FOOD Tek
SUPPLY AND CONSULTANT

เอกสารอบรม

เทคนิคการทำ Swab Test และ Air Test

บรรยายโดย

อาจารย์ ประเชิญ นาคพันธ์ (อ.ปาน)
วิทยากร และที่ปรึกษาด้านห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

อบรมโดย ทีมงาน
Foodtek Supply and Consultant Co.,Ltd.

เทคนิคการทำ Swab test และ Air test

Profile : นางประเชิญ นาคพันธ์ (ปาน)

BSC : Microbiology

FOOD Tek SUPPLY AND CONSULTANT	**Present** วิทยากร และที่ปรึกษาด้านห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา
nfi	2566 – 2568 รองผู้อำนวยการฝ่ายบริการห้องปฏิบัติการ
nfi	2552 – 2566 ผู้จัดการแผนกจุลชีววิทยา
nfi	2546 – 2552 นักวิทยาศาสตร์
บริษัทเอกชน	2537 – 2545 ควบคุมคุณภาพ

2

Swab Test and Air Test

1. **Swab Test (Surface-sampling methods)**
   การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวอุปกรณ์ ภาชนะ พื้นผิวทำงาน ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหาร
2. **Air Test (Air-sampling methods)**
   การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ
3. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของภาชนะสัมผัสอาหาร
4. ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ตามความเสี่ยงระดับ **2**

3

การตรวจติดตามทางจุลชีววิทยาของสภาพแวดล้อมในการแปรรูปอาหาร

01 ทวนสอบและเฝ้าติดตาม ขั้นตอนการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ

02 หาแหล่งที่เป็นที่สะสมของสารอินทรีย์ หรือแหล่งอาหารที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้

03 หาแหล่งของเชื้อที่สามารถเป็นที่เจริญของเชื้อก่อโรค หรือเชื้อที่ทำให้เน่าเสียได้ง่าย

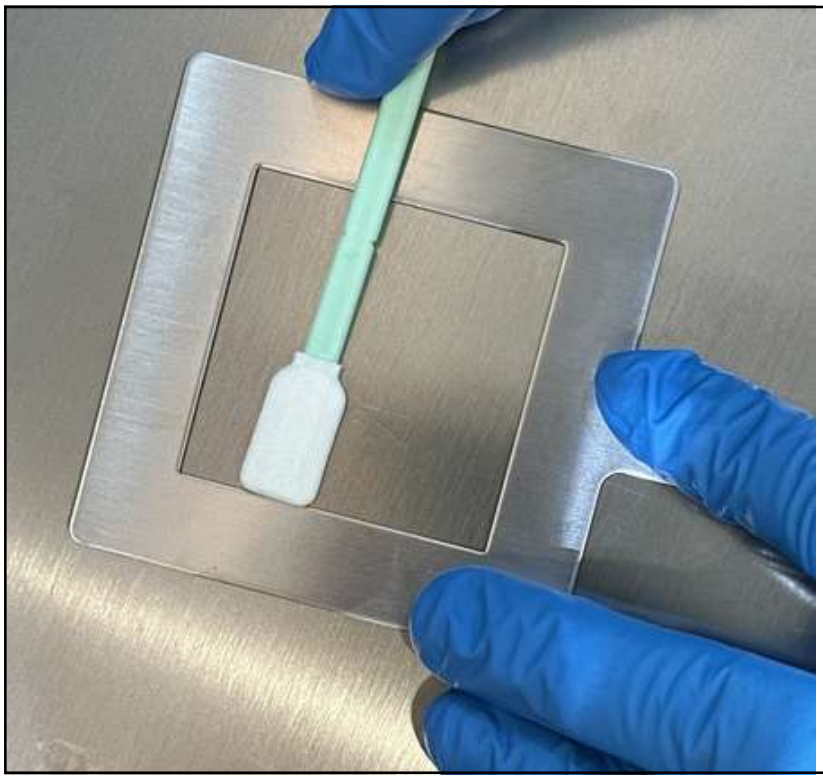
4

ตัวอย่างการปนเปื้อนหลังการแปรรูป

Postprocess contamination

Salmonella spp	*Listeria monocytogenes*	*Bacillus cereus*
ปนเปื้อนในไอศกรีม นมผงทารก ชีสนิ่ม แฮมสไลซ์ปรุงสุก	ปนเปื้อนในเนย ฮอทดอก ชีสแบบแม็กซิกัน นมพาสเจอไรซ์	ปนเปื้อนในนมพาสเจอไรซ์
Staphylococcus aureus	***Clostridium botulinum***	***E. coli***
ปนเปื้อนในลาซานญ่า เนื้อปู ข้าวมันไก่	ปนเปื้อนในปลาแซลมอนกระป๋อง หน่อไม้ปี๊ป	ปนเปื้อนในเนื้อบด ข้าวมันไก่

5



1. เทคนิคการ Swab test ISO 18593:2018

6

หลักการทดสอบทางจุลชีววิทยา

วิธีการทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์

01 **Quantitative Methods**
การทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์เชิงปริมาณ เช่น MPN , CFU

02 **Qualitative Methods**
การทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์เชิงคุณภาพ เช่น Detected/Not Detected

7

ประเภทของเชื้อจุลินทรีย์

A **Pathogenic bacteria**
เช่น *Salmonella* spp.

B **Non-pathogenic bacteria**
เช่น *Escherichia coli*

C **Yeast and moulds**

8

การที่เราจะ swab test
เกณฑ์เชื้อผลิตภัณฑ์สุดท้ายของเรากำหนดอะไรบ้าง

Culture media and reagents

การปฏิบัติการเตรียม ให้ทำตาม ISO 7218 และการตรวจสอบประสิทธิภาพตาม ISO 11133

เอกสารอ้างอิงจากจุลินทรีย์

Diluent **สารเจือจางตัวอย่าง**	• Buffered peptone water , Peptone salt solution (ISO 6887-1) • Quarter-strength ringer's solution (ISO 6887-5)
Medium:contact plate **(มีส่วนโค้งนูนขึ้นกับแผ่นสัมผัส)**	• Plate count agar : bacteria • Potato dextrose agar: Yeast/Mold
Neutralizer **(ควรถูกใส่ลงใน Diluent หรือ Media)**	• กรณีมีสารตกค้างจากการทำความสะอาด • เช่น Polysorbate 80+lecithin

***สารเจือจางที่เหมาะสมควรได้รับการตรวจสอบอย่างถูกต้อง ซึ่งต้องพิจารณาระยะเวลาของการขนส่ง

9

Culture media and reagents

การปฏิบัติการเตรียม ให้ทำตาม ISO 7218 และการตรวจสอบประสิทธิภาพตาม ISO 11133

INTERNATIONAL STANDARD **ISO 6887-1**

Second edition
2017-03

THAI INDUSTRIAL STANDARDS INSTITUTE

Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination —

Part 1:
General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

INTERNATIONAL STANDARD **ISO 6887-5**

First edition
2010-08-15

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination —

Part 5:
Specific rules for the preparation of milk and milk products

10

Culture media and Diluent

ใช้ตามชนิดเชื้อจุลินทรีย์ที่จะทำการทดสอบ

- Plate count agar :Aerobic plate count
- Potato dextrose agar ,DG18 (Dichloran 18% Glycerol Agar) , : Yeast&Molds
- Baird-parker agar : *Staphylococcus aureus*
- Buffer peptone water : APC ,YM
- Peptone salt solution : APC ,YM
- Butterfield's phosphate-buffered dilution (BPB) : APC ,YM

11

Neutralizer

สารทำให้เป็นกลาง ในกรณีมีสารตกค้างของสารฆ่าเชื้อที่ใช้ทำความสะอาด

Antimicrobial agent	Examples of suitable neutralizers
01 Quaternary ammonium compounds and fatty amines	-Polysorbate 80: 30g/l+saponin 30 g/l+lecithin 3g/l. 01
02 Oxidizing compounds (Chlorine ,iodine,hydrogen peroxide,peracetic acid,hypochlorites)	-Sodium thiosulfate 3g/l-20 g/l+ polysorbate 80: 30 g/l+lecithin 3 g/l 02
03 Phenolic and related compounds:orthophenylphenol, phenoxyethanol,triclosan, phenylethanol)	-Polysorbae 80:30 g/l + Lecithin 3 g/l 03

12

Neutralizer

สารทำให้เป็นกลาง ในกรณีมีสารตกค้างของสารฆ่าเชื้อที่ใช้ทำความสะอาด

Antimicrobial agent	Examples of suitable neutralizers
04 Aldehydes	-Polysorbate 80: 30g/l+lecithin 3g/l.+L-histidine 1 g/l 04
05 Alcohols	-Polysorbate 80: 30g/l +saponin 30 g/l+lecithin 3 g/l 05
06 Mercurials	-Sodium thioglycolate 0.5 g/l -5 g/l 06

13

Neutralizer

ความสำคัญของสารทำให้เป็นกลาง

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างที่ไม่มีสารทำให้เป็นกลางที่เหมาะสม
2. แบคทีเรียอาจตายเนื่องจากการทำให้เป็นกลางที่ไม่มีประสิทธิภาพ
3. ผลทดสอบ : เป็นผลลบปลอมได้

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างที่มีสารทำให้เป็นกลางที่เหมาะสม
2. ทำให้แบคทีเรียฟื้นตัวอย่างมีประสิทธิภาพ
3. ผลทดสอบ : ถูกต้อง

***กรณีไม่มีสารฆ่าเชื้อตกค้าง ไม่ควรใส่สารทำให้เป็นกลาง

14

เครื่องมือและอุปกรณ์

01 Contact plate
จานพลาสติกขนาดตามต้องการ :ภาชนะที่ยืดหยุ่นหรือแข็งอื่น ๆ ที่ช่วยให้สัมผัสกับพื้นผิวที่สุ่มตัวอย่างได้

02 Sterile stick swab
เป็น Cotton หรือ วัสดุสังเคราะห์ เช่น alginate , rayon บรรจุอยู่ใน tube หรือ อยู่ในซองหุ้มห่อ และไม่มีสารยับยั้ง

03 Sterile cloth
ไม่มีสารยับยั้ง

04 Sterile sponge
โพลียูรีเทน หรือเซลลูโลส มี หรือไม่มีที่จับ และไม่มีสารยับยั้ง

15

ขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง

พิจารณาตามความเสี่ยงของพื้นที่ผิวที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการผลิต และสามารถไปจัดทำเป็นแผนการดำเนินการ

ตำแหน่งการสุ่ม
เข้าถึงยาก ทำความสะอาดยาก จุดสะสมเศษอาหาร

Non-food contact surfaces เช่น ผนัง รอบๆท่อ

Food contact surfaces เช่น สายพาน เครื่องสไลด์

บริเวณการสุ่ม

Detection of microorganisms
- 1,000 cm^2 - 3,000 cm^2

Enumeration of microorganism
- ≤ 100 cm^2

ช่วงเวลา และความถี่
1.ระหว่าง/หลังกระบวนการผลิต (เช่น ทำงานแล้ว 2 ชม.) , หลังจากทำความสะอาด
2.ความถี่ เช่น ทุกสัปดาห์ (กรณีพื้นที่ไม่เกี่ยวข้องโดยตรงอาจจะเดือนละครั้ง เช่น ห้องเก็บตัวอย่าง)

16

เทคนิคการทำ Swab Test

1

Contact plate method
เหมาะสำหรับทดสอบกับพื้นผิวตัวอย่างแบนเรียบ

2

Stick swab method
เหมาะสำหรับตำแหน่งตัวอย่างเข้าถึงยาก หรือพื้นผิวทั่วไป

3

Sponge/cloth method
เหมาะสำหรับพื้นผิวตัวอย่างมีขนาดใหญ่

17

1.Contact plate method

-ตัวอย่างที่พื้นผิวเรียบ

-กดผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยห้ามเคลื่อนไหว

-ค้างไว้ประมาณ 10 วินาที แล้วปิดฝา

-นำไปเก็บในอุปกรณ์สำหรับขนส่งเพื่อนำส่งตัวอย่าง

*** ไม่ใช้วิธีนี้กับการทดสอบเชิงคุณภาพ

18

2.Stick Swab method

- -ควรใช้กับบริเวณที่เข้าถึงยาก
- -ขนาดของบริเวณทดสอบ ≤ 100 cm^2
- -ขนาดของบริเวณที่เก็บตัวอย่างควรทราบโดยประมาณ
- -ควรมีการระบุตำแหน่งอย่างชัดเจน

01 **Moistened Stick swab**

ไม้ swab แบบชื้น เหมาะสำหรับบริเวณเก็บตัวอย่างที่แห้ง

02 **Dry stick swab**

ไม้ swab แบบแห้ง เหมาะสำหรับบริเวณเก็บตัวอย่างเปียก(นอกจากจำเป็นต้องใช้สารทำให้เป็นกลาง)

19

3.Sponge/cloth method

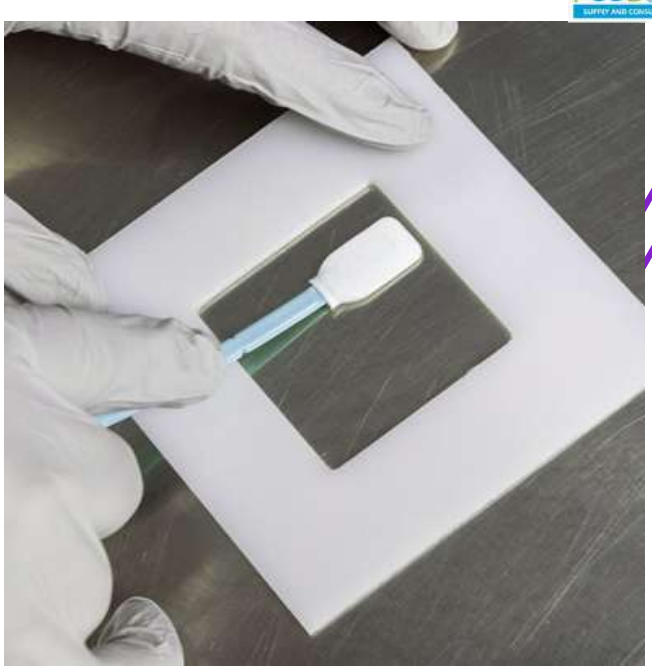
- -สำหรับพื้นที่ขนาดใหญ่ > 100 cm^2
- -สามารถถูกถูลงบนพื้นผิวได้อย่างรวดเร็ว และมีคุณสมบัติดูดซับสูง
- -ควรทำให้ฟองน้ำหรือผ้าชื้นด้วย **diluent/neutralizer** ในปริมาณที่เพียงพอ

1.Moistened sponge/cloth

ฟองน้ำหรือผ้า เหมาะสำหรับบริเวณเก็บตัวอย่างที่แห้ง

2.Dry sponge/cloth

ฟองน้ำหรือผ้า เหมาะสำหรับบริเวณเก็บตัวอย่างที่เปียก (นอกจากจำเป็นต้องใช้สารทำให้เป็นกลาง)



20

เทคนิคปลอดเชื้อสำหรับการเก็บตัวอย่าง

1.การเตรียมอุปกรณ์

01 ใส่อุปกรณ์ปกป้องส่วนบุคคล
(Personal Protective Equipment (PPE))
เช่น หมวกคลุมผม หน้ากากอนามัย ชุดปฏิบัติการ

02 เครื่องมือและวัสดุที่ปลอดเชื้อ
-ก้านสวอป ถุงเก็บตัวอย่างปลอดเชื้อ /ถุงเก็บเศษขยะ แอลกอฮอลล์70%

03 ระบุชื่อบนภาชนะก่อนการเก็บตัวอย่าง
เช่น ชื่อตัวอย่าง วันที่ เวลา สถานที่

2.ระหว่างเก็บตัวอย่าง

04 เครื่องมือที่ปลอดเชื้อห้ามสัมผัสกับพื้นผิวที่ไม่ปลอดเชื้อ
เช่น เมื่อเปิดก้านสวอปแล้วระวังห้ามไปสัมผัสพื้นผิวอื่นก่อนทำการเก็บตัวอย่าง

05 ระวังมือของเราทำให้มีการปนเปื้อนข้าม
เช่น เมื่อทำให้เกิดการตกหล่นแล้วไปสัมผัสก็ควรต้องทำความสะอาดมืออีกครั้งหรือเปลี่ยนถุงมือ

06 เปิดภาชนะเก็บตัวอย่างนานเท่าที่จำเป็น
เช่น การนำก้านสวอปออกจากหลอด ทำการปิดฝาก่อน เมื่อสวอปเสร็จแล้วจึงเปิดฝาหลอดอีกครั้ง

เทคนิคปลอดเชื้อสำหรับการเก็บตัวอย่าง

3.การปฏิบัติหลังการเก็บตัวอย่าง

07 ปิดผนึกและเก็บรักษาตัวอย่างทันทีในที่จัดเก็บที่เหมาะสม
เช่น ปิดผนึกให้แน่นใส่ใน rack /ถุงที่สะอาด และควบคุมอุณหภูมิ

08 ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อเครื่องมือ
เช่น กำจัด/ทิ้ง สิ่งของที่ใช้ครั้งเดียวอย่างเหมาะสม

09 การบันทึกรายละเอียด
เช่น บันทึกรายละเอียดความผิดปกติที่พบ

การเก็บรักษาและการขนส่ง

ระยะเวลาระหว่างการเก็บตัวอย่างและการทดสอบ เร็วที่สุดเท่าที่ทำได้

Contact plate

- เก็บ 1-8 °C , ทำการบ่มภายใน 48 ชั่วโมง

Stick swab ,sponge/cloth

- เก็บ 1-8 °C , ทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง
- เก็บ 3±2 °C , ทดสอบภายใน 48 ชั่วโมง(กรณีทดสอบไม่ทัน)

