป็นต้องตรวจสอบซ้ำ

* ต้องมีการเก็บรักษาอย่างเหมาะสม

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตัวอย่างใบ Certificate

Product Manufacturing Certificate

Certificate of Analysis

Product: 6446 or 6490 or 6491 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plates

Batch: 2014-04 KB

Stock Number: 70-2007-7074-4 or 70-2007-3453-4 or 70-2007-3454-2

Organism Tested	Minimum growth	Result
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 49476	$\geq -4.5^*$	Passes
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	None allowed	No growth
<i>Bacillus atrophaeus</i> (<i>subtilis</i>)	None allowed	No growth

*Expressed as the number of standard deviations away from the average count on standard agar media

ISO 11133-2 Performance Testing

Organism Tested	Criteria	Result
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	PR** ≥ 0.5	Passes
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	PR** ≥ 0.5	Passes
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Total Inhibition	Passes
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Atypical of S. aureus	Passes

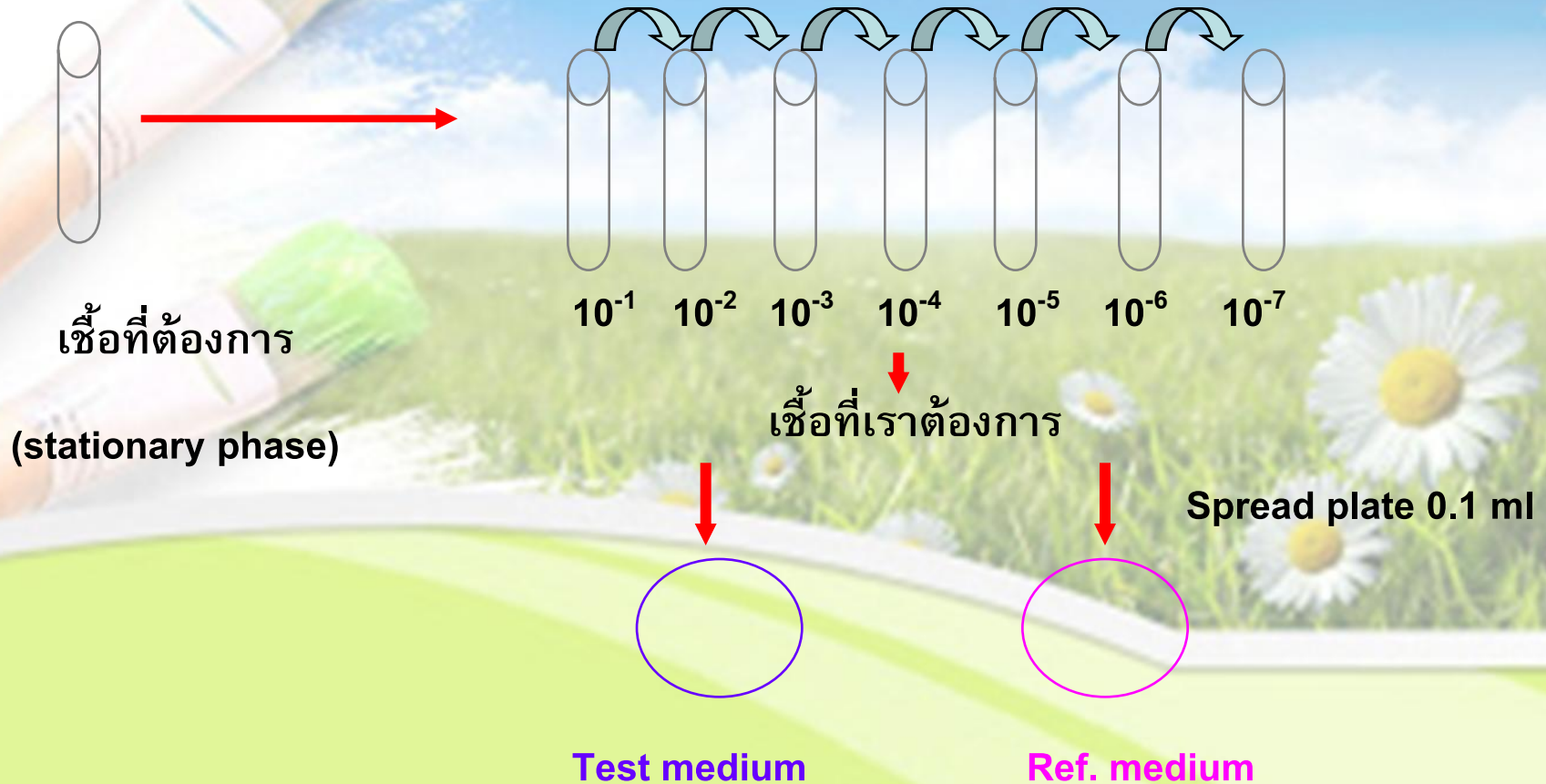
V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

- กรณีที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Dehydrated media หรือ Basic individual components ควรตรวจสอบโดยวิธี Qualitative เป็นอย่างน้อยแต่วิธี quantitative จะประกันคุณภาพได้ดีกว่า โดยปฏิบัติตามวิธีการตรวจสอบใน ISO 11133-2:2003,2011

