



การทวนสอบวิธีทดสอบทาง จุลชีววิทยา

(Microbiological Method Verification: ISO 16140-3:2021)

นำเสนอ โดย ประเชษฐ นาคพันธ์



ISO 16140-3 :2021

Microbiology of the chain-Method validation

Part 3:

**Protocol for the verification of reference methods
and validated alternative methods implemented
in a single laboratory**

ISO 16140 series

ISO 16140-1 :Vocabulary

ISO 16140-2:Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method

ISO 16140-3:Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory

ISO 16140-4:Protocol for method validation in a single laboratory

ISO 16140-5:Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods

ISO 16140-6 :Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures

Flow chart linking the SIX parts of ISO 16140 Series

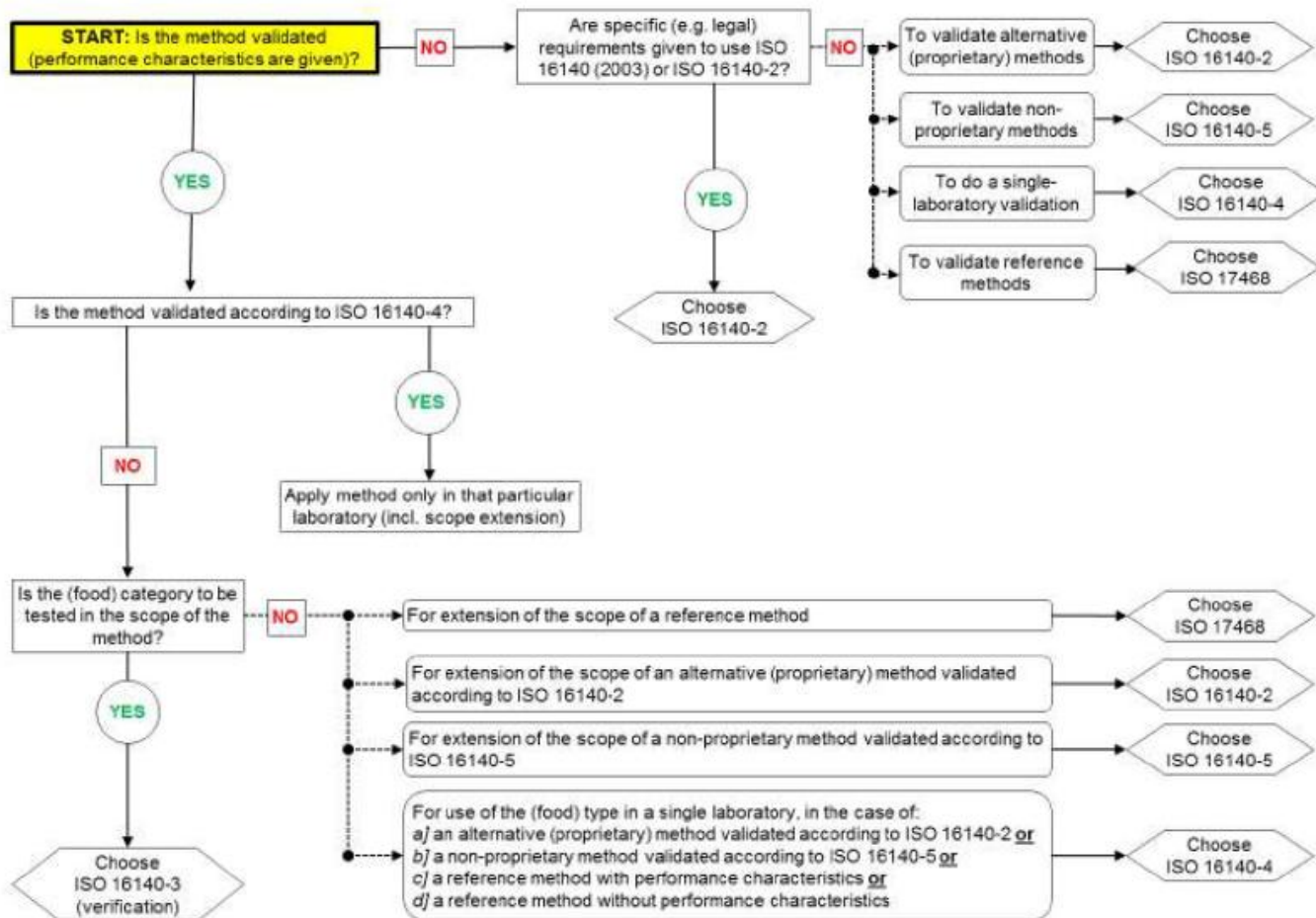
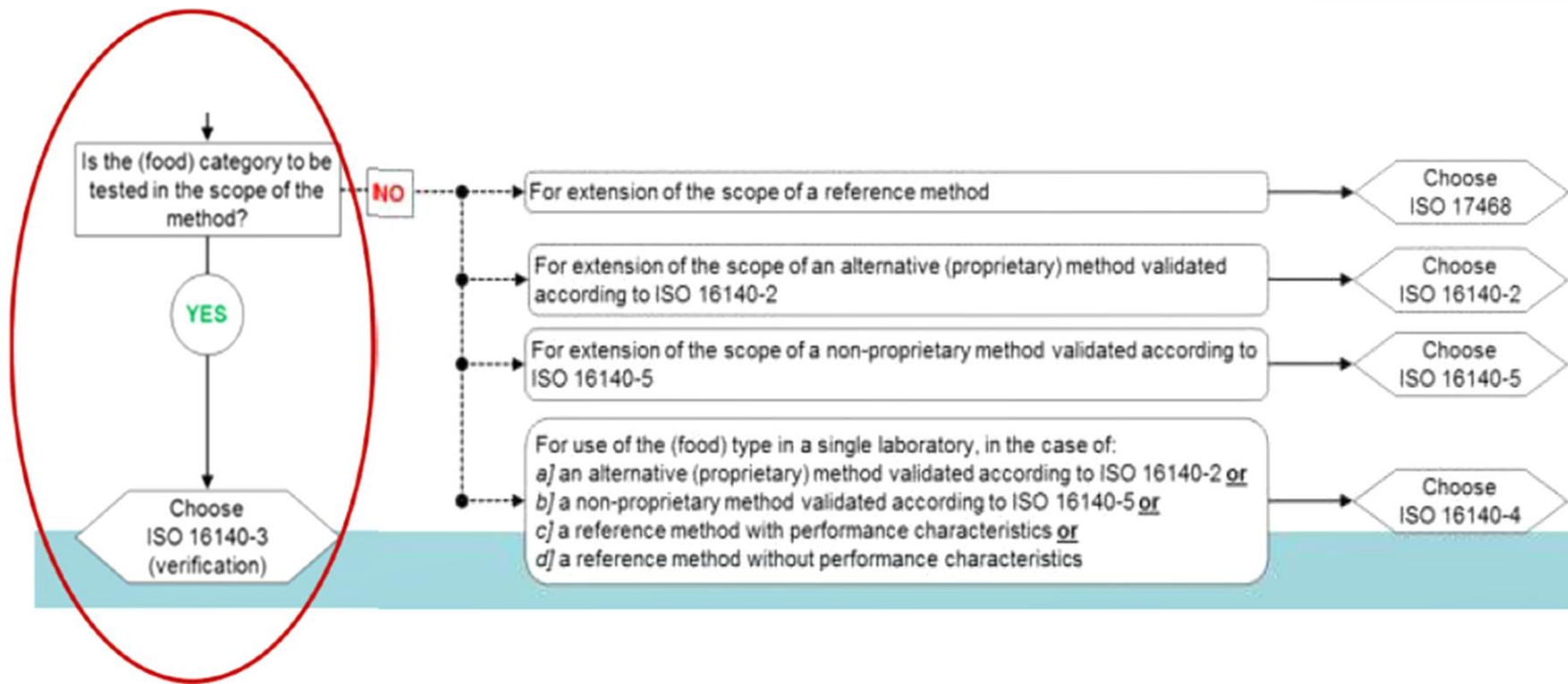


Figure 1 — Flow chart for application of the ISO 16140 series (parts 2, 3, 4 and 5)

Method Validated?

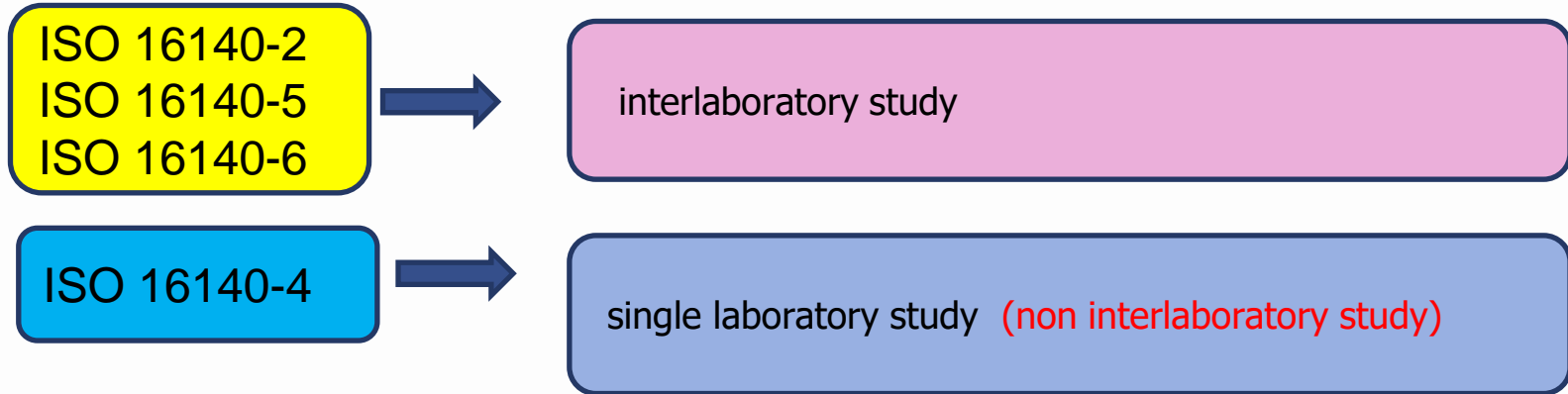


International
Organization for
Standardization

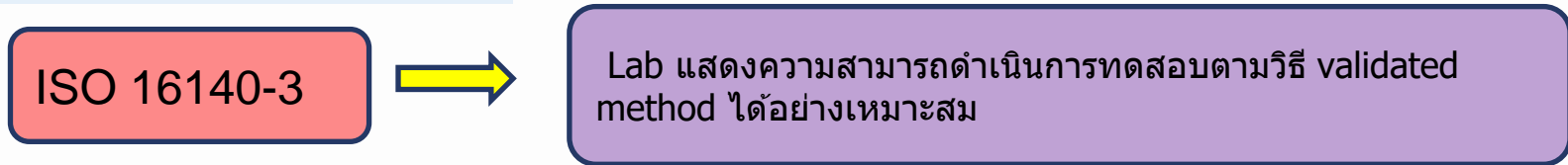


มีขั้นตอนที่จำเป็นสองขั้นตอน ก่อนที่ห้องปฏิบัติการจะนำวิธีไปใช้

1. Validation of the method



2. Method verification



การทวนสอบ กับ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Verification versus Validation)(ISO 16140-1:2016)

validation

- การจัดหาหลักฐานแสดงคุณสมบัติที่เหมาะสมเฉพาะของวิธีทดสอบ เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้งาน

verification

- การแสดงความสามารถของ **Lab** ในการใช้วิธีทดสอบสอดคล้องกับวิธีที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง และมีความเหมาะสมในการนำไปใช้งาน

การศึกษา Validation study

ไม่สามารถทดสอบอาหารที่มีอยู่ทั้งหมดได้

ถ้าศึกษา food categories อย่างน้อย จำนวน
5 กลุ่ม (ISO 16140-2:2016, Annex A)

เรียก Broad range of foods
อาหารหลากหลายกลุ่ม

ถ้าศึกษา food categories น้อยกว่า
จำนวน 5 กลุ่ม

เรียก Limited range of foods
อาหารจำกัดกลุ่ม

การศึกษา Validation study



บางครั้ง validation มีการเพิ่มเติมให้สมบูรณ์ด้วยการเติม (non-food) categories

- Pet food and animal feed
- Environmental samples (foods or feed production)
- Primary production samples

การทวนสอบวิธี(Verification) มี 2 แบบ

1.Implementation verification

เป็นการแสดงว่าห้องปฏิบัติการสามารถปฏิบัติการทดสอบด้วยวิธีทดสอบนั้นได้อย่างถูกต้อง

1.1 Qualitative

Food item เดียวกัน

ที่ได้ถูก validation study

1.2 Quantitative

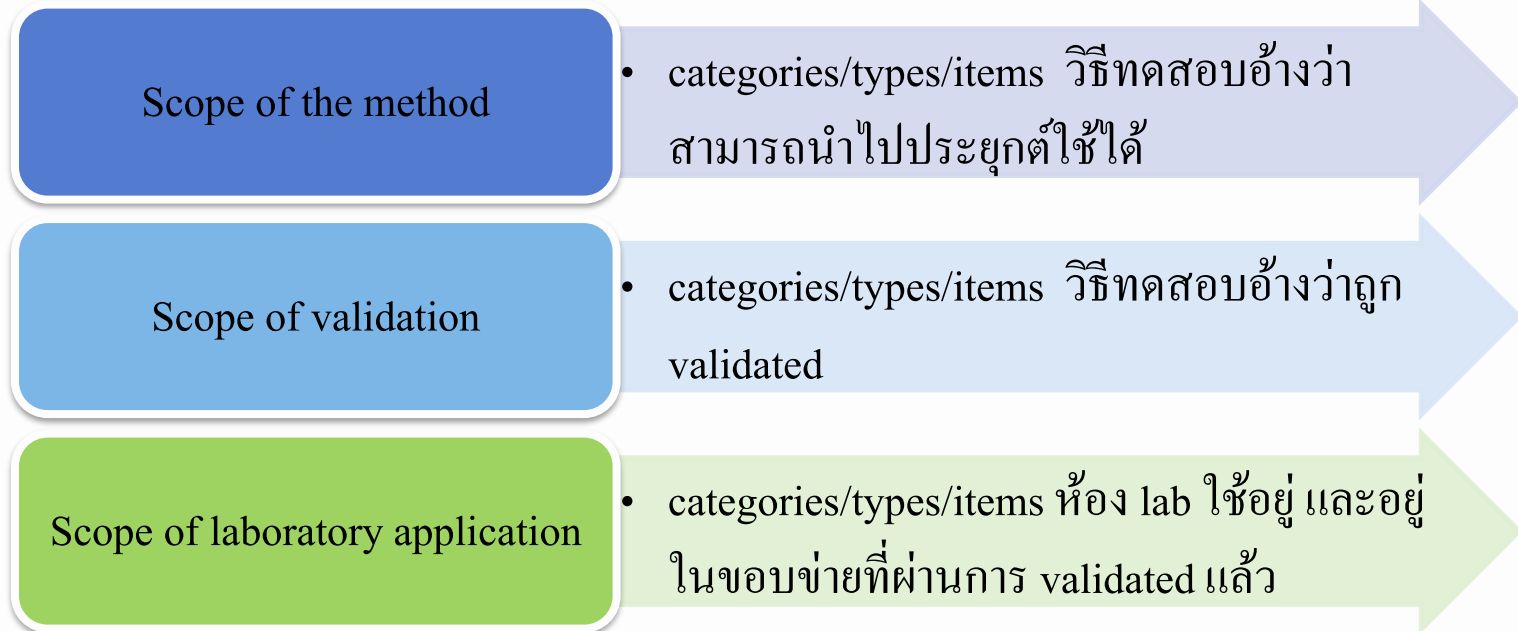
Food item ใดก็ได้

ที่อยู่ในขอบข่ายของอาหารที่ผ่าน
validation study

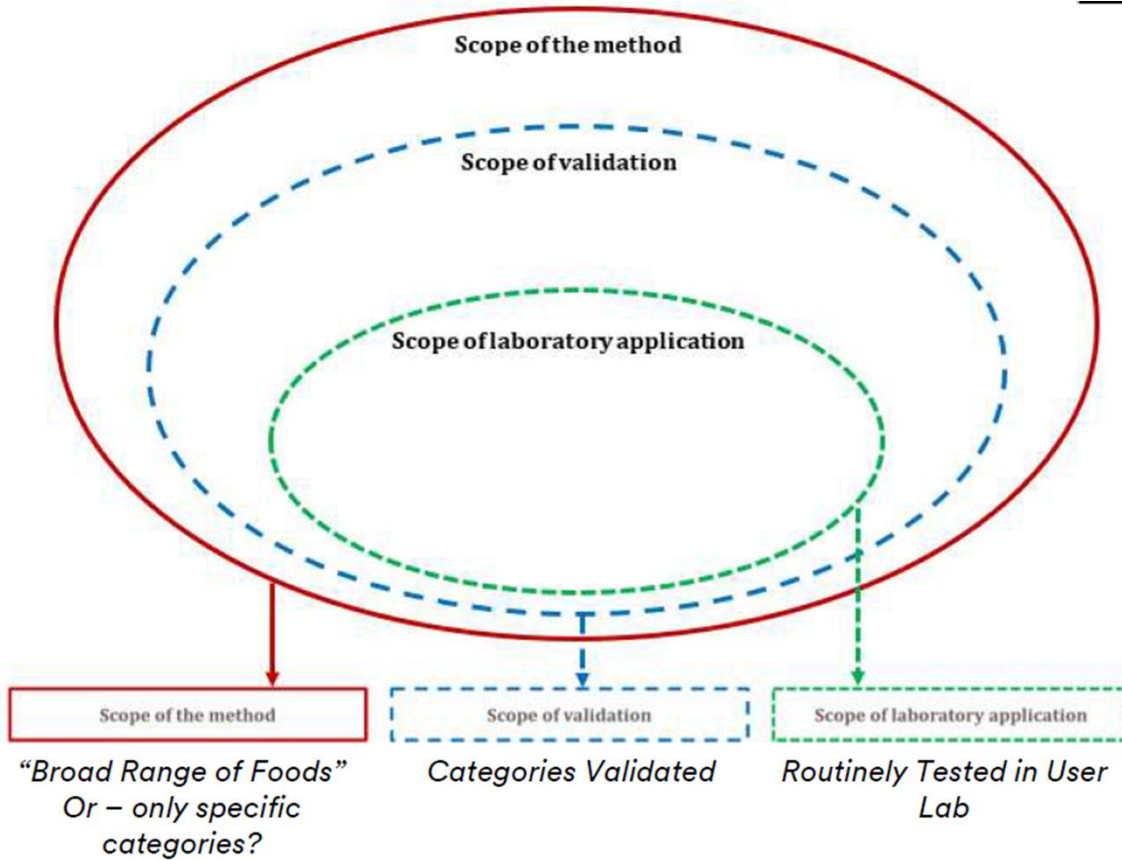
2.(food) Item verification

การแสดงความสามารถของห้องปฏิบัติการที่จะนำวิธีทดสอบไปใช้ใน scope ที่อ้างถึง

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขอบข่าย



Overlab between the difference scopes



Scope of the method

Method is applicable to:

- products intended for human consumption (15 categories);
- products intended for feeding of animals (1 category);
- environmental samples in the area of food production and food handling (1 category);
- samples from the primary production stage such as animal faeces, dust, and swabs (1 category).

Scope of validation

Method has been validated for a "broad range of foods" involving the following (food) categories and (food) items:

- egg and egg products (derivates) [food item: whole liquid egg];
- raw meat ready-to-cook meat products (except poultry) [food item: minced meat];
- heat-processed milk and dairy products [food item: pasteurized milk];
- chocolate, bakery products and confectionary [food item: tiramisu];
- multi-component foods or meal components [food item: pasta salad].



Implementation verification



(Food) item verification

Scope of laboratory application

The user laboratory wants to verify the method for a "broad range of foods".

The user laboratory selects:

Implementation verification:

- food item: minced meat [category: raw meat and ready-to-cook meat products (except poultry)]

(Food) item verification: as these are challenging matrices and relevant to the samples tested by the user laboratory;




- blue cheese [category: raw milk and dairy products];
- smoked fish [category: ready-to-eat, ready-to-reheat fishery products];
- alfalfa [category: fresh produce and fruits];
- black pepper [category: dried cereals, fruits, nuts, seeds and vegetables].
- pizza [category: multi-component foods or meal components].

Method Scope: Matrices

ISO 16140-2

Table A. 1: Classification of sample types & suggested target combinations for validation studies

CATEGORIES

Raw Milk & Dairy Products	Heat Processed Milk & Dairy Products	Raw meat & Ready-to-cook meat products (except poultry)	Ready-to-eat, ready-to-reheat meat products (except poultry)	Raw Poultry & ready-to-cook poultry products	Ready-to-eat, ready-to-reheat meat poultry products
Eggs & egg products (derivatives)	Raw & ready-to-cook fish & seafoods (unprocessed)	Ready-to-eat, ready-to-reheat fishery products	Fresh produce & fruits	Processed fruits & vegetables	Dried cereals, fruits, nuts, seeds and vegetables
Infant formula & infant cereals	Chocolate, bakery products & confectionary	Multi-component foods or meal components	Primary production samples 	Pet food & animal feed 	Environmental samples (food or feed production) 

There are 18 CATEGORIES recognized (and harmonized between ISO and AOAC)

Example of Categories & Food types

Category	Types	Items (matrices)
Meat products	Raw	Meat cuts, carpaccio's, minced meat... (20 samples)
	Heat processed	Cooked ham, cooked meat preparations...(20 samples)
	Cured	Cured ham, bacon, etc...(20 samples)

= 60 *different* samples tested per Meat Products Category

ขอบข่าย (Scope)

เอกสารนี้ระบุแนวทางสำหรับการทวนสอบวิธีทดสอบอ้างอิง (reference methods) และวิธีทางเลือกที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว (validated alternative methods) สำหรับให้ห้องปฏิบัติการนำไปใช้

- การตรวจแบบ detection
- การตรวจแบบ quantification
- การตรวจยืนยัน (confirmation)
- การจำแนก (typing)

ครอบคลุมวิธี



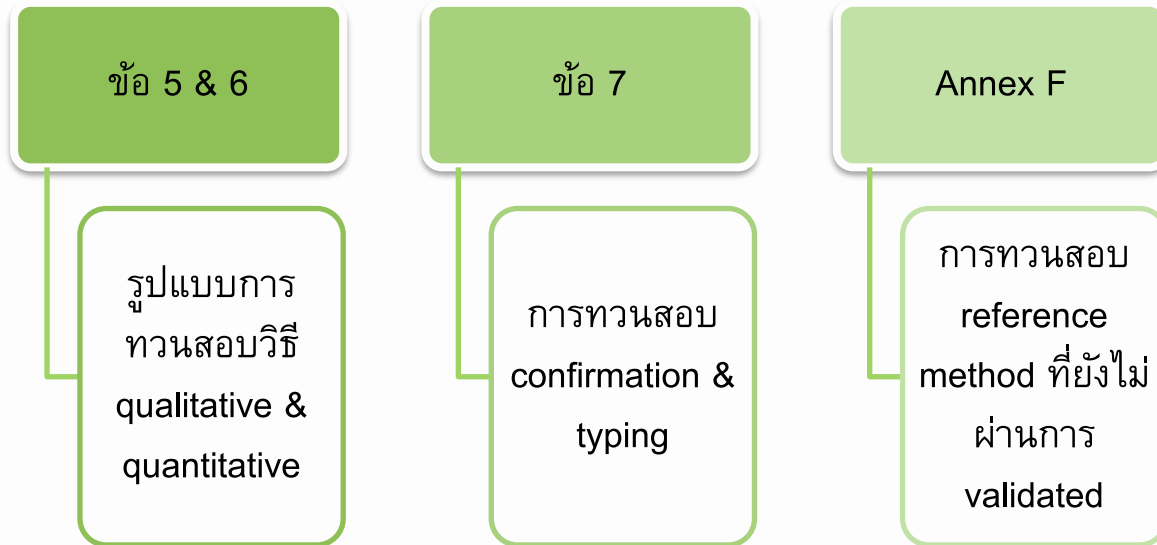
- อาหารคน
- อาหารสัตว์
- ตัวอย่างสิ่งแวดล้อมจากพื้นที่ผลิตและการจัดการ

ประเภทตัวอย่าง



ขอบข่าย (Scope)