การวิเคราะห์ตัวอย่าง : Contact plate method

01

การทดสอบ

กดอาหารเลี้ยงเชื้อตรงบริเวณตัวอย่างค้างไว้ 10 นาที นำไปบ่มตามประเภทของเชื้อ

02

เช่น Plate count agar

บ่มอุณหภูมิ 35±1 ° C ,48 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ

03

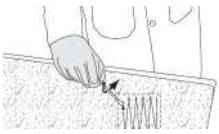
เช่น Potato dextrose agar

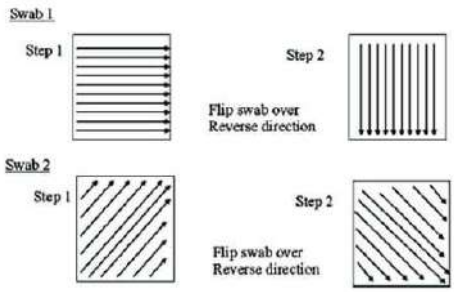
บ่มอุณหภูมิ 25±1 °C ,5 วัน และนับจำนวนโคโลนีบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ

เทคนิคการทำ Swab Test

01

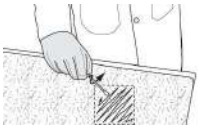
02



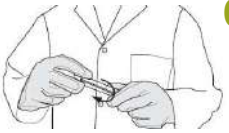


03

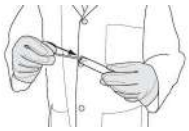
04



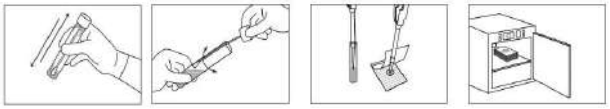
05



06



07



ตัวอย่างก้าน Swab

ก้านสำลีพันปลายไม้

เปิดใช้งานฝั่งด้ามจับ
สัมผัสก้านขณะ
ทดสอบ ทำการหักด้าม
ก่อนนำไปใส่ในหลอด
ทดสอบ

Sponge แบบมีรอยบาก

สัมผัสก้านขณะ
ทดสอบ ทำการหักด้าม
ก่อนไปใส่ในหลอด
ทดสอบ

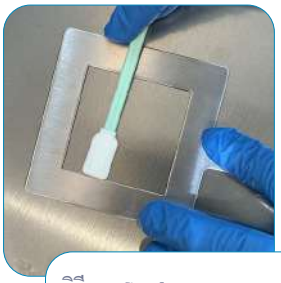
Sponge แบบมีรอยบาก

สัมผัสก้านขณะ
ทดสอบ ทำการหักด้าม
ก่อนไปใส่ในหลอด
ทดสอบ

Stick swab สำเร็จรูป

เวลาทดสอบ มือไม่
สัมผัสก้าน swab

รูปภาพขั้นตอนการ Swab



วิธีการ Swab

- ตารางปลอดเชื้อมีขนาดพื้นที่ตามที่ต้องการ เช่น 50 cm^2
- ห้ามจับต่ำกว่าจุดเส้นบาก

นำก้าน Swab ใส่ใน diluent

- หักด้ามส่วนที่มือจับออก
- นำไปใส่สารเจือจาง

นำส่งตัวอย่าง

- ปิดฝา
- นำใส่กล่องเก็บรักษาอุณหภูมิ

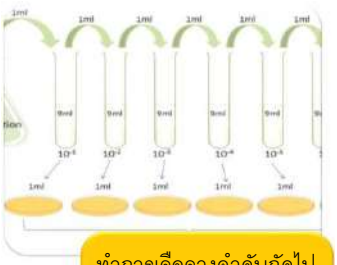
27

การวิเคราะห์ตัวอย่าง:Stick swab test/cloth/sponge method

การทดสอบเชิงปริมาณ : นำไปทดสอบตามชนิดของเชื้อด้วยวิธีที่เหมาะสม

เตรียมตัวอย่างเริ่มต้น

- นำก้าน swab ใส่ลง diluent : 9, 10 ml (stick swab) / 90,100 ml (sponge) /225 ml (cloth)



ทำการเจือจางลำดับถัดไป

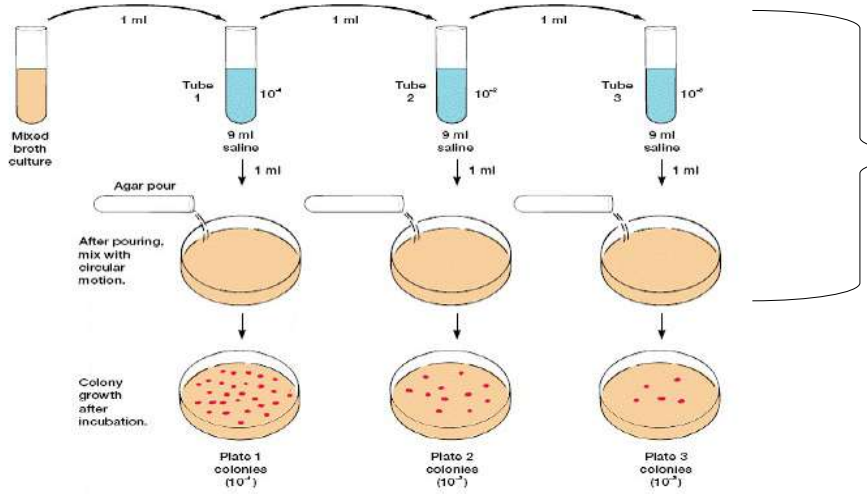
- ปิเปต 1 ml จากการเตรียมตัวอย่างเริ่มต้นใส่ลง diluent 9 ml
- ปิเปต 1 ml ลง plate หรือ 0.1 ml

ทดสอบตามวิธี

- ทำการ pour plate หรือทำ spread plate
- นำไปบ่ม ตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

28

Initial suspension and decimal dilutions



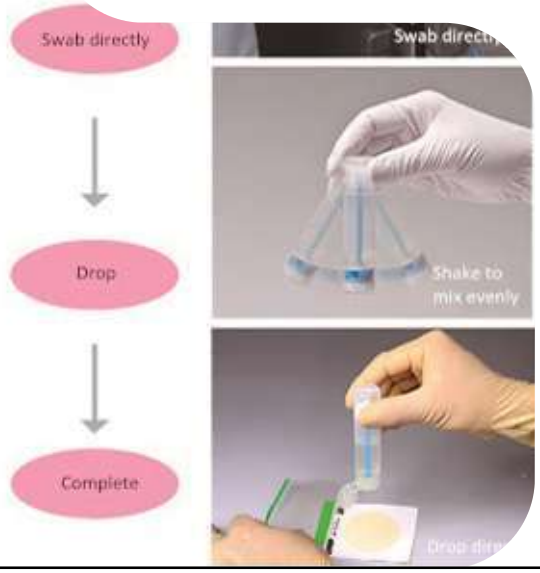
BAM:ไม่เกิน 15 นาที
ISO : ควรน้อยกว่า20
แต่ไม่เกิน 45 นาที

ระยะเวลาตั้งแต่สิ้นสุดการเตรียมตัวอย่างเริ่มต้น จนถึง การเจือจางสุดท้าย และ
อาหารเลี้ยงสัมผัสกับตัวอย่าง ≤15 นาที (ISO:<20 แต่ไม่เกิน 45 นาที)

29

ตัวอย่างการทดสอบ stick swab

ข้อดีคือ ไม่ต้องหักก้าน ล้างแล้วนำไปฆ่าเชื้อแล้วนำกลับมาใช้ใหม่



ทำการผสมให้เข้ากันก่อนนำไปทดสอบ และทำการเจือจางถัดไปได้เลย

นำไปหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือ บนจานเพาะเชื้อ

30

การวิเคราะห์ตัวอย่าง:Stick swab test/cloth/sponge method

การทดสอบเชิงคุณภาพ : ทำการทดสอบตามชนิดของเชื้อด้วยวิธีที่เหมาะสม

1. **Pre-enrichment**
   นำก้าน Swab ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Salmonella* spp +BPW
2. **ทำการทดสอบตามวิธีมาตรฐาน**
   -ตามวิธีแต่ละมาตรฐาน : ISO ,FDA-BAM
3. **การรายงานผล**
   พบ/ไม่พบ ต่อพื้นที่ผิว เช่น ไม่พบ *Salmonella* spp /50 cm^2 , ไม่พบ *Salmonella* spp /ชิ้น

การคำนวณและการรายงานผลทดสอบ

การทดสอบเชิงปริมาณ

Ns : จำนวนโคโลนีต่อพื้นที่ผิวตัวอย่าง

$$N_S = \frac{NxF}{A}\text{xD} \quad (1)$$

- **N** — **จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร**
  จำนวนเชื้อที่นับใน dilution liquid /neutralizing liquid
- **F** — **ปริมาตรของเหลวเริ่มต้น**
  ปริมาตรที่อยู่ในหลอดทดสอบ
- **A** — **พื้นผิวของตัวอย่าง**
  เช่น ตารางเซ็นติเมตร (กรณีเป็นพื้นที่ไม่สามารถวัดได้ ก็นับเป็น 1 เช่น 1 ห้วบรรจุ)
- **D** — **อัตราส่วนกลับของการเจือจาง**
  เช่น 10^{2} เป็นอัตราส่วนกลับของ 10^{-2}

การคำนวณและการรายงานผลทดสอบ

การทดสอบเชิงปริมาณ

ตัวอย่างที่ 1 :ทำการทดสอบพื้นที่ผิว 50 ตร.ซม. รายการ APC

$$\text{จำนวน APC} = \frac{50x10}{50}\text{x}100$$

$$\text{จำนวน APC} = 1{,}000\ \text{CFU/cm}^2$$

N — จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร

พบเชื้อ 10^{-2} :Plate 1 =40 CFU , plate 2=60 CFU

เฉลี่ยโคโลนี =((40+60)/2)=50

F — ปริมาตรของเหลวเริ่มต้น

10 ml

A — พื้นผิวของตัวอย่าง

50 cm^2

D — อัตราส่วนกลับของการเจือจาง

10^2

การคำนวณและการรายงานผลทดสอบ

การทดสอบเชิงปริมาณ

ตัวอย่างที่ 2:ทำการทดสอบพื้นที่ผิวหัวบรรจุ รายการ APC

$$\text{จำนวนเชื้อAPC} = \frac{50x10}{\text{หัวบรรจุ}}\text{x}100$$

$$\text{จำนวนเชื้อAPC} = 50{,}000\ \text{CFU/หัวบรรจุ}$$

N — จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร

พบเชื้อ 10^{-2} :Plate 1 =40 CFU , plate 2=60 CFU

เฉลี่ยโคโลนี =((40+60)/2)=50

F — ปริมาตรของเหลวเริ่มต้น

10 ml

A — พื้นผิวของตัวอย่าง

หัวบรรจุ

D — อัตราส่วนของการเจือจาง

10^2

การคำนวณและการรายงานผลทดสอบ
อาหารทั่วไป ISO7218:2024

สูตรการคำนวณ :
1.ช่วงการนับ APC: 10-300 CFU
2.ช่วงการนับ Y&M:10-150 CFU

N : จำนวนโคโลนีต่อกรัม,มิลลิลิตร

$$N = \frac{\Sigma C}{Vx(n_1+(0.1\ x\ n_2)x\ d} \quad (2)$$

ΣC — ผลรวมจำนวนโคโลนีจากการเจือจางติดกัน
เช่น 10^{-1} :120 , 10^{-2} : 15

V — ปริมาตรที่ใช้ทดสอบในแต่ละจานเพาะเชื้อ
เช่น 1 ml

n1 — จำนวน **plate** การเจือจางแรก
จำนวน plate ในการเจือจางแรก (ที่นำไปใช้ได้)

n2 — จำนวน **plate** การเจือจางที่สอง
จำนวน plate ในการเจือจางถัดมาที่ติดกัน(ที่นำไปใช้ได้ ถ้าใช้ไม่ได้มีค่า=0)

d — ระดับการเจือจางแรกที่นับ
กรณีไม่ได้ทำการเจือจาง d=1

การคำนวณและการรายงานผลทดสอบ
อาหารทั่วไป ISO7218:2024

ตัวอย่างที่ 3 :ทดสอบในตัวอย่างเครื่องดื่ม รายการ APC

$$N = \frac{(250 + 240 + 30 + 25)}{1x(2 + (0.1\ x\ 2)x\ 10^{-1}}$$

$N = 2{,}477$ CFU/ml

$N = 2{,}500$ CFU/ml

$N = 2.5\text{x}10^{3}$ CFU/ml

ΣC — ผลรวมจำนวนโคโลนีจากการเจือจางติดกัน
เช่น 10^{-1} : 250, 240 , 10^{-2} : 30,25 CFU

V — ปริมาตรที่ใช้ทดสอบในแต่ละจานเพาะเชื้อ
เช่น 1 ml

n1 — จำนวน **plate** การเจือจางแรก
= 2

n2 — จำนวน **plate** การเจือจางที่สอง
= 2

d — ระดับการเจือจางแรกที่นับ
= 10^{-1}

การคำนวณและการรายงานผลทดสอบ
อาหารทั่วไป ISO7218:2024

ตัวอย่างที่ 4 :การทดสอบตัวอย่างเครื่องดื่ม รายการ APC

$$N = \frac{(250 + 240)}{1x(2 + (0.1\ x\ 0)x\ 10^{-1}}$$

$$N = 2{,}450\ \text{CFU/ml}$$

$$N = 2{,}500\ \text{CFU/ml}$$

$$N = 2.5\text{x}10^{3}\ \text{CFU/ml}$$

ΣC ผลรวมจำนวนโคโลนีจากการเจือจางติดกัน
เช่น 10^{-1} : 250, 240 , 10^{-2} : 3, 2 CFU

V ปริมาตรที่ใช้ทดสอบในแต่ละจานเพาะเชื้อ
เช่น 1 ml

n1 จำนวน **plate** การเจือจางแรก
= 2

n2 จำนวน **plate** การเจือจางที่สอง
= 0

d ระดับการเจือจางแรกที่นับ
= 10^{-1}

การคำนวณและการรายงานผลทดสอบ
อาหารทั่วไป ISO7218:2024

การทดสอบที่ต้องการยืนยันของจำนวนโคโลนี

สูตรการคำนวณ

$$a = \frac{b}{A}\ \text{x}\ C \quad (3)$$

เมื่อ **A** = จำนวน **presumptive colony ที่เลือกมายืนยันแต่ละจาน**
b = จำนวนโคโลนี**ที่ยืนยันบวกจาก A**
C = จำนวน **presumptive colony ทั้งหมดในจานเพาะเชื้อ**
Σa = จำนวนโคโลนีที่ยืนยันบวกจากทุกจานเพาะเชื้อ
และแทนที่ Σc ด้วย Σa ในสูตร 2

การคำนวณและการรายงานผลทดสอบ

อาหารทั่วไป ISO7218:2024

ตัวอย่างที่ 5 :ทดสอบในตัวอย่างผงปรุงรส รายการ *Bacillus cereus*

พบเชื้อ 10^{-1} : 120 โคโลนี นำมายืนยัน 5 โคโลนี ให้ผล positive 5 โคโลนี
10^{-2} : 10 โคโลนี นำมายืนยัน 5 โคโลนี ให้ผล positive 4 โคโลนี

Dilution แรก a=$\frac{5}{5}$ x $120 = 120$

Dilution ถัดมา a=$\frac{4}{5}$ x $10 = 8$

$$N = \frac{(120 + 8)}{1x(1 + (0.1\ x\ 1)x\ 10^{-1}}$$

$$N = 1{,}163\ \text{CFU/g}$$

$$N = 1{,}200\ \text{CFU/g}$$

$$N = 1.2\text{x}10^{3}\ \text{CFU/g}$$

39

การคำนวณและการรายงานผลทดสอบ

ตัวอย่างที่ 6 : ทำการทดสอบพื้นที่ผิว 50 ตร.ซม.
รายการ *S. aureus* ปริมาตรเริ่มต้น 10 ml
พบเชื้อ 10^{-1} : 120 โคโลนี นำมายืนยัน 5 โคโลนี ให้ผล positive 5 โคโลนี
10^{-2} : 10 โคโลนี นำมายืนยัน 5 โคโลนี ให้ผล positive 4 โคโลนี

สูตร3

Dilution แรก a=$\frac{5}{5}$ x $120 = 120$

Dilution ถัดมา a=$\frac{4}{5}$ x $10 = 8$

สูตร2

$$N = \frac{(120 + 8)}{1x(1 + (0.1\ x\ 1)x\ 10^{-1}}$$

$$N = 1{,}163\ \text{CFU}$$

สูตร1

จำนวนเชื้อ $= \frac{1163x10}{50}$x ...**

= 232 CFU/ตร.ซม.

= 230 CFU/ตร.ซม.