Quantitative plating method

Solid Media 1. for non-selective medium

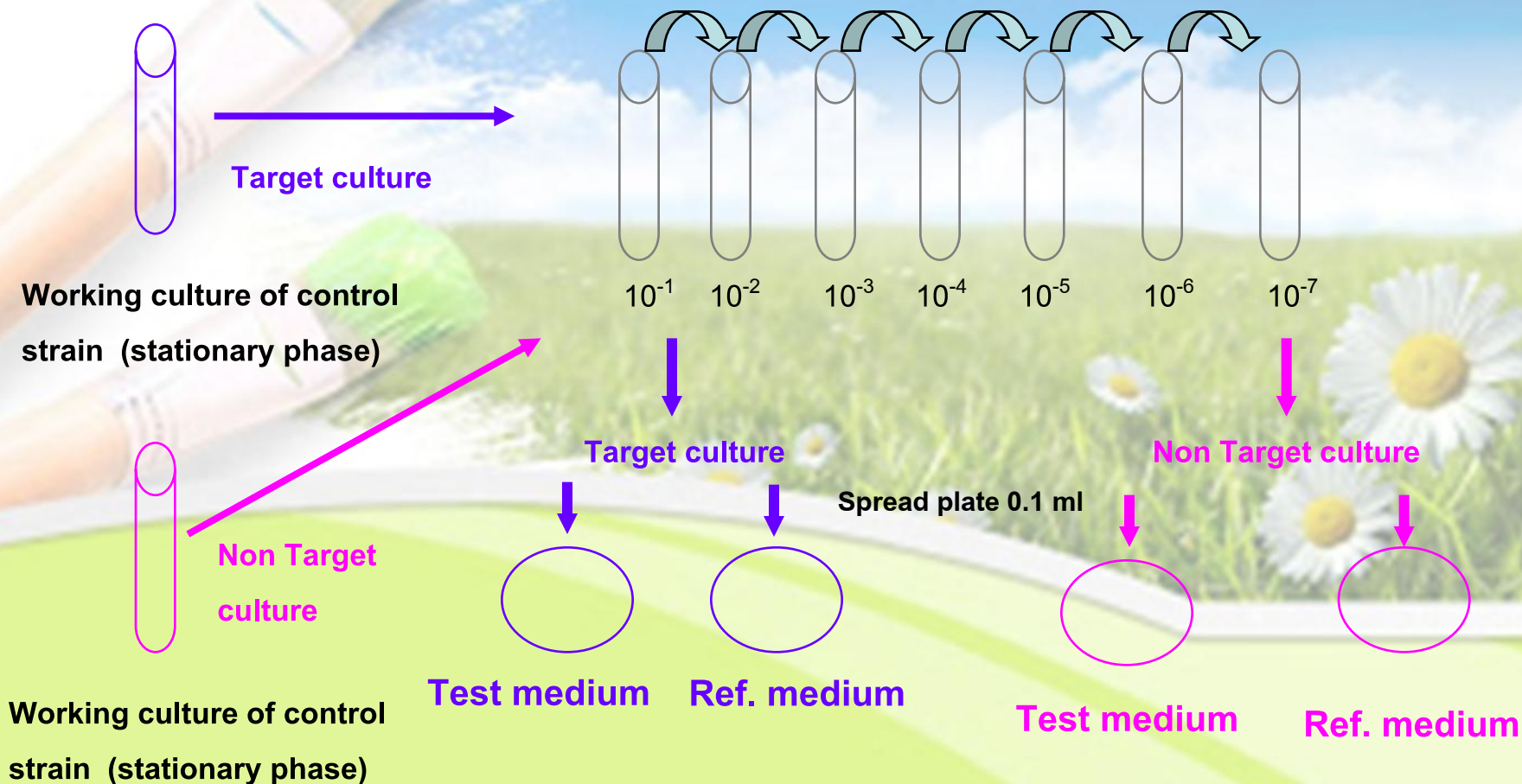
การทดสอบ Productivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง



Quantitative plating method (ต่อ)

Solid Media 2. for selective medium

การทดสอบ Productivity และ Selectivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง



Quantitative plating method (ต่อ)

การคำนวณค่า Productivity ratio(P_R)

$$P_R = N_s / N_o$$

N_s = จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดบน Test medium

N_o = จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดบน Reference medium

(จำนวนเชื้อบน plate ที่นำมาใช้ควร ≥ 100 cfu/plate)

Quantitative plating method (ต่อ)

Calculation of selectivity ratio(S_F)

$$S_F = D_o - D_s$$

D_o = dilution สูงสุดที่เชื่อเจริญได้ ไม่น้อยกว่า 10 cfu
บน Reference medium

D_s = dilution สูงสุดที่เชื่อเจริญได้ บน Test medium

Quantitative plating method (ต่อ)

