



ข้อแนะนำในการทวนสอบ วิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา (LA-G-24)

สำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

75/7 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท์ : 0-2201-7125 0-2201-7165 0-2201-7134

<http://bla.dss.go.th>

บทนำ

เอกสารฉบับนี้ใช้เป็นข้อแนะนำในการทวนสอบวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา ตาม ISO 16140-3:2021/Amd 1: 2025 เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการในการยื่นขอรับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตาม ISO/IEC 17025 และมาตรฐานการยอมรับความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์บริการ รวมทั้งคณะผู้ประเมินได้นำไปใช้เป็นแนวทางในการดำเนินการในการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการ

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	i
สารบัญ	ii
1. ขอบข่าย	1
2. นิยาม	1
3. (food) category	1
4. การทวนสอบวิธี	2
4.1 Broad range of foods verification	2
4.2 (Food) item verification	2
5. วิธีทดสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative) และวิธีทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative)	3
6. การหาค่า eLOD ₅₀	3
7. การหาค่า S _{IR}	4
8. การหาค่า eBias	5
9. การทวนสอบวิธีการตรวจยืนยันและการจำแนกของวิธีทางเลือกที่มีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี	5
10. การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่มีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบแล้ว – รูปแบบทางเทคนิคสำหรับการทวนสอบวิธี	5
เอกสารอ้างอิง	7

1. ขอบข่าย

เอกสารฉบับนี้ใช้เป็นข้อแนะนำในการทวนสอบวิธีทางจุลชีววิทยาด้านอาหาร ตาม ISO 16140-3: 2021/Amd 1: 2025 ใช้สำหรับห้องปฏิบัติการเพื่อทวนสอบว่าวิธีทดสอบที่ได้ตรวจสอบวิธีทดสอบแล้ว (Validated) ตาม ISO 161410 - 2 : 2016 เพื่อแสดงว่าห้องปฏิบัติการสามารถใช้วิธีทดสอบได้และให้ผลที่ถูกต้อง รวมทั้งยื่นขอการรับรองหรือได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบตาม ISO/IEC 17025 และมาตรฐานการยอมรับความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์บริการ และคณะผู้ประเมินได้นำไปใช้เป็นแนวทางในการดำเนินการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทดสอบด้านอาหาร

2. นิยาม

- 2.1 (food) category หมายถึง (food) type ที่มีแหล่งกำเนิดเหมือนกัน
- 2.2 (food) type หมายถึง (food) item ที่ผ่านกระบวนการผลิตในลักษณะเดียวกัน โดยมีลักษณะเฉพาะและนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ที่คล้ายคลึงกัน
- 2.3 (food) item หมายถึง อาหาร อาหารสัตว์ สิ่งแวดล้อม หรือตัวอย่างกระบวนการผลิตขั้นต้นที่ชี้เฉพาะที่นำมาทดสอบ เพื่อเป็นตัวแทน (food) type นั้น ๆ
- 2.4 Implementation verification หมายถึง การทวนสอบการนำวิธีไปใช้ เป็นการแสดงความสามารถของปฏิบัติการในการใช้วิธีทดสอบที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้แล้ว (Validated) ได้อย่างถูกต้อง โดยมุ่งเน้น (food) item ที่อยู่ในขอบข่ายการตรวจสอบความใช้ได้ และอยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการนำไปใช้
- 2.5 (Food) item verification หมายถึง การแสดงความสามารถของห้องปฏิบัติการที่จะนำวิธีทดสอบไปใช้ตามขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการทดสอบ
- 2.6 Challenging (food) items หมายถึง (food) item ที่มีลักษณะหรือ Matrix ที่อาจมีผลกระทบต่อทดสอบ เช่น มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สูง มีองค์ประกอบของตัวอย่าง เช่น high fat content, lecithin, thickener เป็นต้น
- 2.7 Broad range of foods หมายถึง การทวนสอบในอาหารหลากหลายกลุ่ม ที่วิธีทดสอบมีการศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในอาหารอย่างน้อย 5 (food) category ขึ้นไป จาก
ท ู ง ห ม ด
15 (food) category
- 2.8 Limited range of foods หมายถึง การทวนสอบในอาหารจำกัดกลุ่ม ที่วิธีทดสอบมีการศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในอาหารน้อยกว่า 5 (food) category จากทั้งหมด
15 (food) category