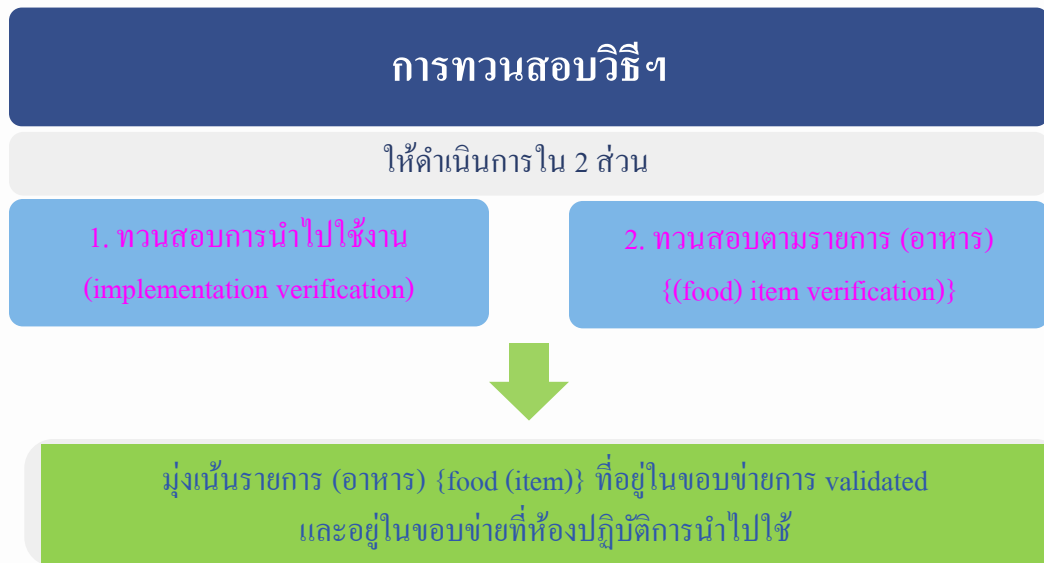
ใช้กับการทดสอบหาแบคทีเรีย ยีสต์ และรา บางครั้งนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก หรือ สารที่เชื้อสร้างขึ้น สามารถนำไปใช้ได้แล้วแต่กรณี



หลักการทั่วไปของการทวนสอบวิธีแบบพบ/ไม่พบ และแบบปริมาณ

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

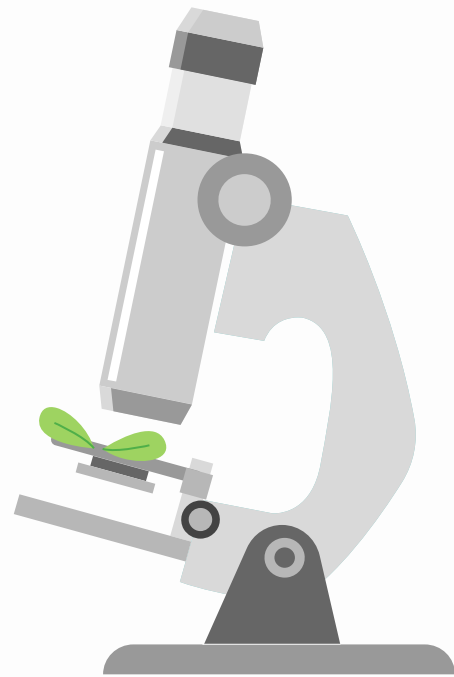
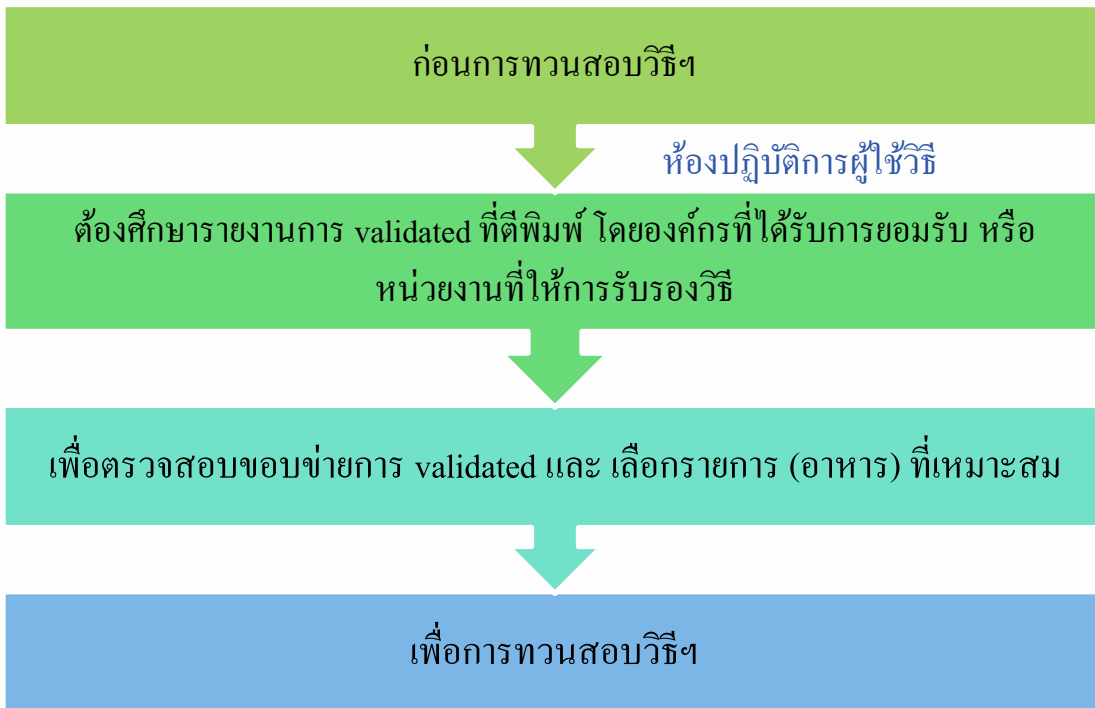
4.1 เรื่องทั่วไป



หลักการทั่วไปของการทวนสอบวิธีแบบพบ/ไม่พบ และแบบปริมาณ

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

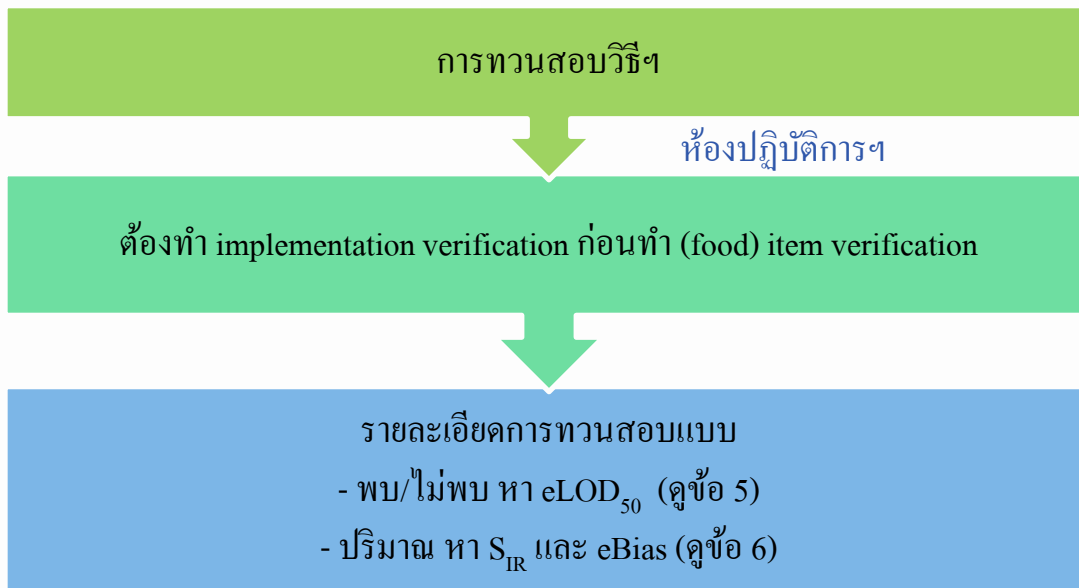
4.1 เรื่องทั่วไป (ต่อ)



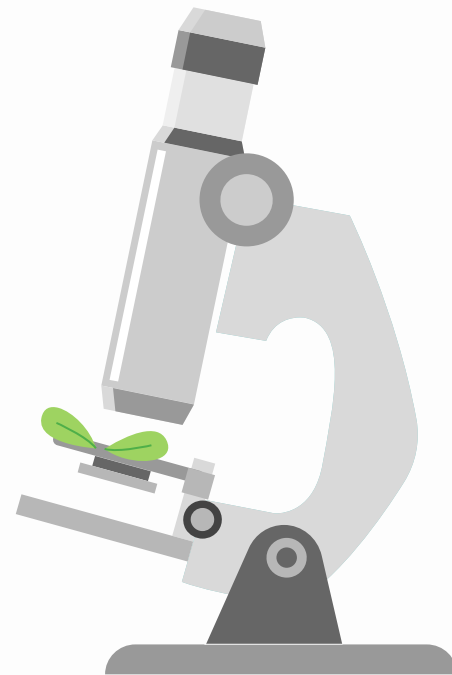
หลักการทั่วไปของการทวนสอบวิธีแบบพบ/ไม่พบ และแบบปริมาณ

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

4.1 เรื่องทั่วไป (ต่อ)



★ ส่วน reference method ที่ยังไม่ผ่านการ validated ดูรายละเอียดใน Annex F



หลักการทั่วไปของการทวนสอบวิธีแบบพบ/ไม่พบ และแบบปริมาณ

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

4.2 การทวนสอบการนำไปใช้งาน implementation verification

มีจุดมุ่งหมายเพื่อแสดงความสามารถของห้องปฏิบัติการ ว่าสามารถใช้วิธีทดสอบได้ถูกต้อง สอดคล้องกับผลการ validated ห้องปฏิบัติการ ต้อง ทบทวนข้อมูล validation (โดยเฉพาะ LOD₅₀ หรือ S_{IR} ในรายการ (อาหาร) ที่ศึกษา)

1

กรณี Qualitative (พบ/ไม่พบ)

เลือก 1 รายการ (อาหาร) food item

- ตรงกับขอบข่ายที่ถูกต้อง และอยู่ใน Scope ของ Lab. application
- ❖ ถ้ารายการ (อาหาร) ตรงกับขอบข่าย validation แต่ไม่อยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการตรวจ ห้องปฏิบัติการต้องจัดหา (ซื้อ) ตัวอย่างรายการ (อาหาร) นี้
- ❖ รายการอาหารที่เลือกมาทวนสอบ ต้องมี sample size ขนาดเดียวกันกับการศึกษา validation

2

กรณี Quantitative (ปริมาณ)

เลือก 1 รายการ (อาหาร) food item

- อยู่ในขอบข่ายการ validated (แต่รายการอาหารไม่จำเป็นต้องตรงกับขอบข่ายที่ศึกษา)
- อยู่ใน Scope ของ Lab. application



หลักการทั่วไปของการทวนสอบวิธีแบบพบ/ไม่พบ และแบบปริมาณ

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

4.3 การทวนสอบตามรายการ (อาหาร) ((food) item verification)

ใช้กับ Validated methods (reference และ alternative) ที่มีข้อมูล validation ที่ตีพิมพ์แล้ว

เพื่อแสดงความสามารถของห้องปฏิบัติการในการใช้ validated method ในรายการ (อาหาร) นั้น

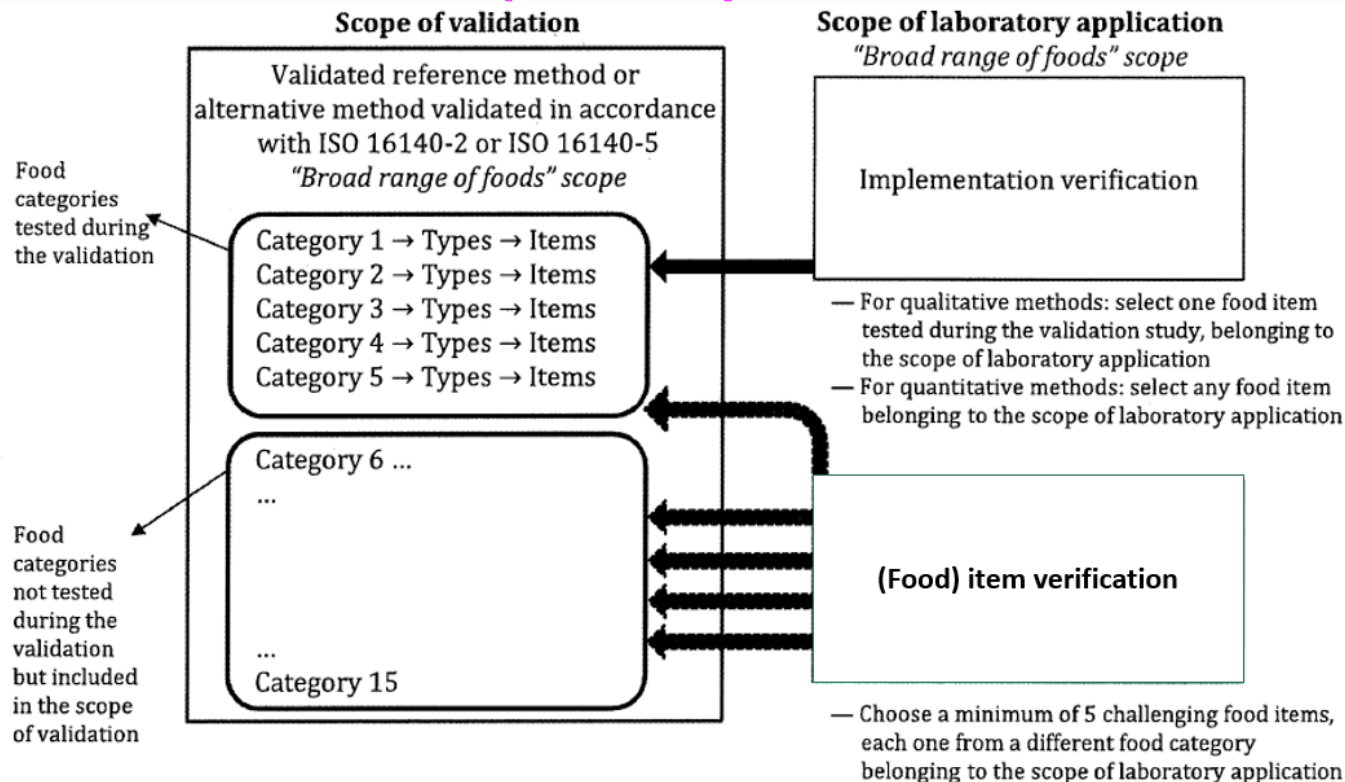
ห้องปฏิบัติการต้อง

★ เลือก 1 รายการอาหารท้าทาย (challenging food item) จากแต่ละกลุ่มอาหาร (categories) ที่อยู่ในขอบข่ายการ validated และอยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการมีการทดสอบ (ดูรายละเอียดข้อ 4.4)

★ รายการอาหารที่ท้าทาย ให้ใช้ sample size เท่ากับตัวอย่างที่ validated หรืออาจใช้ขนาดเล็กกว่าตามที่ lab ใช้ในงานประจำ

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

4.4 ข้อกำหนดสำหรับการทวนสอบฯ (requirements for implementation verification and (food) item verification)



**เชิงคุณภาพ

- ตรงกลุ่ม

- ตรงรายการ

- ตรง test portion

**เชิงปริมาณ

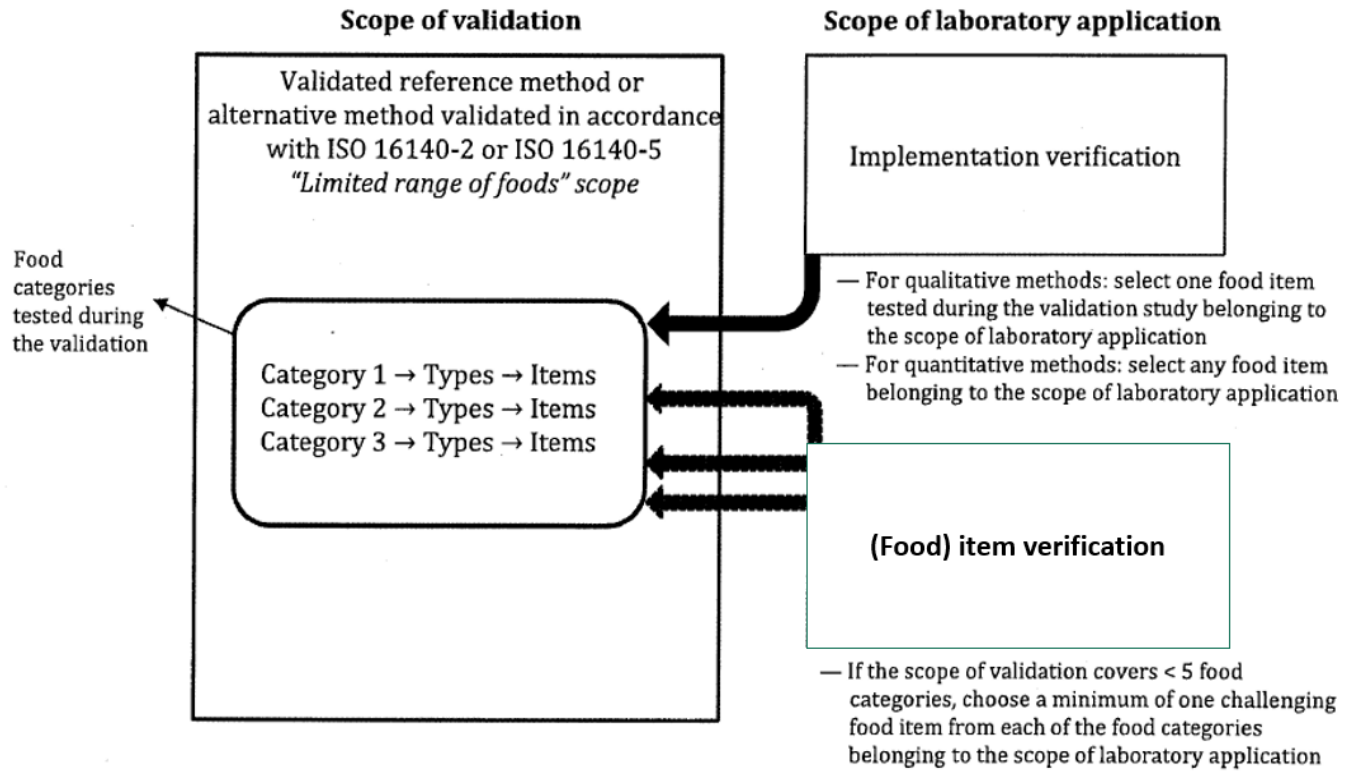
- ตรงกลุ่ม

- รายการไม่ต้องตรง

หลักการทั่วไปของการทวนสอบวิธีแบบพบ/ไม่พบ และแบบปริมาณ

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

4.4 ข้อกำหนดสำหรับการทวนสอบฯ (requirements for implementation verification and (food) item verification) ต่อ

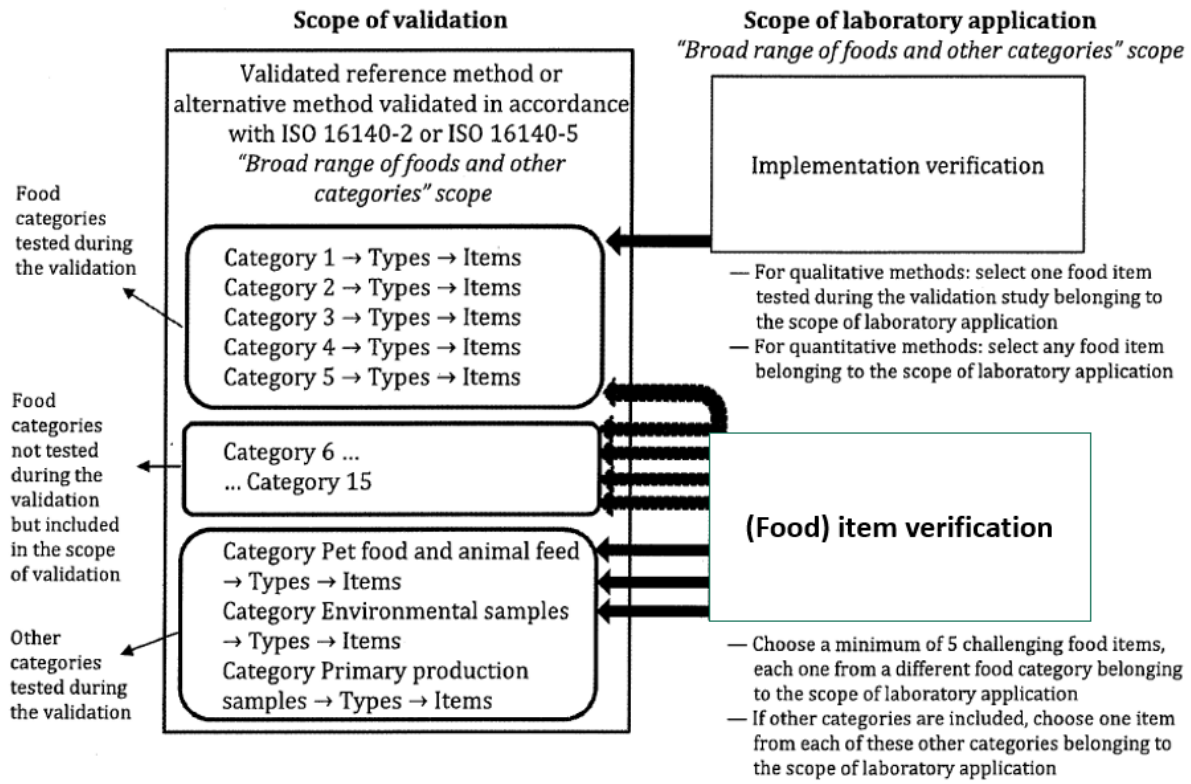


รูปแสดงรายการอาหาร (food item) ที่ต้องทวนสอบในอาหารจำกัดกลุ่ม (limited range of foods)

หลักการทั่วไปของการทวนสอบวิธีแบบพบ/ไม่พบ และแบบปริมาณ

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

4.4 ข้อกำหนดสำหรับการทวนสอบฯ (requirements for implementation verification and (food) item verification) ต่อ



รูปแสดงรายการอาหาร (food item) และรายการอื่นที่ต้องทวนสอบในอาหารหลากหลายกลุ่มและในกลุ่มอื่นๆ

หลักการทั่วไปของการทวนสอบวิธีแบบพบ/ไม่พบ และแบบปริมาณ

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

4.4 ข้อกำหนดสำหรับการทวนสอบฯ (requirements for implementation verification and (food) item verification) ต่อ

Table 1 — Summary of the minimum number of (food) items required for verification

Scope of validation	Number of samples		
	Implementation verification	(Food) item verification	Total
“Broad range of foods” scope ≥ 5 food categories	1	≥ 5	≥ 6
“Limited range of foods” scope N_{food} categories	1	$N_{\text{food}} \leq 4$	$(N_{\text{food}} + 1) \leq 5$
“Broad range of foods” + other categories (N_{other}) scope	1	≥ 5 food items + 1 item from each of the N_{other} other categories	$\geq 6 + N_{\text{other}}$
“Limited range of foods” N_{food} categories + other categories (N_{other}) scope	1	$N_{\text{food}} \leq 4$ + 1 item from each of the N_{other} other categories	$(N_{\text{food}} + N_{\text{other}} + 1) \leq 8$
Other categories (N_{other}) scope only	1	$N_{\text{other}} \leq 3$	$(N_{\text{other}} + 1) \leq 4$

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

4.4 ข้อกำหนดสำหรับการทวนสอบฯ (requirements for implementation verification and (food) item verification) ต่อ

★ แนวทางในการเลือกรายการอาหารท้าทาย (challenging food items) Annex B

สำหรับ “Broad range of foods” scope ที่ต้องทำอย่างน้อย 5 รายการอาหาร

ตาราง B1 แสดงตัวอย่างรายการอาหาร (food item) และคุณสมบัติที่ต้องการเพื่อใช้ทวนสอบ

Category	Item	Challenging characteristic
1	1	pH
2	2	Viscosity
3	3	Fat content
4	4	High background microbiota and pH
5	5	Polyphenol

หลักการทั่วไปของการทวนสอบวิธีแบบพบ/ไม่พบ และแบบปริมาณ

ISO 16140-3:2021

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

4.4 ข้อกำหนดสำหรับการทวนสอบฯ (requirements for implementation verification and (food) item verification) ต่อ

★ แนวทางในการเลือกรายการอาหารท้าทาย (challenging food items) Annex B

Matrix ของอาหารที่อาจมีผลกระทบต่อทดสอบ

- ✓ มีการปนเปื้อนของเชื้อสูง เช่น raw meat, raw milk, fermented milk spoilage microorganism ฯลฯ
- ✓ องค์ประกอบของตัวอย่างอาหาร เช่น high fat content, lecithin, thickener, nutrient content ฯลฯ
- ✓ pH เช่น กรดสูง (<4.5) – เครื่องดื่ม ซอส
- ✓ มีสารยับยั้งการเจริญในตัวอย่าง
- ✓ โครงสร้างทางฟิสิกส์ของอาหาร เช่น ความเหนียว การละลาย

(General principles of verification of qualitative (detection) methods and quantification methods)

4.5 คุณลักษณะของสมรรถนะที่ต้องทวนสอบ (Performance characteristics)

ตารางที่ 2 แสดงคุณลักษณะของสมรรถนะที่ต้องทวนสอบ

Table 2 — Required performance characteristics to be determined for verification

Method	Performance characteristic	Implementation verification	(Food) item verification
Qualitative	Estimated LOD ₅₀ (eLOD ₅₀)	✓	✓
Quantitative	Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR})	✓	Not applicable
	Estimated bias (eBias)	Not applicable	✓

NOTE 1 The relationship between intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR}) and ISO 19036 is explained in [6.1](#).