Criteria for interpretation

a non – selective medium

$$P_R \geq 0.7$$

a selective medium

- target microorganism

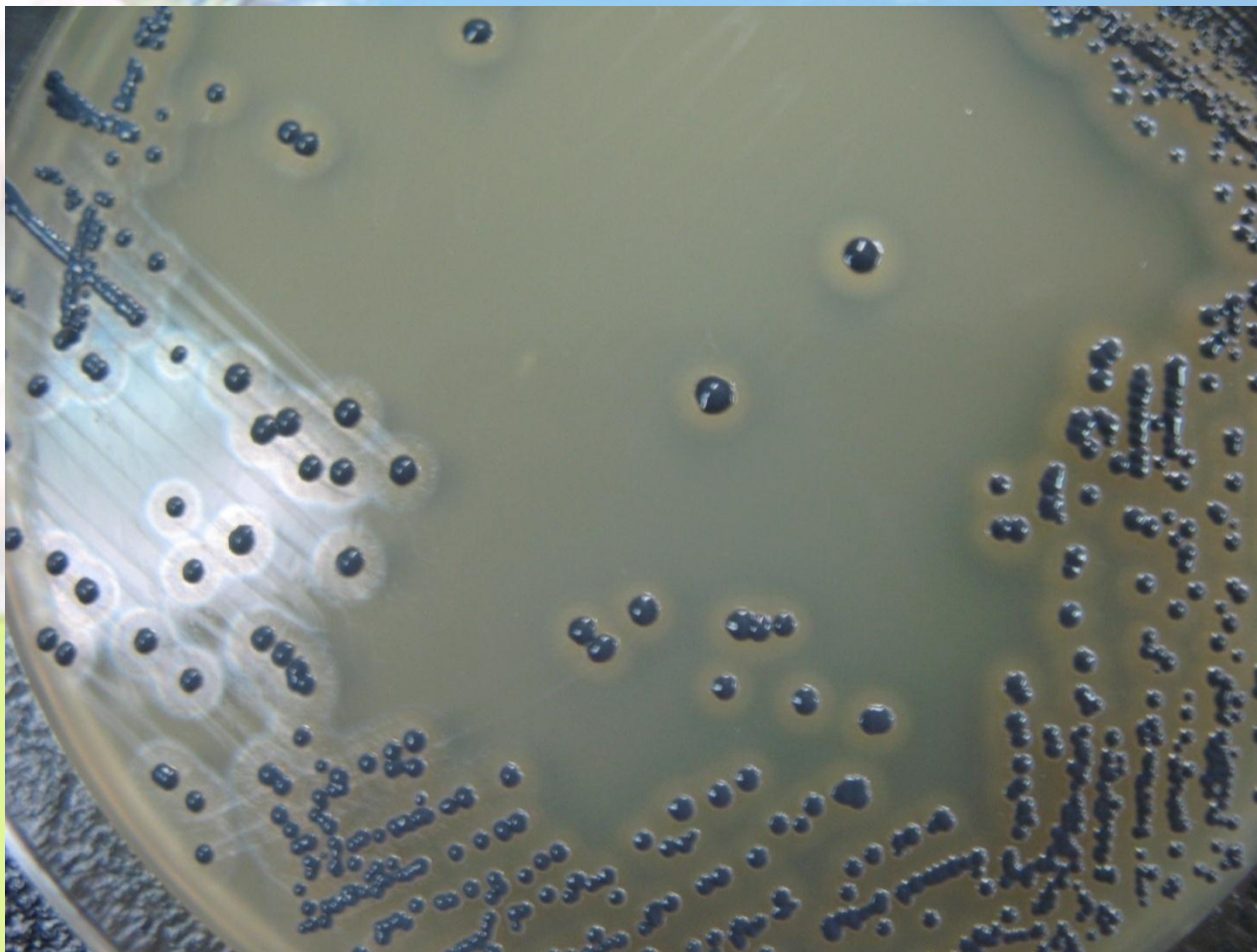
$$P_R \geq 0.1$$

- non-target microorganism

$$S_F \geq 2$$

Colony appearance and size  Typical
of wanted (target) microorganism

ลักษณะโคโลนีที่ต้องการ

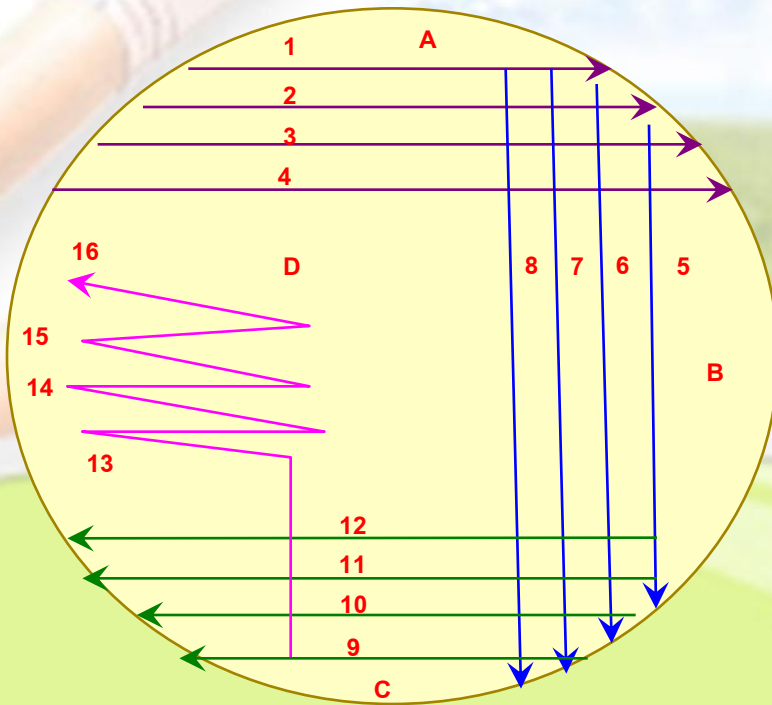


Semi-quantitative streaking method based on ecometry

Solid Media 3. for selective medium and non- selective medium

✍ เลี้ยงเชื้อ target organism และ non-target organism

✍ streak บน plate โดยแบ่ง plate เป็น 4 ส่วน (sector A-D)



Test medium

- Streak 1 μ l loop ไม่ต้องเผา loop
- แต่ละแนว streak ห่างกันประมาณ 0.5 Cm
- loop ควรเอียงทำมุม 20-30 องศา กับ agar