**ไม่ได้นำมาคูณ เนื่องจากคูณแล้วในสูตร 2

40

การคำนวณและการรายงานผลทดสอบ

หลักการปัดเศษ

- **ตำแหน่งที่สามเป็นเลข 6 ,7,8,9 ให้ทำการปัดตำแหน่งที่สองขึ้น**
  เช่น 13,700 ปัดเป็น 14,000
- **ตำแหน่งที่สามเป็นเลข 1 ,2 ,3, 4 ให้ทำการปัดทิ้ง**
  เช่น 13,200 ปัดเป็น 13,000.
- **ตำแหน่งที่สามเป็นเลข 5 ให้พิจารณาตำแหน่งที่สอง (FDA-BAM)**
  1.ตำแหน่งที่สองเป็นเลขคู่ ให้ปัดทิ้ง เช่น 14,500 ปัดเป็น 14,000
  2.ตำแหน่งที่สองเป็นเลขคี่ ให้ปัดขึ้น เช่น 15,500 ปัดเป็น 16,000
  .
- **ตำแหน่งที่สามเป็นเลข 5 ให้ทำการปัดข้น (ISO)**
  เช่น 14,500 ปัดเป็น 15,000

41

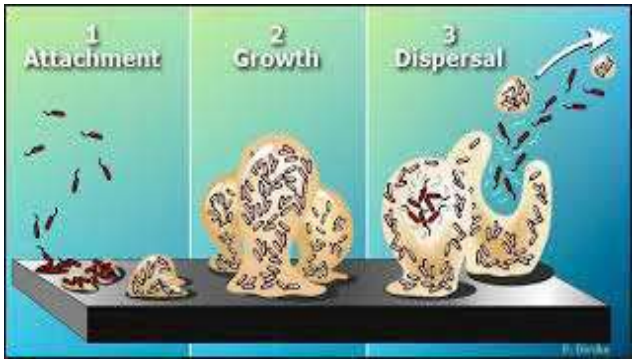
ตัวอย่างแหล่งที่พบการปนเปื้อน

1. **สิ่งแวดล้อมที่มีแหล่งกำเนิดจากสัตว์**
   เช่น เนื้อสัตว์ สัตว์ปีก ไข่ ผลิตภัณฑ์นม
2. **สภาพแวดล้อมที่มีความชื้น**
   เช่น โรงงานผลิต : นม อาหารทะเล สัตว์ปีก
3. **เครื่องมือสำหรับทำขนาดต่างๆ**
   เช่น เครื่องสไลซ์ เครื่องหั่นเต๋า
4. **เครื่องบรรจุ**
   เช่น เครื่องกรอก
5. **พื้นผิวพื้น อุปกรณ์**
   เช่น รอยแตก ร่องลึกในพื้น รอยแยกของอุปรกรณ์
6. **โครงสร้างของโรงงาน**
   เช่น ระบบการจัดการอากาศ ท่อระบายน้ำ

42

Biofilm

คือ กลุ่มของแบคทีเรียที่เกาะติดอยู่กับพื้นผิวที่เปียกชื้น ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติจากแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำ (Planktonic cells) มันจะสร้างฟิลม์บางๆ เพื่อเป็นที่อยู่อาศัยของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียอื่นมาเกาะติดได้ง่ายขึ้นและกลายเป็นแหล่งที่อยู่ชั้นดีของจุลินทรีย์มากมาย



- คราบสะสมที่เกาะติดแน่นบนพื้นผิวของเครื่องมือ
- มักเกิดที่พื้นผิวหยาบ ขรุขระ มีแรงตึงผิวสูง
- เซลล์แบคทีเรีย น้ำ โพลีแซคคาไรด์ ไกลโคโปรตีน
- เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์
- ทำให้การใช้ detergent และสารฆ่าเชื้อไม่ได้ผล
- กำจัดได้โดยการใช้แรงขัด และสารเคมีที่เหมาะสม

Biofilm

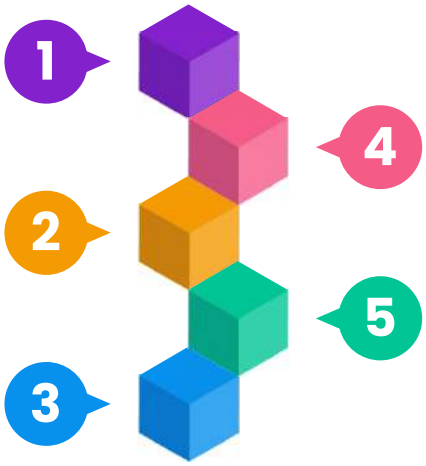
การป้องกัน การลดโอกาส หรือการควบคุมการปนเปื้อน การเกิดแหล่งสะสมของเชื้อจุลินทรีย์

ตัวอย่างอุตสาหกรรมที่สุ่มตัวอย่างด้านสิ่งแวดล้อมต้องปฏิบัติตามระเบียบด้านสุขภาพและความปลอดภัย

ทางการแพทย์
ต้องปลอดเชื้อและสะอาดเพื่อให้แน่ใจว่าผู้ป่วยจะไม่ได้รับเชื้อโรคที่เป็นอันตรายขณะอยู่ในการดูแล เช่น ห้องผ่าตัด เครื่องมือแพทย์

สัตว์แพทย์
ต้องการสภาพแวดล้อมที่ปลอดเชื้อเมื่อดูแลสัตว์ป่วย

ยา/เทคโนโลยีชีวภาพ
ต้องมีสภาพแวดล้อมที่สะอาดปราศจากเชื้อเป็นสิ่งจำเป็นในกระบวนการผลิตเพื่อให้แน่ใจว่าเภสัชภัณฑ์และชีวเภสัชภัณฑ์ปลอดภัยสำหรับผู้ป่วย



เครื่องสำอาง
จะมีข้อกำหนดที่ไม่เข้มงวดเท่าอาหารและยา แต่ก็ยังดูแลการพัฒนาเครื่องสำอางเพื่อให้แน่ใจว่าปลอดภัยสำหรับผู้คนที่ใช้

อาหารและเครื่องดื่ม
การเตรียมอาหารในสภาพแวดล้อมที่ปราศจากสารเคมีและเชื้อโรคที่เป็นอันตราย ตั้งแต่การเตรียมวัตถุดิบจนถึงการบรรจุหีบห่อจนถึงการเก็บรักษา

ตัวอย่าง: การเลือกใช้สารละลายหรือสารทำให้เป็นกลางที่เหมาะสม

เพื่อรักษาความมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์

- **Neutralizing solution**
  ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อในผลิตภัณฑ์นม อุปกรณ์อาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนหรือน้ำยาฆ่าเชื้อแบบปราศจากแอลกอฮอล์ (Quaternary ammonium compound) สารละลายประกอบด้วยเลซิติน โพลีซอร์เบต 80และโซเดียมไธโอซัลเฟต ซึ่งทำให้สารทำความสะอาดที่ต้านเชื้อแบคทีเรียเป็นกลาง เช่น Phosphate-Buffered Saline (PBS) หรือ น้ำเกลือ (Saline solution)

- **Buffered peptone water**
  เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่ใช้เพิ่มจำนวนขั้นต้น (pre-enrichment nonselective buffered solution) ที่ช่วยในการซ่อมแซมเซลล์ที่เสียหายและส่งเสริมการฟื้นฟูสภาวะที่เชื้ออาจจะเกิดการอ่อนแอและบาดเจ็บ เช่น ตรวจหา *Salmonella* spp

- **Letheen broth**
  เหมาะสำหรับการทดสอบเชิงคุณภาพของการทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อแบบปราศจากแอลกอฮอลล์ (Quaternary ammonium compounds) อาหารกลุ่มนี้จะมีสารที่ช่วยทำให้สารละลายเป็นกลาง เช่น เลซิตินทำให้สารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมเป็นกลาง และโพลีซอร์เบต 80 จะทำให้สารฆ่าเชื้อฟีนอลิก เฮกซะคลอโรฟีน และฟอร์มาลินเป็นกลาง

ตัวอย่าง: การเลือกใช้สารละลายหรือสารทำให้เป็นกลางที่เหมาะสม

เพื่อรักษาความมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์

- **Butterfield's Solution (Butterfield's Phosphate Buffered, BPB**
  สารละลายที่ใช้สำหรับเจือจางเพื่อการทดสอบจำนวนของจุลินทรีย์โดยไม่ส่งเสริมต่อการเพิ่มจำนวน ใช้ทั้งอุตสาหกรรมยาและอาหาร นอกจากนี้นิยมใช้เป็นสารละลายเจือจางเมื่อจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างสูงเกินไปด้วยเทคนิคการเจือจางแบบอนุกรม (serial dilution)

- **D/E Neutralizing Broth**
  สารละลายที่เหมาะสำหรับการสุ่มเก็บตัวอย่างด้านสิ่งแวดล้อมโดยมีสารเคมีที่ช่วยให้สารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียมีค่าเป็นกลางได้แก่ สารเคมีน้ำยาฆ่าเชื้อ รวมถึงสารปรอท ไอโอดีน และคลอรีนควอเทอร์นารี สารประกอบแอมโมเนีย ฟีนอล ฟอร์มาลดีไฮด์ และกลูตาราลดีไฮด์ การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และหรือมีความขุ่นเกิดขึ้น

- **Neutralizing Buffered Peptone Water**
  คือสารละลายที่เหมาะสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ได้รับบาดเจ็บจากทางอุตสาหกรรม เช่น น้ำล้างไลน์ผลิตของสัตว์ปีก ก่อนที่จะนำไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวนขั้นต้นและการคัดแยกแบบเฉพาะเจาะจง นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของสารที่ทำให้เป็นกลางเพื่อลดผลกระทบต่อเซลล์จากยาต้านจุลชีพ

47

ตัวอย่าง stick sponge

1. เป็นฟองน้ำสำหรับเก็บเชื้อบนพื้นผิวอุปกรณ์ที่เข้าถึงยาก เช่น ท่อระบายน้ำ
2. ผลิตจากโพลียูรีเทนปราศจากสารฆ่าเชื้อพร้อมด้ามจับพลาสติก บรรจุในถุงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
3. สามารถเก็บหมุนด้ามจับเพื่อถอดฟองน้ำออกหลังจากเก็บตัวอย่างได้อย่างง่ายดาย
4. สามารถเลือกใช้งานกับสารละลายบัฟเฟอร์ได้หลากหลายชนิด เช่น **Buffered peptone water , Letheen broth ,Neutralizing buffer**

48

ตัวอย่างที่ 7 : ฝาขวด

ทดสอบ *Salmonella* spp.: ISO 6579

01 **Swab ฝาขวด**
ทำการ swab พื้นที่ภายในฝา

02 **Pre-enrichment**
นำก้าน swab ใส่ลงใน Buffer peptone water 90 ml

03 **ทดสอบ**
นำไปทดสอบตามวิธีอ้างอิง

04 **การรายงานผล**
พบ/ไม่พบ ต่อ ฝาขวด

49

ตัวอย่างที่ 8 : สายพานลำเลียง

ทดสอบ *Salmonella* spp.: ISO 6579

01 **Swab สายพานลำเลียง**
ทำการ swab : 50 cm^2

02 **Pre-enrichment**
นำก้าน swab ใส่ลงใน Buffer peptone water 90 ml

03 **ทดสอบ**
นำไปทดสอบตามวิธีอ้างอิง

04 **การรายงานผล**
พบ/ไม่พบ ต่อ 50 cm^2

50

ตัวอย่างที่ 9 : ฝาขวด (ทดสอบหลายรายการ)

ทำการทดสอบ : APC , Y&M ,*E.coli*(MPN:3:3:3)

1 Swab ฝาขวด

ทำการ swab พื้นที่ภายในฝา

2 Diluent Fluid

นำก้าน swab ใส่ลงใน Buffer peptone water 10 ml

3 ทดสอบ

ปิเปต 1 ml ใส่ plate จำนวน 2 plate ทำ 2 ชุด :ทดสอบ APC 1 ชุด , ทดสอบ Y&M 1 ชุด และ 1 ml ใส่หลอด LST จำนวน 3 หลอด (ปริมาตรที่ใช้ไป 7 ml)

4 การรายงานผล

APC : CFU/ฝาขวด , Y&M ; CFU/ฝาขวด , *E.coli* : MPN/ฝาขวด

***สำหรับรายการ *E.coli* ต้องทำการเจือจางถัดไป 10^{-2} ,10^{-3}

ตัวอย่างที่ 10:สายพานลำเลียง (ทดสอบหลายรายการ)

ทำการทดสอบ : APC , Y&M ,*E.coli*(MPN:3:3:3)

1 Swab สายพานลำเลียง

ทำการ swab : 50 cm^2

2 Diluent Fluid

นำก้าน swab ใส่ลงใน Buffer peptone water 10 ml

3 ทดสอบ

ปิเปต 1 ml ใส่ plate จำนวน 2 plate ทำ 2 ชุด :ทดสอบ APC 1 ชุด , Y&M 1 ชุด และ 1 ml ใส่หลอด LST จำนวน 3 หลอด (ปริมาตรที่ใช้ไป 7 ml)

4 การรายงานผล

-APC : CFU/50 cm^2 , Y&M ; CFU/50 cm^2 , *E.coli* : MPN/50 cm^2

-APC : CFU/cm^2 , Y&M ; CFU/cm^2

***สำหรับรายการ *E.coli* ต้องทำการเจือจางถัดไป 10^{-2} ,10^{-3}

ตัวอย่างที่ 11:สายพานลำเลียง (ทดสอบหลายรายการ)

ทำการทดสอบ : APC , Y&M ,*E.coli*(MPN:3:3:3),*Salmonella* spp

1 **Swab สายพานลำเลียง**

ทำการ swab : 50 cm^2

2 **Diluent Fluid**

นำก้าน swab ใส่ลงใน Buffer peptone water 10 ml

3 **ทดสอบ**

ปิเปต 1 ml ใส่ plate จำนวน 2 plate ทำ 2 ชุด :ทดสอบ APC 1 ชุด ,Y&M 1 ชุด และ 1 ml ใส่หลอด LST จำนวน 3 หลอด (ปริมาตรที่ใช้ไป 7 ml)

สำหรับรายการ *Salmonella* เทสารละลายที่เหลือทั้งหมดใส่ BPW 90 ml

4 **การรายงานผล**

-APC : CFU/50 cm^2 , Y&M ; CFU/50 cm^2 , *E.coli* : MPN/50 cm^2
,*Salmonella* spp. : พบ,ไม่พบ/ 50 cm^2
-APC : CFU/cm^2 , Y&M ; CFU/cm^2

***สำหรับรายการ *E.coli* ต้องทำการเจือจางถัดไป 10^{-2} ,10^{-3}

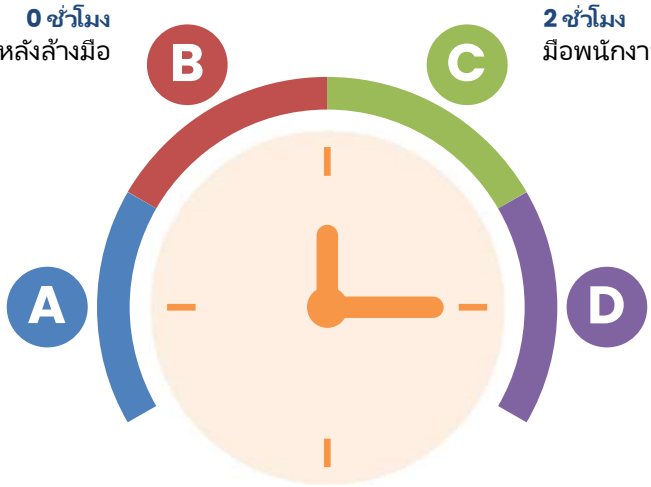
53

ตัวอย่างที่ 12: การทำ Swab มือพนักงาน

กรณีพนักงานไม่ได้สวมถุงมือปฏิบัติงาน

0 ชั่วโมง
มือพนักงานหลังล้างมือ

2 ชั่วโมง
มือพนักงานทำงาน 2 ชม.



ก่อนล้าง
มือพนักงานก่อนล้างมือ

4 ชั่วโมง
มือพนักงานทำงาน 4 ชม.

54

ตัวอย่างที่ 12:มือ (ทดสอบหลายรายการ) (ต่อ)

ทำการทดสอบ : APC , Y&M ,*E.coli*(/ml),*Salmonella* spp

1 Swab มือ

ทำการ swab : มือด้านหน้าและด้านหลัง (บริเวณสัมผัสอาหาร)

2 Diluent Fluid

นำก้าน swab ใส่ลงใน Buffer peptone water 10 ml

3 ทดสอบ

ปิเปต 1 ml ใส่ plate จำนวน 4 plate :ทดสอบ APC และ Y&M (อย่างละ 2 plate)

และ 1 ml ใส่หลอด LST จำนวน 2 หลอด (ปริมาตรที่ใช้ไป 6 ml)

สำหรับรายการ *Salmonella* เทสารละลายที่เหลือทั้งหมดใส่ BPW 90 ml

4 การรายงานผล

-APC : CFU/มือ , Y&M ; CFU/มือ , *E.coli* :พบ,ไม่พบ/มือ ,

Salmonella spp : พบ,ไม่พบ/มือ

55

ตัวอย่างที่ 13 :มือ (ทดสอบ 1 รายการ)

ทำการทดสอบ : *Salmonella* spp

1 Swab

ทำการ swab : มือด้านหน้าและด้านหลัง (บริเวณสัมผัสอาหาร)

2 Diluent Fluid

นำก้าน swab ใส่ลงใน Buffer peptone water 90 ml

3 ทดสอบ

นำ BPW 90 ml ทำการบ่ม และทดสอบตามความเหมาะสม

4 การรายงานผล

-*Salmonella* spp. :พบ,ไม่พบ/มือ

56

ตัวอย่างที่ 14 :เชิงคุณภาพ (กรณีตัวอย่างมีพื้นที่กว้าง)

ทำการทดสอบ : *Salmonella* spp , *E. coli*

บริเวณที่ 1:***Salmonella* spp.**

Swab :50 cm ^{2} → นำก้าน swab ใส่ลง BPW 90 ml → นำไปบ่ม และทดสอบตามวิธี

บริเวณที่ 2: ***E.coli***

Swab :50 cm ^{2} → นำก้าน swab ใส่ลง LST 10 ml → นำไปบ่ม และทดสอบตามวิธี

1.Buffer peptone water :BPW
2.Lauryl sulfate tryptose broth : LST

57

ตัวอย่างที่ 15 : การใช้ชุด Swab กรมวิทย์

58

ตัวอย่างที่ 16 : ทดสอบหลายรายการ
ทำการเก็บตัวอย่างด้วย Sponge + 25 ml buffer ทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
Compendium ,chapter3:2015
เชิงคุณภาพ
ดูดปริมาตร 10 ml แต่ละรายการ
(ใช้ปริมาตรทั้งหมด 20 ml)
เชิงปริมาณ
ดูดปริมาตร 1 ml ลงplate จำนวน 2 plate
(ใช้ปริมาตรทั้งหมด 4 ml)
Salmonella spp
L.monocytogenes
Aerobic plate count
Yeasts & Molds
Pre-enrichment broth
ทดสอบ 1:10 หรือ เจือจางตามวิธีทดสอบ
ทำ serial dilution
นำไป pour plate ด้วยอาหารเลี้ยง
59