NOTE 2 For the verification of qualitative method, three protocols are proposed to the user laboratory. The protocol 3 does not require a determination of an eLOD₅₀ but to target a concentration of 3 cfu to 5 cfu/test portion.

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.1 การประมาณค่า LOD₅₀ (estimated LOD₅₀ (eLOD₅₀) determination)



การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.2 การออกแบบการทดลอง (Experimental design)

Table 3 — Protocols to determine eLOD₅₀ and number of replicates needed per inoculation level

Protocol	Inoculation level of the test portion					Total number of replicates
	9 × LOD ₅₀ /test portion	3 × LOD ₅₀ /test portion	1 × LOD ₅₀ /test portion	3 to 5 cfu /test portion	Blank	
1	1	4	4	-	1	10
2	-	3	5	-	1	9
3	-	-	-	7	1	8

NOTE The abbreviation of colony forming units is cfu.

Unsure about level of contamination

Reference material used

The choice of one of the three protocols depends on the ability of the laboratory to achieve the desired level of contamination.

Intermediate approach – use if 1 or 3 don't work, and need to repeat

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.2 การออกแบบการทดลอง (Experimental design) ต่อ



รูปแบบที่ 1

ใช้เมื่อมีความไม่แน่นอน ในการทำให้ได้ระดับการปนเปื้อนที่ต้องการ เนื่องจากปริมาณเชื้อที่เดิมขณะนั้นใน test portion ไม่ทราบปริมาณที่แท้จริง



รูปแบบที่ 2

ใช้เมื่อ รูปแบบที่ใช้ครั้งแรก ผลใช้ไม่ได้ และการทดลองต้องทำซ้ำ



รูปแบบที่ 3

ใช้เมื่อเชื้อที่เดิมทราบปริมาณที่แน่นอน เช่น การใช้ reference material

★ ไม่ว่า Lab จะใช้รูปแบบการทดลองใด ถ้าผลการทดสอบ ($eLOD_{50}$) ไม่สอดคล้องกับการปนเปื้อนของเชื้อที่ต้องการ เพื่อลดการทำซ้ำ ให้ทำ dilution เพิ่มขึ้น

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.2 การออกแบบการทดลอง (Experimental design) ต่อ

รูปแบบการทดลอง

ต้องปฏิบัติ ดังนี้



1

เตรียมเชื้อเป้าหมายเพื่อเติมใน (food) items

2

เตรียม test portions (จาก (food) item เดียวกัน) ตามจำนวนที่ต้องการใช้ (ดูตารางที่ 3) โดย (food) item ต้องไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อเป้าหมาย

3

หาระดับของเชื้อที่ต้องการ โดยการเจือจางด้วย non-selective medium หรือวิธี MPN ตามระบุ ISO 7218

หมายเหตุ : ถ้าระดับการปนเปื้อนของเชื้อที่ใช้เดิมไม่ทราบปริมาณ ให้เจือจางมากขึ้น เพื่อให้แน่ใจว่าระดับของเชื้อเป้าหมายถึงระดับที่ต้องการทวนสอบ

4

เติมเชื้อเป้าหมายใน test portion ตามรูปแบบที่เลือก (จากตารางที่ 3)

5

ทดสอบ test portion ตามวิธีทดสอบ

6

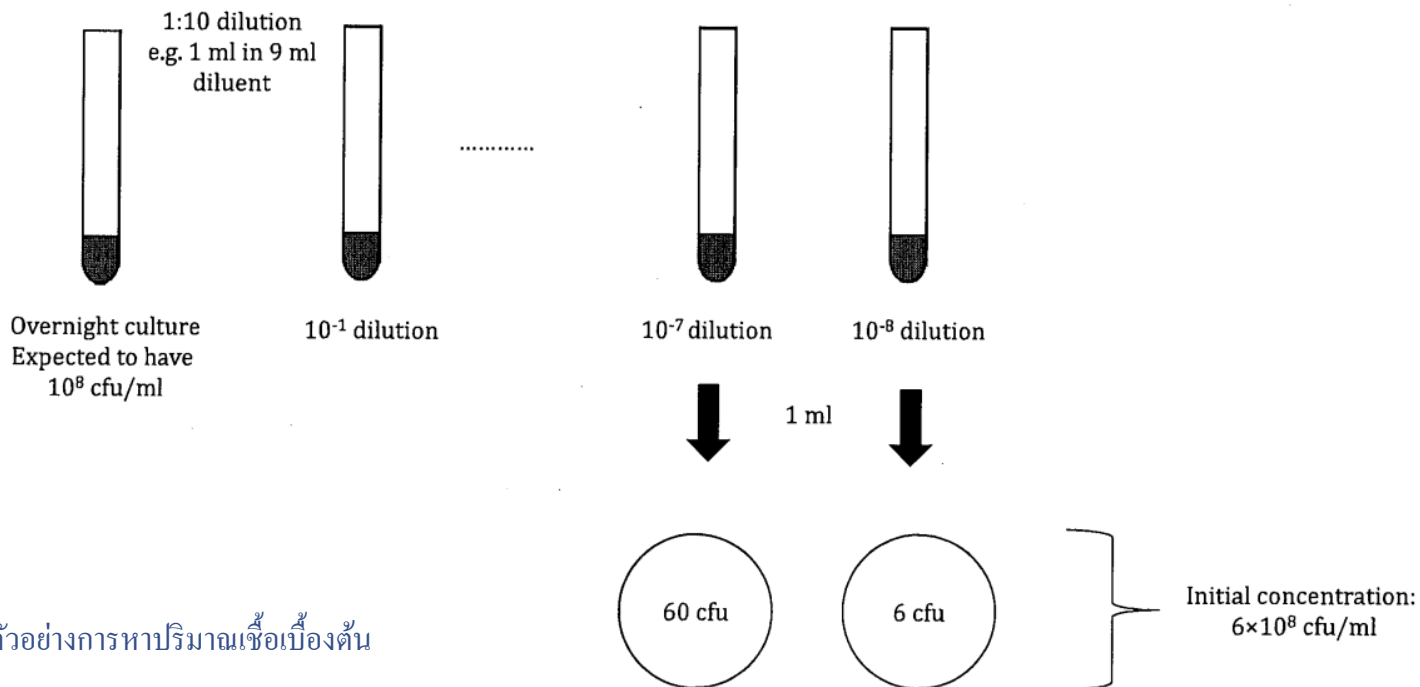
คำนวณ $eLOD_{50}$ โดยอาศัยผล + หรือ - (ดูรายละเอียดข้อ 5.5)

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.2 การออกแบบการทดลอง (Experimental design) ต่อ

ตัวอย่างการเตรียมเชื้อเป่าหมายเพื่อใช้ในการทวนสอบ : Annex C



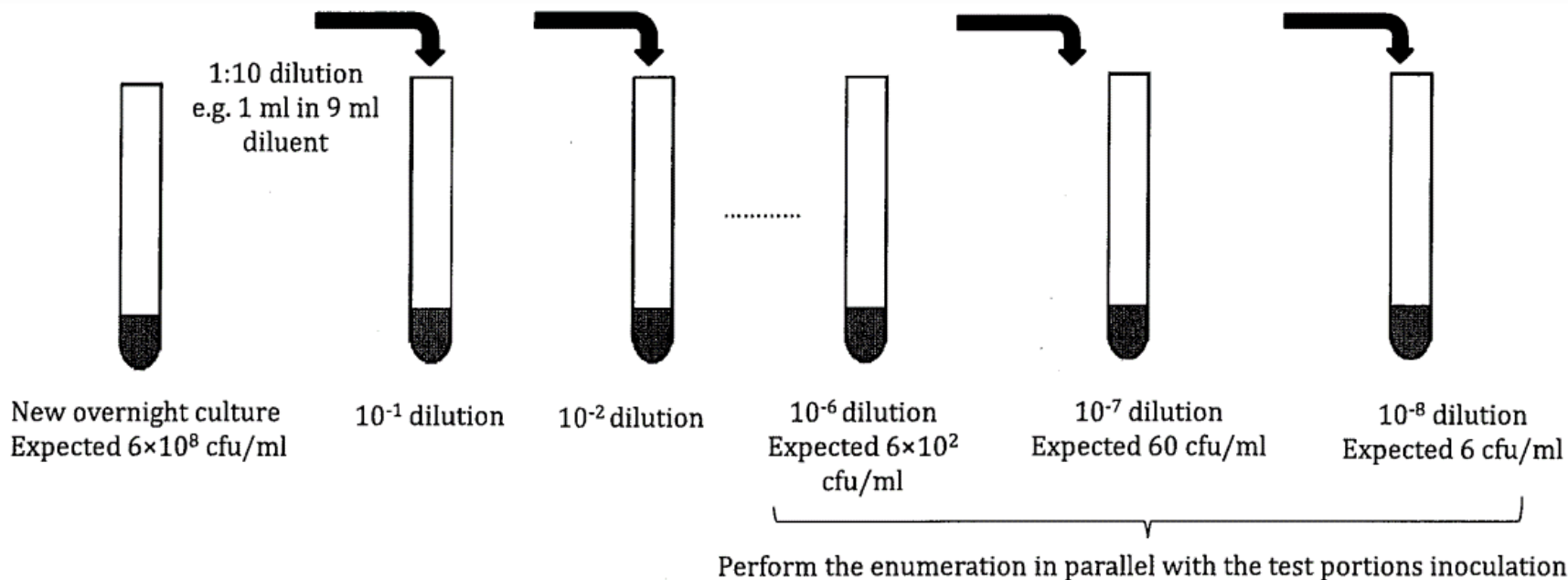
รูปที่ C.1 : ตัวอย่างการหาปริมาณเชื้อเบื้องต้น

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.2 การออกแบบการทดลอง (Experimental design) ต่อ

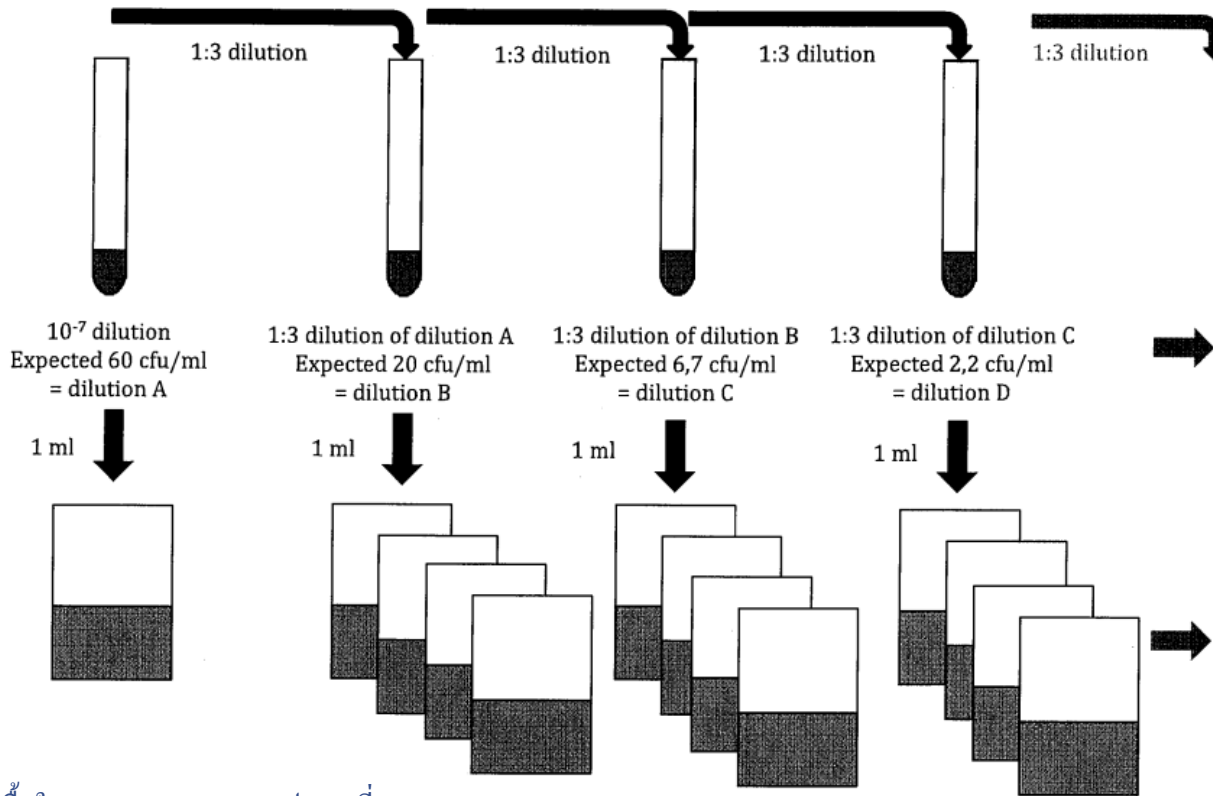
ตัวอย่างการเตรียมเชื้อเป่าหมายเพื่อใช้ในการทวนสอบ : Annex C



การทดสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.2 การออกแบบการทดลอง (Experimental design) ต่อ

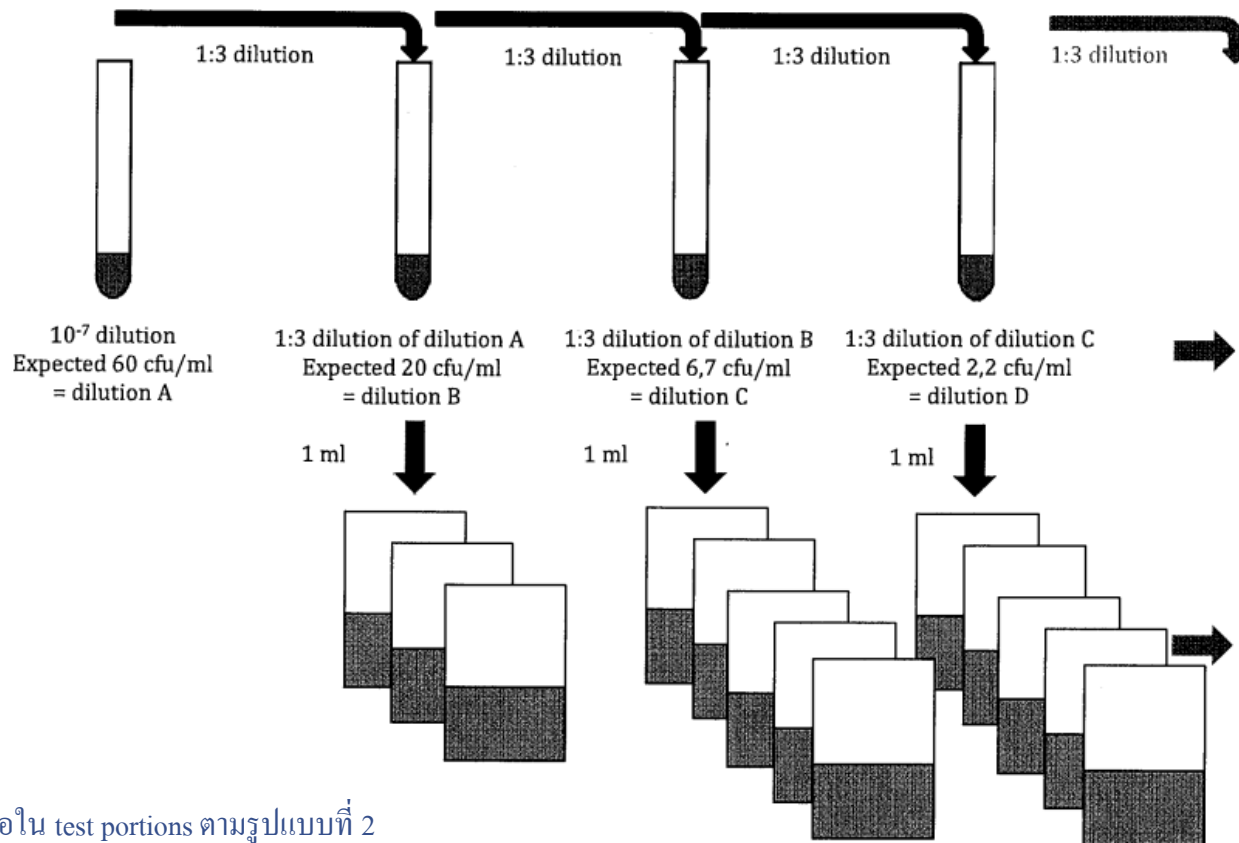


รูปที่ C.3 : ตัวอย่างการเตรียมเชื้อใน test portions ตามรูปแบบที่ 1

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.2 การออกแบบการทดลอง (Experimental design) ต่อ

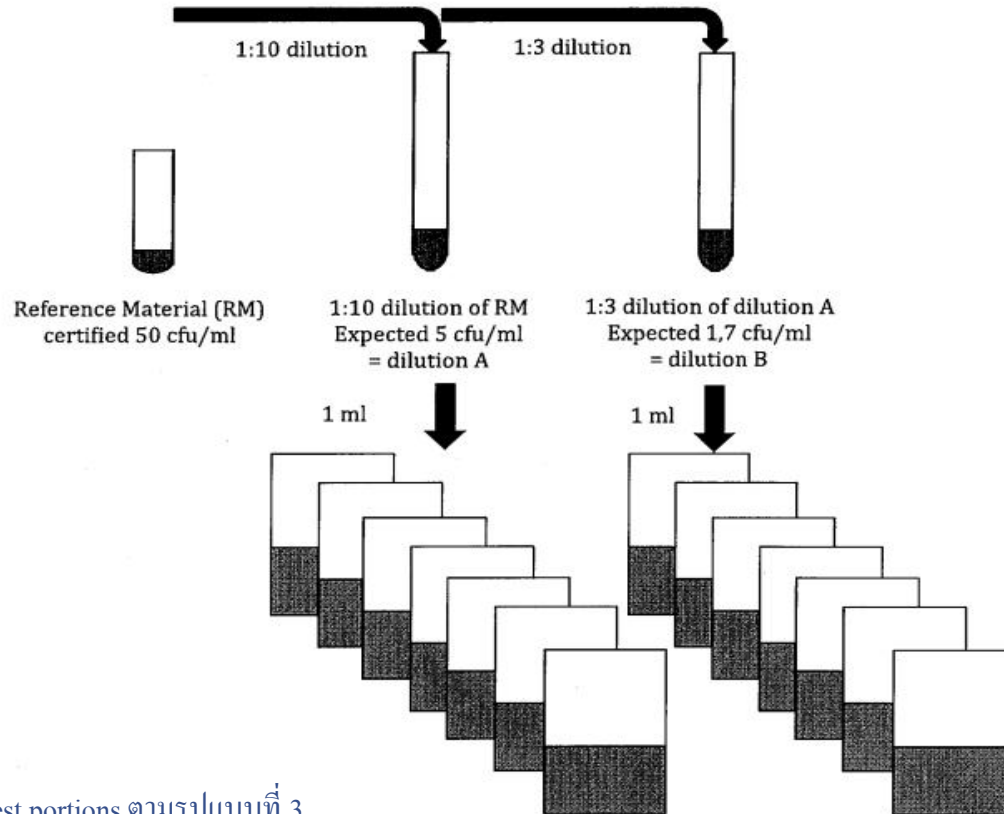


รูปที่ C.4 : ตัวอย่างการเตรียมเชื้อใน test portions ตามรูปแบบที่ 2

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.2 การออกแบบการทดลอง (Experimental design) ต่อ

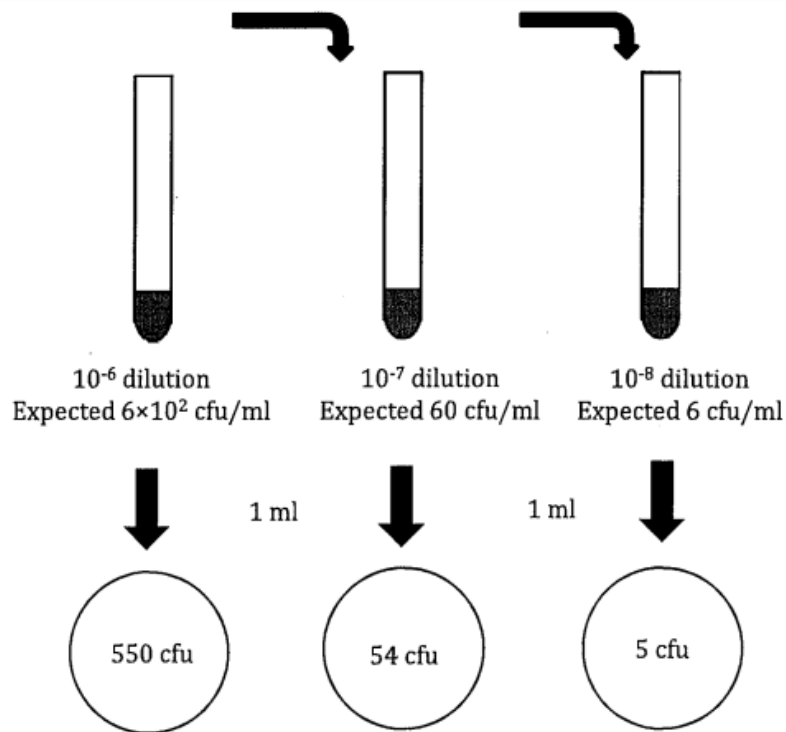


รูปที่ C.5 : ตัวอย่างการเตรียมเชื้อใน test portions ตามรูปแบบที่ 3

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.2 การออกแบบการทดลอง (Experimental design) ต่อ



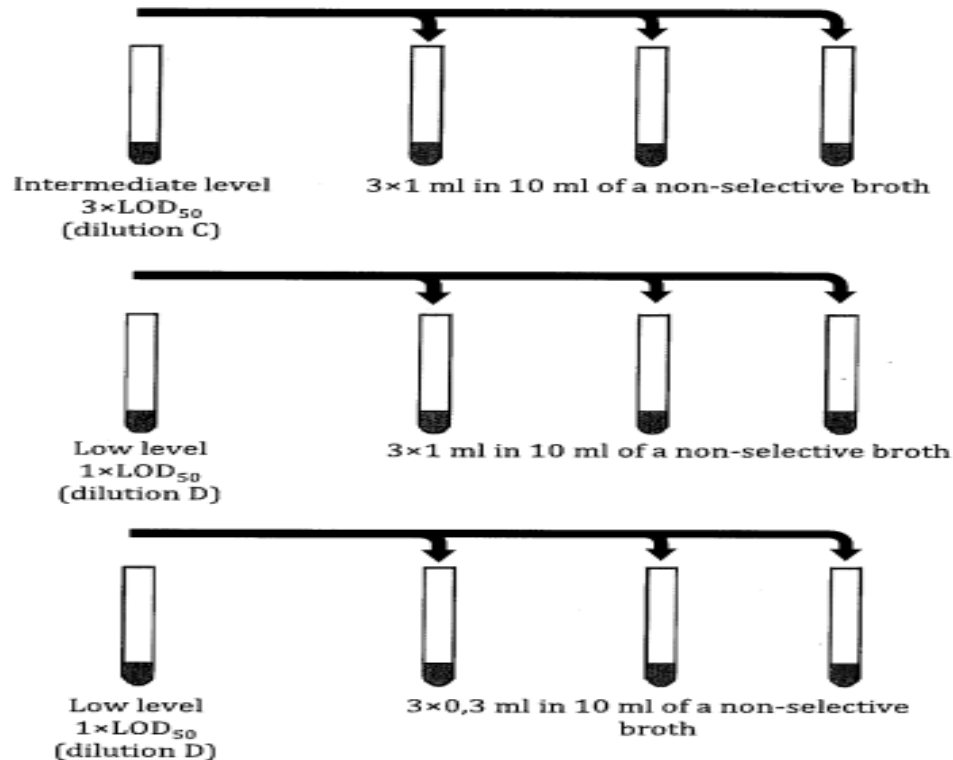
รูปที่ C.6 : ตัวอย่างการหาปริมาณเชื้อจริงที่เดิม

Enumeration result:
 $5,4 \times 10^8$ cfu/ml
 instead of 6×10^8 cfu/ml

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.2 การออกแบบการทดลอง (Experimental design) ต่อ

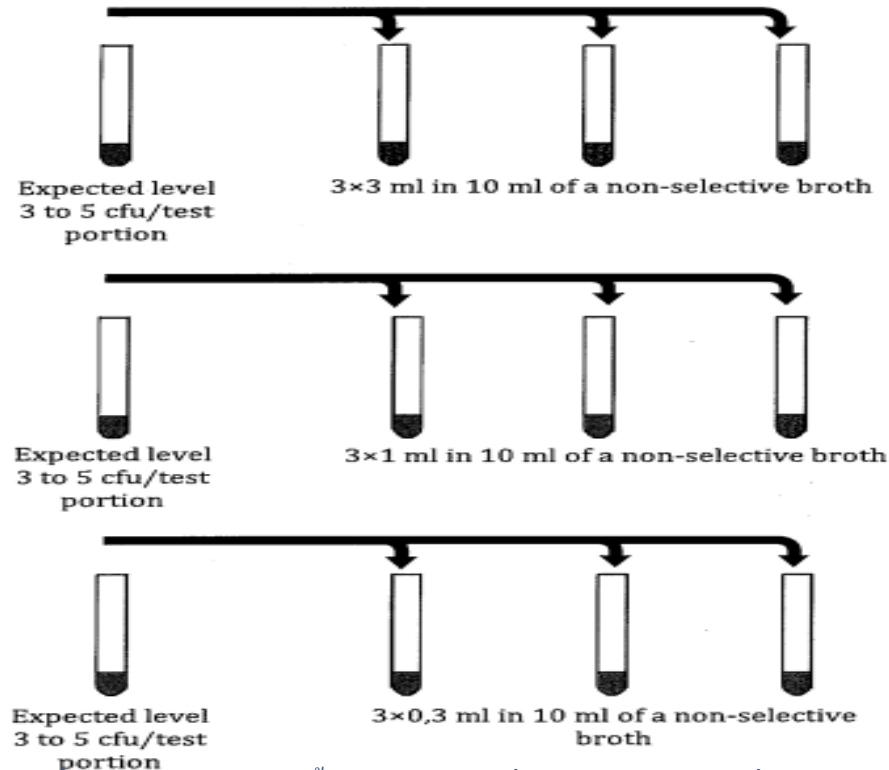


รูปที่ C.7 : การหาปริมาณเชื้อโดยวิธี MPN เพื่อใช้เดิมตามรูปแบบที่ 1 และ 2

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.2 การออกแบบการทดลอง (Experimental design) ต่อ



รูปที่ C.8 : การหาปริมาณเชื้อโดยวิธี MPN เพื่อใช้เติมตามรูปแบบที่ 3

Table C.1 — MPN table for the calculation of the inoculum level using protocols 1, 2 or 3

Number positive results for inoculum volume (ml)				MPN per ml of dilution D (protocols 1 and 2) or of inoculum (protocol 3)	Rarity category ^a
Protocol 1	1 ml dilution C	1 ml dilution D	0,3 ml dilution D		
Protocol 2	1 ml dilution C	1 ml dilution D	0,3 ml dilution D		
Protocol 3	3 ml inoculum	1 ml inoculum	0,3 ml inoculum		
	3	3	3	∞	1
	3	3	2	4,1	1
	3	3	1	2,4	1
	3	3	0	1,5	1
	3	2	3	2,5	1
	3	2	2	1,8	1
	3	2	1	1,3	1
	3	2	0	0,9	1
	3	1	3	1,5	2
	3	1	2	1,1	1
	3	1	1	0,8	1
	3	1	0	0,6	1
	3	0	3	1,0	3
	3	0	2	0,8	1
	3	0	1	0,6	1
	3	0	0	0,4	1
	2	3	3	1,3	3
	2	3	2	1,1	2
	2	3	1	0,9	1
	2	3	0	0,7	1
	2	2	3	1,0	3
	2	2	2	0,8	1
	2	2	1	0,7	1
	2	2	0	0,5	1
	2	1	3	0,8	3
	2	1	2	0,6	1
	2	1	1	0,5	1
	2	1	0	0,3	1
	2	0	3	0,6	3
	2	0	2	0,5	2
	2	0	1	0,3	1
	2	0	0	0,2	1
	1	3	3	0,8	3
	1	3	2	0,7	3
	1	3	1	0,5	2
	1	3	0	0,4	2
	1	2	3	0,6	3
	1	2	2	0,5	2
	1	2	1	0,4	2
	1	2	0	0,3	1

^a If the result of the rarity category is 3, the MPN combination is very unlikely to occur. In this case, the experiment shall be repeated.