Semi-quantitative streaking method based on ecometry (ต่อ)

Solid Media 3. for selective medium and non- selective medium

 บ่มตามความเหมาะสม

 นำมานับคะแนนเพื่อหาค่า growth index G_i

- ถ้าเชื้อเจริญขึ้นเต็มเส้นได้ 1 คะแนน
- ถ้าเชื้อเจริญขึ้นครึ่งเส้นได้ 0.5 คะแนน
- ถ้าเชื้อเจริญน้อยกว่าครึ่งเส้น หรือไม่เจริญ ได้ 0 คะแนน

 นำผลรวมคะแนนของ sector A ถึง D รวมกันจะได้เป็นค่า G_i

Semi-quantitative streaking method based on ecometry (ต่อ)

Solid Media 3. for selective medium and non-selective medium

Interpretation of results

- Selective medium

- ⇒ target microorganism ขึ้นอย่างน้อย 6 คะแนน
- ⇒ non-target microorganism ไม่มีการเจริญ

- Non-selective medium

- ⇒ Growth index G_1 มากกว่า 6 คะแนน

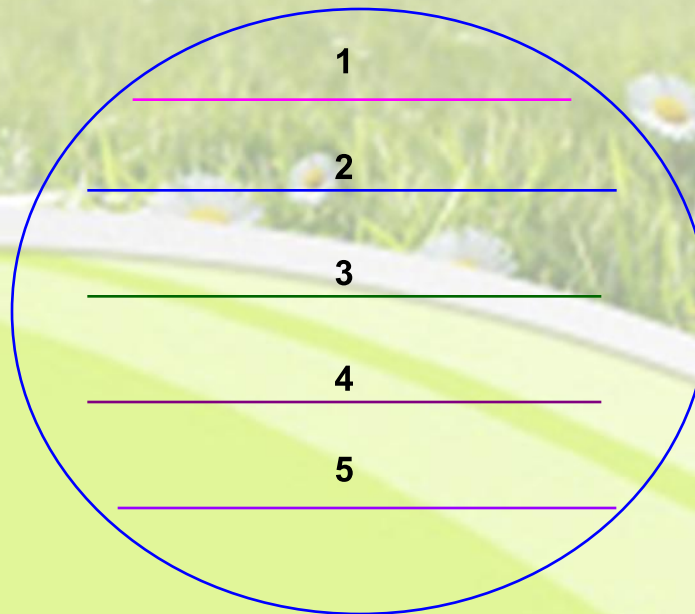
Qualitative streaking method

Solid Media 4. for selective medium and non- selective medium

-เลี้ยงเชื้อ target และ non-target(อาจใช้เชื้อเดียวหรือหลายเชื้อ)

★ **Streak 1 μ l loop บน plate**

-ปัดตามความเหมาะสม



Qualitative streaking method (ต่อ)

Solid Media 4. for selective medium and non- selective medium

Interpretation

- ★ เชื้อขึ้นเต็มเส้นให้นับ 2 คะแนน
- ★ เชื้อขึ้น $\geq$ ครึ่งเส้นให้นับ 1 คะแนน
- ★ เชื้อไม่ขึ้นหรือขึ้นน้อยกว่าครึ่งเส้นให้นับ 0 คะแนน

Qualitative streaking method (ต่อ)

Solid Media 4. for selective medium and non-selective medium

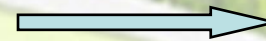
Criteria for interpretation

- non-selective agar : ควรได้ 2 คะแนนในแต่ละเชื้อที่ทดสอบ
- selective agar:

เชื้อ target : ควรได้ 2 คะแนน

เชื้อ non-target : ควรได้ 0 หรือ 1 คะแนน

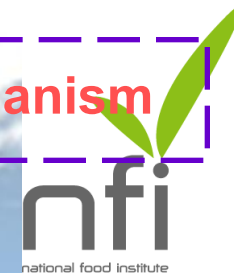
Colony appearance and size
of wanted (target) microorganism



Typical

Quantitative dilution method for target and non target microorganism

Liquid Media 5. for selective medium and non-selective medium



การทดสอบ Productivity และ Selectivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