การทดสอบ ATP (Adenosine triphosphate)
อะดีโนซีนไตรฟอสเฟส (ATP) เป็นสารเคมีที่พบในเซลล์สิ่งมีชีวิตและสารตกค้างจากแหล่งอินทรีย์
Compendium chapter 3,2015
แหล่งสารอินทรีย์ตกค้าง
ประโยน์ที่ได้รับ
01
เศษอาหารที่เหลืออยู่บนพื้นผิว
หลังจากการทำความสะอาด
02
ไบโอฟิล์มที่ผลิตโดยแบคทีเรีย
03
พื้นผิวที่ผู้ปฏิบัติงานสัมผัส
สามารถตรวจสอบ
ประสิทธิภาพด้านสุขอนามัยได้
อย่างรวดเร็วแบบเรียลไทม์
01
สามารถระบุพื้นที่ที่อาจยังมีสาร
ปนเปื้อนหลังจากการทำความ
สะอาด
02
สามารถดำเนินการแก้ไขได้
อย่างรวดเร็ว
03
60

ตัวอย่าง : การทดสอบ ATP

Step 1 : Swab

Step 2: เครื่องมือวัด

Step 3:การอ่านผล

1. ใช้สำลีป้ายเก็บตัวอย่างจากพื้นผิวที่ต้องการตรวจสอบ
2. นำสำลีไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดการเรืองแสง ATP
3. เครื่องวัดการเรืองแสงจะทำปฏิกิริยากับ ATP ทำให้เกิดการเรืองแสง (bioluminescence)
4. ปริมาณแสงที่เกิดขึ้นจะบ่งบอกถึงปริมาณ ATP ที่มีอยู่ในตัวอย่าง
5. โดยทั่วไปผลลัพธ์จะแสดงเป็นตัวเลขในหน่วยแสงสัมพัทธ์ (RLU) โดยค่า RLU สูงแสดงว่าจำเป็นต้องทำความสะอาดเพิ่มเติม

61

ความแตกต่างของการทดสอบ

ระหว่างวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา และ ATP

การทดสอบทางจุลชีววิทยา	ATP
01 สามารถระบุชนิดและนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์	ไม่สามารถระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ 01
02 ระยะเวลาทดสอบนาน	ผลทดสอบทันต่อเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นจริง (real-time) 02
03 ไม่สามารถแก้ปัญหาการผลิตได้ทันเวลา	ประสิทธิภาพของการทำความสะอาดเพื่อแก้ปัญหาการผลิต 03

62

Rinse Solution Method

Compendium chapter 3,2015 :
Microbiological monitoring of the food processing environment

63

Rinse Solution Method

สำหรับเก็บตัวอย่างบรรจุภัณฑ์ (packaging)
Compendium , chapter 3:2015

01 -1 บรรจุภัณฑ์ ≤ 1 lit
เติม Butterfield' phosphate buffer 20 ml

01-2 บรรจุภัณฑ์ 1.89 lit
เติม Butterfield' phosphate buffer 50 ml

01-3 บรรจุภัณฑ์ ≥ 3.78 lit
เติม Butterfield' phosphate buffer 100 ml

02
-เขย่าแนวนอน 10 ครั้ง -หมุนแนวตั้ง 90 องศา เขย่าแนวนอนอีก 10 ครั้ง -จากนั้นหมุน 90 องศา 2 ครั้ง ทำการเขย่าแนวนอนอีก 10 ครั้ง -แล้วหมุนภาชนะตั้งตรงในแนวตั้ง และหมุนวนวงเล็กๆ อย่างแรง 20 ครั้ง แล้วกลับด้านทำซ้ำอีกครั้ง แล้วตั้งภาชนะในแนวตั้งก่อนนำไปทดสอบ

03
Coliform , Aerobic plate count
-ปิเปต 10 ml. กระจายใส่ลง 3 plate (3,3,4 ml)

04
Pour plate 12-20 ml
- Plate count agar :APC
- Violet red bile agar :Coliform

05
นำไปบ่มตามความเหมาะสม และยืนยันผลตามวิธีนั้นๆ

64

Rinse Solution Method

การคำนวณ

จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ CFU/container

=(จำนวนโคโลนีที่นับได้ทั้งหมด x ปริมาตรสารละลายที่ใช้ $rinse$)/ปริมาตรที่ใช้ทดสอบ

A

ตัวอย่าง : ขวด PET ขนาด 1 ลิตร

-นับเชื้อ 20 CFU (นับรวมกันทั้ง 3 plates)
=(20 CFU x 20 ml)/10 ml =40 CFU

B

ตัวอย่าง: ขวด : PET ขนาด 1.5 ลิตร

-นับเชื้อ 20 CFU (นับรวมกันทั้ง 3 plates)
=(20 CFU x 50 ml)/10 ml =100 CFU

65

Rinse Solution Method

กรณีสารละลายในการ rinse ตั้งแต่ 50 ml ใช้ membrane filtration

1

01-1 บรรจุภัณฑ์ 1.89 lit

เติม Butterfield' phosphate buffer 50 ml

01-2 บรรจุภัณฑ์ ≥3.78 lit

เติม Butterfield' phosphate buffer 100 ml

1

2

Coliform, APC

เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรอง

3

เตรียม plate ชนิดแข็ง

-APC :นำแผ่นกรองมาวางบน PCA agar
-Coliform: นำแผ่นกรองมาวางบน VRBA

4

นำไปบ่ม และยืนยันผล

ตามความเหมาะสมของวิธีนั้นๆ

66

Rinse Solution Method

การคำนวณและการรายงานผล

จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ CFU/container
=จำนวนโคโลนีที่นับได้ทั้งหมด บน plate : Aerobic plate count
หรือจำนวนโคโลนีหลังทำการยืนยันผล : Coliform

A

ตัวอย่าง : ขวด PET ขนาด 1.5 ลิตร
-APC นับเชื้อ 20 CFU /plate
รายงานผลเป็น : 20 CFU /container

B

ตัวอย่าง: ขวด PET ขนาด 3.5 ลิตร
-Coliform นับเชื้อเบื้องต้น 30 CFU
นำไปทำการยืนยัน 5 CFU ให้ผลบวก 4 CFU
= (4/5)x30=24
รายงานผลเป็น :24 CFU/container

Rinse Solution Method

การคำนวณและการรายงานผล

ตัวอย่างที่ 17 : ทดสอบกับขวด PET ขนาด 500 ml รายการ APC และ *Salmonella* spp.

จำนวน APC = (15x20)/10
= 30 CFU/ขวด

1 **ปริมาตร** Butterfield' phosphate buffer 20 ml

2 **รายการทดสอบ**
-APC 10 ml :ทดสอบ 3 plate (3,3,4 ml)
-*Salmonella* spp : 10 ml

3 **ผลทดสอบ**
- APC นับรวม 3 plate : 15 CFU
- *Salmonella* spp : พบ

4 **การรายงานผล**
1. APC = 30 CFU/ขวด
2. *Salmonella* spp : พบ/ขวด

Rinse Solution Method

การคำนวณและการรายงานผล

ตัวอย่างที่ 18 : ทดสอบกับขวด PET ขนาด 2,000 ml รายการ *Salmonella* spp.

1 **ปริมาตร** Butterfield' phosphate buffer 50 ml

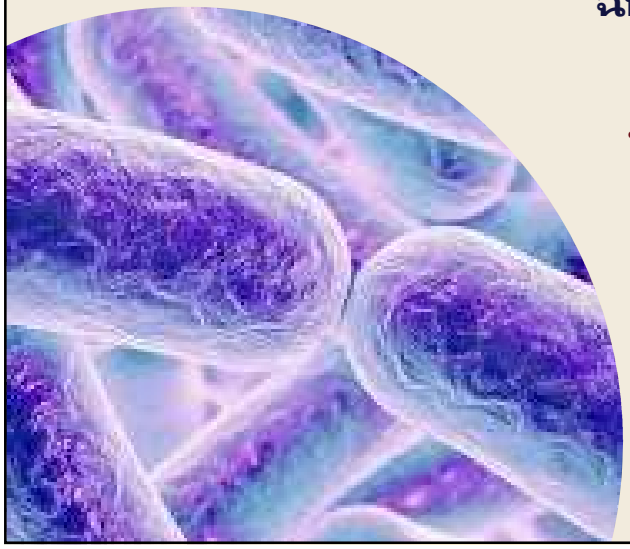
2 **รายการทดสอบ**
Samonella spp : 50 ml นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วนำกระดาษกรองใส่ลงใน BPW 90 ml และทดสอบตามวิธี

3 **ผลทดสอบ**
Salmonella spp : พบ

4 **การรายงานผล**
Salmonella spp : พบ/ขวด

69

2.เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 : 2560



ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

70

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3:2560

ข้อ 7 ภาชนะสัมผัสอาหาร , ข้อ 8 พื้นผิวสัมผัสอาหาร ,ข้อ 9 มือผู้สัมผัสอาหาร

ภาชนะสัมผัสอาหาร
เช่น จาน ชาม ถ้วย แก้วน้ำ ตะเกียบ

พื้นผิวสัมผัสอาหาร
เช่น พื้นผิวโต๊ะประกอบอาหาร
ซองบรรจุอาหาร

มือผู้สัมผัสอาหาร
เช่น มือพนักงาน ถุงมือ

71

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3:2560

ภาชนะสัมผัสอาหาร

01 จำนวนจุลินทรีย์ CFU/ชิ้นภาชนะต่อคู่
น้อยกว่า 1,000

02 *Staphylococcus aureus* / ชิ้นภาชนะหรือต่อคู่
ไม่พบ

03 *Salmonella* spp./ชิ้นภาชนะหรือต่อคู่
ไม่พบ

72

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3:2560

พื้นผิวสัมผัสอาหาร

(2x25 ตร.ซม. หรือ 5x10 ตร.ซม.)

01 จำนวนจุลินทรีย์ CFU/ตารางเซนติเมตร
น้อยกว่า 100

02 *Staphylococcus aureus* /50 ตร.ซม
ไม่พบ

03 *Salmonella* spp./50 ตร.ซม.
ไม่พบ

04 *Clostridium perfringens*/50 ตร.ซม.
ไม่พบ

05 *Bacillus cereus* /50 ตร.ซม.
ไม่พบ

06 *Escherichia coli*/50 ตร.ซม.
ไม่พบ

73

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3:2560

มือพนักงาน

1. จำนวนจุลินทรีย์ CFU/มือ
น้อยกว่า 500

2. *Escherichia coli* หรือ Fecal coliform/มือ
ไม่พบ

3. *Staphylococcus aureus*/มือ
ไม่พบ

4. *Salmonella* spp./มือ
ไม่พบ

74

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3:2560

ภาชนะสัมผัสอาหาร : การสุ่มจำนวนชิ้นภาชนะ/ตัวอย่าง

1. สุ่มตัวอย่างชนิดเดียวกัน 4 ชิ้นภาชนะ/ตัวอย่าง
2. ภาชนะที่ใช้เป็นคู่ เช่น ตะเกียบหรือช้อน-ส้อม
   -ตะเกียบ 4 คู่/ตัวอย่าง
   -ช้อน-ส้อม 4 คู่/ตัวอย่ง (ถ้าตรวจแยก สุ่มอย่างละ 4 ชิ้น/ตัวอย่าง)
3. ภาชนะที่ใช้เพียงชิ้นเดียว เช่น เขียง มีด
   ให้สุ่ม 1 ชิ้นภาชนะ

75

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3:2560

ภาชนะสัมผัสอาหาร : วิธี swab ภาชนะ

1. **แก้วน้ำ ถ้วยกาแฟ**
   เช็ดส่วนที่สัมผัสของเหลวด้านในภาชนะ
2. **จาน ชาม ถ้วย**
   เช็ดส่วนที่สัมผัสอาหารด้านในภาชนะ
3. **ตะเกียบ**
   เช็ดโดยรอบจากปลายชิ้นมา 1 นิ้วครึ่ง
4. **มีด**
   เช็ดส่วนที่ใช้ตัดอาหารทั้งสองด้าน
5. **เขียง ถาด**
   เช็ดตรงกลางภาชนะ พื้นที่ 50 ตร.ซม.

76

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3:2560

มือพนักงาน : วิธี swab มือ

1. **เช็ดมือที่สัมผัสอาหารข้างที่ถนัดมือเดียว**
   โดยหงายฝ่ามือขึ้น ใช้ไม้ swab เช็ดฝ่ามือและรอบนิ้วทุกนิ้ว หรือเช็ดส่วนของมือที่ใช้หยิบสัมผัสอาหาร
2. **กรณีตรวจสอบทุกรายการตามเกณฑ์**
   ผลทดสอบแต่ละรายการเป็นผลของส่วนหนึ่งของมือ เช่น swab 1 มือ แล้วใส่ในหลอดบรรจุ diluent 10 ml
3. **ควรทดสอบหลังทำความสะอาดมือ**

- Aerobic plate count: 1 ml ลง plate จำนวน 2 plate
  - นับได้ 10 ,12 CFU จะได้เป็น 11x10 =110 CFU/มือ
- *Escherichia coli* : 1 ml ลง LST จำนวน 2 หลอด
  - พบ,ไม่พบ/มือ
- *S. aureus* : 1 ml ลง TSB+10%Nacl+1%sodium piruvate
  - พบ ไม่พบ/มือ
- *Salmonella* spp.: ปริมาตรที่เหลือ ใส่ลง BPW
  - พบ, ไม่พบ/มือ

77

เกณฑ์การประเมินการทำ Swab test

≤100 CFU/อุปกรณ์หนึ่งชิ้น หรือต่อพื้นผิวอุปกรณ์

ตามแนวทางของกรมบริการสาธารณสุขสหรัฐฯ Compendium ,chapter 3:2015

เชิงปริมาณ

01 **จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (ไม่ได้ระบุชนิด)**
≤ 100 CFUต่ออุปกรณ์หนึ่งชิ้น หรือต่อพื้นผิวอุปกรณ์

02 **จำนวนจุลินทรีย์ กับพื้นที่จุดสำคัญ**
พิจารณาตามชนิดของเชื้อที่มีความสำคัญต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์

เชิงคุณภาพ

01 **เชื้อก่อโรค**
ไม่พบ เช่น *Salmonella* spp. ,*Listeria monocytogenes*

02 **เชื้อชี้บ่งสุขลักษณะ**
ไม่ควรพบ เช่น Enterobacteriaceae , Coliform ถูกกำจัดได้ง่ายด้วยการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ

78

การตรวจสอบSterility อุปกรณ์

การประยุกต์ใช้งานกับห้องปฏิบัติการ

79

การตรวจสอบ Sterility อุปกรณ์

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้งานในห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจสอบเชิงคุณภาพ

ช้อน แท่งแก้วงอ ปากคีบ
-ทำการ swab โดยใช้ stick swab เสร็จแล้วนำใส่ลง TSB นำไปบ่ม 35 °C , 24 ชม.

ถุงปลอดเชื้อ โถปั่น
-เท TSB ปริมาตรตามเหมาะสม เขย่าให้สัมผัสให้ทั่ว นำไปบ่ม 35 °C , 24 ชม.

จานเพาะเชื้อ
ทำการเท PCA ทิ้งไว้ให้แข็ง นำไปบ่ม 35 °C , 48 ชม.

การประเมินผลทดสอบ : ต้องไม่พบการเจริญของเชื้อ

80

การตรวจสอบ **Sterility** อุปกรณ์

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้งานในห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจสอบเชิงคุณภาพ

กรรไกร

-ทำการ swab โดยใช้ stick swab เสร็จแล้วนำใส่ลง TSB นำไปบ่ม 35 °C , 24 ชม.

ชุดหัวกรองน้ำ

แกะส่วนประกอบแยกเป็นชิ้นๆ นำใส่ถุงปลอดเชื้อ เท TSB ให้ท่วม ปิดปากถุง และทำการเขย่า นำไปบ่ม 35 °C ,24 ชม.

กระดาษกรอง

พับเล็กๆนำไปใส่หลอด TSB ปริมาตร 10 ml นำไปบ่ม 35 °C , 24 ชม.

การประเมินผลทดสอบ : ต้องไม่พบการเจริญของเชื้อ

81

การตรวจสอบ **Sterility** อุปกรณ์

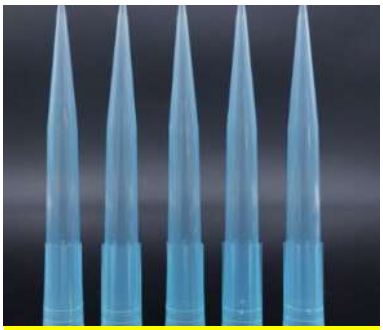
ตัวอย่างการประยุกต์ใช้งานในห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจสอบเชิงคุณภาพ

ปิเปต

-ใช้ TSB 10 ml แล้วใช้ปิเปตดูดขึ้นจนถึงสเกลขีดบน แล้วก็ปล่อยลงในหลอดเดิม นำไปบ่ม 35 °C , 24 ชม.

หลอดทดสอบ 13x100 mm

-เท TSB ปริมาตรตามเหมาะสม เขย่าให้สัมผัสให้ทั่ว นำไปบ่ม 35 °C , 24 ชม.