3. (food) category

ห้องปฏิบัติการต้องเลือก (food) category (food) type และ (food) item เพื่อนำมาทวนสอบวิธีจากเอกสาร ISO 16140 – 3 : 2021 (Annex A) เช่น

(food) category: ผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านความร้อน และผลิตภัณฑ์นม

(food) type: ผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์

(food) item: นมพาสเจอร์ไรซ์ช็อกโกแลต

4. การทวนสอบวิธี

4.1 Broad range of foods verification

4.1.1 Implementation verification

- กรณีวิธีทดสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative) ให้เลือก 1 (food) item ที่เป็นขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการใช้ทดสอบ และเป็น (food) item ที่ตรงกับขอบข่ายที่มีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Validation)
- กรณีวิธีทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative) ให้เลือก 1 (food) item ที่อยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการใช้ทดสอบ และเป็น (food) item ใดก็ได้ที่อยู่ในขอบข่ายที่มีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Validation)

4.1.2 (Food) item verification

ห้องปฏิบัติการเลือกอย่างน้อย 5 Challenging (food) items จากแต่ละกลุ่มอาหารที่แตกต่างกัน โดยต้องมี 1 (food) item อยู่ในขอบข่ายที่วิธีใช้ใน Validation และอีก 4 (food) item อยู่ในขอบข่ายของวิธีทดสอบที่ไม่ได้นำมาศึกษา Validation หากมีกลุ่มอื่นๆ คือกลุ่มอาหารสัตว์เลี้ยงและอาหารสัตว์ กลุ่มตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม (จากกระบวนการผลิตอาหารและอาหารสัตว์) และกลุ่มตัวอย่างกระบวนการผลิตขั้นต้น (PPS) ทดสอบรวมอยู่ด้วย ให้เลือก 1 (food) item จากกลุ่มอื่นๆ เหล่านี้ ซึ่งอยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการวิธีนำไปใช้ทดสอบ

4.2 Limited range of foods verification

4.2.1 Implementation verification

- กรณีวิธีทดสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative) ให้เลือก 1 (food) item ที่เป็นขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการใช้ทดสอบ และเป็น (food) item ที่ตรงกับขอบข่ายที่มีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Validation)
- กรณีวิธีทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative) ให้เลือก 1 (food) item ที่อยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการใช้ทดสอบ และเป็น (food) item ใดก็ได้ที่อยู่ในขอบข่ายที่มีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Validation)

4.2.2 (Food) item verification

ห้องปฏิบัติการสามารถเลือกอย่างน้อย 5 Challenging (food) items จากแต่ละ (food) category ที่แตกต่างกัน โดยต้องมี 1 (food) item อยู่ในขอบข่ายที่วิธีใช้ในการ Validation และอีก 4 (food) item อยู่ในขอบข่ายของห้องปฏิบัติการซึ่งซึ่งไม่ได้นำมาศึกษา Validation หากมีกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่กลุ่มอาหารสัตว์เลี้ยงและอาหารสัตว์ กลุ่มตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม (จากกระบวนการผลิตอาหารและอาหารสัตว์) และกลุ่มตัวอย่างกระบวนการผลิตขั้นต้น (PPS) รวมอยู่ด้วย ให้เลือก 1 รายการจากแต่ละกลุ่มตัวอย่างอื่น ๆ เหล่านี้ ซึ่งอยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการวิธีนำไปใช้ทดสอบ

5. วิธีทดสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative) และวิธีทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative)

5.1 การทวนสอบวิธีทดสอบเชิงคุณภาพ

ห้องปฏิบัติการต้องทำการประมาณค่า LOD₅₀ (estimated LOD₅₀, eLOD₅₀) ทั้งใน Implementation verification และ (Food) item verification

5.2 การทวนสอบวิธีทดสอบเชิงปริมาณ

ห้องปฏิบัติการต้องหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานภายในห้องปฏิบัติการ (Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR}) ใน Implementation verification และการประมาณค่า eBias (Estimation of bias) ใน (Food) item verification

6. การหาค่า eLOD₅₀

โดยเลือกรูปแบบในการดำเนินการตามตารางที่ 1 ดังนี้

รูปแบบที่ 1 ใช้เมื่อมีความไม่แน่นอนของระดับการปนเปื้อนและไม่ทราบปริมาณที่แท้จริงใน test portion