1. Prepare liquid medium

10 ml

10 ml



Test broth



Reference broth

2. Prepare stationary phase cultures of the test strains

dilute



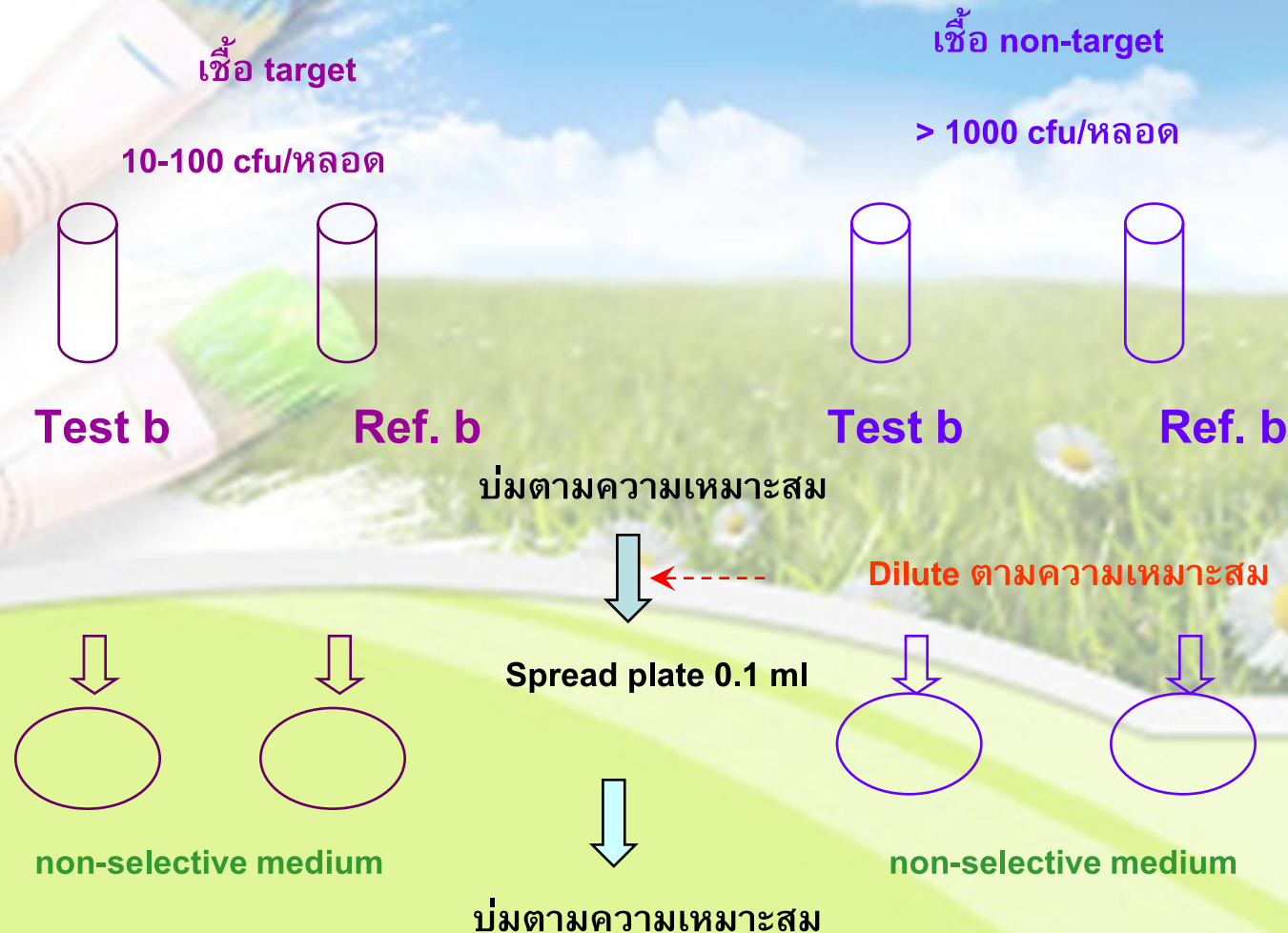
10-100 cfu/0.1 ml for target microorganism

> 1,000 cfu/0.1 ml for non-target microorganism

Quantitative dilution method for target and non target microorganism (ต่อ)

Liquid Media 5. for selective medium and non-selective medium

การทดสอบ Productivity และ Selectivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว



Calculation and Interpretation

☯ Productivity ratio:

Non-selective broth : $P_R \geq 0.7$

Selective broth : ≥ 0.1

☯ Selectivity Factor : $S_F \geq 2$

Quantitative dilution method for target and non target microorganism (ต่อ)

Liquid Media 6. for diluents and transport media

เชื้อ target

เชื้อ non-target



ชุดที่ 1

100-1000 cfu/หลอด

เชื้อ target

เชื้อ non-target



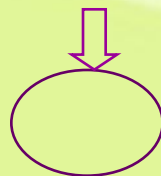
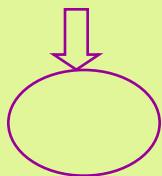
ชุดที่ 2

บ่มตามความเหมาะสม(transport media)

บ่มที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที(diluents)



Spread plate 0.1 ml



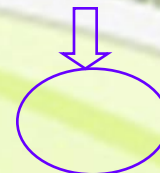
non-selective
medium



บ่มตามความ
เหมาะสม



Spread plate 0.1 ml



non-selective
medium

Quantitative dilution method for target and non target microorganism (ต่อ)

Calculation

- นับปริมาณของเชื้อ target และ เชื้อ non-target ภายหลัง spread บน non-selective medium
- เปรียบเทียบปริมาณเชื้อ ในชุดที่ 1 (ไม่บ่ม) และชุดที่ 2(บ่มก่อนนำไป spread บน non-selective medium)

Interpretation

ทั้งเชื้อ target และ non-target ของชุดที่ 2 ควรมีปริมาณอยู่ในช่วง $\pm 50\%$ ของปริมาณเชื้อที่นับได้ในชุดที่ 1

Semi-quantitative single tube method for target, non target and mixed culture

Liquid Media 6. for selective medium

การทดสอบ Productivity และ Selectivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

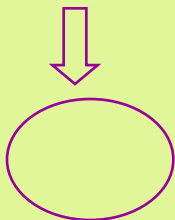
1.เติมเชื้อ non-target

> 1,000 cfu/หลอด

10 ml



Test b

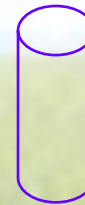


non-selective medium

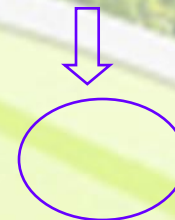
2.เติมเชื้อ target 10-100 cfu +

non-target > 1,000 cfu/หลอด

10 ml



Test b



Specific selective medium

บ่มตามความเหมาะสม



Streak 10 µl



บ่มตามความเหมาะสม

Semi-quantitative single tube method for target, non target and mixed culture (ต่อ)