Table C.1 (continued)

Number positive results for inoculum volume (ml)				MPN per ml of dilution D (protocols 1 and 2) or of inoculum (protocol 3)	Rarity category ^a
Protocol 1	1 ml dilution C	1 ml dilution D	0,3 ml dilution D		
Protocol 2	1 ml dilution C	1 ml dilution D	0,3 ml dilution D		
Protocol 3	3 ml inoculum	1 ml inoculum	0,3 ml inoculum		
	1	2	0	0,3	1
	1	1	3	0,5	3
	1	1	2	0,4	2
	1	1	1	0,3	1
	1	1	0	0,2	1
	1	0	3	0,4	3
	1	0	2	0,3	2
	1	0	1	0,2	1
	1	0	0	0,1	1
	0	3	3	0,6	3
	0	3	2	0,5	3
	0	3	1	0,4	3
	0	3	0	0,3	3
	0	2	3	0,4	3
	0	2	2	0,4	3
	0	2	1	0,3	2
	0	2	0	0,2	1
	0	1	3	0,3	3
	0	1	2	0,3	3
	0	1	1	0,2	2
	0	1	0	0,1	1
	0	0	3	0,2	3
	0	0	2	0,2	3
	0	0	1	0,1	1
	0	0	0	0,0	1

^a If the result of the rarity category is 3, the MPN combination is very unlikely to occur. In this case, the experiment shall be repeated.

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.3 การเลือก (food items) (Selection of (food) items)



1

ให้เลือก 1 (food) item ที่อยู่ในของการ validated อยู่ใน scope ที่ lab นำไปใช้ทำ implementation

2

เลือก (food) item (เสนอให้เลือกรายการท้าทาย) | จากแต่ละ categories ที่อยู่ใน scope ที่ lab นำไปใช้ (food) items verification

หมายเหตุ : 1) รายละเอียดจำนวน categories ที่ใช้ในการทวนสอบ ดูข้อ 4.4

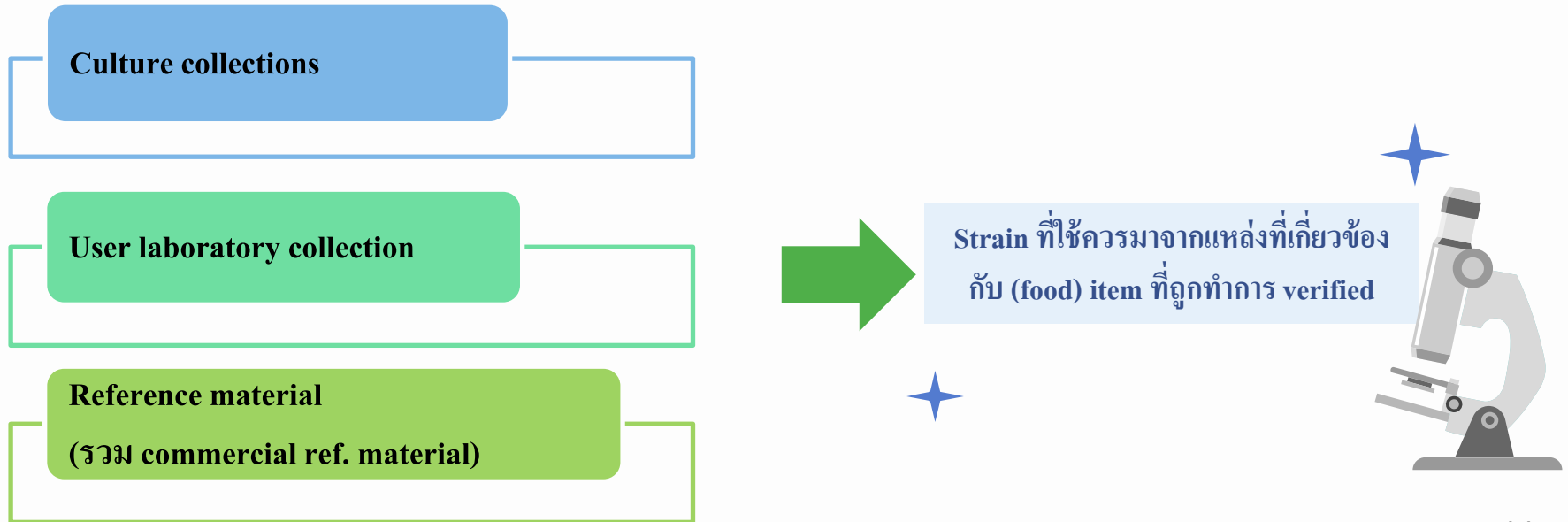
2) ข้อเสนอแนะในการเลือกรายการอาหารที่ท้าทาย (challenging food item) ดู Annex B

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.4 การทำให้ปนเปื้อน (Artificial contamination)

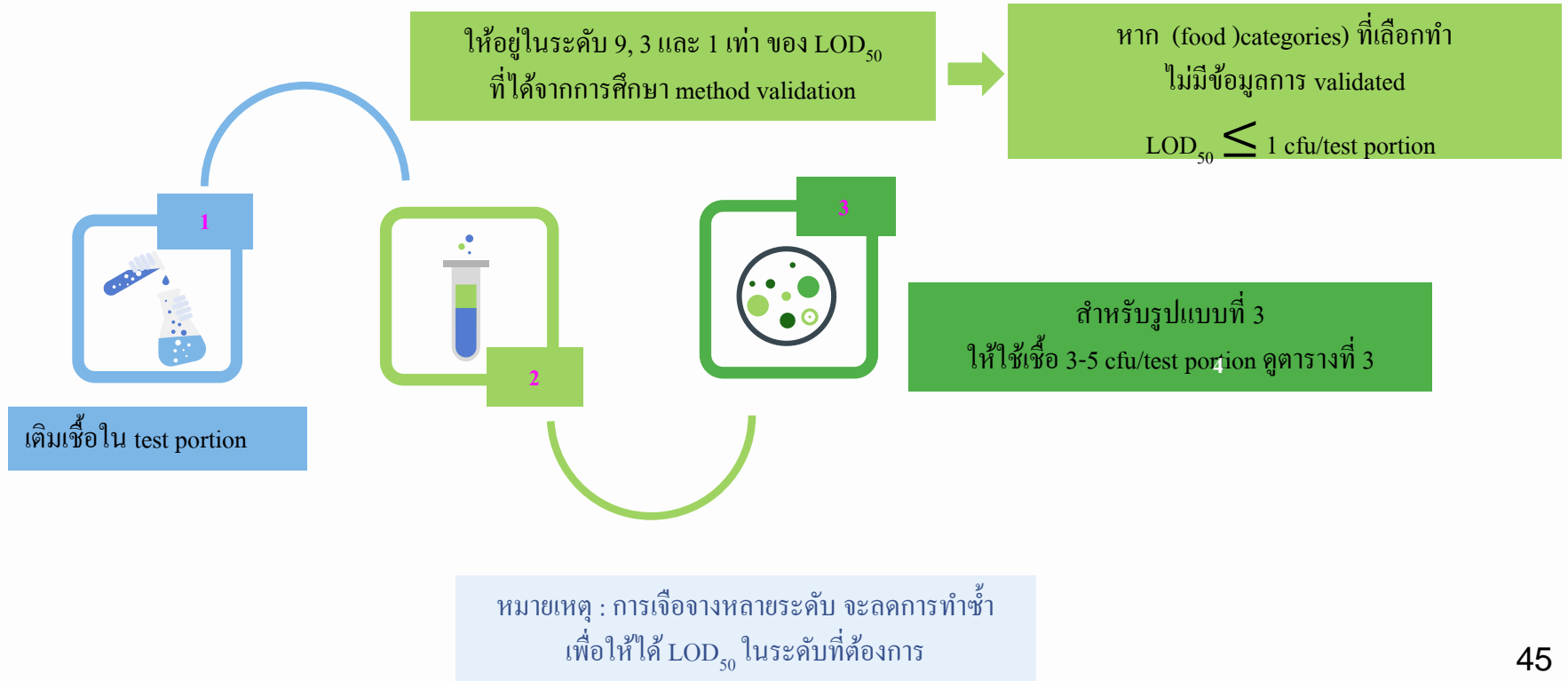
5.4.1 การเลือกสายพันธุ์ ใช้สายพันธุ์ที่ได้จาก



การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.4.2 การเติมเชื้อลงใน test portion (Inoculation of the test portion)



การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.4.2 การเติมเชื้อลงใน test portion (Inoculation of the test portion)

ตารางที่ 4 ระดับของเชื้อที่เติมใน test portion

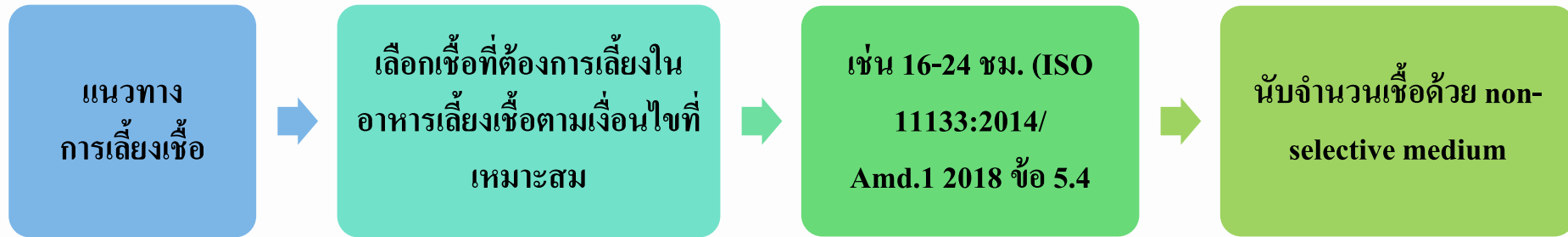
Protocol	High level 9 cfu/test portion	Intermediate level 3 cfu/test portion	Low level 1 cfu/test portion	3 cfu to 5 cfu/test portion
1	This should be at a maximum of nine times the assumed LOD ₅₀ .	From the high inoculation level, perform a 1:3 dilution to achieve the intermediate level.	From the intermediate inoculation level, perform a 1:3 dilution to achieve the low level.	
2		This should be at a maximum of three times the assumed LOD ₅₀ .	From the intermediate inoculation level, perform a 1:3 dilution to achieve the low level.	
3				The level of contamination of the inoculum is known, (e.g. reference material with known concentration).

More dilutions can be tested in order to make sure the target levels are reached. Use as many dilutions as needed, but always take into account a 1:3 dilution factor between the levels.

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.4.2 การเติมเชื้อลงใน test portion (Inoculation of the test portion)

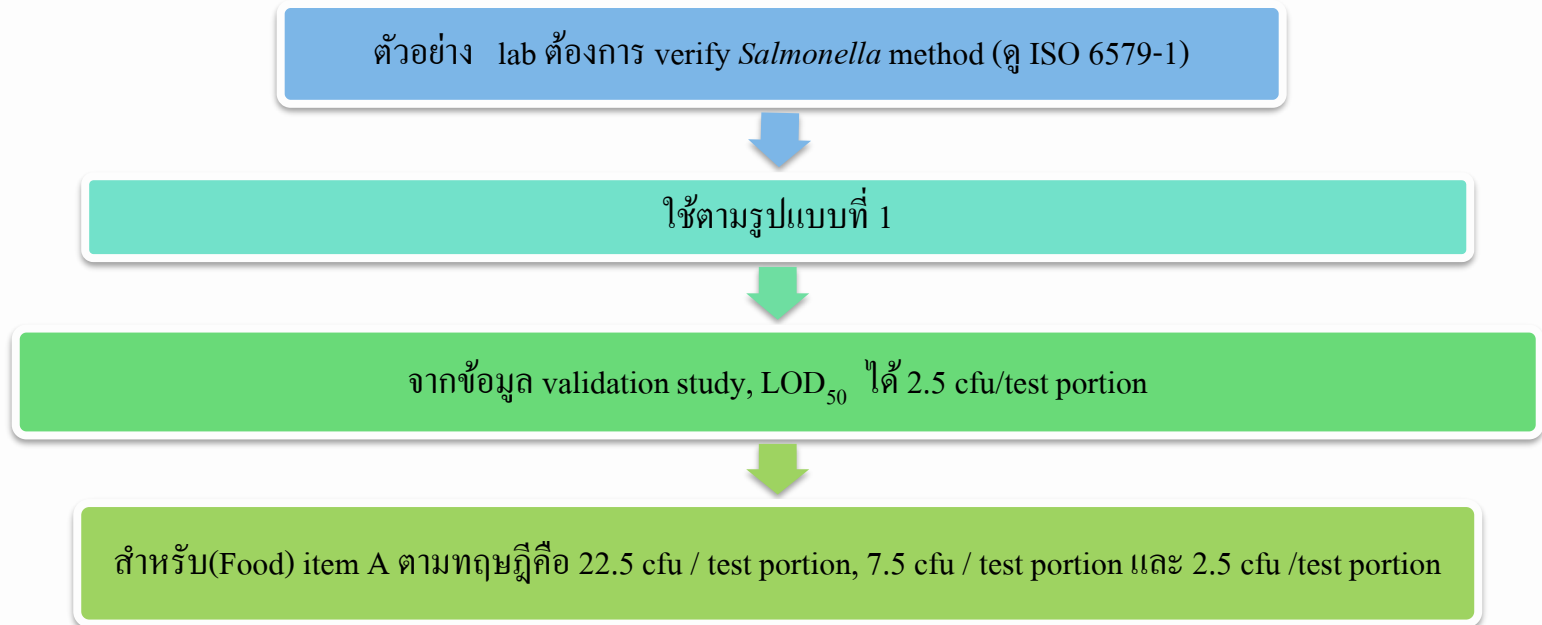


- 1) ถ้าห้องปฏิบัติการใช้เชื้อที่ทราบปริมาณ เช่น reference material หรือทราบ stability เชื้อที่มีชีวิตหลังการเก็บ เช่น 4°C ข้ามคืน ให้เจือจางและนำไปใช้
- 2) แนะนำให้ใช้ stressed culture (ไม่เป็นข้อบังคับ) เติมลงใน test portion (ดู 16140-2:2016; ANNEX C)

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.4.2 การเติมเชื้อลงใน test portion (Inoculation of the test portion)



(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.4.2 การเติมเชื้อลงใน test portion (Inoculation of the test portion) ต่อ

- ★ สมมติ นำ overnight culture (ที่ก่อนเก็บหาปริมาณ 6×10^8 cfu/ml) เจือจางที่ dilution A (10^{-7}) ได้ 60 cfu/ml
- dilution B (1:3 ของ dilution A) ได้ 20 cfu/ml
- dilution C (1:3 ของ dilution B) ได้ 6.67 cfu/ml
- dilution D (1:3 ของ dilution C) ได้ 2.22 cfu/ml
- dilution E (1:3 ของ dilution D) ได้ 0.74 cfu/ml
- dilution F (1:3 ของ dilution E) ได้ 0.25 cfu/ml



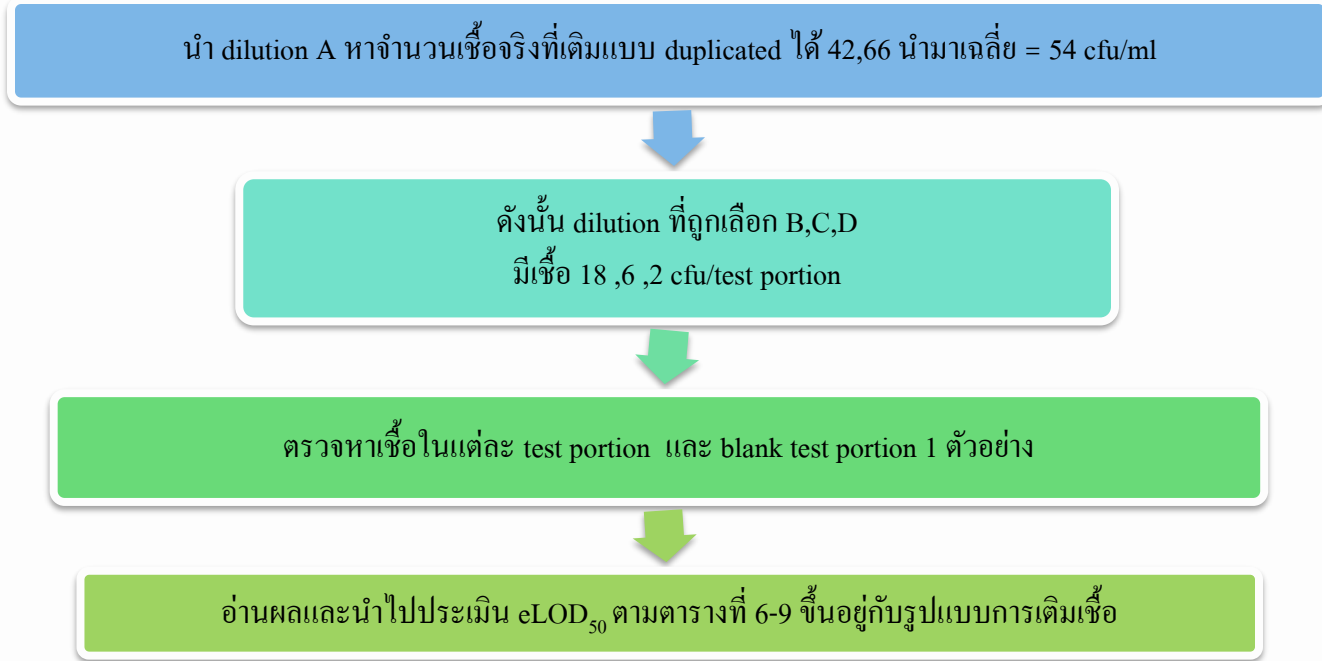
เติม 1 ml ลงในแต่ละ test portion

Protocol	dilution A (10^{-7})	dilution B (1:3 of A)	dilution C (1:3 of B)	dilution D (1:3 of C)	dilution E (1:3 of D)	dilution F (1:3 of E)
1	1	4	4	4	4	4
2	-	3	5	5	5	5
3	-	-	7	7	7	7

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.4.2 การเติมเชื้อลงใน test portion (Inoculation of the test portion)

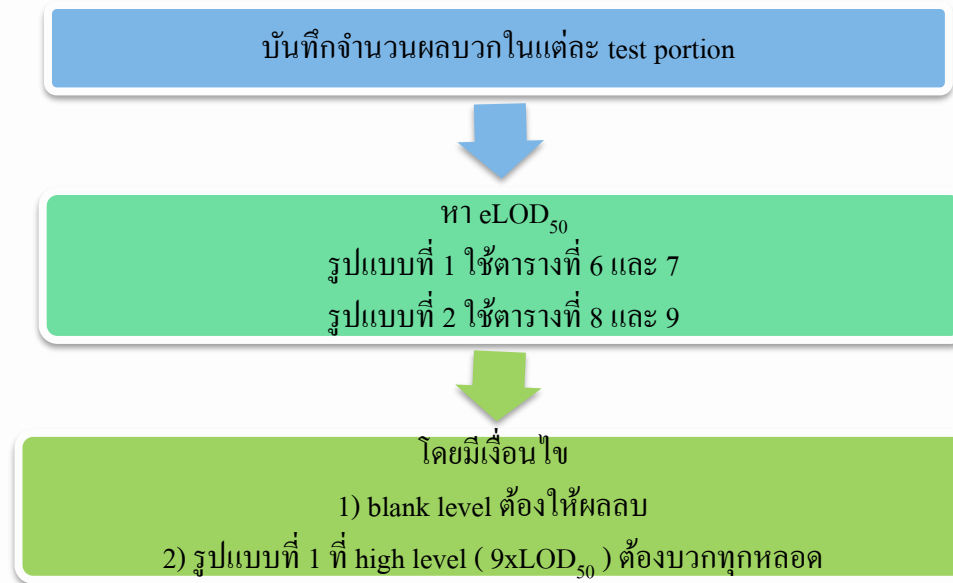


	Expect count		Actual count
A	60	1000 μ l	54
B	20	333 μ l	18
C	6.7	111 μ l	6
D	2.2	37 μ l	2
E	0.7	12 μ l	0.7
F	0.2	4 μ l	0.2

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.5 การประเมินผล (Evaluation of result)



หมายเหตุ : 1) ถ้าไม่เป็นไปตามเงื่อนไข ต้องทำซ้ำทุกระดับ 2) ถ้าผลที่อ่านได้จากตาราง 6-9 เป็น “Unreliable MPN result” ต้องทำซ้ำ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.5 การประเมินผล (Evaluation of result)

ตารางที่ 6 การประเมินค่า eLOD₅₀ จากผลบวกของเชื้อแต่ละระดับโดยใช้ **รูปแบบที่ 1**

High inoculation level targeted 9 × LOD ₅₀ / test portion	Intermediate inoculation level targeted 3 × LOD ₅₀ / test portion	Low inoculation level targeted 1 × LOD ₅₀ / test portion	Blank level	eLOD ₅₀ cfu/test portion
1/1	4/4	4/4	0/1	< 1,0 × LIL ^a
1/1	4/4	3/4	0/1	= 0,5 × LIL
1/1	4/4	2/4	0/1	= 0,7 × LIL
1/1	4/4	1/4	0/1	= 1,0 × LIL
1/1	4/4	0/4	0/1	= 1,5 × LIL
1/1	3/4	4/4	0/1	= 0,7 × LIL
1/1	3/4	3/4	0/1	= 1,0 × LIL
1/1	3/4	2/4	0/1	= 1,3 × LIL
1/1	3/4	1/4	0/1	= 1,7 × LIL
1/1	3/4	0/4	0/1	= 2,3 × LIL
1/1	2/4	4/4	0/1	= 1,1 × LIL
1/1	2/4	3/4	0/1	= 1,5 × LIL
1/1	2/4	2/4	0/1	= 1,9 × LIL
1/1	2/4	1/4	0/1	= 2,6 × LIL
1/1	2/4	0/4	0/1	= 3,7 × LIL
1/1	1/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result^b
1/1	1/4	3/4	0/1	= 2,1 × LIL
1/1	1/4	2/4	0/1	= 2,8 × LIL
1/1	1/4	1/4	0/1	= 4,0 × LIL
1/1	1/4	0/4	0/1	= 6,3 × LIL
1/1	0/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result^b
1/1	0/4	3/4	0/1	= 3,0 × LIL
1/1	0/4	2/4	0/1	= 4,3 × LIL
1/1	0/4	1/4	0/1	= 6,7 × LIL
1/1	0/4	0/4	0/1	= 14,0 × LIL

^a LIL = low inoculation level.
^b Unreliable MPN result: MPN combination is very unlikely to occur. The experiment shall be repeated.