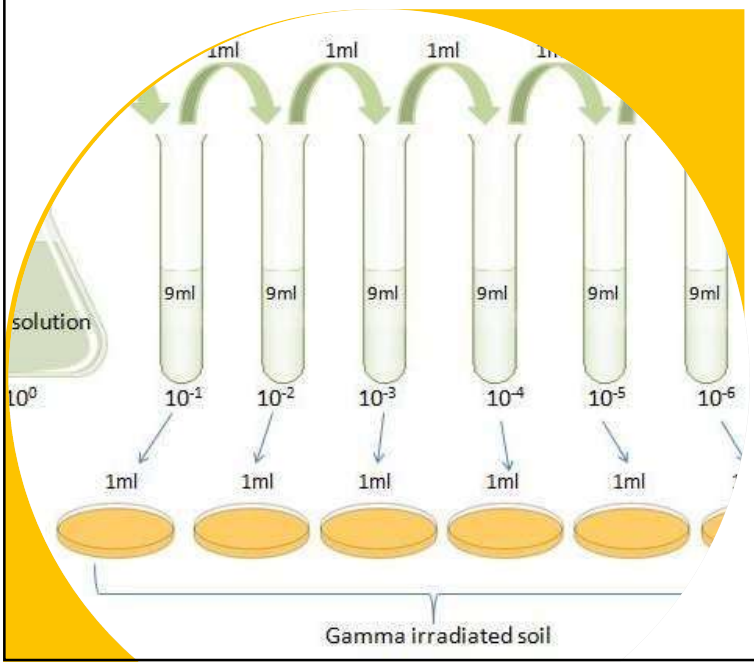


ปิเปตทิป

นำใส่ถุงปลอดเชื้อ เท TSB ให้ท่วมปิเปตทิป ปิดปากถุง และทำการเขย่า แล้วนำไปบ่ม 35 °C , 24 ชม.

การประเมินผลทดสอบ : ต้องไม่พบการเจริญของเชื้อ

82



การทดสอบประสิทธิภาพ

Diluent

-ISO 6887-1 :2017 Amd 2024
-ISO 11133 :2014 , Amd 1 :2018 , Amd 2:2020

83

การตรวจสอบปริมาตรของ Diluent

ISO 6887-1:2017; Amd2024

วิธีที่ 1 : ทดสอบหลังการฆ่าเชื้อ

01 นำภาชนะเปล่าวางบนเครื่องชั่งปรับน้ำหนักเป็นศูนย์ (กด **tare**)

02 เท **diluent** หลังการฆ่าเชื้อ แล้วชั่งน้ำหนัก

03 นำค่าที่ได้เทียบกับเกณฑ์กำหนด

วิธีที่ 2 : ทดสอบก่อนการฆ่าเชื้อ

01 ชั่งน้ำหนักภาชนะ และบรรจุ **diluent** ที่ทราบปริมาตร ทำเครื่องหมายไว้ นำไปฆ่าเชื้อ

02 ชั่งน้ำหนักรวมหลังการฆ่าเชื้อ

03 นำมาหาค่าปริมาณสารละลายที่เปลี่ยนแปลง แล้วนำมาเทียบกับเกณฑ์

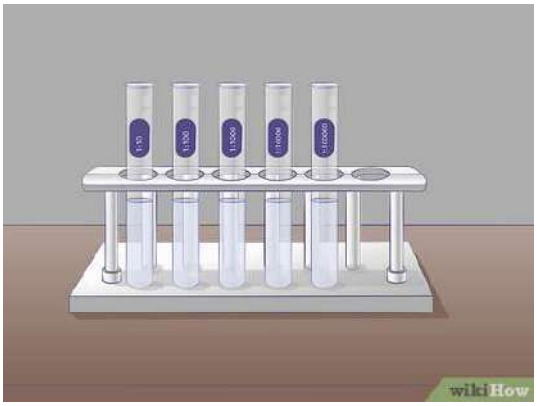
84

การตรวจสอบปริมาตรของ Diluent

ISO 6887-1:2017; Amd2024

ทางเลือกเพิ่มเติม

- เตรียม Diluent ในปริมาณมาก หลังจากการฆ่าเชื้อ ทำการถ่ายสารละลายด้วยเทคนิคปลอดเชื้อในปริมาตรตามที่ต้องการลงในภาชนะปลอดเชื้อ



85

การทวนสอบประสิทธิภาพ Diluent

ISO 6887-1:2017; Amd2024

เกณฑ์การยอมรับปริมาตรสุดท้าย

- คลาดเคลื่อน ± 2%

การสุ่มตัวอย่างปริมาตร

- จำนวน < 100 หน่วย สุ่มตัวอย่างน้อย 1 ตัวอย่าง
- จำนวน ≥ 100 หน่วย สุ่มตัวอย่าง 3-5 %

ปริมาตรสุดท้าย ± 2%

- เตรียม 9 ml : 9±0.18
- เตรียม 90 ml : 9±1.8
- เตรียม 90 ml :90±1 (BAM)

86

ตัวอย่างการทวนสอบปริมาตร

อุปกรณ์ :self refilling syring

1. ลองทวนสอบปริมาตรเริ่มต้น เช่น ปริมาตรที่ต้องการ 9 ml เริ่มต้นที่ 9.24 ml โดยใช้ปิเปตหรือ Syring
2. ทำการหาน้ำหนัก diluent ที่เตรียม 1 ml เท่ากับ 1 กรัม หรือไม่ (ใช้เป็น g หรือ ml ตามสะดวก)
3. ใช้ syring ดูดสายละลาย 9.24 ml (A) นำไปชั่งน้ำหนักให้ได้ค่า 9.24 g ถ้าไม่ได้ให้ทำการปรับตั้ง syring
4. นำหลอดมาชั่งน้ำหนัก (B) กดเครื่องชั่งให้เป็นศูนย์ ดูด diluent ใส่ลงในหลอด แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก (C)

87

ตัวอย่างการทวนสอบปริมาตร(ต่อ)

อุปกรณ์ :self refilling syring

5. นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave 121 °C 15นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วทำการชั่งน้ำหนัก (D)
6. น้ำหนักก่อนฆ่าเชื้อ (B+C)-น้ำหนักหลังฆ่าเชื้อ (D) = น้ำหนัก diluent ที่ละเหย
7. น้ำหนักที่เหลือสุทธิ =น้ำหนักเริ่มต้น(A)-((C+B)-D))
8. น้ำหนักที่ยอมรับได้ 9±2% คือ 8.82-9.18

88

ตัวอย่างการทวนสอบปริมาตร 9 ml (ต่อ)

ปริมาตรเริ่มต้น (A) = 9.24 ml

น้ำหนักหลอด (B)(g)	น้ำหนัก diluent ก่อน clave (C)(g)	น้ำหนัก diluent หลัง clave (D)(g)	น้ำหนักสุทธิA-((C+B)-D)(g)	เกณฑ์ ประเมิน 8.82-9.18
36.01	9.23	45.12	9.12	ผ่าน
36.11	9.23	45.11	9.01	ผ่าน
36.55	9.24	45.56	9.01	ผ่าน
36.12	9.23	45.05	8.94	ผ่าน
36.41	9.24	45.33	8.92	ผ่าน

89

ตัวอย่างการทวนสอบปริมาตร (ต่อ)

การเตรียมปริมาตรที่ใช้งาน สามารถนำไปจัดทำ WI

ปริมาตร Diluent ที่ต้องการ (ml)	ปริมาตร Diluent ที่ต้องเตรียม (g)	ช่วงการยอมรับ (g)
9	9.23	8.82 - 9.18
10	10.23	9.80 - 1.20
90 (FDA-BAM)	94	89.0 - 91.0
99	104	97.02 - 100.98
450	465	441.00 - 459.00

90

การทวนสอบประสิทธิภาพ Diluent

ISO 6887-1:2017; Amd2024

Table 1 — Test microorganisms and productivity criterion for diluents

Media	Incubation	Test microorganisms	WDCM number[a]	Reference medium	Control method	Criteria
Peptone salt diluent Buffered peptone water (single and double strength) Peptone solution Phosphate buffered diluent	45 min to 1 h at laboratory ambient temperature (18 °C to 27 °C)	*Escherichia coli*[c] *Staphylococcus aureus*	00012 or 00013 00034[b]	TSA	Quantitative	±30 % of original count

[a] Refer to the reference strain catalogue available at http://www.wfcc.info for information on culture collection strain numbers and contact details.

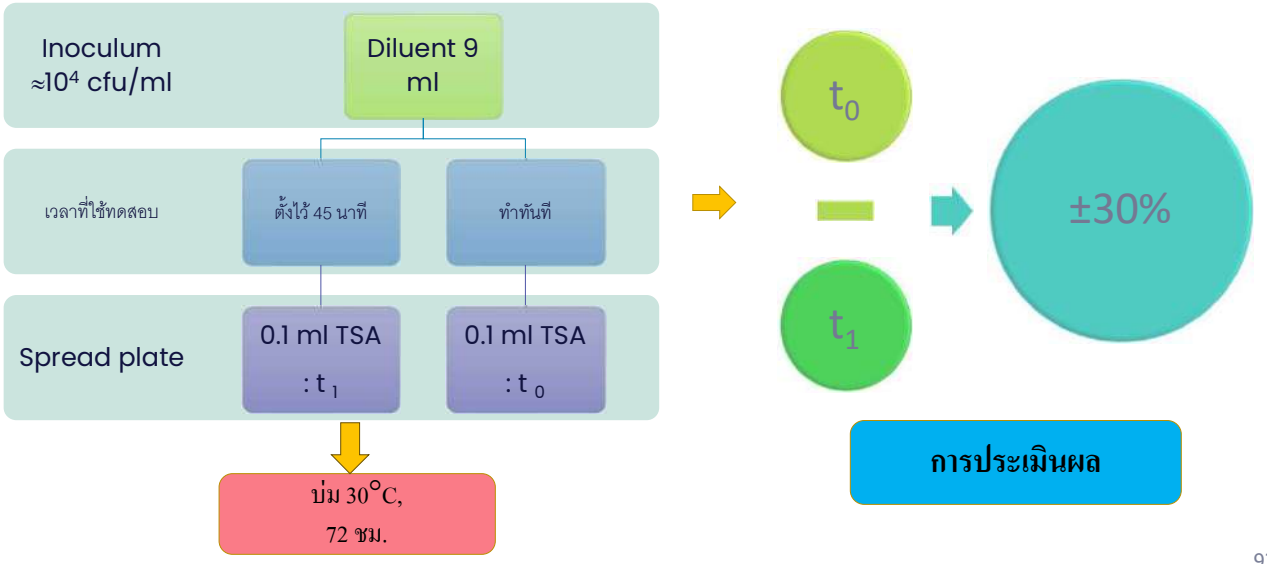
[b] Strain to be used as a minimum.

[c] Free choice of strain; one of the strains must be used as a minimum.

91

การทวนสอบประสิทธิภาพ Diluent

ISO 11133:2014; Amd1:2018;Amd 2:2020



92

ตัวอย่าง : ใบรับรองของ Buffered peptone water 10 ml

3M
Sample Collection

Product Manufacturing Certificate — Certificate of Analysis

Chemical and Physical Testing

Parameter	Specification	Pass
Clarity	Clear	Yes
Precipitate	None	Yes
Parameter	Specification	
pH	7.2 ± 0.2	7.2 Yes
Average Fill Volume	10 mL ± 0.5 mL	10.1mL Yes

Microorganism Testing
Survival of Inoculated Organisms* — Log Colony Forming Units/mL

Organism Tested	Time Zero	One Hour	Pass
Escherichia coli ATCC 25922	2.13	2.12	Yes
Escherichia coli ATCC 35218	2.06	2.03	Yes
Salmonella typhimurium ATCC 14028	2.16	2.19	Yes

Terminal Irradiation Processing Parameters
This product has been subjected to Gamma irradiation as a terminal process. The minimum and maximum delivered met established specifications for this product.

ปริมาตร 10.1 ml ผลประเมินผ่าน

ทดสอบการเหลือรอดของเชื้อชั่วโมงที่ ศูนย์ กับ เมื่อผ่านไป 1 ชม. ผลประเมินผ่าน

93

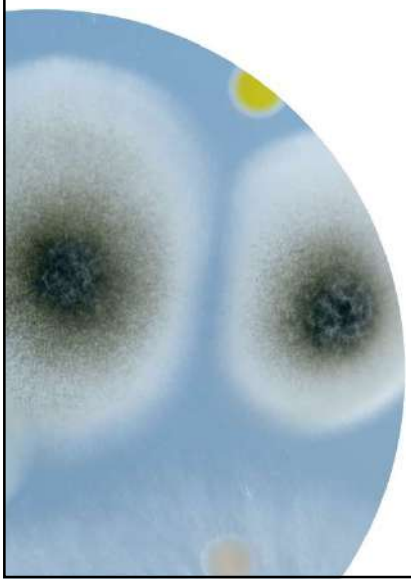
3.เทคนิคการทำ Air test

Compendium chapter 3,2015 : Microbiological monitoring of the food processing environment

94

การเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ

จุลินทรีย์ในอากาศประกอบด้วยสปอร์ของ แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์หรือVegetative cell



1 รูปแบบจุลินทรีย์ในอากาศ

พบในรูปแบบละออง (aerosols) ประกอบด้วยเซลล์หรือกลุ่มของเซลล์

2 การปนเปื้อนจากกิจกรรมต่างๆ

จากพนักงานไอจาม อ่างล้างจาน รูระบายน้ำทิ้ง ละอองน้ำ

3 การปนเปื้อนจากกระบวนการผลิตอาหาร

ฝุ่นที่เกิดจากวัตถุดิบ การฟุ้งกระจายจากการผสม การปนเปื้อนข้ามระหว่างห้องผลิต

4 ระบบปรับอากาศ

มีหยดน้ำ มีการสะสมของเชื้อ

การเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ

บริเวณผลิตที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อน

1 บริเวณที่มีความชื้นสูง

หากเชื้อที่ปนเปื้อนตกลงสู่บริเวณดังกล่าว อาจทำให้เจริญและเพิ่มจำนวนได้ดี

2 อากาศเป็นตัวกลางที่ช่วยแพร่เชื้อ

จากพื้นที่ความดันสูงไปยังพื้นที่ความดันต่ำ

3 บริเวณห้องบรรจุ

อยู่ใกล้บริเวณที่มีการปนเปื้อนสูง โดยเฉพาะอาหารที่บรรจุแบบปลอดเชื้ออาจต้องให้อากาศในห้องบรรจุมีปริมาณต่ำมากๆ

การเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ

วิธีการทดสอบเชื้อจุลินทรย์ในอากาศ

01 **วิธีเก็บตัวอย่างแบบดูดเก็บอากาศ (Impaction methods)**

วิธีการดูดอากาศผ่านจานเพาะเชื้อภายในตัวเครื่อง

02 **วิธีเก็บตัวอย่างแบบการตกตะกอน (Sedimentation methods)**

วิธีการเปิดเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อให้สัมผัสอากาศ

วิธีการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ

โดยวิธีการเปิดเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจสอบ
1.Non-selective medium :
Plate count agar ,
Trypticase soy agar
2.Selective medium :
Violet red bile glucose agar

เปิดเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 นาที หรือตามที่ต้องการแต่ให้ระวังการสูญเสียความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำไปบ่มตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์
1.Aerobic plate count :
บ่ม 35 °C, 48 ชั่วโมง
2.Yeast &Mold :
บ่ม 25 °C , 5 วัน

วิธีการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ

ตัวอย่างพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง

01 บริเวณช่องเปิดของเครื่องจักรที่อาจปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ถูกพัดมากับกระแสลม

02 จุดที่เลือกไว้สำหรับทดสอบอากาศภายในห้องโดยรวม

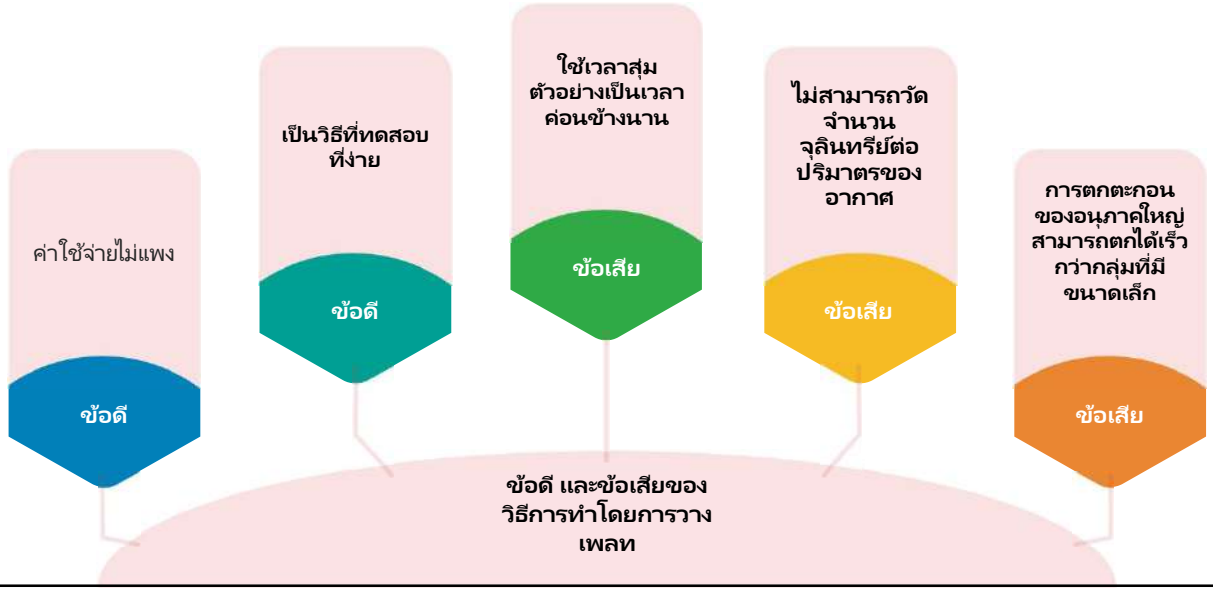
03 บริเวณที่มีพนักงานรวมตัว

04 ช่องทางอากาศของกระบวนการผลิตที่อากาศถูกนำเข้าไปผสมในผลิตภัณฑ์

99

วิธีการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ

วิธีการเก็บตัวอย่างแบบเปิดเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ



100

วิธีการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ

วิธีการดูดอากาศผ่านจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เครื่องมือ (Active air sampling equipment)

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจสอบ
1.Non-selective medium :
Plate count agar ,
Trypticase soy agar
2.Selective medium :
Violet red bile glucose agar

ดูดอากาศผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ
ปริมาตรอากาศตามที่ต้องการ
เช่น อัตรา 28 ลิตรต่อนาที