Interpretation

- **Productivity** ของเชื้อ target : ต้องขึ้นอย่างน้อย 10 โคโลนีบน selective medium
- **Selectivity** ของเชื้อ non-target : ต้องไม่ขึ้น (Total inhibition) หรือ ขึ้นน้อยกว่า 10 โคโลนีบน non-selective medium

LST : ดูการเจริญ การสร้างก๊ส



Qualitative single tube method

Liquid Media 7. for selective medium and non- selective medium

Working culture of target and
non-target control strain
(stationary phase)

เชื้อ target

เชื้อ non-target

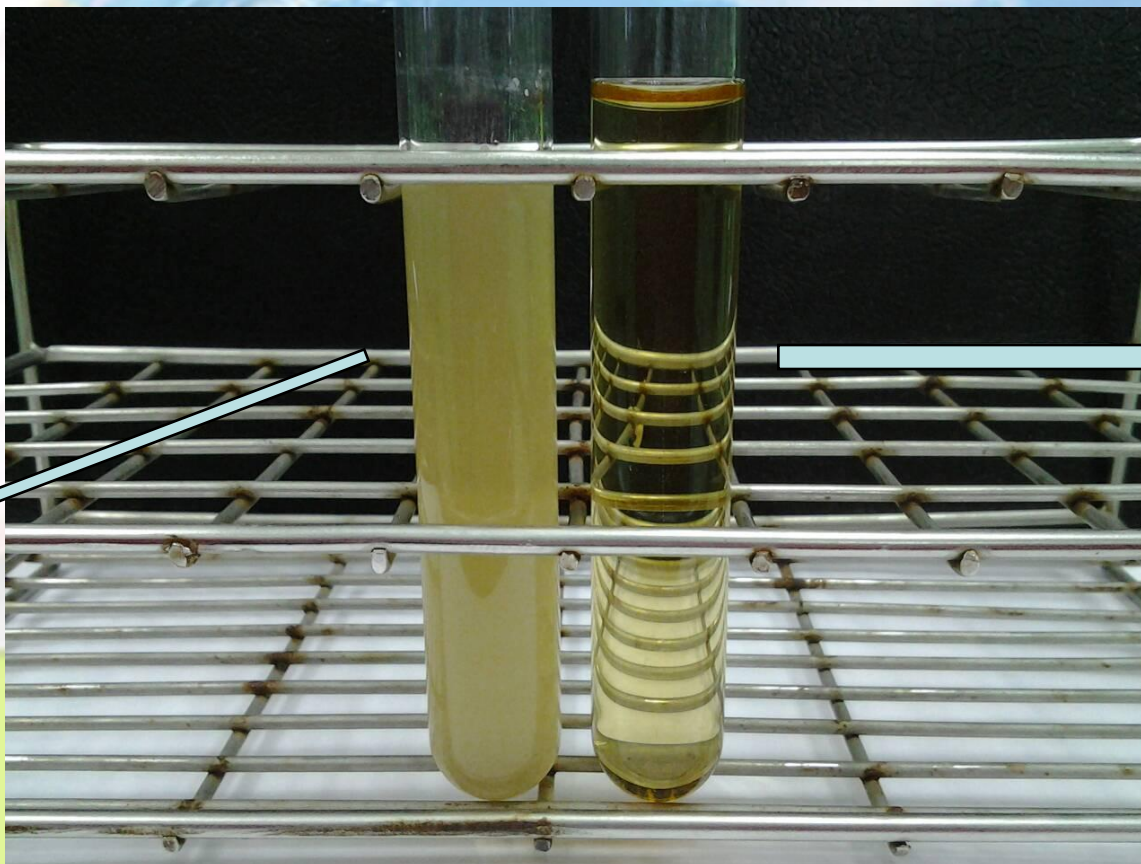
10 ml

Test broth

ป้อนตามความเหมาะสม



TSB : ดูการเจริญ



ขุ่น +2

ไม่ขุ่น

Qualitative single tube method (ต่อ)

Calculation

- ✂ หลอดขุ่นถึงขุ่นมาก แสดงว่าเชื้อเจริญ = 2 คะแนน
- ✂ หลอดขุ่นน้อย แสดงว่าเชื้อเจริญไม่ดี = 1 คะแนน
- ✂ หลอดไม่ขุ่น แสดงว่าเชื้อไม่เจริญ = 0 คะแนน

Interpretation

👍 non-selective broth : ต้องได้ 2 คะแนนในแต่ละเชื้อที่ทดสอบ

👍 selective broth :

เชื้อ target - ต้องได้ 2 คะแนน

เชื้อ non-target - ต้องได้ 0 หรือ 1 คะแนน

สรุป : การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.Quantitative : ใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

★ชนิดใหม่

★ผู้ผลิตรายใหม่

★ที่ใช้นับจำนวน (lot หรือ batch ที่รับใหม่)

2.Semi- Quantitative ใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

✂ Selective medium (lot หรือ batch ที่รับใหม่)

3.Qualitative ใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ห้องปฏิบัติการเตรียม

แบบฝึกหัด

ข้อ1 จากข้อมูล จงประเมินอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird parker Lot. No. ใหม่ว่าสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการได้หรือไม่

อาหาร Baird parker :