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.5 การประเมินผล (Evaluation of result)

ตารางที่ 7 ตัวอย่างการคำนวณ eLOD₅₀ จากผลบวกของเชื้อแต่ละระดับ โดยใช้ **รูปแบบที่ 1**

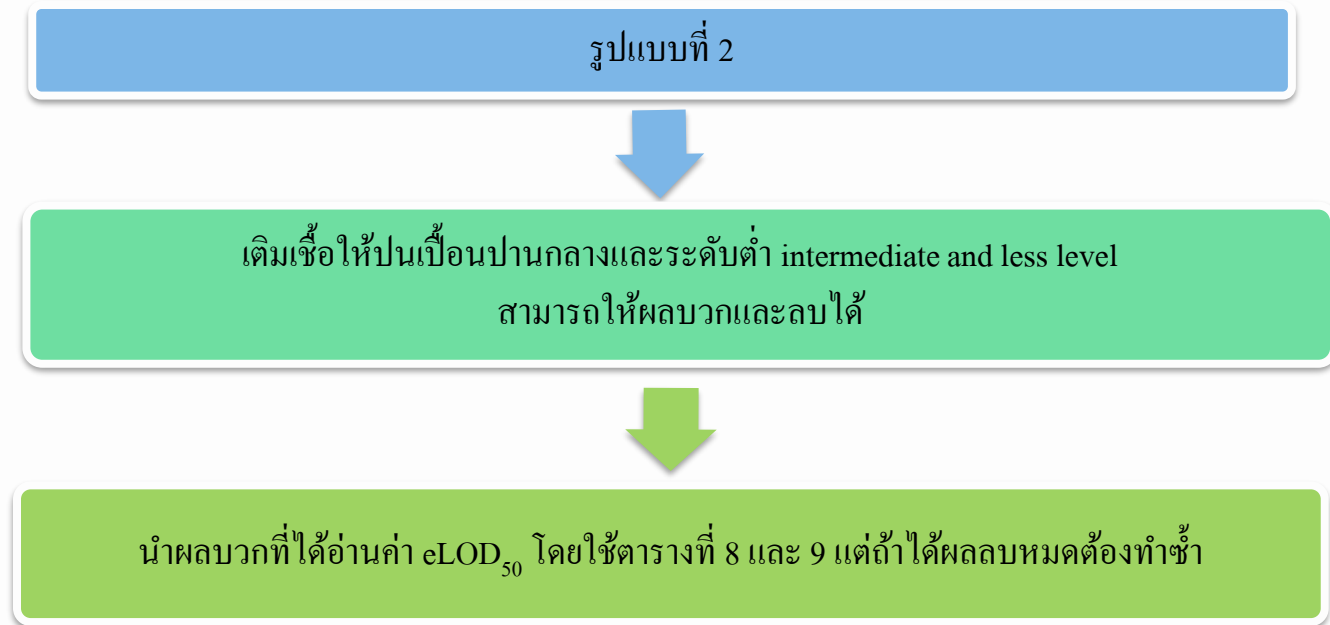
High inoculation level = 18 cfu/test portion	Intermediate inoculation level = 6 cfu/test portion	Low inoculation level = 2 cfu/test portion	Blank level	eLOD ₅₀ cfu/test portion
1/1	4/4	4/4	0/1	< 2,0
1/1	4/4	3/4	0/1	= 1,0
1/1	4/4	2/4	0/1	= 1,4
1/1	4/4	1/4	0/1	= 2,0
1/1	4/4	0/4	0/1	= 3,0
1/1	3/4	4/4	0/1	= 1,4
1/1	3/4	3/4	0/1	= 2,0
1/1	3/4	2/4	0/1	= 2,6
1/1	3/4	1/4	0/1	= 3,4
1/1	3/4	0/4	0/1	= 4,6
1/1	2/4	4/4	0/1	= 2,2
1/1	2/4	3/4	0/1	= 3,0
1/1	2/4	2/4	0/1	= 3,8
1/1	2/4	1/4	0/1	= 5,2
1/1	2/4	0/4	0/1	= 7,4
1/1	1/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result*
1/1	1/4	3/4	0/1	= 4,2
1/1	1/4	2/4	0/1	= 5,6
1/1	1/4	1/4	0/1	= 8,0
1/1	1/4	0/4	0/1	= 12,6
1/1	0/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result*
1/1	0/4	3/4	0/1	= 6,0
1/1	0/4	2/4	0/1	= 8,6
1/1	0/4	1/4	0/1	= 13,4
1/1	0/4	0/4	0/1	= 28,0

* Unreliable MPN result: MPN combination is very unlikely to occur. The experiment shall be repeated.

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.5 การประเมินผล (Evaluation of result)



(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.5 การประเมินผล (Evaluation of result)

ตารางที่ 8 การประมาณค่า eLOD₅₀ จากผลบวกของเชื้อแต่ละระดับโดยใช้ **รูปแบบที่ 2**

Intermediate inoculation level targeted 3 × LOD ₅₀ /test portion	Low inoculation level targeted 1 × LOD ₅₀ /test portion	Blank level	eLOD ₅₀ cfu/test portion
3/3	5/5	0/1	< 1,0 × LIL ^a
3/3	4/5	0/1	= 0,4 × LIL
3/3	3/5	0/1	= 0,7 × LIL
3/3	2/5	0/1	= 1,0 × LIL
3/3	1/5	0/1	= 1,4 × LIL
3/3	0/5	0/1	= 2,0 × LIL
2/3	5/5	0/1	= 0,7 × LIL
2/3	4/5	0/1	= 0,9 × LIL
2/3	3/5	0/1	= 1,2 × LIL
2/3	2/5	0/1	= 1,6 × LIL
2/3	1/5	0/1	= 2,3 × LIL
2/3	0/5	0/1	= 3,7 × LIL
1/3	5/5	0/1	Unreliable MPN result^b
1/3	4/5	0/1	= 1,4 × LIL
1/3	3/5	0/1	= 1,8 × LIL
1/3	2/5	0/1	= 2,6 × LIL
1/3	1/5	0/1	= 4,1 × LIL
1/3	0/5	0/1	= 8,6 × LIL
0/3	5/5	0/1	Unreliable MPN result^b
0/3	4/5	0/1	Unreliable MPN result^b
0/3	3/5	0/1	= 2,9 × LIL
0/3	2/5	0/1	= 4,5 × LIL
0/3	1/5	0/1	= 9,4 × LIL

^a LIL = low inoculation level.
^b Unreliable MPN result: MPN combination is very unlikely to occur. The experiment shall be repeated.

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.5 การประเมินผล (Evaluation of result)

ตารางที่ 9 ตัวอย่างการคำนวณ eLOD₅₀ จากผลบวกของเชื้อแต่ละระดับโดยใช้ **รูปแบบที่ 2**

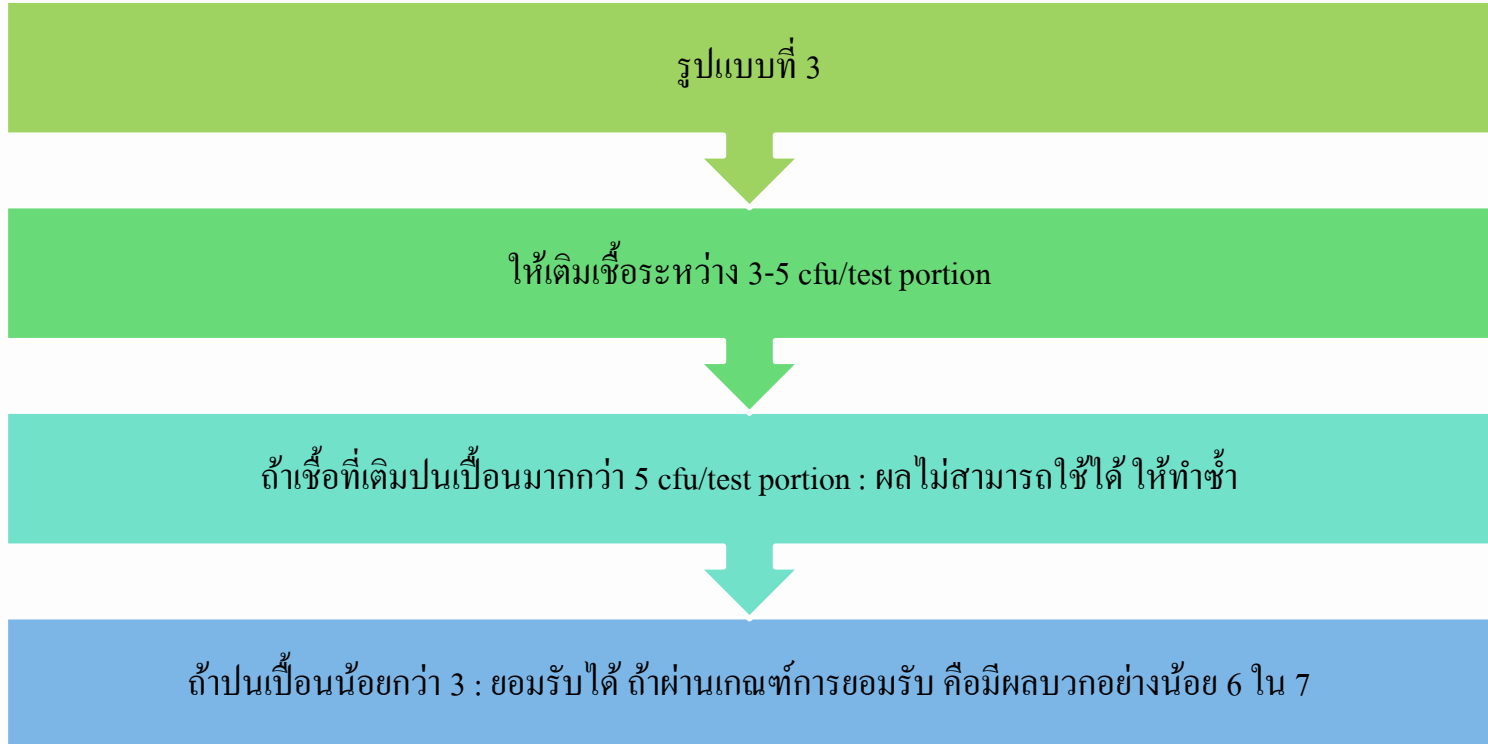
Intermediate inoculation level = 6 cfu/test portion	Low inoculation level = 2 cfu/test portion	Blank level	eLOD ₅₀ cfu/test portion
3/3	5/5	0/1	< 2,0
3/3	4/5	0/1	= 0,8
3/3	3/5	0/1	= 1,4
3/3	2/5	0/1	= 2,0
3/3	1/5	0/1	= 2,8
3/3	0/5	0/1	= 4,0
2/3	5/5	0/1	= 1,4
2/3	4/5	0/1	= 1,8
2/3	3/5	0/1	= 2,4
2/3	2/5	0/1	= 3,2
2/3	1/5	0/1	= 4,6
2/3	0/5	0/1	= 7,4
1/3	5/5	0/1	Unreliable MPN result ^a
1/3	4/5	0/1	= 2,8
1/3	3/5	0/1	= 3,6
1/3	2/5	0/1	= 5,2
1/3	1/5	0/1	= 8,2
1/3	0/5	0/1	= 17,2
0/3	5/5	0/1	Unreliable MPN result ^a
0/3	4/5	0/1	Unreliable MPN result ^a
0/3	3/5	0/1	= 5,8
0/3	2/5	0/1	= 9,0
0/3	1/5	0/1	= 18,6

^a Unreliable MPN result: MPN combination is very unlikely to occur. The experiment shall be repeated.

การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.5 การประเมินผล (Evaluation of result)



การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.6 เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits)



eLOD₅₀ ที่หาได้จากรูปแบบที่ 1 และ 2 (ตามตารางที่ 6 ถึง 9)

➔ ต้องไม่เกิน 4 เท่าของ eLOD₅₀ ($\leq 4 \times \text{LOD}_{50}$) ที่ได้จากการศึกษา validated



ส่วนรูปแบบที่ 3 ต้องให้ผลบวกอย่างน้อย 6 ใน 7 ซ้ำ

➔ ถ้า eLOD₅₀ มากกว่า 5 cfu/test portion ต้องทำซ้ำ

หมายเหตุ : 1) สรุปเกณฑ์การยอมรับให้ดูข้อ 8

2) LOD₅₀ จาก validation study และ eLOD₅₀ ของการทวนสอบจะเปรียบเทียบกันได้ ต้องอยู่ในหน่วยเดียวกัน เช่น ต่อ 25 กรัม, 100 ml หรือ 375 กรัม เป็นต้น

★ ถ้า LOD₅₀ จาก validation study แสดงในรูป cfu/g, cfu/ml ให้คูณด้วยน้ำหนักหรือปริมาณของ test portion เช่น

LOD₅₀ = 0.1cfu/g •• LOD₅₀ = 2.5 cfu/25g เป็นต้น

ในกรณีที่ LOD₅₀ ของ validation study = 2.5 cfu/test portion

เกณฑ์การยอมรับมากที่สุดของ eLOD₅₀ = 10 cfu/test portion (maximum of 4 x eLOD₅₀)



การทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

5.7 การวิเคราะห์หาสาเหตุ (Root cause analysis)

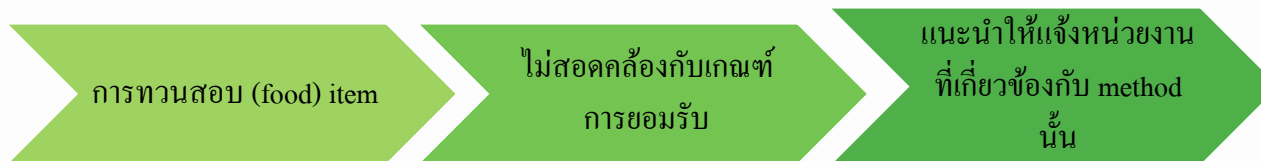


- ขาด GLP
- ใช้รูปแบบไม่ถูกต้อง (เช่นเติมเชื้อไม่ถูกต้อง)
- ความจำเพาะของ (food) item เช่น มีสารยับยั้ง

1



2

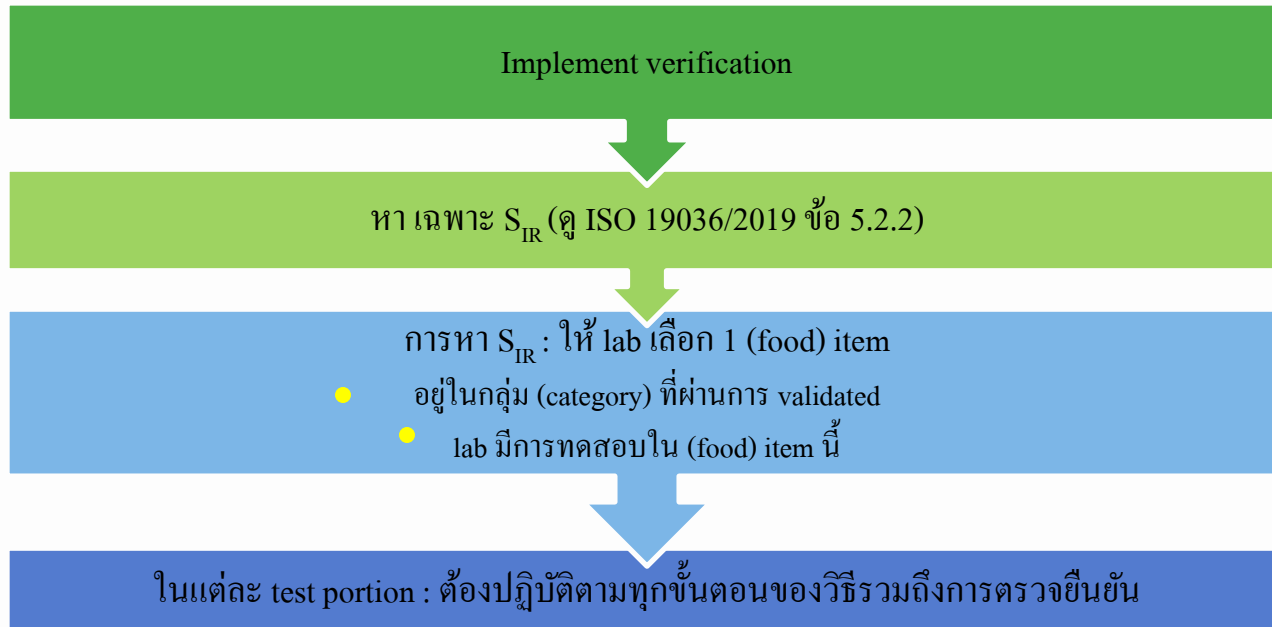


การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.1 การหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานภายในห้องปฏิบัติการ (intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR}))

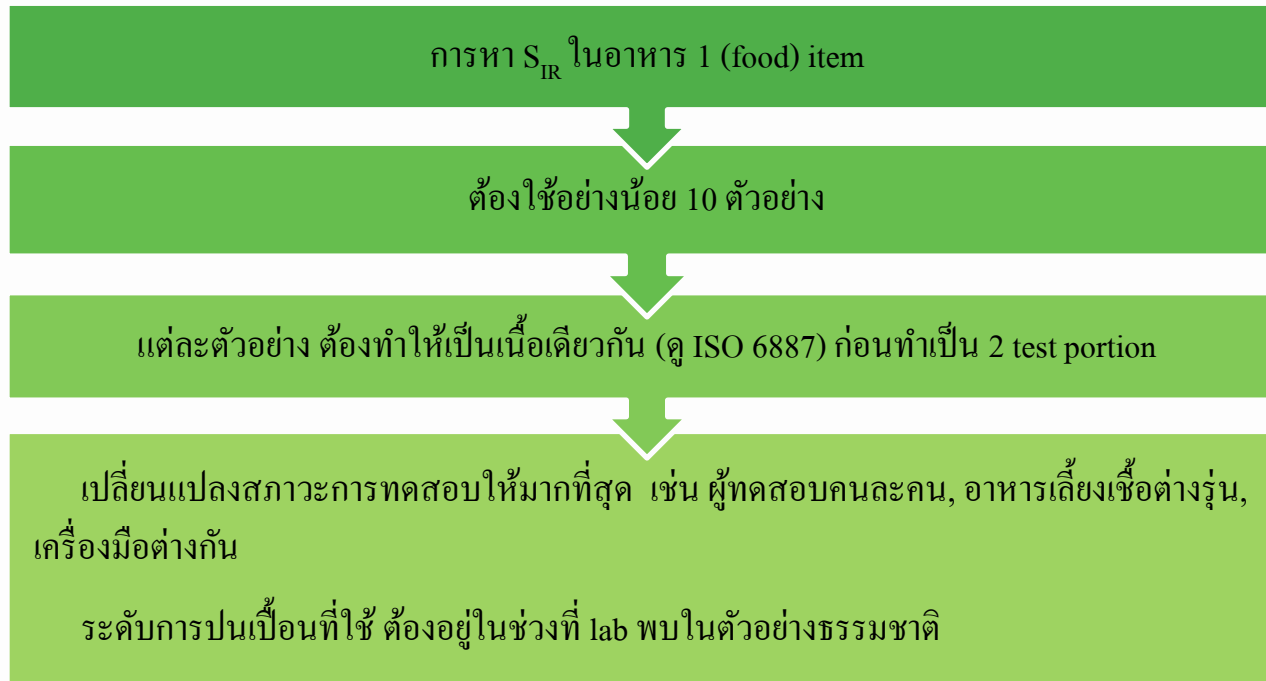
6.1.1 เรื่องทั่วไป (general)



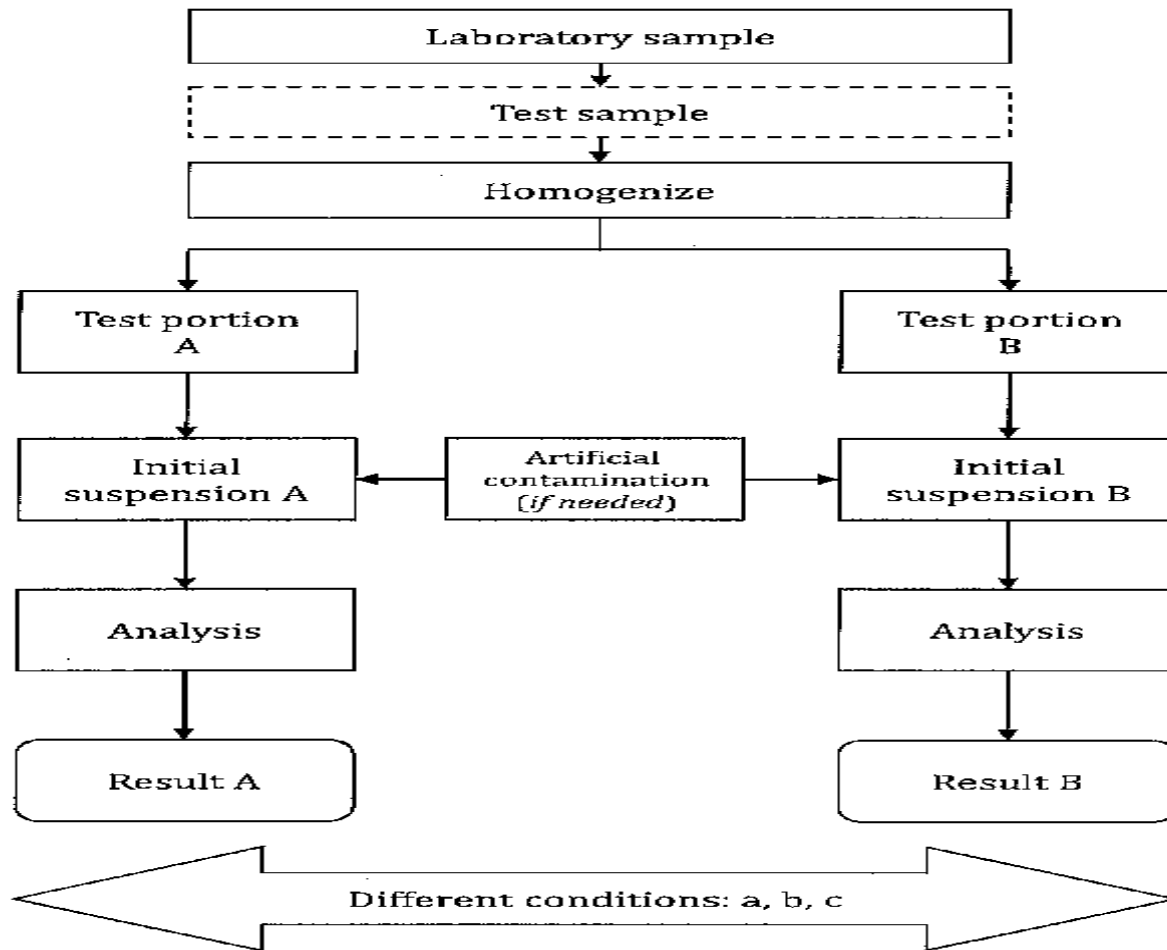
การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