นำไปบ่มตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์
1.Aerobic plate count :
บ่ม 35 °C, 48 ชั่วโมง
2.Yeast &Mold :
บ่ม 25 °C , 5 วัน

101

วิธีการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ

วิธีการดูดอากาศผ่านจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เครื่องมือ (Active air sampling equipment)

ข้อเสีย
ราคาค่อนข้างแพง

ข้อดี
มีประสิทธิภาพการเก็บอนุภาคสูง

ข้อดี
พกพาสะดวก

ข้อดี
การตรวจเชื้อที่สัมพันธ์กับกิจกรรมเฉพาะ ณ ช่วงเวลาหนึ่งได้ดี

ข้อควรระวัง
เครื่องมือสามารถผ่านการฆ่าเชื้อด้วย autoclave ได้

102

ตัวอย่าง Air sample:MAS-100 NT

ตรวจวัดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอากาศ
ในห้องสะอาดอย่างแม่นยำ

1. พัฒนาการทำงานของเครื่องให้สอดคล้องกับ GAMPของโรงงานที่ผลิตยา
2. สามารถทำความสะอาดฆ่าเชื้อได้ด้วย ก๊าซไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารฆ่าเชื้ออื่น ตามมาตรฐานโรงงานอุตสาหกรรม
3. ฝาปิดส่วนที่เป็นรูพรุนด้านบนสามารถนึ่งฆ่าเชื้อ

วิธีการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ

ความถี่ในการทดสอบและเกณฑ์การประเมินผล

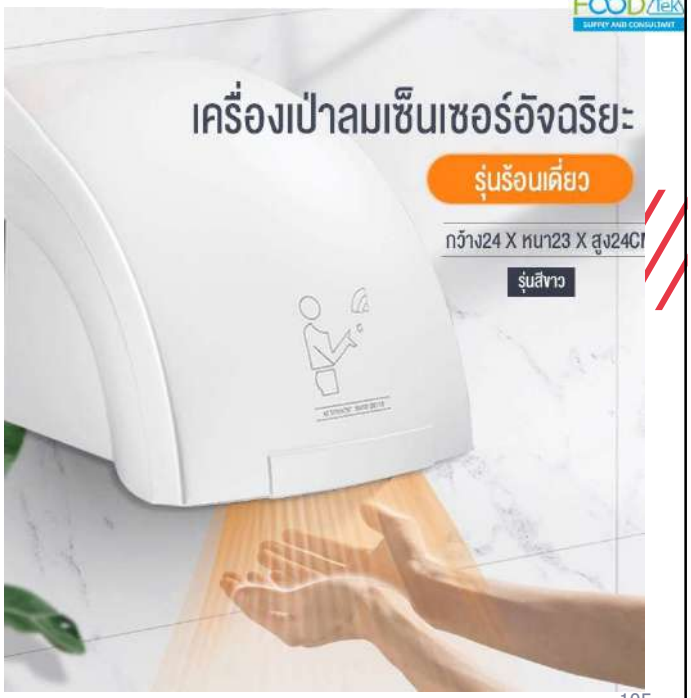
ห้องปฏิบัติการ	สถานที่ผลิตอาหาร
ความถี่ อย่างน้อย 1 ครั้ง/เดือน หรือตาม ความเสี่ยงการปนเปื้อน	**ความถี่** ไม่มีกำหนด ขึ้นอยู่กับทางโรงงาน เป็นผู้กำหนด
เกณฑ์การประเมิน ≤15 CFU/15 min ***AWWA 24th ;2023	**เกณฑ์การประเมิน** กำหนดแนวทางเฉพาะสำหรับแต่ละโรงงาน -ควรกำหนดเป็นเชิงปริมาณหรือเชิงคุณภาพ ที่ระบุจำนวนและชนิดของเชื้อ ที่เชื่อมโยง กับระดับการปนเปื้อนที่ยอมรับได้ในผลิตภัณฑ์

ตัวอย่าง เครื่องเป่ามือ

ทำความสะอาดมือแล้วทำให้แห้ง :เครื่องเป่ามือ
-swab test มือพนักงาน พบว่า Aerobic plate count เกินเกณฑ์

ทำความสะอาดมือแล้วทำให้แห้ง :เช็ดด้วยกระดาษทิชชู่
-swab test มือพนักงาน พบว่า Aerobic plate count ผ่านเกณฑ์

เช็คเชื้อจุลินทรีย์จากเครื่องเป่าลม
-นำ plate :PCA เปิดฝา 15 นาที นำไปบ่มตามวิธี
: ผลทดสอบ APC เยอะมาก



105

ตัวอย่าง เครื่องล้างและเป่าผลไม้

กำหนดความถี่การทำความสะอาด
-swab test พื้นที่หลังทำความสะอาด จุดที่เกี่ยวข้อง
-Air test จุดที่มีการเป่าลมให้ผลไม้แห้ง

เช็คเชื้อจุลินทรีย์ผลิตภัณฑ์สุดท้าย
-swab test พื้นผิวผลไม้
: ผลทดสอบ APC เทียบกับเกณฑ์ที่ใช้ในการควบคุม

106

แนวทางการเฝ้าระวังทางจุลชีววิทยา

Compendium chapter 3,2015 :
Microbiological monitoring of the food processing environment

107

โซนการเฝ้าระวัง 4 โซน

โซน 1 : พื้นผิวที่สัมผัสอาหารโดยตรง

หลังทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ
-ควรเก็บตัวอย่างจากพื้นผิวเพื่อวัดตัวชี้บ่งลักษณะ เช่น Aerobic plate count ,Enterobacteriaceae ,Yeast/Mold

นำมาประเมินคู่กับวิธีการทำความสะอาด
-สามารถนำมากำหนดความเหมาะสมในกระบวนการทำความสะอาด

ตัวอย่างอุปกรณ์/ เครื่องมือ
-สายพานลำเลียง เครื่องหั่น เครื่องกรอกผลิตภัณฑ์ โต๊ะ

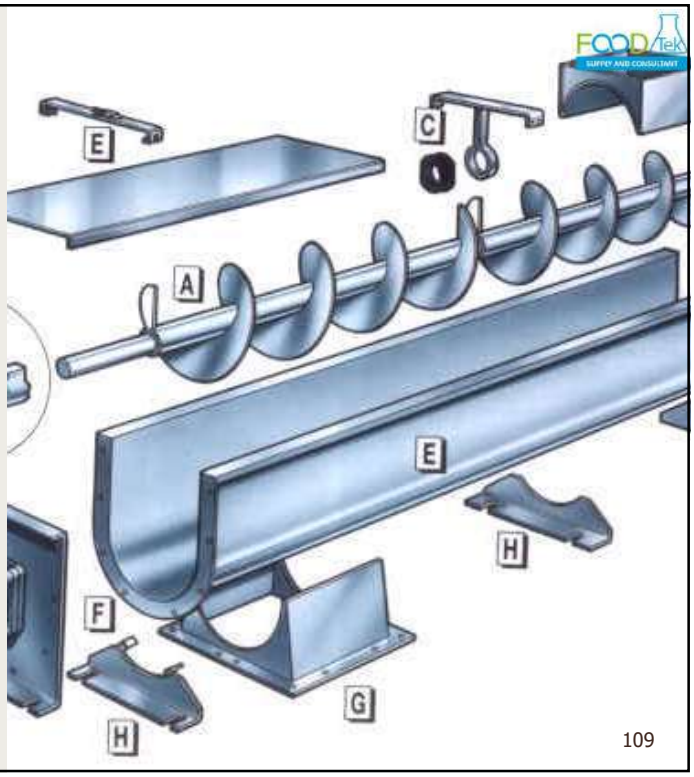
โซนการเฝ้าระวัง 4 โซน

โซน 2 : พื้นผิวที่อยู่ใกล้กับผลิตภัณฑ์ /ผิวด้านนอกอุปกรณ์

พื้นผิวบางจุดอาจมีโอกาสปนเปื้อนสูง

ตัวอย่างอุปกรณ์/ เครื่องมือ

-สกรูลำเลียง เครื่องทำความเย็น เครื่องแช่แข็ง



โซนการเฝ้าระวัง 4 โซน

โซน 3 : พื้นผิวที่อยู่ในสภาพแวดล้อมของการผลิต

พื้นผิวไม่ได้สัมผัสกับอาหาร -ถ้าไม่สะอาดสามารถปนเปื้อนข้าม

พื้นผิวต่างๆ

-ผนังห้อง ท่อระบายน้ำ รถโฟล์กลิฟต์

โซนการเฝ้าระวัง 4 โซน

โซน 4 : พื้นที่ที่อยู่ไกลจากผลิตภัณฑ์

พื้นผิวไม่ได้สัมผัสกับอาหาร
-ถ้าไม่สะอาดสามารถปนเปื้อนข้ามได้

โถงทางเดิน ห้องน้ำ ห้องล็อกเกอร์
โรงอาหารภายในโรงงาน

4 แนวทางเพื่อยืนยันความเหมาะสมของการเฝ้าระวัง

01	เก็บตัวอย่างและทดสอบจากพื้นที่ที่ไม่สัมผัสอาหารโดยตรงภายในสภาพแวดล้อมการผลิต
02	เก็บตัวอย่างและทดสอบอุปกรณ์ ก่อนและหลังปฏิบัติงาน
03	เก็บตัวอย่างและทดสอบผลิตภัณฑ์ระหว่างกระบวนการผลิต
04	วัดปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการผลิต การบรรจุ
การจัดทำโปรแกรมเพื่อตรวจสอบ	นำข้อมูลที่รวบรวมจากการเก็บตัวอย่างเป็นประจำมาเป็นฐานข้อมูล แล้วนำมาพัฒนาเป็นเกณฑ์ในการประเมิน และสามารถนำมาจัดทำโปรแกรมเพื่อเฝ้าระวังที่มีประสิทธิภาพ

112

4.ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ตามความเสี่ยงระดับ2

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข
เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิต หรือมีไว้ในครอบครอง และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรค และพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

พระราชบัญญัติ
เชื้อโรคและพิษจากสัตว์
พ.ศ. ๒๕๕๘

ภูมิพลอดุลยเดช ป.ร.

ให้ไว้ ณ วันที่ ๒๐ สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๘
เป็นปีที่ ๗๐ ในรัชกาลปัจจุบัน

พระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช มีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ ให้ประกาศว่า

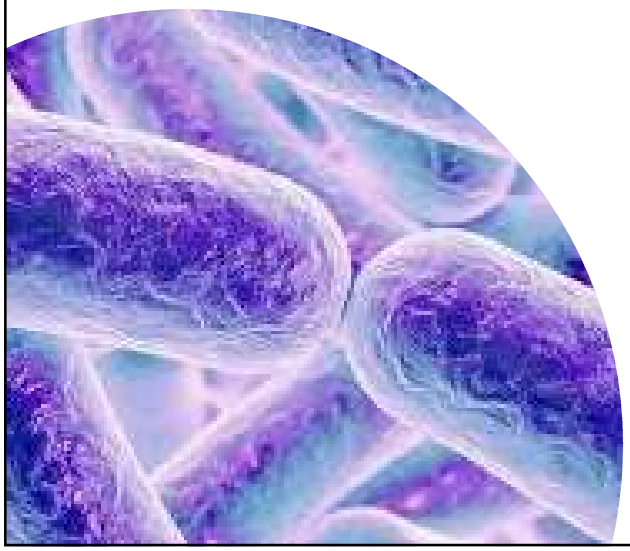
โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงกฎหมายว่าด้วยเชื้อโรคและพิษจากสัตว์

จึงทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ตราพระราชบัญญัติขึ้นไว้โดยคำแนะนำและยินยอมของ

พระราชบัญญัติเชื้อโรค และพิษจากสัตว์ พ.ศ.2558

พระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2558

เชื้อโรค หมายความว่า



เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรีย รา ไวรัส ปรสิต

สารชีวภาพ

1.ผลิตผลหรือส่วนหนึ่งส่วนใดที่ถูกสร้างขึ้นหรือดัดแปลงจากพิษจากสัตว์ เชื้อจุลินทรีย์ หรือเชื้ออื่นตามประกาศ

2.อนุภาคโปรตีนก่อโรค

เชื้ออื่น

ตามประกาศกำหนด

115

พระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2558

เชื้อโรคแบ่งเป็น 4 กลุ่ม

1 กลุ่มที่ 1

เชื้อโรคที่มีความเสี่ยงน้อยหรืออันตรายน้อย เช่น

Lactobacillus acidophilus , *Saccharomyces cerevisiae*

2 กลุ่มที่ 2

เชื้อโรคที่มีความเสี่ยงปานกลางหรืออันตรายปานกลาง เช่น

Bacillus cereus , *Aspergillus flavus* (สารพิษอะฟลาทอกซิน)

3 กลุ่มที่ 3

เชื้อโรคที่มีความเสี่ยงสูงหรืออันตรายสูง เช่น

Mycobacterium tuberculosis (วัณโรค) , *Bacillus antracis*(โรคแอนแทรกซ์)

4 กลุ่มที่ 4

เชื้อโรคที่มีความเสี่ยงสูงมากหรืออันตรายสูงมาก เช่น

Variola virus (ไข้ทรพิษ)

116

เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการจำแนก 4 ระดับ :ตามการดำเนินการกับกลุ่มเชื้อโรค

สถานปฏิบัติการระดับ 1

สถานปฏิบัติการที่ใช้ดำเนินการกับเชื้อโรค กลุ่มที่ 1

สถานปฏิบัติการระดับ 2

สถานปฏิบัติการที่ใช้ดำเนินการกับเชื้อโรค กลุ่มที่ 1 ,เชื้อโรคกลุ่มที่ 2 ,พิษจากสัตว์ กลุ่มที่1,สารชีวภาพที่เป็นอนุภาคโปรตีนก่อโรค และเชื้อกลุ่มที่ 3 ที่สามารถดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการระดับ 2 ตามที่กำหนดในประกาศที่ออก

สถานปฏิบัติการระดับ 3

สถานปฏิบัติการที่ใช้ดำเนินการกับเชื้อโรค กลุ่มที่ 1 ,เชื้อโรคกลุ่มที่ 2 และเชื้อกลุ่มที่ 3 และพิษจากสัตว์ทุกกลุ่ม

สถานปฏิบัติการระดับระดับ 4

สถานปฏิบัติการที่ใช้ดำเนินการกับเชื้อโรค กลุ่มที่ 1 ,เชื้อโรคกลุ่มที่ 2 ,เชื้อโรคกลุ่ม 3 และเชื้อกลุ่มที่ 4และพิษจากสัตว์ทุกกลุ่ม

เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการระดับ 2 มีลักษณะดังนี้

1. พื้นที่ปิดหรือห้องแยกเป็นสัดส่วน สามารถมองเห็นภายในห้องได้ มีขนาดเพียงพอสำหรับการผลิต
2. ผนัง พื้น และฝ้าเพดานที่ถูกออกแบบและก่อสร้างโดยใช้วัสดุที่คงทนและทำความสะอาดง่าย
3. ประตูที่สามารถล็อกได้
4. มีอุปกรณ์และเครื่องมือเพียงพอต่อการผลิต
5. โต๊ะที่แข็งแรง วัสดุกันน้ำ ทนต่อกรด ด่าง น้ำยาฆ่าเชื้อ ทำความสะอาดง่าย
6. เก้าอี้แข็งแรง ทำด้วยวัสดุที่ไม่ดูดซับของเหลว ทำความสะอาดง่าย มีจำนวนเพียงพอ

เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการระดับ 2 มีลักษณะดังนี้

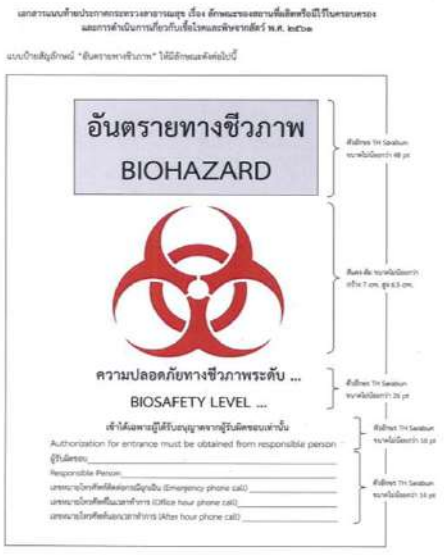
7. มีอ่างล้างมือภายในห้องปฏิบัติการ
8. มีพื้นที่ บริเวณ หรือห้องสำหรับล้างทำความสะอาดอุปกรณ์หรือวัสดุที่ใช้งานแล้ว
9. มีพื้นที่ บริเวณ หรือห้อง สำหรับรวบรวมและจัดเก็บมูลฝอย โดยแยกมูลฝอยติดเชื้อ มีมาตรการห้ามบุคคลอื่นและสัตว์เข้าถึง
10. มีเสียงและอุณหภูมิในระดับที่ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานและสุขภาพของผู้ปฏิบัติงาน
11. มีแสงสว่างในระดับที่เพียงพอต่อการปฏิบัติงาน
12. มีมาตรการควบคุมผู้มีสิทธิเข้าออก

119

เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการระดับ 2 มีลักษณะดังนี้

13. มีป้ายสัญญลักษณ์ “อันตรายทางชีวภาพ”ติดที่ประตู



120

เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง
และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการระดับ 2 : เครื่องมือและอุปกรณ์

1 ภาชนะบรรจุมีฝาปิดสนิท ไม่รั่วซึม

2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่เหมาะสม
สำหรับจัดเก็บภาชนะบรรจุ

3 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการขนส่ง
หรือเคลื่อนย้าย ซึ่งสามารถป้องกันการตก
หล่นของภาชนะบรรจุ

4 ถังขยะมีฝาปิด เปิดได้โดยไม่ใช้มือสัมผัส

121

เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง
และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการระดับ 2 : เครื่องมือและอุปกรณ์