S. aureus (โคโลนี)

Dilution 10 (-5) = 40

Dilution 10 (-6) = 5

E. coli ไม่เจริญ

อาหาร TSA

S. aureus (โคโลนี)

Dilution 10 (-5) = 45

Dilution 10 (-6) = 3

E. coli

Dilution 10 (-6) = 60

Dilution 10 (-7) = 7

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- สูตร

- ยี่ห้อของส่วนประกอบ

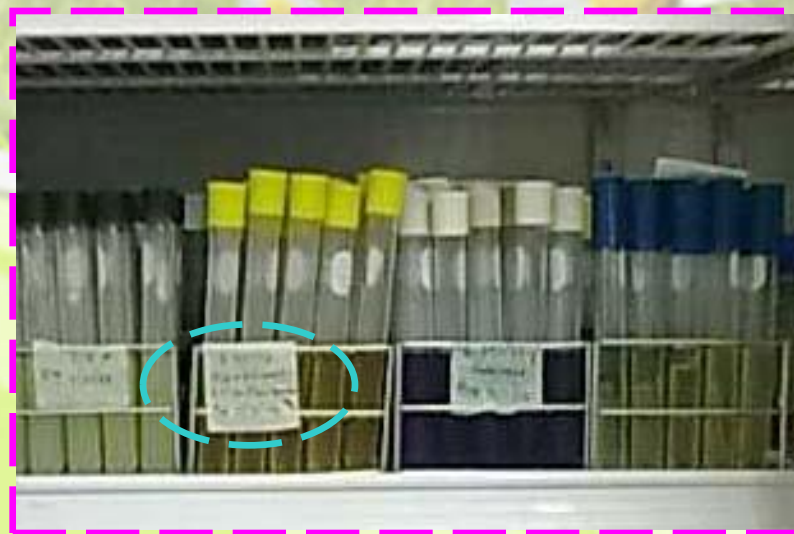
- วิธีการเตรียม

- pH เริ่มต้น / สุดท้าย



V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

- เวลา , อุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ
- ฉลาก (label)
- การเก็บรักษา, ระบุวันหมดอายุ
- การควบคุมคุณภาพ



V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเก็บรักษา media ก่อนเปิดใช้งาน

- dehydrated media เก็บในขวดปิดฝาให้แน่นในที่ที่เย็นและแห้ง ไม่มีแสง ถ้ากำหนดว่าต้องแช่ในตู้เย็นและมีดก็ต้องปฏิบัติตาม
- หลังจากเปิดขวด media ใช้งานแล้วควรใช้ให้หมดภายใน 6 เดือน
- media ที่มีสีเป็นองค์ประกอบ ควรเก็บในที่ที่ป้องกันแสงโดยเก็บในที่มืด ขวดสีเข้ม ห่อด้วยฟอยล์
- สภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องไม่เปลี่ยนแปลง
- มีระบบบันทึก stock และบันทึกการนำไปใช้

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเก็บรักษา media ที่เตรียมแล้ว

- ห้องปฏิบัติการควรจัดให้มีข้อมูลสภาวะการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ
- องค์ประกอบและ packaging ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่ออายุของ media
- ปริมาณของเหลวที่หายไปต้องไม่เกิน 10 %

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเก็บรักษา media ที่เตรียมแล้ว (ต่อ)

- Optimum temperature ส่วนใหญ่ $4 - 6^{\circ}\text{C}$ เก็บได้ เป็นระยะเวลาหลายเดือน
- liquid media ส่วนใหญ่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ได้ เป็นระยะเวลาหลายเดือน แต่ก็มี liquid media บางชนิดที่มีอายุสั้น ได้แก่ tetrathionate broth

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเก็บรักษา media ที่เตรียมแล้ว (ต่อ)

- ป้องกันอาหารเลี้ยงเชื้อจากการถูกแสงแดด เนื่องจากอาจทำให้ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง เนื่องจากเกิดการสร้าง peroxides หรือทำให้ stability ของสี (dye) ลดลง
- Solid media ส่วนใหญ่จะเก็บไว้ได้หลายเดือน ถ้าเก็บใน airtight container เช่น เก็บใน tube ที่เป็นฝาเกลียว

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเก็บรักษา media ที่เตรียมแล้ว (ต่อ)

- Agar plate จะมีปัญหาในการเก็บรักษาคือ Contamination และ dehydration อาจป้องกันได้ด้วยการหุ้มห่อหรือ seal plate ด้วยถุงพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C (ต้องคว่ำ plate)



V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

เวลาในการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อ

- Membrane fill broth (MF) เก็บใน SCREW CAP ที่ 4 °C เก็บได้ 96 ชั่วโมง
- agar หรือ broth เก็บใน loose-cap tubes ที่ 4 °C เก็บได้ 2 สัปดาห์
- agar หรือ broth เก็บใน tightly screw-cap tubes ที่ 4 °C เก็บได้ 3 เดือน

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

เวลาในการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารแบบวุ้นที่เทลงใน plate และเก็บใน
ถุงพลาสติกที่ปิดสนิท ที่ 4°C เก็บได้ 2 สัปดาห์

(ก่อนใช้ทำการ dry plate โดยเปิดฝา คว่ำหน้า plate

ทำใน oven $25-50^{\circ}\text{C}$ หรือ Laminar flow cabinet)

- อาหารแบบวุ้นที่เก็บใน flask ขนาดใหญ่มี screw-cap
ที่ 4°C เก็บได้ 3 เดือน

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

การละลาย Agar medium

- ♥ ถ้าหลังจากฆ่าเชื้อแล้ว ยังไม่ได้ทำการ pour plate ให้สามารถทิ้งไว้ให้แข็ง แล้วสามารถนำกลับมาใช้ได้โดยอนุญาตให้ทำการละลายได้อีกหนึ่งครั้ง ถ้าเหลือให้ทิ้งได้เลย
- ♥ อุณหภูมิที่ใช้เท plate 47-50 °C
- ♥ อุณหภูมิที่ใช้เทลงใน ตัวอย่าง plate 44-47 °C
เมื่อทำการละลาย media แล้ว ต้องใช้ภายในไม่เกิน 4 ชม.