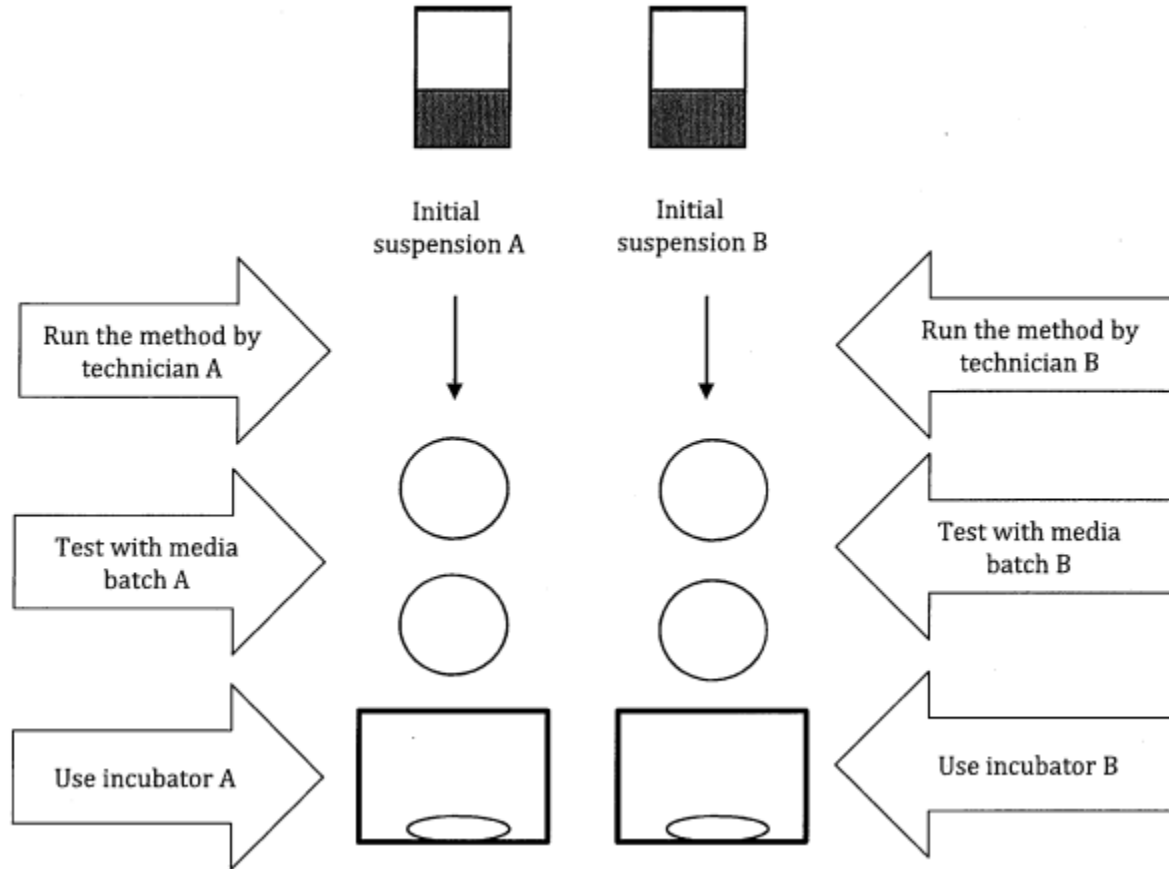
(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.1.2 การออกแบบการทดลอง (experimental design)



ดูที่รูป 7, D1, D2



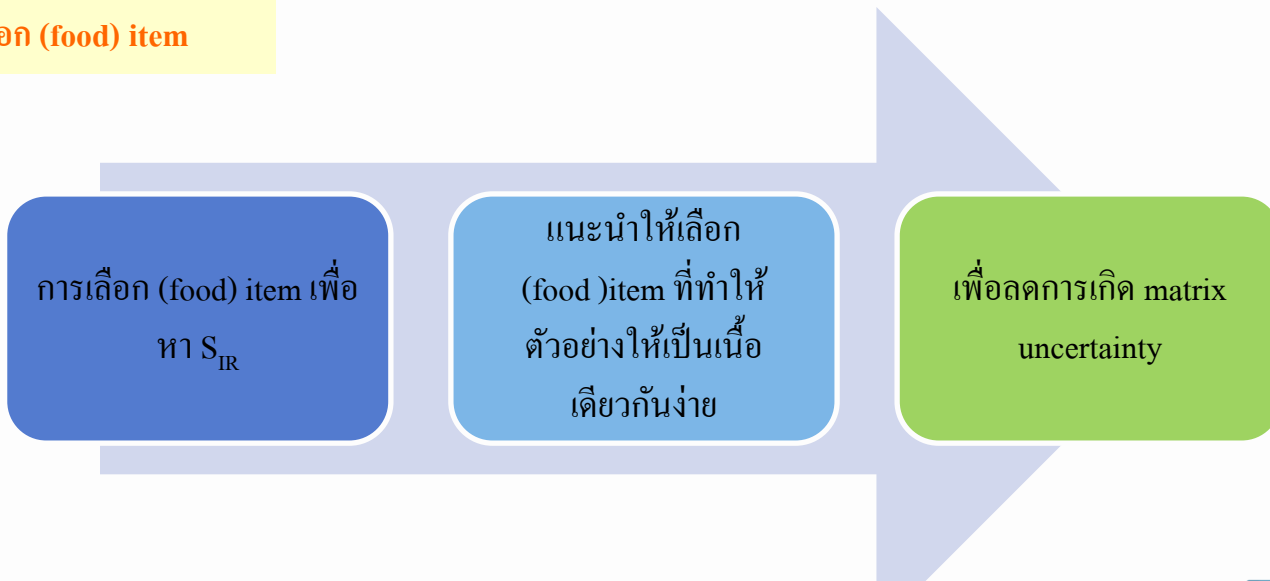
การหา S_{IR} 

รูปที่ D2 ข้อเสนอแนะการเปลี่ยนแปลงความแปรปรวนเพื่อหา S_{IR}

การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.1.3 การเลือก (food) item



6.1.4 ถ้าเป็นไปได้ให้เลือกตัวอย่าง (food) item ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อตามธรรมชาติ

- ถ้าพบปริมาณเชื่อน้อย (< 10 cfu) ให้เติมเชื้อ (ดูข้อ 6.1.5)



การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.1.5 การทำให้ปนเปื้อน (Artificial contaminated)

ถ้าต้องการทำให้ปนเปื้อน (Artificial contaminated) ใน initial suspension

ต้องทราบระดับของเชื้อที่เติม

เช่น Lab พบ food item นี้ มีเชื้อปนเปื้อนระหว่าง 30-30,000 cfu/g

ให้เติมเชื้อ 30×10 cfu ลงใน initial suspension 100 ml (=test portion 10 g)
จะได้เชื้อ ~ 30 cfu/g เป็นต้น

เชื้อที่เติมควรเป็น stress cultures (แต่ไม่ได้เป็นข้อกำหนด) (ดู ISO 16140-2:2016)



การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.1.6 การประเมินผล (Evaluation of results)

ใช้สูตร

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

S_{IR} = intralaboratory reproducibility standard deviation

I = ลำดับของตัวอย่าง

n = จำนวนตัวอย่าง

$y_{iA}, y_{iB} = \log_{10} (\text{cfu/ml})$ หรือ $\log_{10} (\text{cfu/ml})$ ของเงื่อนไข A และ B ตามลำดับ

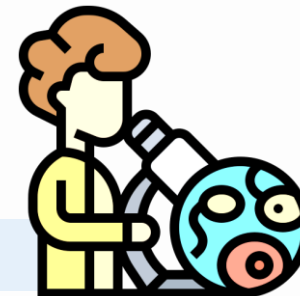
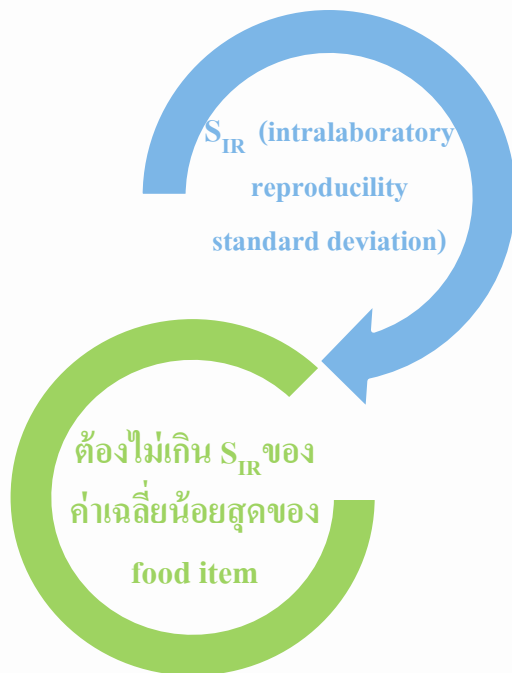
ดูตารางที่ 10,11



การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.1.7 เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits)



หมายเหตุ : สรุปรูปเกณฑ์การยอมรับอยู่ข้อ 8

ตัวอย่าง : จากทวนสอบ tiramisu (เค้กอิตาเลียน) 12 ตัวอย่าง เพื่อหาเชื้อ Enterobacteriaceae โดยใช้ ISO 21528-2 ได้ผลตามตารางที่ 12

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.1.7 เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits)

ตารางที่ 10 ตัวอย่างผลทดสอบ tiramisu (เค้กอิตาเลียน) 12 ตัวอย่าง

Laboratory sample number	Expected contamination level cfu/g	Result A (x_{iA})	Result B (x_{iB})	Log ₁₀ result A $y_{iA} = \log_{10}(x_{iA})$	Log ₁₀ result B $y_{iB} = \log_{10}(x_{iB})$
		cfu/g	cfu/g		
1	30	< 40 (10)	< 40 (30)	≤ 1,60	≤ 1,60
2	300	110	182	2,04	2,26
3	300	410	620	2,61	2,79
4	600	640	330	2,81	2,52
5	600	690	570	2,84	2,76
6	600	780	640	2,89	2,81
7	600	620	1 300	2,79	3,11
8	600	870	1 500	2,94	3,18
9	6 000	8 600	6 400	3,93	3,81
10	6 000	16 000	5 000	4,20	3,70
11	6 000	> 15 000	13 400	> 4,18	4,13
12	30 000	20 000	32 000	4,30	4,51

- The results of laboratory samples 1 and 11 cannot be used because one of the counts was either too high (“>” result) or too low (below the permitted counting range in accordance with ISO 7218). The results of 10 laboratory samples remain for the calculation.
- Based on the 10 remaining laboratory samples, the S_{IR} can be calculated as shown in Table 11.

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.1.7 เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits)

จากผลการทดสอบ : ตัวอย่างที่ 1 และ 11 นำมาใช้คำนวณไม่ได้ ต้องคำนวณ S_{IR} จาก 10 Laboratory samples

Laboratory sample number	Log ₁₀ result A $y_{iA} = \log_{10}(x_{iA})$	Log ₁₀ result B $y_{iB} = \log_{10}(x_{iB})$	Absolute difference $ y_{iA} - y_{iB} $	Squared difference $ y_{iA} - y_{iB} ^2$
1	≤ 1,602 1	≤ 1,602 1	Not used	Not used
2	2,041 4	2,260 1	0,218 7	0,047 8
3	2,612 8	2,792 4	0,179 6	0,032 3
4	2,806 2	2,518 5	0,287 7	0,082 8
5	2,838 8	2,755 9	0,083 0	0,006 9
6	2,892 1	2,806 2	0,085 9	0,007 4
7	2,792 4	3,113 9	0,321 6	0,103 4
8	2,939 5	3,176 1	0,236 6	0,056 0
9	3,934 5	3,806 2	0,128 3	0,016 5
10	4,204 1	3,699 0	0,505 1	0,255 2
11	> 4,176 1	4,127 1	Not used	Not used
12	4,301 0	4,505 1	0,204 1	0,041 7
ตารางที่ 11 การคำนวณ S_{IR}			Sum	0,650 0
			Sum/(2 × 10)	0,032 5
			$S_{IR} = \sqrt{(0,032 5)}$	0,18

— The calculated S_{IR} value of 0,18 is compared to the results of the validation study (data taken over from ISO 21528-2). Table 12 lists the S_R values obtained from that validation study.

การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.1.7 เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits)

จากการคำนวณ : $S_{IR} = 0.18 \log_{10} \text{ cfu/g}$

นำผลการทวนสอบนี้ไปเปรียบเทียบกับ S_{IR} ที่ได้จากการศึกษา validated กับ ISO 21528-2 ตามตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สรุปค่า S_{IR} จาก validation study

(Food) item	S_R values from the validation study			
	Low inoculation level	Intermediate inoculation level	High inoculation level	Mean value of three inoculation levels
Egg product	0,32	0,50	0,48	0,43
Raw meat	0,28	0,36	0,57	0,40
Animal feed	0,18	0,17	0,20	0,18
Pasteurized milk	0,24	0,18	0,19	0,20
Tiramisu	0,22	0,28	0,13	0,21

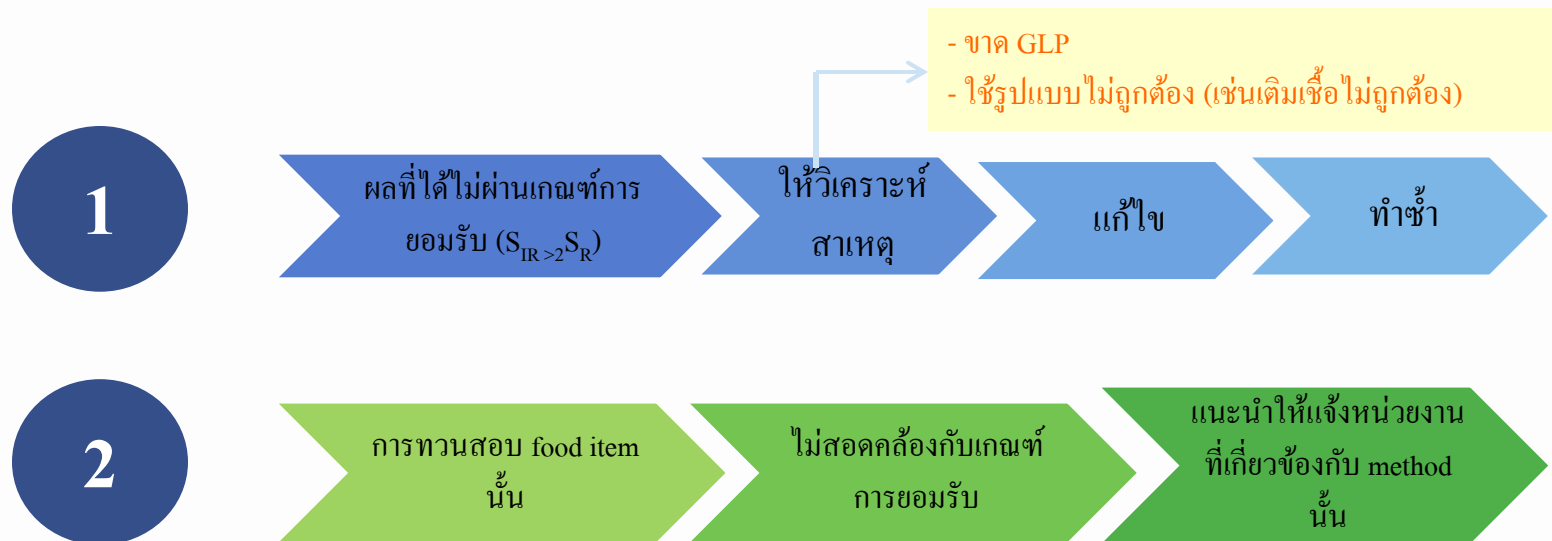
พบ S_{IR} ที่มีค่าเฉลี่ยต่ำสุด = 0.18 ดังนั้น S_{IR} (0.18) น้อยกว่า $2 S_R$ (2×0.18)

สรุป : ยอมรับ

การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.1.8 การวิเคราะห์หาสาเหตุ (Root cause analysis)



การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.2 การประมาณค่า Bias (Estimation of bias)

6.2.1 เรื่องทั่วไป (general)

1

การประมาณค่า Bias

2

ให้ปฏิบัติตามทุกขั้นตอนของวิธี รวมถึงการ
ตรวจยืนยัน



ต้องตรวจยืนยันทุก test portion

การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.2.2 การวางแผนการทดลอง (experimental design)

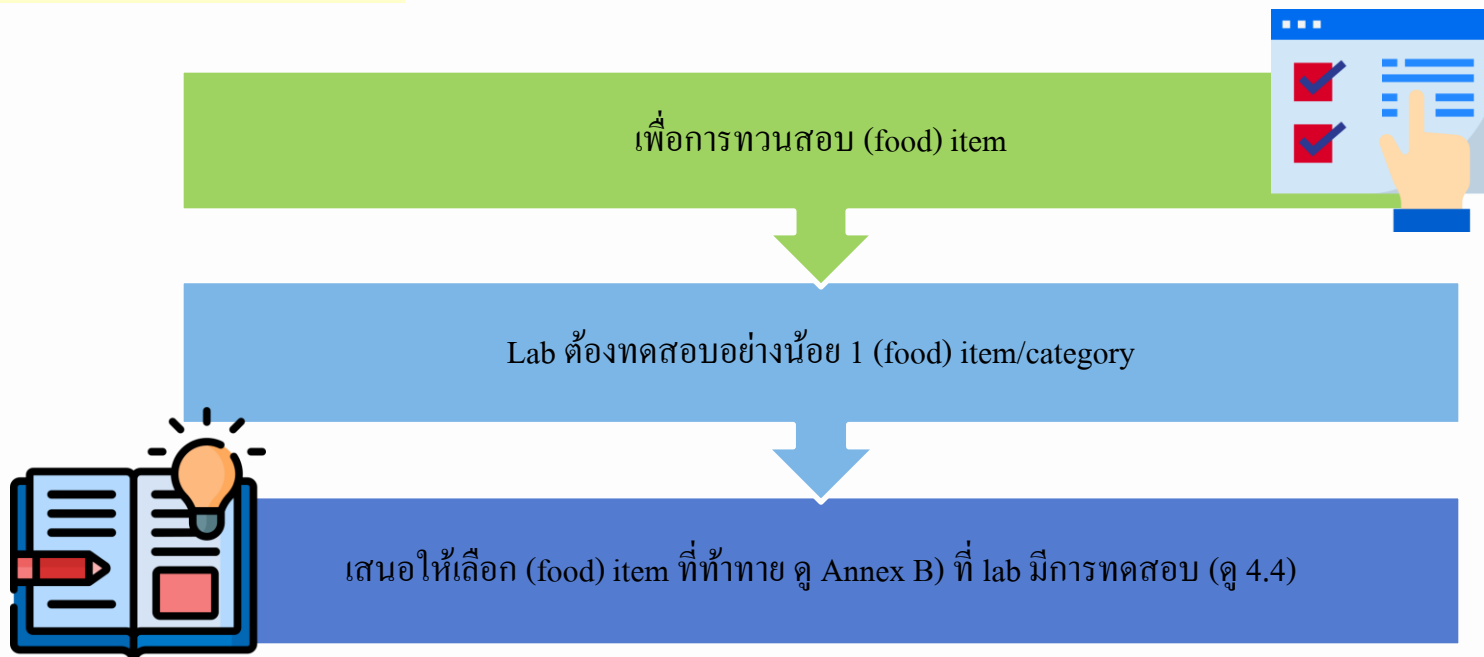
ตัวอย่างตาม Annex D.2



การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.2.3 การเลือก food item



การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.2.4 การทำให้ปนเปื้อนเชื้อ (Artificial contamination)

6.2.4.1 การเลือกสารพันธุ์ (เหมือนข้อ 6.1.5.1)

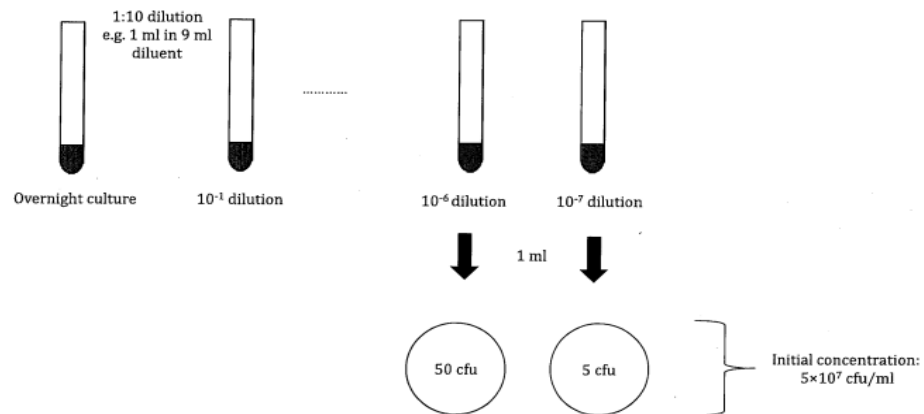
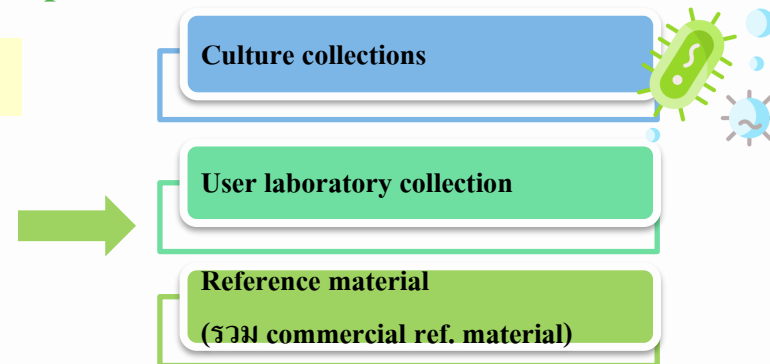
6.2.4.2 การเติมเชื้อใน test portion

การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทวนสอบ (Annex D ข้อ D.2)

หาปริมาณเชื้อที่ต้องการเบื้องต้น

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ต้องการ เลี้ยงใน non-selective media ใน สภาวะที่เหมาะสม (ISO 11133:2014)

หาปริมาณ (รูป D3)



รูปที่ D.3 : ตัวอย่างการหาปริมาณเชื้อเบื้องต้น

การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.2.4 การทำให้ปนเปื้อนเชื้อ (Artificial contamination)

6.2.4.2 การเติมเชื้อใน test portion (ต่อ)

การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการเติมเชื้อใน test portion ต้องปรับระดับของเชื้อให้เหมาะสมตามที่ lab พบในงานประจำ (routine analysis) : ต้องเติมอย่างน้อย 3 ระดับ (low, medium, high) ระดับละ 2 ซ้ำ

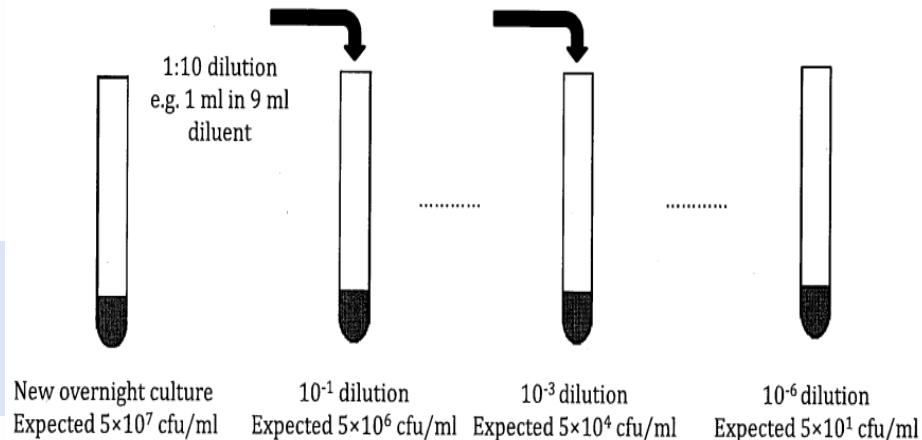
ตัวอย่างการเตรียม test portion

เช่น งานประจำของ lab พบเชื้อในตัวอย่าง 10^2 - 10^6 cfu/g ให้นำเชื้อมาเลี้ยงอีกรอบในสถานะเดิม (ที่ก่อนหน้าเคยนับได้ 5×10^7 cfu/ml)

เจือจาง 10 เท่า 6 ครั้ง ได้ dilution ที่เชื้อประมาณ 10^1 - 10^6 cfu/ml (รูป D.4) นำเชื้อ 5×10^7 , 5×10^5 , 5×10^3 cfu/ml of test portion)

↓ 1 ml

เติมใน duplication initial suspensions (A และ B) {ตัวอย่าง 10g + diluent 90 ml}
จะได้เชื้อ 5×10^6 , 5×10^4 , 5×10^2 cfu/ml of test portion = เชื้อ 5×10^5 , 5×10^3 , 5×10^2 cfu/ml of the initial suspension (รูป D.5)