05 มีเครื่องมือและอุปกรณ์
ในการทำลายเชื้อโรค
เช่น **Autoclave**

06 อุปกรณ์หรือน้ำเกลือ
สำหรับล้างตา

07 ชุดปฐมพยาบาล

08 ชุดจัดการสารชีวภาพ
รั่วไหล **(Biological spill kit)**

น้ำยาฆ่าเชื้อ วัสดุดูดซับ ชุดปฏิบัติการ
ถุงมือยาง แว่นตานิรภัย หน้ากากอนามัย
และอุปกรณ์สำหรับเก็บวัสดุปนเปื้อนเชื้อโรค
เช่นปากคีบ ชุดโกยผง ถุงใส่ขยะติดเชื้อ

122

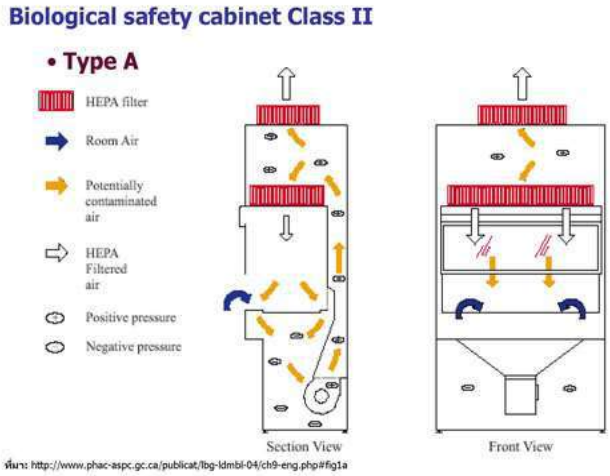
เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง
และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการระดับ 2 : เครื่องมือและอุปกรณ์

09

ตู้ชีวนิรภัย (Biological Safety Cabinet :BSC)

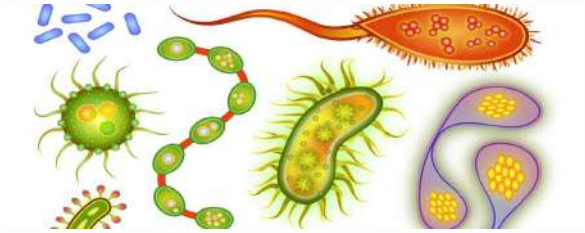
ส่วนประกอบ :
-ชุดกรองอากาศประสิทธิภาพสูง (high efficiency particulate air (HEPA) filter)
-ระบบควบคุมการไหลเวียนอากาศทั้งภายในตู้และอากาศที่ไหลออกต้องผ่านชุดกรองอากาศประสิทธิภาพสูง



123

Biological Safety Cabinet class II

ป้องกันผู้ใช้งาน → ป้องกันสิ่งแวดล้อม → ป้องกันงานที่ทำ



124

Biological Safety Cabinet class II

1. ก่อนและหลังใช้ เปิดเครื่อง 10-15 นาที และเช็ด disinfectant
2. เช็ค Air flow ก่อนใช้
3. สอบเทียบ ปีละ 1 ครั้ง
4. เช็คประสิทธิภาพหลอด UV ทุก 3 เดือน
5. Air test – 30 นาที
6. ทำความสะอาดหลอด UV ทุกเดือน

125

การจัดวางอุปกรณ์ภายในตู้ BSC

อุปกรณ์

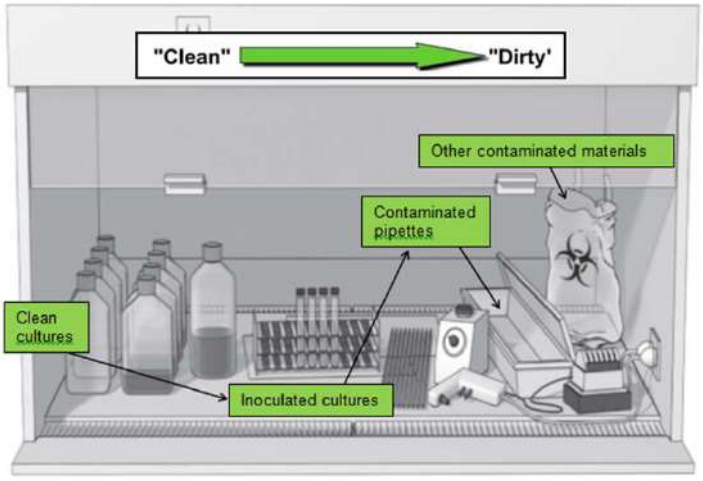
- เช็ดพื้นผิว 70% Alcohol
- วางถาดที่ทิ้งของเสียด้านในตู้
- ไม่ควรใช้ตะเกียงบุนเสนในตู้

การจัดวาง

- ไม่ขวางช่องลมด้านหน้า และด้านหลัง
- วางของให้เป็นระเบียบเพื่อลดการรบกวน airflow

ผู้ใช้งาน

- ให้เคลื่อนมือเข้าออกตู้ช้าๆ
- เมื่อเคลื่อนมือเข้าในตู้ให้รอแป๊ปนึง เพื่อให้อากาศไหลเวียน เอาสิ่งที่เกาะติดออกไป



126

เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการระดับ 2 : เครื่องมือและอุปกรณ์

3* หมายถึง เชื้อโรค กลุ่มที่ 3 ที่อนุโลมให้ดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการระดับ 2

1. มีข้อมูลความปลอดภัยของเชื้อโรค Pathogen Safety Data Sheets:PSDS
2. ห้องปฏิบัติการระดับ 2 เสริมสมรรถนะ Biosafety Level 2 enhanced : BSL-2 enhanced)

- ลักษณะของเชื้อ แหล่งที่พบ การแพร่เชื้อ การก่อโรค อาการของโรค การรักษา วัคซีนป้องกัน
- แยกห้องสำหรับดำเนินการกับเชื้อโรคโดยเฉพาะ
- การปฐมพยาบาลกรณีเกิดอุบัติเหตุ วิธีการทิ้ง และวิธีการทำลาย
- มีอุปกรณ์ปกป้องส่วนบุคคลเพื่อสวมใส่อย่างมิดชิดและเหมาะสม

127

ตัวอย่าง :Pathogen safety data sheet ของประเทศแคนาดา

p.1

128

ตัวอย่าง :Pathogen safety data sheet ของประเทศแคนาดา

p.2

CHARACTERISTICS: Salmonella enterica is one of two Salmonella species (enterica and bongori) and a member of the Enterobacteriaceae family (1, 2). Salmonella enterica spp. is subdivided into 6 subspecies (enterica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV) and indica (VI)). The usual habitat for subspecies enterica (I) is warm-blooded animals (1-3). The usual habitat for subspecies II, IIIa, IIIb, IV and VI is cold-blooded animals and the environment (2). All species of Salmonella can infect humans. Salmonella enterica subspecies enterica has 2610 different serotypes; the most well known being serotypes Typhi, Paratyphi, Enteriditis, Typhimurium and Choleraesuis (1). The serotypes are characterized by three surface antigens: the flagellar "H" antigen, the oligosaccharide "O" antigen and the polysaccharide "Vi" antigen (found in Typhi and Paratyphi serotypes) (4). Salmonella enterica is a facultative anaerobe and is a gram negative, motile and non-sporing rod that is 0.7-1.5 by 2.0-5.0 µm in size (4-6).

SECTION II – HAZARD IDENTIFICATION

PATHOGENICITY/TOXICITY: *Salmonella enterica* can cause four different clinical manifestations: gastroenteritis, bacteremia, enteric fever, and an asymptomatic carrier state [7]. It is more common in children under the age of 5, adults 20-30 year olds, and patients 70 years or older [7].

Gastroenteritis: Gastroenteritis or "food poisoning" is usually characterized by sudden nausea, vomiting, abdominal cramps, diarrhea, headache chills and fever up to 39 °C (6-9). The symptoms can be mild to severe and may last between 5-7 days (7, 8). The Typhimurium serotype is the most common cause of gastroenteritis and there are an estimated 1.3 billion cases and 3 million deaths annually (1.4 million cases and 600 deaths in the US alone) due to non-typhoidal Salmonella (2, 9, 10). In well resourced countries with low levels of invasive complications, the mortality rate due to non-typhoidal Salmonella is lower then 1% (10); however, in developing countries, the mortality rate can be as high as 24% (10).

129

ตัวอย่าง :Pathogen safety data sheet ของประเทศแคนาดา

p.3

INFECTIOUS DOSE: The infectious dose varies with the serotype. For non-typhoidal salmonellosis, the infectious dose is approximately 10^3 bacilli [4, 7]. For enteric fever, the infectious dose is about 10^5 bacilli by ingestion [4, 6, 7]. Patients with achlorhydria, depressed cell-mediated immunity, or who are elderly may become infected with at a lower infectious dose [4, 7]. The infectious dose may also be dependent on the level of acidity in the patient's stomach [4].

MODE OF TRANSMISSION: Human infection usually occurs when consuming contaminated foods and water, contact with infected feces, as well as contact with infective animals, animal feed, or humans [2, 4, 7, 8, 16]. Foods that pose a higher risk include meat, poultry, milk products, and egg products [7-9]. In hospitals, the bacteria have been spread by personnel in pediatric wards, either on their hands or on inadequately disinfected scopes [5, 17]. Flies can infect foods which can also be a risk for transmission to humans [18, 19].

INCUBATION PERIOD: For non-typhoidal salmonellosis, the incubation period is variable, depends on the inoculum size, and usually ranges between 5 and 72 hours [8]. For typhoid fever, the incubation period can be between 3 and 60 days, although most infections occur 7-14 days after contamination [4]. The incubation period for typhoid fever is highly variable and depends on inoculum size, host susceptibility, and the bacterial strain [2, 4].

COMMUNICABILITY: Humans can spread the disease for as long as they shed the bacterium in their feces [20]. Certain carriers shed the bacteria for years and 5 % of patients recovering from non-typhoidal salmonellosis can shed the bacteria for 20 weeks [7]. Animals can have a latent or carrier state where they excrete the organism briefly, intermittently or persistently [4].

130

ตัวอย่าง :Pathogen safety data sheet ของประเทศแคนาดา

p.4

SECTION IV – STABILITY AND VIABILITY

DRUG SUSCEPTIBILITY: Susceptible to chloramphenicol, ciproflaxin, amoxicillin, co-trimoxazole, trimethprim-sulfonamid, cephalosporins and norfloxacin [4, 8]. Some resistance to chloramphenicol has been reported and, in 1989, 32% of strains were multi-drug resistant [2, 4, 17].

SUSCEPTIBILITY TO DISINFECTANTS: Gram negative bacteria are susceptible to 2-5% phenol, 1% sodium hypochlorite, 4% formaldehyde, 2% glutaraldehyde, 70% ethanol, 70% propanol, 2% peracetic acid, 3-6% hydrogen peroxide, quaternary ammonium compounds and iodophors; however, Salmonella spp. is resistant to nitrites (6, 17).

PHYSICAL INACTIVATION: Susceptible to moist heat (121 °C for at least 15 minutes) and dry heat (170 °C for at least 1 hour) [17]. *Salmonella* spp. can also be disinfected with ozone [17].

SURVIVAL OUTSIDE HOST: Serotype Choleraesuis can survive in wet swine feces for at least 3 months and in dry swine feces for at least 13 months [21]. Serotype Dublin can survive in feces spread on concrete, rubber, and polyester for almost six years [17]. Serotype Typhimurium can survive in cattle slurry for 19-60 days, cattle manure for 48 days, soil for 231 days, and water for up to 152 days [22, 23]. Flies have been shown to excrete certain serotypes for 8 days and bed bugs can excrete bacilli for up to 21 days [15, 24]. Certain serotypes have been shown to survive on fingertips for up to 80 minutes, depending on the inoculum size [25]. *Salmonella* serotypes have been found to live up to 63 days on lettuce, 231

131

เรื่อง รายชื่อเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ.2561

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข
เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา ๑๘
พ.ศ. ๒๕๖๑

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๕ วรรคหนึ่ง มาตรา ๖ (๑) และมาตรา ๑๘ แห่งพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข โดยคำแนะนำของคณะกรรมการเชื้อโรคและพิษจากสัตว์จึงออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ประกาศนี้เรียกว่า "ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา ๑๘ พ.ศ. ๒๕๖๑"

ข้อ ๒ ประกาศนี้ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ข้อ ๓ ให้ยกเลิกประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา ๑๘ พ.ศ. ๒๕๖๐

ข้อ ๔ กำหนดรหัสเชื้อโรค และให้รหัสเชื้อโรคมีองค์ประกอบตามลำดับ ดังนี้

(๑) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ใช้แทนประเภทของเชื้อโรค ได้แก่

B ใช้แทนแบคทีเรีย

F ใช้แทนรา

V ใช้แทนไวรัส

132

เรื่อง รายชื่อเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ.2561

				วินิจฉัย species ได้
B-1-0187	*Bacillus amyloliquefaciens*	๑	คนและสัตว์	
B-3-0188	*Bacillus anthracis*	๓*	คนและสัตว์	

รหัสเชื้อโรค	ชื่อเชื้อโรคควบคุม	กลุ่มที่	การก่อโรค	รายละเอียดเพิ่มเติม
B-1-0189	*Bacillus atrophaeus*	๑	คนและสัตว์	
B-1-0190	*Bacillus badius*	๑	คนและสัตว์	
B-2-0191	*Bacillus cereus*	๒	คนและสัตว์	
B-1-0192	*Bacillus circulans*	๑	คนและสัตว์	
B-1-0193	*Bacillus mycoides*	๑	คนและสัตว์	
B-1-0194	*Bacillus weihenstephanensis*	๑	คนและสัตว์	
B-2-0195	*Bacillus* spp.	๒	คนและสัตว์	หมายความว่า เป็นเชื้อที่ไม่สามารถวินิจฉัย species ได้

133

เรื่อง รายชื่อเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ.2561

รหัสเชื้อโรค	ชื่อเชื้อโรคควบคุม	กลุ่มที่	การก่อโรค	รายละเอียดเพิ่มเติม
F-3-0019	*Apophysomyces* spp.	๓*	คนและสัตว์	หมายความว่า เป็นเชื้อที่ไม่สามารถวินิจฉัย species ได้
F-1-0020	*Arthrographis kalrae*	๑	คนและสัตว์	ชื่ออื่น *Oidiodendron kalrai*
F-1-0021	*Arthrographis* spp.	๑	คนและสัตว์	หมายความว่า เป็นเชื้อที่ไม่สามารถวินิจฉัย species ได้
F-2-0022	*Aspergillus flavus*	๒	คนและสัตว์	
F-2-0023	*Aspergillus fumigatus*	๒	คนและสัตว์	
F-1-0024	*Aspergillus restrictus*	๑	คนและสัตว์	
F-2-0025	*Aspergillus terreus*	๒	คนและสัตว์	
F-1-0026	*Aspergillus* spp.	๑	คนและสัตว์	หมายความว่า เป็นเชื้อที่ไม่สามารถวินิจฉัย species ได้

134

เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการระดับ 2 : ลักษณภาชนะบรรจุและหีบห่อ (สำหรับการขนส่ง)

1.ภาชนะชั้นใน

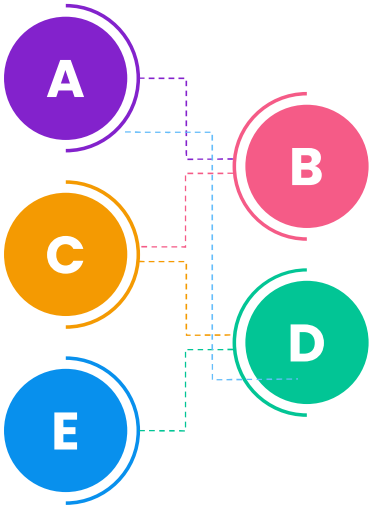
มีความคงทนไม่แตกง่าย กันน้ำหรือของเหลวซึมผ่าน เช่น หลอดหรือขวดที่ทำด้วยแก้ว พลาสติก หรือโลหะ มีฝาปิดสนิท

2.ภาชนะชั้นกลาง

มีความคงทนไม่แตกง่าย กันน้ำหรือของเหลวซึมผ่านปิดได้สนิท และสามารถรองรับของเหลวในกรณีที่ภาชนะบรรจุชั้นในแตกหรือรั่ว

3.หีบห่อชั้นนอก

ทำด้วยกระดาษแข็ง พลาสติก โลหะ หรือวัสดุอื่นที่มีความคงทนต่อการกระแทกและมีฝาที่ปิดได้สนิท



กรณีผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง

บรรจุเชื้อโรคในภาชนะ อย่างน้อย 2 ชั้น

กรณีมีการขนส่ง

บรรจุเชื้อโรคในภาชนะ รวม 3 ชั้น

135

เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการระดับ 2 : ระบบความปลอดภัยและระบบคุณภาพ