ตัวอย่างแบบบันทึกการเตรียม อาหารเลี้ยงเชื้อ

ว/ด/ป	Bath No.	Media	น้ำหนัก(g)	ปริมาตร(ml)	pHเริ่ม	pHสุดท้าย	ผู้เตรียม	QC media		Sterility	ผู้รับผิดชอบ
								Positive	Negative		

V การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

คุณภาพน้ำที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

👍 ใช้น้ำกลั่นหรือ deionized water



มีการบันทึกผลการตรวจ
คุณภาพน้ำ



ควรเลือกซื้อจากบริษัทที่มี
certificate



คุณภาพของน้ำที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา



Test	Monitoring Frequency	Limit
Chemical tests : Conductivity	Monthly or each new batch	< 2 μmhos/cm at 25 C
pH	With each use	5.5 — 7.5
Total organic carbon	Monthly	< 1.0 mg/l
Heavy metals total	Annually	<0.1 mg/ l
Total chlorine residual	Monthly or with each use	< 0.1 mg/l
Bacteriological tests : Heterotrophic plate count	Monthly	< 500 CFU/ml

VI การควบคุมคุณภาพวิธีทดสอบ

- ทำ duplicate อย่างน้อยเดือนละครั้ง
หรือ 10 % ของตัวอย่าง
หรือ หนึ่งตัวอย่างต่อการทดสอบ (test run)
หรือ หนึ่งตัวอย่างต่อสัปดาห์ ถ้าตัวอย่างต่อสัปดาห์
น้อยกว่า 10

Precision criterion

No.	Duplicate Analyses		Logarithms of Counts		Range of Logarithms
	D_1	D_2	L_1	L_2	$(R_{\log})(L_1 - L_2)$
1	89	71	1.9494	1.8513	0.0981
2	38	34	1.5798	1.5315	0.0483
3	58	67	1.7634	1.8261	0.0627
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
14	7	6	0.8451	0.7782	0.0669
15	110	121	2.0414	2.0828	0.0414

Precision criterion

$$\begin{aligned}\sum R_{\log} &= 0.0981 + 0.0483 + 0.0627 + \dots + 0.0669 + 0.0414 \\ &= 0.71889\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\bar{R} &= \sum R_{\log} / n \\ &= 0.71889 / 15 = 0.0479\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Precision criterion} &= 3.27 \bar{R} \\ &= 3.27(0.0479) \\ &= 0.1566\end{aligned}$$

VI การควบคุมคุณภาพวิธีทดสอบ

- Spike ตัวอย่างด้วย positive และ negative control culture สำหรับ test method นั้น ๆ ด้วยปริมาณเชื้อที่ทราบค่า
- sterility check ของ media ทำทุก 1-4% และ glassware
โดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วแทนตัวอย่าง โดยทำการทดลองไปพร้อม ๆ กับการทดสอบตัวอย่าง

VII การควบคุมคุณภาพตัวอย่างทดสอบ

- ควรทดสอบทันทีที่ตัวอย่างเข้ามาถึงห้องปฏิบัติการ
- ในกรณีที่ต้องมีการเก็บรักษาตัวอย่างต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิและภาวะที่เหมาะสม

โดย

- ➡ อาหารแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ $< -18^{\circ}\text{C}$
- ➡ อาหารแช่เย็น เก็บที่อุณหภูมิ $1-5^{\circ}\text{C}$ แต่ต้องทดสอบภายใน 36 ชั่วโมง

VII การควบคุมคุณภาพตัวอย่างทดสอบ



ตัวอย่างน้ำ เก็บที่อุณหภูมิ $0-4^{\circ}\text{C}$ แต่ต้อง
ทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง



อาหารกระป๋องและอาหารแห้งเก็บที่
อุณหภูมิห้อง



เอกสารอ้างอิง

- **ISO 7218: 2007; Microbiology of food and animal feeding stuffs- General requirements and guidance for micro biological examinations**
- **Standard Methods for the Examination of water and waste water, 22nd, 2012 ., American Public Health Association.**
- **Bacteriological Analytical Manual .Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate, 2003**

เอกสารอ้างอิง

- ISO 11133-1:2009, Microbiology of food and animal feeding stuffs –Guidelines on preparation and production of culture media –part 1 : General guideline on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
- ISO 11133-2:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs –Guidelines on preparation and production of culture media –part 2 : Practical guidelines on performance testing of culture media .

เอกสารอ้างอิง

- APHA 2001 , Compendium of method for the microbiological examination of food 4th ., chapter 1 laboratory quality assurance.
- ISO 11133-2:2011, Microbiology of food and animal feeding stuffs –Guidelines on preparation and production of culture media –part 2 : Practical guidelines on performance testing of culture media .Amendment 1 : Test microorganisms for commonly used culture media.