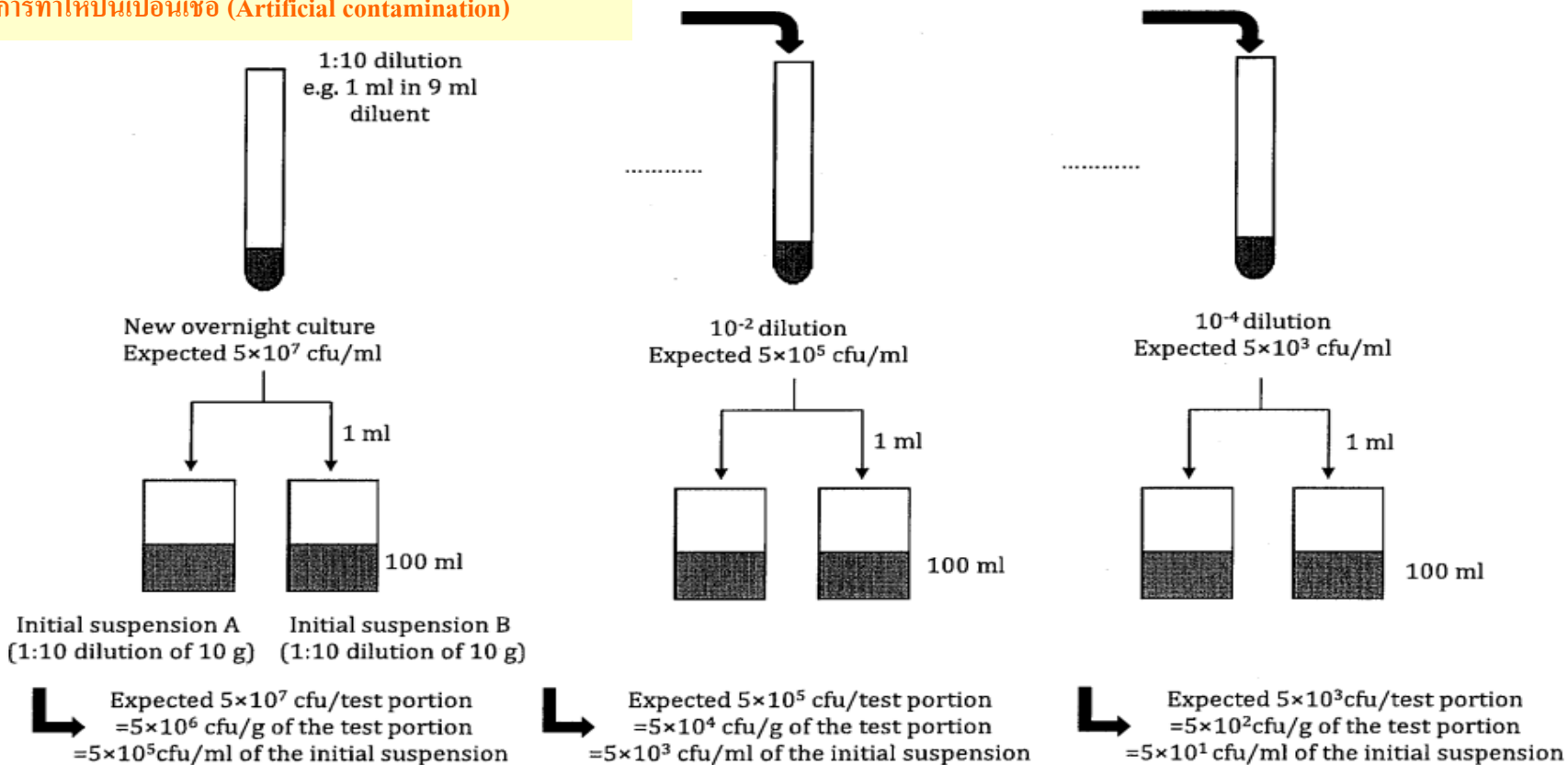


รูปที่ D.4 : ตัวอย่างการเตรียมเชื้อ

การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.2.4 การทำให้ปนเปื้อนเชื้อ (Artificial contamination)



รูปที่ D.5 : ตัวอย่างการเตรียมเชื้อใน test portions

การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.2.4 การทำให้ปนเปื้อนเชื้อ (Artificial contamination)

6.2.4.2 การเติมเชื้อ ใน test portion (ต่อ)



การหาปริมาณเชื้อ โดยใช้วิธีที่ต้องการทวนสอบ



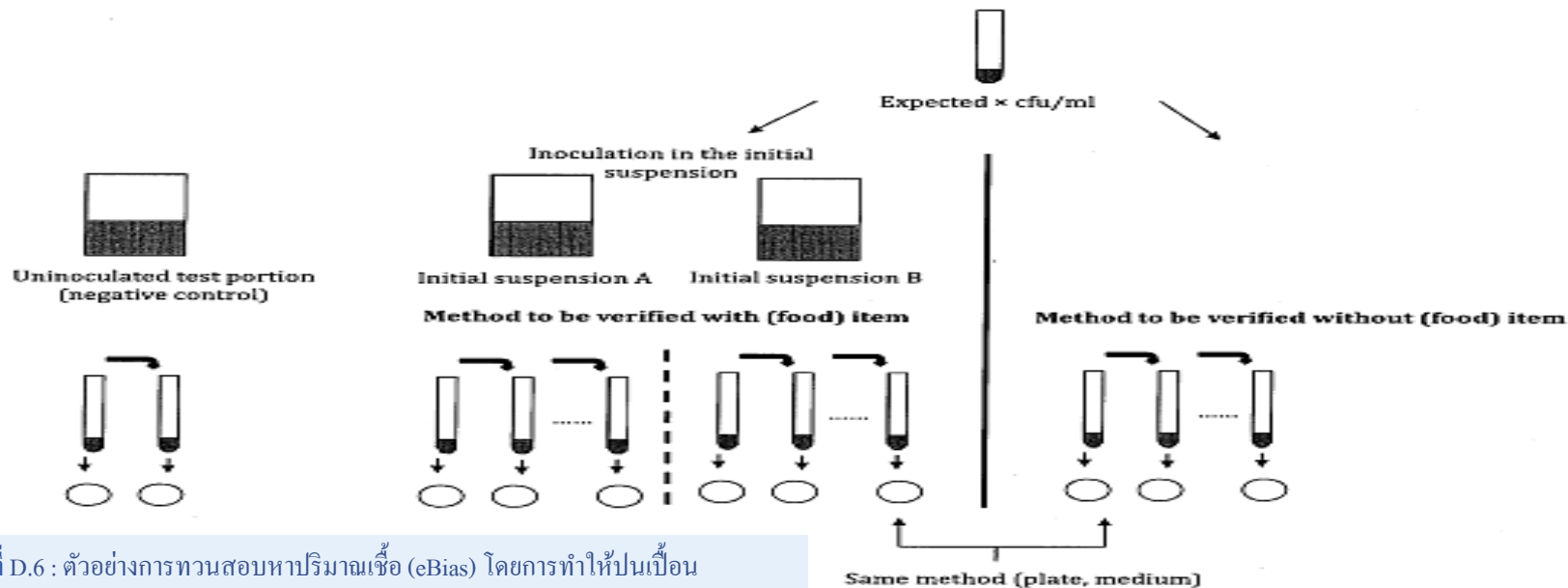
หาปริมาณเชื้อใน test portion ที่ไม่ได้เติมเชื้อ



หาปริมาณเชื้อใน test portion ที่เติมเชื้อ (A และ B)



หาปริมาณเชื้อในสารละลายที่เติมเชื้อ (inoculum suspension)



รูปที่ D.6 : ตัวอย่างการทวนสอบหาปริมาณเชื้อ (eBias) โดยการทำให้ปนเปื้อน

การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.2.5 การประเมินผล (Evaluation of results)

6.2.6 เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits)

นำปริมาณเชื้อที่หาได้ ในรูป \log_{10} cfu/g หรือ \log_{10} cfu/ml

เปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อจริงที่เติม (inoculum suspension) ต้องต่างกันไม่เกิน $0.5 \log_{10}$ cfu/g หรือ \log_{10} cfu/ml (คูตารางที่ 13)



(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.2.6 เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits)

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบที่ได้จากวิธีทวนสอบ

	Mean result Artificially contaminated (food) item (log ₁₀ cfu/g or ml) ^a	For comparison		eBias: absolute difference in results between artificially contaminated (food) item per test portion and the inoculum suspension
		Result Artificially contaminated (food) item (log ₁₀ cfu/test portion) ^a	Result Inoculum suspension [without (food) item] (log ₁₀ cfu/ml)	
Laboratory sample 1 (from batch 1), test portion 1	2,06 (average of 1,87 and 2,25)	3,06	3,17	0,11
Laboratory sample 1 (from batch 1), test portion 2				
Laboratory sample 2 (from batch 2), test portion 1	3,11 (average of 3,16 and 3,06)	4,11	4,05	0,06
Laboratory sample 2 (from batch 2), test portion 2				
Laboratory sample 3 (from batch 3), test portion 1	3,99 (average of 3,93 and 4,04)	4,99	5,29	0,30
Laboratory sample 3 (from batch 3), test portion 2				

^a This example is based on the use of a 10-gram test portion inoculated with 1 ml of inoculum.

Table 13 – Test results obtained using the method to be verified.

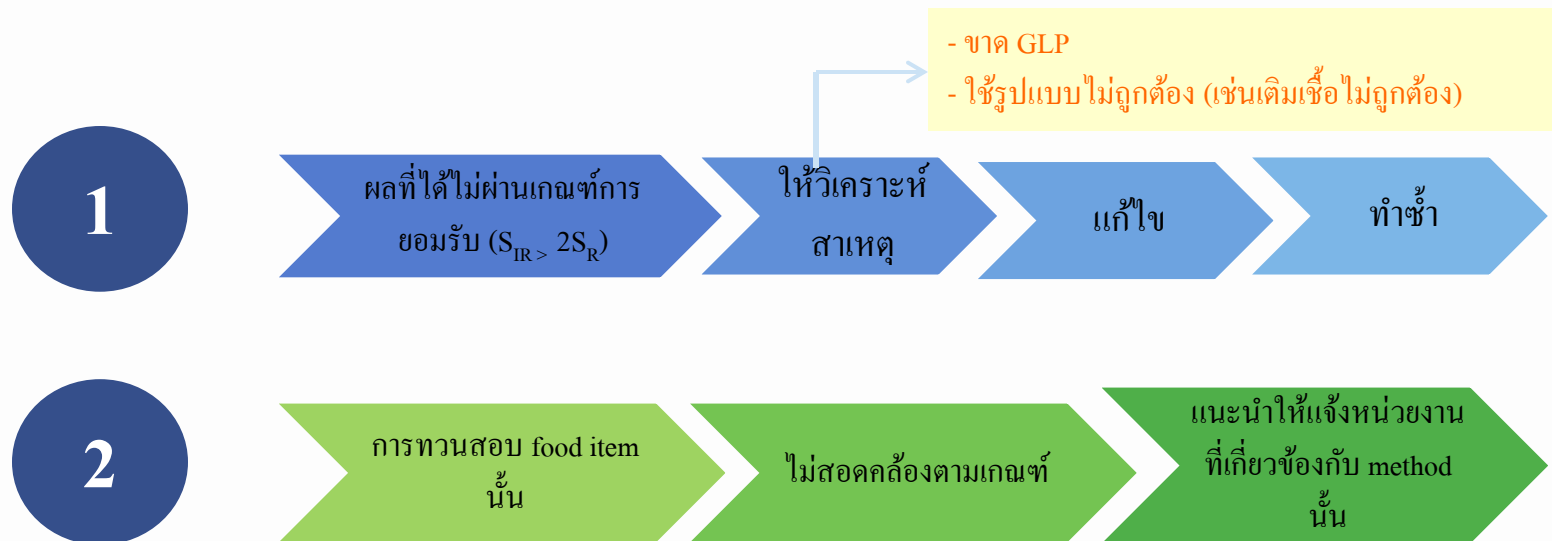
	Mean results artificial contaminated (Food) item (log ₁₀ cfu/ml)	Mean results artificial contaminated (Food) item (log ₁₀ cfu/test portion)	For comparison		eBias absolute difference between Artificially contaminated (Food) item/test portion and the inoculum suspension
			Results Artificial Contaminated (Food) item (log ₁₀ cfu /test portion)	Results Inoculum suspension without (Food) item (log ₁₀ cfu /ml)	
Laboratory sample 1 (from batch 1), test portion 1	2.06 (average of 1,87 and 2,25)	$\text{Antilog } 2.06 = 10^{2.06} = 114.82$ $= \log(114.82 \times 10) / \text{test portion}$ $= \log(114.82) + \log(10) / \text{test portion}$ $= (2.06 + 1) \log \text{ cfu} / \text{test portion}$ $= 3.06 \log \text{ cfu} / \text{test portion}$	3.06	3,17	0.11
Laboratory sample 1 (from batch 1), test portion 2					
Laboratory sample 2 (from batch 2), test portion 1	3,11 (average of 3,16 and 3,06)	$\text{Antilog } 3.11 = 10^{3.11} = 1288.25$ $= \log(1288.25 \times 10) / \text{test portion}$ $= \log(1288.25) + \log(10) / \text{test portion}$ $= (3.11 + 1) \log \text{ cfu} / \text{test portion}$ $= 4.11 \log \text{ cfu} / \text{test portion}$	4.11	4.05	0.06
Laboratory sample 2 (from batch 2), test portion 2					
Laboratory sample 3 (from batch 3), test portion 1	3.99 (average of 3,93 and 4.04)	$\text{Antilog } 3.99 = 10^{3.99} = 9772.37$ $= \log(9772.37 \times 10) / \text{test portion}$ $= \log(9772.37) + \log(10) / \text{test portion}$ $= (3.99 + 1) \log \text{ cfu} / \text{test portion}$ $= 4.99 \log \text{ cfu} / \text{test portion}$	4.99	5.29	0.30
Laboratory sample 3 (from batch 3), test portion 2					

This example is based on the use of a 10-gram test portion inoculated with 1 ml of inoculum.

การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification)

6.2.7 การวิเคราะห์หาสาเหตุ (Root cause analysis)



7 การทวนสอบวิธีการตรวจยืนยันและจำแนกของวิธีทางเลือกที่ validated แล้ว

(Validated alternative confirmation and typing methods- Technical protocol for verification)

7.1 เรื่องทั่วไป (General)



7 การทวนสอบวิธีการตรวจยืนยันและจำแนกของวิธีทางเลือกที่ validated แล้ว

(Validated alternative confirmation and typing methods- Technical protocol for verification)

7.2 การทวนสอบการใช้งาน (expected results)



ทบทวนข้อมูลที่ได้จากการ
validated (ข้อมูลการ
validated ของวิธีทางเลือก)

เลือก selective agar plate 1
ชนิดที่ใช้ในการ validated
(ถ้าเป็นไปได้ ให้อยู่ใน
ขอบข่ายของ lab)

ใช้ selective agar plate ชนิด
นี้ในการทวนสอบรายการ
(implementation
verification) ถ้าไม่มี
selective agar plate ชนิดนี้
ให้ใช้ non selective agar ที่
ใช้ในการ validated

หมายเหตุ : รายละเอียดและตัวอย่างการทวนสอบ ดู Annex E

7 การทวนสอบวิธีการตรวจยืนยันและจำแนกของวิธีทางเลือกที่ validated แล้ว

(Validated alternative confirmation and typing methods- Technical protocol for verification)

สรุป

นำเชื้อที่ต้องการ และ เชื้อที่ไม่ต้องการ (อย่างละ 5 สายพันธุ์)

ที่แยกได้บน selective agar 1 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษา validated (ถ้าเป็นไปได้ selective agar อยู่ใน
ขอบข่ายที่ lab ใช้) ถ้าไม่มี selective agar ให้ใช้ non selective agar
ตามที่การศึกษา validated ใช้

เลือก typical colonies ไปทดสอบ

ผลต้องสอดคล้องกัน 100% ตาม Annex E

7 การทดสอบวิธีการตรวจยืนยันและจำแนกของวิธีทางเลือกที่ validated แล้ว

ISO 16140-3:2021

(Validated alternative confirmation and typing methods- Technical protocol for verification)

ตารางที่ E1 ภาพรวมผลการทดสอบการตรวจยืนยัน

Tested strains	Inclusivity/exclusivity	Characteristics of the strain	Expected confirmation result ^a	Result of the confirmation method being verified ^a	Interpretation ^b
1	Inclusivity	<i>L. monocytogenes</i> (serotype 4b) WDCM 00021 Human isolate	+	+	Agreement
2	Inclusivity	<i>L. monocytogenes</i> (serotype 1/2a) WDCM 00109 Guinea-pig isolate	+	+	Agreement
3	Inclusivity	<i>L. monocytogenes</i> (genotype IV) 12MOB112LM Meat isolate	+	+	Agreement
^a +: positive result, indicating the strain is confirmed to be the target; --: negative result, indicating the strain is not confirmed to be the target. ^b Agreement or deviation between the expected result and the result of the confirmation method being verified. ^c Not able to grow on Agar <i>Listeria</i> according to Ottaviani and Agosti, and therefore tested from a non-selective agar plate.					

7 การทดสอบวิธีการตรวจยืนยันและจำแนกของวิธีทางเลือกที่ validated แล้ว

ISO 16140-3:2021

(Validated alternative confirmation and typing methods- Technical protocol for verification)

ตารางที่ E1 ภาพรวมผลการทดสอบการตรวจยืนยัน

Tested strains	Inclusivity/exclusivity	Characteristics of the strain	Expected confirmation result ^a	Result of the confirmation method being verified ^a	Interpretation ^b
4	Inclusivity	<i>L. monocytogenes</i> (genotype II) 12MOB118LM Dairy isolate	+	+	Agreement
5	Inclusivity	<i>L. monocytogenes</i> Field strain LM01 Smoked salmon isolate	+	+	Agreement
6	Exclusivity	<i>L. innocua</i> WDCM 00017	-	-	Agreement
7	Exclusivity	<i>L. ivanovii</i> WDCM 00018	-	-	Agreement
8	Exclusivity	<i>Bacillus cereus</i> WDCM 00001 ^c	-	-	Agreement
9	Exclusivity	<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00009 ^c	-	-	Agreement
10	Exclusivity	<i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00034 ^c	-	-	Agreement

^a +: positive result, indicating the strain is confirmed to be the target;

-: negative result, indicating the strain is not confirmed to be the target.

^b Agreement or deviation between the expected result and the result of the confirmation method being verified.

^c Not able to grow on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti, and therefore tested from a non-selective agar plate.

7 การทวนสอบวิธีการตรวจยืนยันและจำแนกของวิธีทางเลือกที่ validated แล้ว

(Validated alternative confirmation and typing methods- Technical protocol for verification)

7.3 การออกแบบการทดลอง (experimental design)

7.3.1 เรื่องทั่วไป (general)

ตารางที่ 14 จำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ในการทวนสอบ

Level of the confirmation	Inclusivity testing	Exclusivity testing
Family	5	5
Genus		
Species		
Microbial (sub)type (e.g. serotyping of <i>Salmonella</i>)		

7.3.2 การเลือกสายพันธุ์ (strain selection)

- 1) Culture collections
- 2) User laboratory collection
- 3) Reference material (รวม commercial ref. material)

7 การทวนสอบวิธีการตรวจยืนยันและจำแนกของวิธีทางเลือกที่ validated แล้ว

(Validated alternative confirmation and typing methods- Technical protocol for verification)

7.4 การประเมินผล (Evaluation of results)

ตารางที่ 15 ภาพรวมผลการทวนสอบการตรวจยืนยัน

Tested strains	Inclusivity/ Exclusivity	Characteristics of the strain	Expected confirmation/typing result	Result of the tested confirmation/typing method	Interpretation ^a
1					
2					
...					
9					
10					

^a Agreement or deviation between the expected result and the result of the tested confirmation or typing method.

7.5 เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits)



ควรให้ผลตรงกัน 100%

7 การทวนสอบวิธีการตรวจยืนยันและจำแนกของวิธีทางเลือกที่ validated แล้ว

(Validated alternative confirmation and typing methods- Technical protocol for verification)

7.6 การวิเคราะห์หาสาเหตุ (Root cause analysis)



เมื่อผลที่ได้ไม่สอดคล้องกัน 100%



ข้อผิดพลาดในการตรวจวิเคราะห์
เนื่องจาก poor laboratory practice

ข้อผิดพลาดในการใช้วิธี เช่น ใช้เวลาและอุณหภูมิ
ไม่ถูกต้อง

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

เชื้อที่ใช้ (ถูกต้องหรือไม่)

8 สรุปเกณฑ์การยอมรับ (Summary of acceptance criteria)

ตารางที่ 16 สรุปเกณฑ์การยอมรับของการทวนสอบวิธี

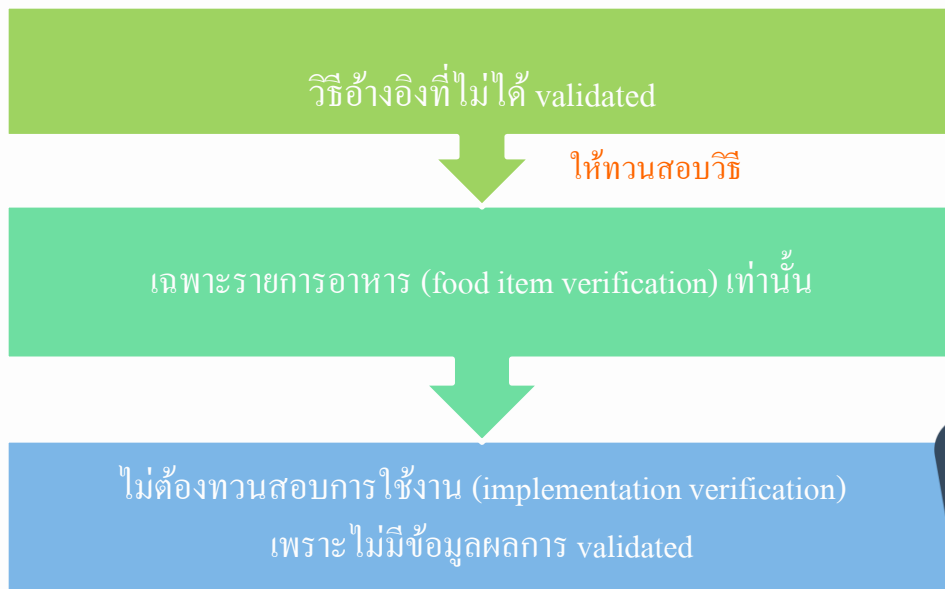
Method	Performance characteristics	Acceptance criteria
Qualitative	eLOD ₅₀	eLOD ₅₀ ≤ 4 × LOD ₅₀
Quantitative	S _{IR}	S _{IR} ≤ 2 × lowest S _R mean value determined in the validation study
	eBias	log ₁₀ cfu/g (inoculum) – mean log ₁₀ cfu/g (artificially contaminated [food] item) ≤ 0,5 log ₁₀ cfu/g for each of the inoculation levels ^a
Confirmation or typing	inclusivity and exclusivity	100 % agreement between methods

^a For readability, only cfu/g is given but the results can also be expressed in cfu/ml.

Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี
(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.1 เรื่องทั่วไป (general)



Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี
(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.2 การทวนสอบรายการอาหาร {(food) item verification}

มีจุดมุ่งหมาย : แสดงความสามารถของ lab ที่จะใช้วิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ validated ในการตรวจ item นั้นได้อย่างถูกต้อง
โดย lab ต้อง



เลือกรายการอาหารที่ไม่ท้าทาย (non-challenging food item) จากกลุ่มอาหาร (category) ที่อยู่ในขอบข่ายของวิธีอ้างอิง และอยู่ในขอบข่ายของ lab ที่อ้างว่านำไปใช้



เลือกรายการอาหารท้าทายจากแต่ละกลุ่มอาหาร (category) ที่อยู่ในขอบข่ายของวิธีอ้างอิง และอยู่ในขอบข่ายของ lab ที่อ้างว่านำไปใช้

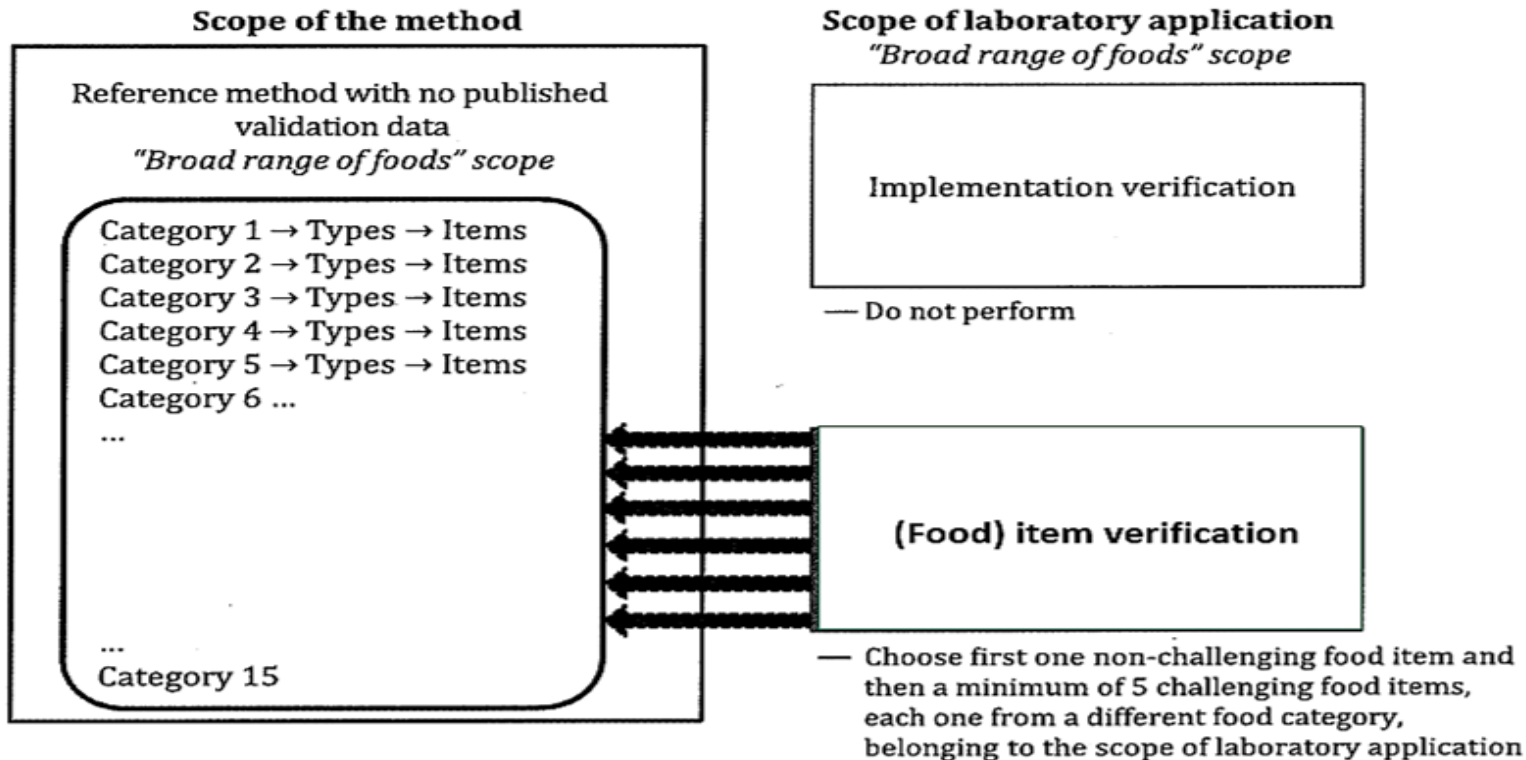


แต่ละรายการอาหาร ใช้ขนาดตัวอย่างตามวิธีอ้างอิงใช้ (หรืออาจใช้ขนาดเล็กลงตามที่ lab ใช้ในงาน routine ทวนสอบ) →

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.3 รายการอาหารต้องทวนสอบ {(Requirements for (food) item verification)}

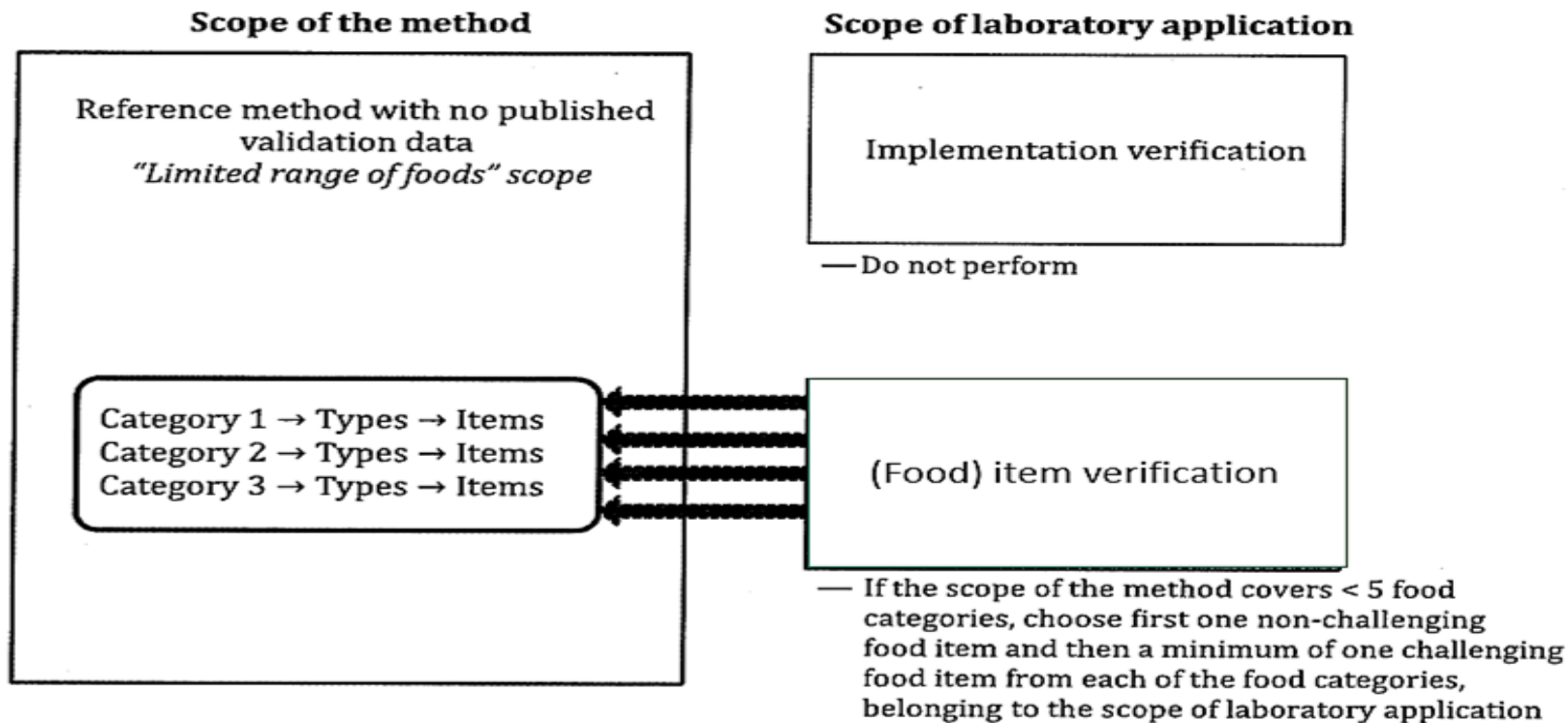


รูปที่ F.1 จำนวนรายการอาหาร (food items) ที่ใช้ในการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ validated ในอาหารหลากหลายกลุ่ม (broad range of foods)

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

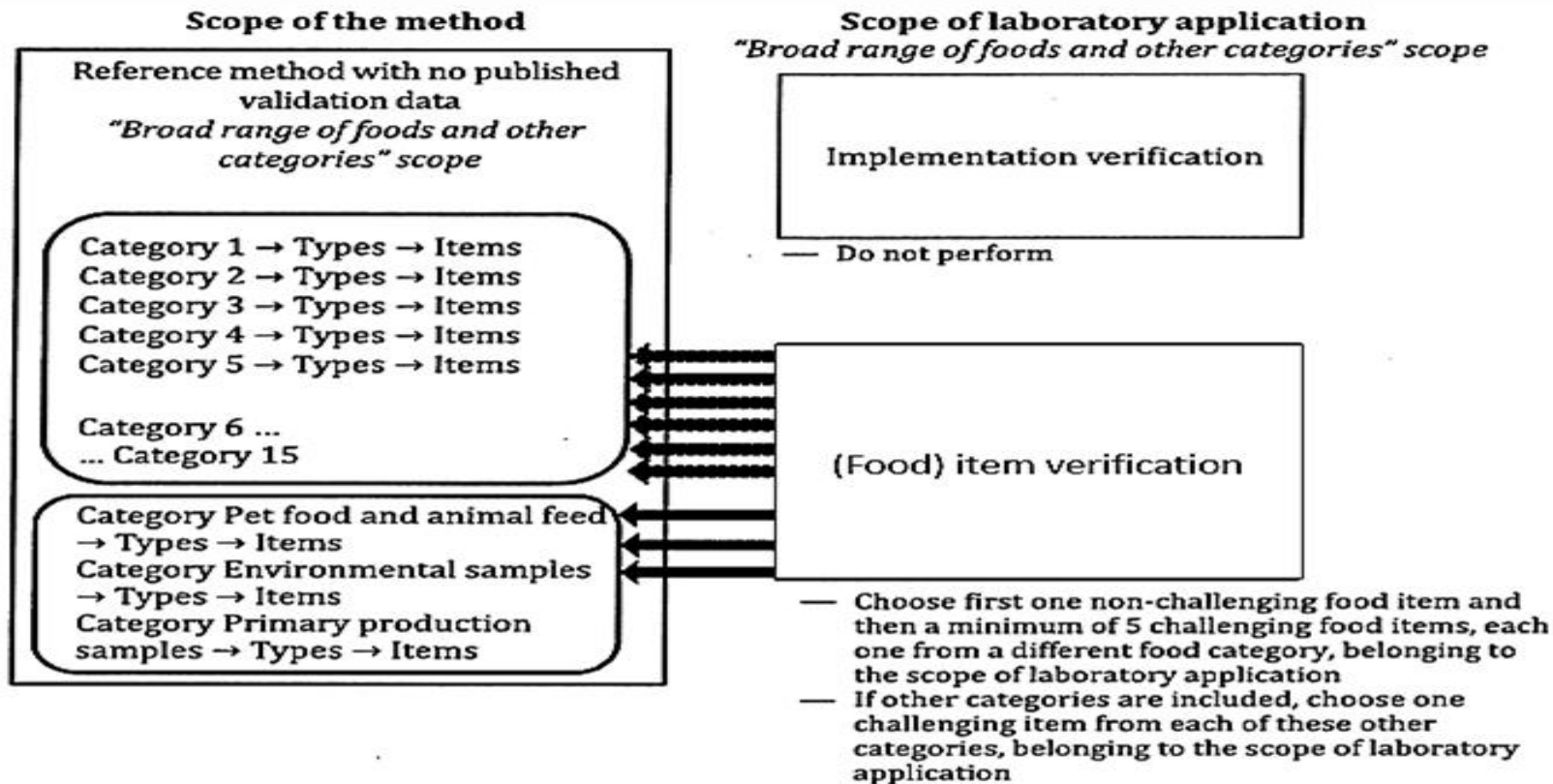
F.3 รายการอาหารต้องทวนสอบ {(Requirements for (food) item verification)}



รูปที่ F.2 จำนวนรายการอาหาร (food items) ที่ใช้ในการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ validated ในอาหารจำกัดกลุ่ม (limited range of foods)

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)



รูปที่ F.3 จำนวนรายการอาหาร (food items) ที่ใช้ในการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ validated ในอาหารหลากหลายกลุ่มและกลุ่มอื่นๆ (broad range of foods and other categories)

Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

Scope of the reference method	Number of samples		
	Implementation verification	(Food) item verification	Total
"Broad range of foods" scope ≥ 5 food categories	Not applicable	1 non-challenging + $N_{\text{food}} \geq 5$ challenging food items	≥ 6
"Limited range of foods" scope N_{food} categories	Not applicable	1 non-challenging + $N_{\text{food}} \leq 4$ challenging food items	$(N_{\text{food}} + 1) \leq 5$
"Broad range of foods" + other categories (N_{other}) scope	Not applicable	1 non-challenging + $N_{\text{food}} \geq 5$ challenging food items + 1 challenging item from each of the N_{other} other categories	$\geq 6 + N_{\text{other}}$
"Limited range of foods" N_{food} categories + other categories (N_{other}) scope	Not applicable	1 non-challenging + $N_{\text{food}} \leq 4$ challenging food items + 1 challenging item from each of the N_{other} other categories	$(N_{\text{food}} + N_{\text{other}} + 1) \leq 8$
Other categories (N_{other}) scope only	Not applicable	1 non-challenging (food or other) + $N_{\text{other}} \leq 3$ challenging items	$(N_{\text{other}} + 1) \leq 4$

ตารางที่ F.1 สรุปจำนวนน้อยที่สุดของรายการ (อาหาร) ที่ต้องทวนสอบสำหรับวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ validated

Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.4 คุณลักษณะที่เหมาะสม (Performance characteristics)

Method	Performance characteristic	Implementation verification	(Food) item verification
Qualitative	Estimated LOD ₅₀ (eLOD ₅₀)	Not applicable	✓
Quantitative	Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR})	Not applicable	Not applicable
	Estimated bias (eBias)	Not applicable	✓

NOTE For the verification of a qualitative method, three protocols are proposed to the user laboratory. The protocol 3 does not require a determination of an eLOD₅₀ but to target a concentration of 3 cfu to 5 cfu/test portion.

ตารางที่ F.2 แสดงคุณลักษณะเหมาะสมที่ต้องการเพื่อใช้ตัดสินการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ validated

Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.5 รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงไม่ได้ validated

(Qualitative methods-Technical protocol for verification of a non-validated reference method)

F.5.1 การประมาณค่า LOD₅₀ (eLOD₅₀) (Estimated LOD₅₀ (eLOD₅₀) determination)

หา eLOD₅₀

เฉพาะการทวนสอบรายการอาหาร
(food item verification)

การตรวจยืนยัน ต้องทำทุก test portion ในแต่ละ
ระดับของการเติมเชื้อ
โดยแต่ละ test portion อาจเลือก 1 colony
มาใช้ในการตรวจยืนยัน

ต้องทำตามวิธีอ้างอิง
รวมถึงการตรวจยืนยัน (ถ้ามี)

Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.5 รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงไม่ได้ validated

(Qualitative methods-Technical protocol for verification of a non-validated reference method)

F.5.2 การวางแผนการทดลอง (experimental design)



Protocol	Inoculation level of the test portion					Total number of replicates
	High level 9 cfu/test portion	Intermediate level 3 cfu/test portion	Low level 1 cfu/test portion	3 cfu to 5 cfu/ test portion	Blank	
1	1	4	4		1	10
2		3	5		1	9
3				7	1	8

NOTE The abbreviation of colony forming units is cfu.

ตารางที่ F.3 รูปแบบการหา eLOD₅₀ และจำนวนซ้ำของเชื้อที่เติมในแต่ละระดับของวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ validated

Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.5 รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงไม่ได้ validated

(Qualitative methods-Technical protocol for verification of a non-validated reference method)

F.5.3 การเลือกรายการ (อาหาร) {Selection of (food) item }



Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.5 รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงไม่ได้ validated

(Qualitative methods-Technical protocol for verification of a non-validated reference method)

F.5.1 การทำให้ปนเปื้อนเชื้อ (Artificial contamination)

F.5.4.1 การเลือกสายพันธุ์ (เหมือนข้อ 5.4.1)

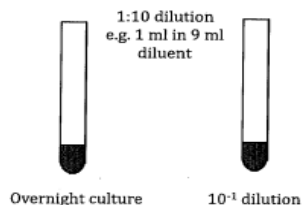
F.5.4.2 การเติมเชื้อใน test portion

การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทวนสอบ (Annex D ข้อ D.2)

หาปริมาณเชื้อที่ต้องการเบื้องต้น

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ต้องการ เลี้ยงใน non-selective media ใน
สภาวะที่เหมาะสม (ISO 11133:2014)

หาปริมาณวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ validated ให้ถือว่า $LOD_{50} = 1$
cfu/test portion

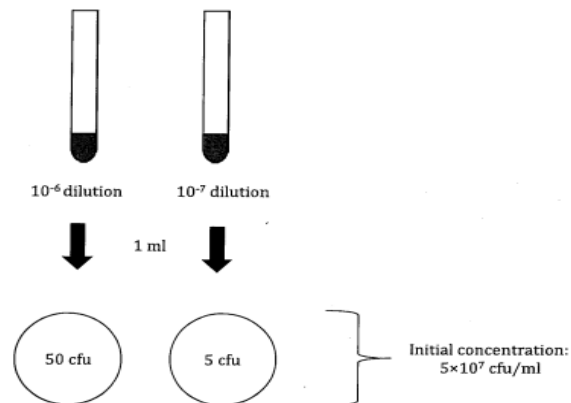


รูปที่ D.3 : ตัวอย่างการหาปริมาณเชื้อเบื้องต้น

Culture collections

User laboratory collection

Reference material
(รวม commercial ref. material)



รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.5 รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงไม่ได้ validated

(Qualitative methods-Technical protocol for verification of a non-validated reference method)

F.5.4 การทำให้ปนเปื้อนเชื้อ (Artificial contamination) (ต่อ)

Protocol	High level 9 cfu/test portion	Intermediate level 3 cfu/test portion	Low level 1 cfu/test portion	3 cfu to 5 cfu/test portion
1	This should be at a maximum of nine times the assumed LOD ₅₀ .	From the high inoculation level, perform a 1:3 dilution to achieve the intermediate level.	From the intermediate inoculation level, perform a 1:3 dilution to achieve the low level.	
2		This should be at a maximum of three times the assumed LOD ₅₀ .	From the intermediate inoculation level, perform a 1:3 dilution to achieve the low level.	
3				The level of contamination of the inoculum is known, (e.g. reference material with known concentration).

ตารางที่ F.4 ระดับของเชื้อที่เติมในแต่ละรูปแบบ (protocol) สำหรับวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ validated

Annex F

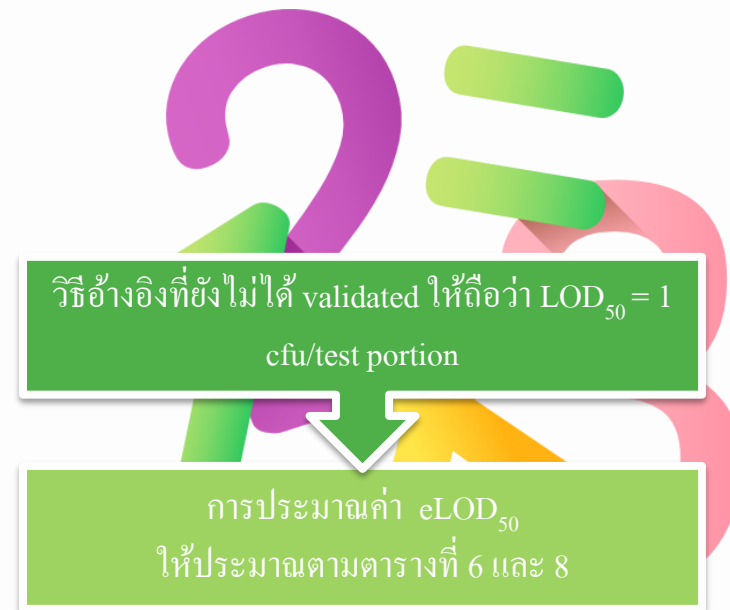
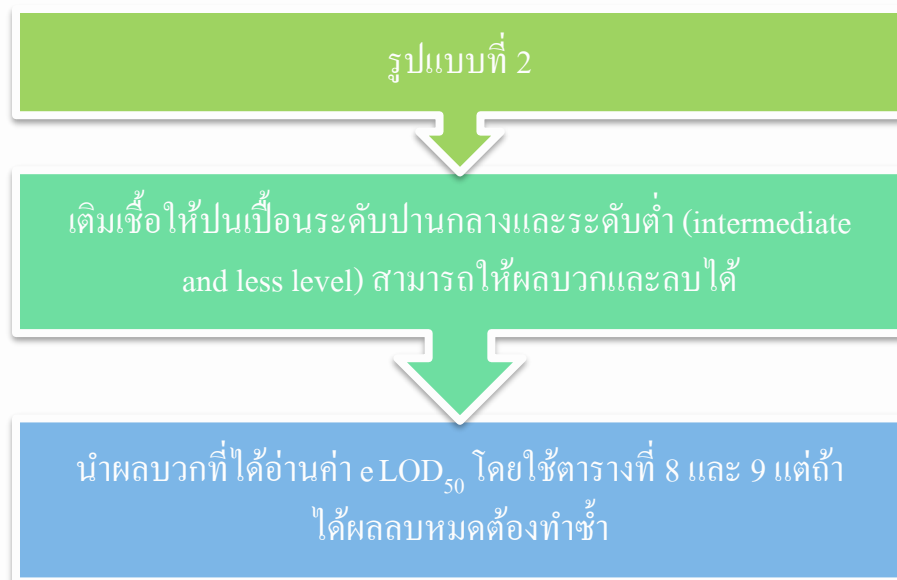
รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.5 รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงไม่ได้ validated

(Qualitative methods-Technical protocol for verification of a non-validated reference method)

F.5.5 การประเมินผล (Evaluation of results)



Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.5 รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงไม่ได้ validated

(Qualitative methods-Technical protocol for verification of a non-validated reference method)

F.5.6 เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits)

การประมาณค่า $eLOD_{50}$ ตามรูปแบบที่ 1 (ดู 5.5.1 หรือ 5.5.2)

ต้องไม่เกิน $4 \times LOD_{50}$ ตามวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ validated
 LOD_{50} ของวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ validated = 1 cfu/ test portion
ดังนั้น $eLOD_{50}$ ต้องไม่เกิน 4 cfu/ test portion

สำหรับรูปแบบที่ 3
(3-5 cfu/ test portion หรือน้อยกว่า)

ต้องมีผลบวกไม่น้อยกว่า 6 ใน 7 ซ้ำ

Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.5 รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงไม่ได้ validated

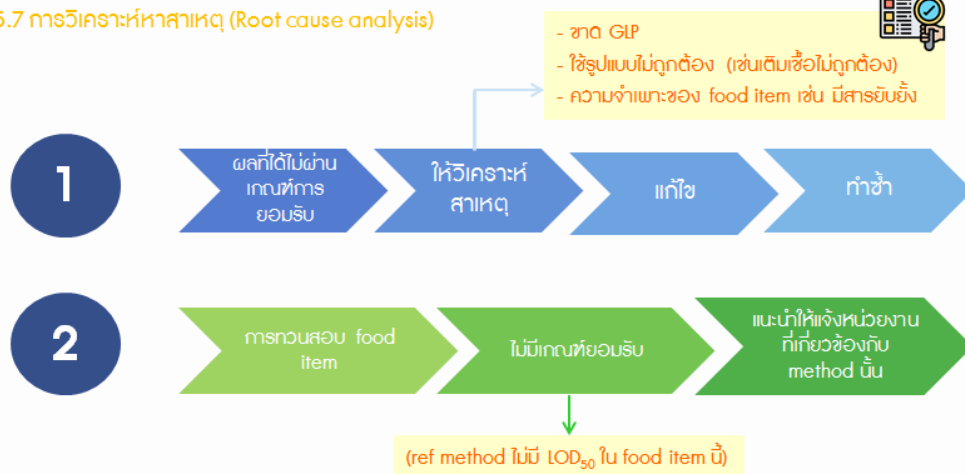
(Qualitative methods-Technical protocol for verification of a non-validated reference method)

F.5.7 การวิเคราะห์หาสาเหตุ (Root cause analysis)

กรณีค่า $eLOD_{50}$ ไม่เป็นไปตามเกณฑ์
($eLOD_{50} > 4$ cfu/ test portion)

ให้หาสาเหตุและวิธีแก้ไข (ดู 5.7)

5.7 การวิเคราะห์หาสาเหตุ (Root cause analysis)



Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

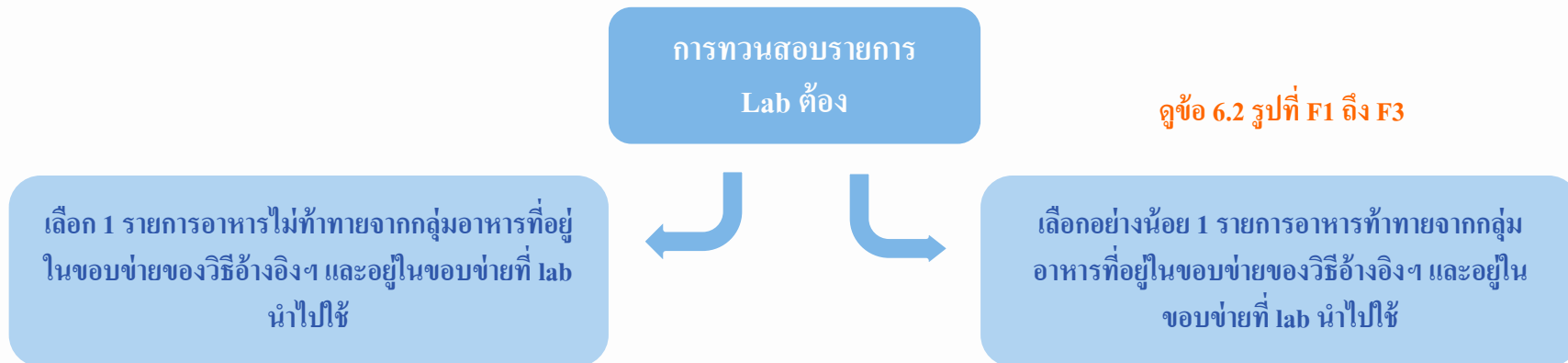
F.6 รูปแบบการทวนสอบวิธีแบบปริมาณ

(Qualitative methods-Technical protocol for verification of a non-validated reference method)

F.6.1 การหา S_{IR} (intralaboratory reproducibility standard deviation)



F.6.2 การประมาณค่า eBias (Estimation bias (eBias) determination)



ดูข้อ 6.2 รูปที่ F1 ถึง F3

Annex F

รูปแบบการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

(Protocol for the verification of non-validated reference methods in single laboratory)

F.7 สรุปเกณฑ์การยอมรับ (Summary of acceptability limits)

Method	Performance characteristics	Acceptability limits
Qualitative	eLOD ₅₀	For protocols 1 and 2: eLOD ₅₀ ≤ 4 cfu/test portion For protocol 3: ≥ 6 out of 7 positive results
Quantitative	eBias	log ₁₀ cfu/ml (inoculum) - mean log ₁₀ cfu/test portion (artificially contaminated [food] item) ≤ 0,5 log ₁₀ for each of the inoculation levels



-Thank you-

-Τηχαυ λου-