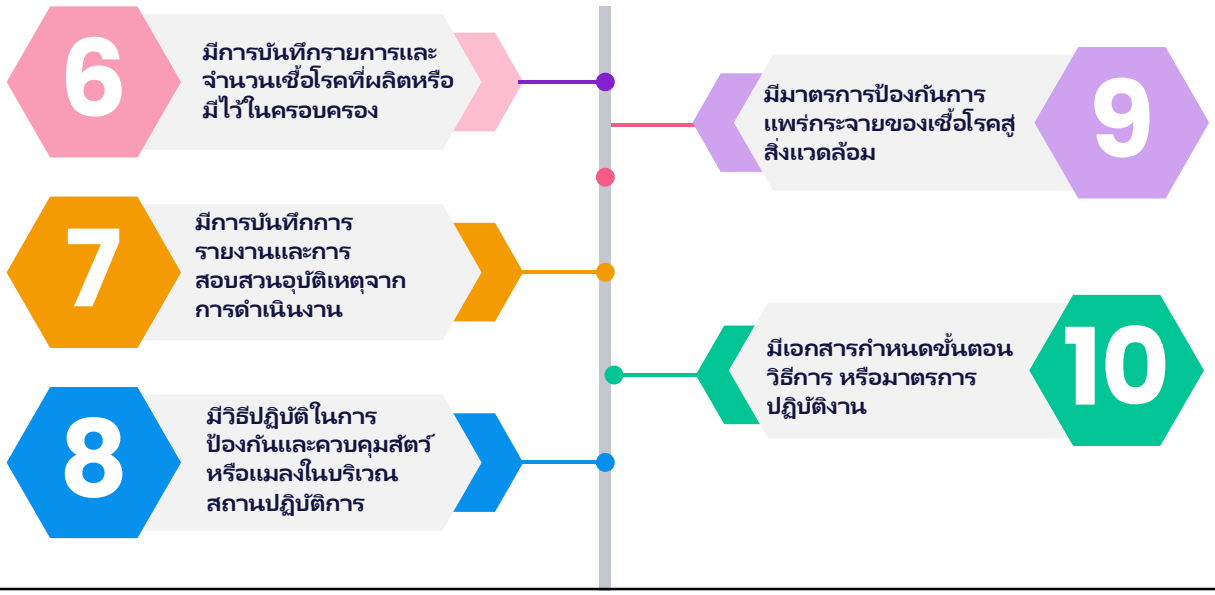
1. การควบคุมดูแลกระบวนการจัดเก็บ ผลิต นำเข้า ส่งออก ขาย นำผ่านหรือมีไว้ในครอบครอง
2. มาตรการควบคุมการเข้าถึงโดยบุคคลอื่นที่ไม่เกี่ยวข้อง
3. มีการใช้อุปกรณ์ปกป้องส่วนบุคคลที่เหมาะสมตามหลักวิชาการ
4. มีการรวบรวม จัดเก็บ เคลื่อนย้าย และทำลายมูลฝอยติดเชื้อ
5. มีการทำความสะอาดวัสดุ อุปกรณ์ สิ่งปนเปื้อนเชื้อโรคที่เหมาะสม

Personal protective equipment(PPE)
เช่น เสื้อคลุมปฏิบัติการ ถุงมือ รองเท้าปิดที่หุ้มทั้งเท้า หน้ากากอนามัย

136

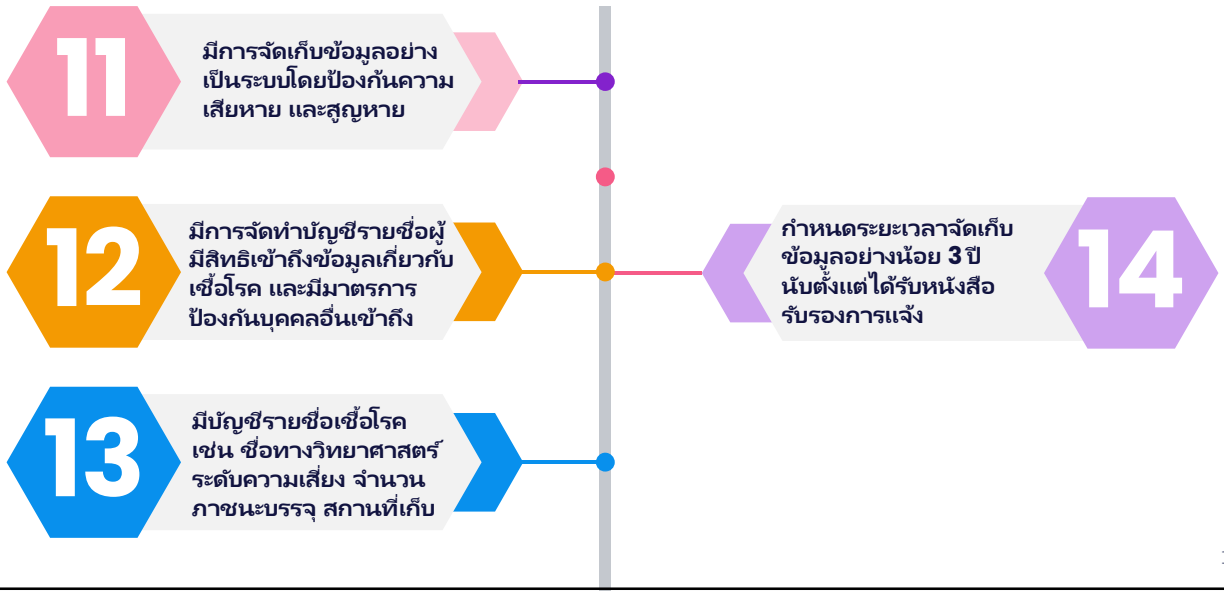
เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการระดับ 2 : ระบบความปลอดภัยและระบบคุณภาพ



เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2561

สถานปฏิบัติการระดับ 2 : ระบบความปลอดภัยและระบบคุณภาพ



ตัวอย่าง **Positive pressure room & Negative pressure room**

Positive pressure room

ห้องที่มีความดันภายในห้องมากกว่าความดันด้านนอกห้อง ทำให้อากาศภายนอกไม่สามารถเข้ามาภายในห้องได้ ทำให้ภายในห้องมีความสะอาดและปลอดภัยจากเชื้อโรค เช่น ห้องผ่าตัด

Negative pressure room

ห้องที่มีความดันภายในห้องต่ำกว่าด้านนอกห้อง ทำให้อากาศภายนอกเข้ามาในห้อง ช่วยลดความเสี่ยงในการแพร่ระบาดของเชื้อโรคออกไปยังบริเวณอื่น ๆ เช่น ห้องฆ่าเชื้อห้องฉุกเฉิน

ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการ

องค์ประกอบสำคัญที่เกี่ยวข้องกับระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการ

เพื่อความปลอดภัยของผู้ทำการวิจัยและทดลอง และลดความเสี่ยงจากการที่สิ่งมีชีวิตที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่อาจหลุดรอด หรือถูกปลดปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม ห้องปฏิบัติการจึงต้องมีระบบการป้องกันอันตรายทางชีวภาพที่ระบุถึงข้อถึงปฏิบัติในขณะปฏิบัติงาน พร้อมระบุถึงองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับระดับความปลอดภัยทางชีวภาพเพื่อป้องกันอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน ชุมชน และสิ่งแวดล้อม

1. มาตรฐานการปฏิบัติงานด้านจุชีววิทยา
2. มาตรการพิเศษ/มาตรการรักษาความปลอดภัย
3. อุปกรณ์เพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ
4. สิ่งอำนวยความสะดวก

ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการ

Biosafety Levels (BSL)

1 **BSL1 :** ใช้กับงานวิจัยและทดลองกับจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ที่มีอันตรายระดับต่ำสุดต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม เช่น ***E. coli*** **k-12**

2 **BSL2 :** งานวิจัยและทดลองที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ก่อโรคมีความเสี่ยงอยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง สามารถฉีดวัคซีนป้องกัน หรือรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะ เช่น ไข้ไทฟอยด์

3 **BSL3 :** งานวิจัยและทดลองที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ก่อโรคร้ายแรงที่อาจอันตรายถึงชีวิต และแพร่กระจายผ่านทางระบบหายใจ เช่น วัณโรค

4 **BSL4 :** งานวิจัยและทดลองที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีความเสี่ยงสูงสุด เป็นอันตรายถึงชีวิต และยังไม่มีวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ

141

สรุปข้อแตกต่างของห้องปฏิบัติการแต่ละระดับ

อ้างอิง :ศูนย์พันธุวิศกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ฉบับปรับปรุง 2568 (Biotech)

สิ่งหรือความจำเป็นที่ต้องจัดทำ	BSL1	BSL2	BSL3	BSL4
1.ความเข้มงวดในการอนุญาตเข้า-ออกของผู้ไม่เกี่ยวข้อง	-	o	●	●
2.การฝึกอบรมมาตรฐานการปฏิบัติงานด้านจุลชีววิทยา	●	●	●	●
3.โต๊ะปฏิบัติการ อ้างล้างมือ	●	●	●	●
4.ตู้ชีวนิรภัย (biological safety cabinet)	o	Class II	Class II หรือ III	Class III
5.ระบบลดการปนเปื้อนด้วย autoclave	o	●	●	●

หมายเหตุ : o หมายถึง ควรมี ,● หมายถึง ต้องมี , - หมายถึง ไม่จำเป็นต้องมี

142

สรุปข้อแตกต่างของห้องปฏิบัติการแต่ละระดับ (ต่อ)

อ้างอิง :ศูนย์พันธุวิศกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ฉบับปรับปรุง 2568 (Biotech)

สิ่งหรือความจำเป็นที่ต้องจัดทำ	BSL1	BSL2	BSL3	BSL4
6.ระบบลดการปนเปื้อนของอากาศ (ระบบกรองอากาศประสิทธิภาพสูง (HEPA filter) สำหรับกรองอากาศออกจากห้องปฏิบัติการ	-	o	●	●
7.การอาบน้ำ เปลี่ยนเสื้อผ้า ก่อนเข้า-ออกห้องปฏิบัติการ	-	-	o	●
8.การแยกอาคารหรือห้องปฏิบัติการออกมาต่างหาก	-	-	-	●
9.มีห้องปรับแรงดันอากาศ (anteroom) อยู่ระหว่างประตู 2 ชั้น ที่ปิดล็อกได้ ไม่สามารถเปิดพร้อมกันในเวลาเดียวกัน	-	-	●	คล้ายกับ BSL3+ ข้อกำหนดเพิ่มเติม
10.แรงดันอากาศแบบลบ(negative pressure) และการไหลของอากาศในทิศทางเดียว	-	-	●	

หมายเหตุ : o หมายถึง ควรมี ,● หมายถึง ต้องมี , - หมายถึง ไม่จำเป็นต้องมี

:HEPA filter –High efficiency particulate air filter

143

สรุปข้อแตกต่างการสวมใส่อุปกรณ์ปกป้องส่วนบุคคลของห้องปฏิบัติการ

ISO 7218 : 2024 กับ Biotech : 2568

สิ่งหรือความจำเป็นที่ต้องจัดทำ	ISO 7218	BSL1	BSL2
1.เสื้อคลุมปฏิบัติการ	●	●	●
2.เสื้อคลุมควรเป็นเสื้อแขนยาวและมีปลอกแขนยางยืด	o	-	-
3. สวมหมวกคลุมผม	o	●	●
4. รองเท้าปิดหุ้มทั้งเท้า	-	●	●
5. สวมถุงมือ	-	●	●

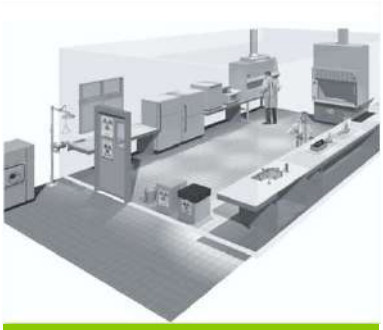
หมายเหตุ : o หมายถึง ควรมี ,● หมายถึง ต้องมี, - หมายถึง ไม่ได้ระบุ

144

ตัวอย่างลักษณะห้องปฏิบัติการตามระดับความปลอดภัยทางชีวภาพ

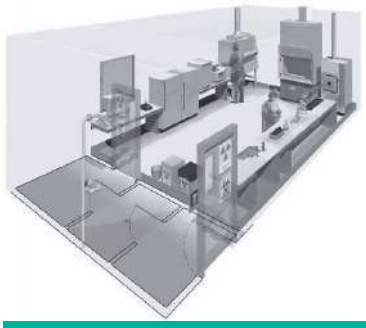
BSL-1

-มีประตูกั้นแยกเป็นสัดส่วน
-ต้องมีอ่างล้างมือโดยไม่ใช้มือสัมผัส
-ควรมีที่ล้างหน้า ล้างตา



BSL-2

-มีตู้ BSC Class II
-แบ่งพื้นที่ห้อง เป็นสัดส่วน เช่น ห้องพัก ห้องเตรียมตัวอย่าง ห้องทดสอบ



BSL-3

-ต้องมีประตู 2 ชั้น
-ความดันในห้องเป็นลบ มีระบบกรองอากาศ
-กำจัดของเสียและวัสดุปนเปื้อนให้เสร็จภายใน (บังคับ Autoclave อยู่ภายใน)

145

เรื่อง หลักเกณฑ์และวิธีการตรวจสอบเกณฑ์มาตรฐานทางชีวภาพ

หลังการจำกัดขยะมูลฝอยติดเชื้อ พ.ศ.2565

การตรวจสอบมาตรฐานทางชีวภาพด้วยวิธีการทำลายเชื้อด้วยไอน้ำหรือวิธีทำลายเชื้อด้วยความร้อน มีตัวชี้บ่งทางชีวภาพ (Biological indicator) เพื่อให้การควบคุมระบบการกำจัดขยะมูลฝอยติดเชื้อมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

01 การกำจัดขยะติดเชื้อด้วยวิธีการทำลายเชื้อด้วยไอน้ำ หรือวิธีทำลายเชื้อด้วยความร้อนต้องสามารถทำลายเชื้อก่อโรคต่อผู้สัมมูลฝอยติดเชื้อได้

02 การตรวจสอบว่ามูลฝอยติดเชื้อได้ผ่านการกำจัดเชื้อก่อโรคได้ตามเกณฑ์มาตรฐานทางชีวภาพให้ทำการตรวจสอบด้วยเชื้อ ***Geobacillus stearothermophillus*** อย่างน้อยวันละหนึ่งครั้งที่มีการใช้งานเครื่องกำจัดขยะมูลฝอยติดเชื้อ

146

เรื่อง หลักเกณฑ์และวิธีการตรวจสอบเกณฑ์มาตรฐานทางชีวภาพ หลังการจำกัดขยะมูลฝอยติดเชื้อ พ.ศ.2565

02 ขั้นตอนการตรวจสอบด้วย spore : *Geobacillus strearothermophillus* (ต่อ)

2.1 spore strip:จำนวนสปอร์ ≥ 100,000 spore ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและมีสาร Bromcresol purple จำนวน 2 หลอด

- หลอดที่ 1:นำไปวางไว้รวมกับขยะติดเชื้อในเครื่อง autoclave หลอดที่ 2:วางไว้ด้านนอกเครื่อง (ควบคุม)

2.2 หลังผ่านการฆ่าเชื้อ ให้นำทั้ง 2 หลอด นำไปบ่มเพาะเชื้อ

- บ่มที่อุณหภูมิ 56 ° C ระยะเวลาตามที่ผู้ผลิตกำหนด

2.3 การตรวจสอบผลทดสอบ

- หลอดที่ 1 :ต้องไม่มีการเปลี่ยนสี หลอดที่ 2:ต้องเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

147

เรื่อง หลักเกณฑ์และวิธีการตรวจสอบเกณฑ์มาตรฐานทางชีวภาพ หลังการจำกัดขยะมูลฝอยติดเชื้อ พ.ศ.2565

03 ให้จัดเก็บขยะติดเชื้อที่ผ่านการทำลายเชื้อแล้ว พักรอไว้จนกว่าผลการตรวจสอบจะอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน จึงดำเนินการกำจัดขยะติดเชื้อตามกฎกระทรวงว่าด้วยการกำจัดมูลฝอยติดเชื้อ

04 กรณีผลการตรวจสอบไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ให้นำขยะติดเชื้อจัดเก็บและพักรอไว้ แล้วไปทำลายด้วยไอน้ำซ้ำอีกครั้ง และดำเนินการตรวจสอบการบ่งชี้ทางชีวภาพทุกครั้ง

เมื่อผลการตรวจสอบมาตรฐานทางชีวภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานทุกครั้ง ให้ปรับลดความถี่ในการตรวจสอบได้

กรณีผลการตรวจสอบมาตรฐานทางชีวภาพอยู่ไม่อยู่ในเกณฑ์ครั้งใดครั้งหนึ่ง ให้หยุดพักการกำจัดขยะ แล้วทำการซ่อมบำรุงเครื่องมือก่อน และทำการตรวจสอบอีกครั้งจนอยู่ในเกณฑ์

148

เอกสารอ้างอิง

ISO 18593:2018

- Microbiological of the food chain – Horizontal method for surface sampling.

ISO 7218: 2024

- Microbiology of food chain – General requirements and guidance for microbiological examinations

AWWA 24th ,2023

- Stanadard Methods for the Examination of water and waste water, 24th ,2023 ., American Public Health Association

149

เอกสารอ้างอิง

ISO 11133:2014 ;Amd 1:2018,Amd 2:2020

- Microbiological of food , animal feed and water-Preparation, production , storage and performance testing of culture media

ISO 6887-1: 2017 Amd :2024

- Microbiological of the food chain – Preparation of test samples , initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination –Part 1:General rules for preparation of the initial suspension and decimal dilutions

Compendium 5th : 2015

- Compendium of method for the microbiological examination of food 2015 ,5th ed ., chapter 3:Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment.

150

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

- แนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับการดำเนินงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ ฉบับปรับปรุงปี พ.ศ.2568

ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 3 :2560

- เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร

THANK YOU!

ANY QUESTIONS?

Foodtek Supply and Consultant Co., Ltd.

Contact No. : 095-246-0906 | 086-032-5445 | 062-461-9916

https://www.foodtek-ftc.com

Website

Facebook

Line OA

153

Our services

- TRAINING
- CONSULTING
- AUDITING
- SUPPLYING

ISO 9001

ISO/IEC 17025

Microbiological & Chemical Lab.

FOOD SAFETY

We provide the best thing in the right way

Line OA	Website	Facebook
@foodtek2014	https://www.foodtek-ftc.com	

บริษัท ฟู้ดเทค ซัพพลาย แอนด์ คอนซัลแตน จำกัด (สำนักงานใหญ่)
92/3 หมู่ที่ 12 หมู่บ้านพฤกษาปูริ 3 ถนนบัวนครินทร์
ตำบลบางแก้ว อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ 10540
เลขประจำตัวผู้เสียภาษี: 010-555-716-794-2

095-246-0906 | 086-032-5445 | 062-461-9916

mkt.foodtek@gmail.com