รูปแบบที่ 3 ใช้เมื่อทราบปริมาณจุลินทรีย์ที่แน่นอน เช่น การเติมจุลินทรีย์โดยใช้ reference material ที่ทราบความเข้มข้น

รูปแบบที่ 2 ใช้เมื่อเลือกรูปแบบที่ 1 หรือรูปแบบที่ 3 แล้วไม่ได้ผลตามที่คาดการณ์ และจำเป็นต้องทดลองซ้ำ

ตารางที่ 1 : รูปแบบการหาค่า eLOD₅₀

Protocol	Inoculation level of the test portion					Total number of replicates
	High level 9 × LOD ₅₀ / test portion	Intermediate level 3 × LOD ₅₀ / test portion	Low level 1 × LOD ₅₀ / 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.

การทดสอบโดยห้องปฏิบัติการเลือก 1 (food) item ที่อยู่ในขอบข่ายที่มีข้อมูล Validation study และอยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการนำไปใช้มาศึกษา implementation verification และ เลือก (food) item (ควรเลือก Challenging (food) items) จากแต่ละ (food) category ที่อยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการนำไปใช้ศึกษา food items verifications ซึ่งการเติมจุลินทรีย์ใช้ข้อมูลค่า LOD₅₀ ของ (food) category จากข้อมูล Validation study ของวิธีทดสอบเพื่อใช้กำหนดระดับการเติมจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยเติมจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับ 9, 3 และ 1 เท่าของ LOD₅₀ ใน test portion สำหรับรูปแบบที่ 3 ให้เพิ่มจุลินทรีย์ 3 - 5 CFU/test portion กรณีเลือก (food) category ที่ไม่มีข้อมูล validation โดยกำหนดให้ LOD₅₀ ≤ 1 CFU/test portion

การประเมินผลโดยผลบวก (+) หรือผลลบ (-) และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางเอกสาร ISO 16140 - 3 : 2021 ดังนี้

- รูปแบบการทวนสอบที่ 1

บันทึกจำนวนผลบวกในแต่ละ test portion และอ่านผลโดยนำไปประเมิน eLOD₅₀ โดยการเทียบกับตารางซึ่งมีเงื่อนไขว่า blank level ต้องให้ผลลบ และรูปแบบทวนสอบที่ 1 ที่ระดับ high level (9 × LOD₅₀) ต้องเป็นบวก หากไม่เป็นไปตามเงื่อนไข ต้องศึกษาซ้ำทุกระดับ และหากผลที่อ่านได้เป็น “Unreliable MPN result” ต้องศึกษาซ้ำเช่นเดียวกัน

- รูปแบบการทวนสอบที่ 2
การเติมจุลินทรีย์ให้ปนเปื้อนระดับปานกลางและระดับต่ำ (intermediate and less level) สามารถให้ผลบวกและลบได้ นำผลบวกที่ได้อ่านค่า eLOD₅₀ ถ้าผลการศึกษาเป็นลบหมดต้องศึกษาซ้ำ

- รูปการทวนสอบแบบที่ 3
เติมจุลินทรีย์ระหว่าง 3 - 5 cfu/test portion ผลของระดับการปนเปื้อนน้อยกว่า 3 (<3) cfu/test portion โดยมีผลบวกอย่างน้อย 6 ใน 7 test portion หากปนเปื้อนมากกว่า 5 (>5) cfu/test portion ผลการศึกษาไม่สามารถใช้ได้ ให้ทำการทดสอบซ้ำ

เกณฑ์การยอมรับค่า eLOD₅₀ ที่ได้จากการศึกษา รูปแบบการทวนสอบที่ 1 และ 2 ต้องไม่เกิน 4 เท่าของ LOD₅₀ ($\leq 4 \times \text{LOD}_{50}$) ของข้อมูล Validation study ในกรณีที่ (food) item ไม่มีข้อมูล Validation study เกณฑ์ค่า eLOD₅₀ ไม่เกิน 4 CFU/test portion ส่วนรูปแบบการทวนสอบที่ 3 ต้องให้ผลบวกอย่างน้อย 6 ใน 7 ซ้ำ (ถ้ามากกว่า 5 CFU/test portion ต้องทดสอบซ้ำ) และค่า LOD₅₀ จากข้อมูลการศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี และ eLOD₅₀ ของการทวนสอบจะเปรียบเทียบกันได้ ต้องอยู่ในหน่วยเดียวกัน เช่น ต่อ 25 กรัม, ต่อ 100 mL หรือ ต่อ 375 กรัม เป็นต้น หาก LOD₅₀ จากข้อมูลการศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแสดงในรูป mL/g, CFU/mL ให้คูณด้วยน้ำหนักหรือปริมาณของ test portion

7. การหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานภายในห้องปฏิบัติการ (S_{IR})

ให้ดำเนินการทวนสอบเฉพาะ implementation verification โดยห้องปฏิบัติการต้องเลือก 1 (food) item ที่อยู่ใน (food) category ที่ใช้ทำ Validation และห้องปฏิบัติการมีการทดสอบใน (food) item นี้ โดยระหว่างการทวนสอบในแต่ละ Test portion ห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามทุกขั้นตอนของวิธี รวมถึงการตรวจการยืนยัน (Confirmation test) การหาค่า S_{IR} ในอาหาร 1 (food) item ต้องใช้อย่างน้อย 10 test sample โดยต้องเตรียมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนแบ่งให้เป็น 2 test portions (ตาม ISO 6887) โดยเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดสอบให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ เช่น ผู้ทดสอบคนละคน อาหารเลี้ยง จุลินทรีย์ต่างรุ่น เครื่องมือต่างกัน เป็นต้น และระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่เติมลงไปต้องอยู่ในช่วงที่ห้องปฏิบัติการพบในตัวอย่างธรรมชาติ การเลือก (food) item เพื่อหา S_{IR} แนะนำให้เลือก (food) item ที่เตรียมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันง่าย ลดการเกิด matrix uncertainty ในกรณีที่สามารถดำเนินการได้ ให้เลือก (food) item ที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ และมีปริมาณที่พบในการทดสอบของห้องปฏิบัติการ หากพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนปริมาณน้อย (<10 CFU หรือ $\Sigma c < 30$) ให้เติมจุลินทรีย์ลงไปได้ โดยต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ครอบคลุมการทดสอบของห้องปฏิบัติการ และต้องทราบระดับของจุลินทรีย์ที่จะเติม เช่น ห้องปฏิบัติการพบว่า (food) item นี้มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนระหว่าง 30 - 30,000 CFU/g ให้เติมจุลินทรีย์ 3.0×10³ CFU ลงใน initial suspension ปริมาตร 100 mL ที่มี test portion 10 g จะได้จุลินทรีย์ประมาณ 30 CFU/g เป็นต้น จากนั้นคำนวณค่า S_{IR} โดยการใช้สูตร

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

S_{IR} = intralaboratory reproducibility standard deviation

i = ลำดับของตัวอย่างทดสอบ, i = 1 ถึง n (n ≥ 1)

n = จำนวนของตัวอย่างทดสอบ

y_{IA}, y_{IB} = log₁₀ (CFU/g) หรือ log₁₀ (CFU /mL) ของเงื่อนไข A และ B ตามลำดับ

โดยเกณฑ์การยอมรับค่า S_{IR} ที่ได้จากการทดสอบต้องมีค่าต้องไม่เกิน 2 เท่าของค่า S_R ของค่าเฉลี่ยน้อยสุดของ (food) item นั้น

8. การหาค่า eBias

ให้ดำเนินการทวนสอบเฉพาะ (food) item verification โดยห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามทุกขั้นตอนของวิธี รวมถึงการตรวจยืนยัน (ถ้ามี) และต้องตรวจยืนยันทุก test portion โดยห้องปฏิบัติการต้องทดสอบอย่างน้อย 1 (food) item/ (food) category เสนอให้เลือก Challenging (food) items มีการทดสอบเพื่อใช้ในการทวนสอบ จากนั้นทำให้ปนเปื้อนใน initial suspension ด้วยการเติมจุลินทรีย์ที่ต้องการอย่างน้อย 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง และสูง (low, medium, high) ครอบคลุมปริมาณที่พบในการทดสอบของห้องปฏิบัติการ และแต่ละระดับ ให้ทำ 2 ซ้ำ หาปริมาณจุลินทรีย์เป้าหมายใน (food) item และหาปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น (pure culture) ที่เติม หากจำเป็นต้องหาปริมาณ background contamination เป็น negative control และเพื่อเป็นข้อมูลประกอบการหาสาเหตุกรณีเกิดข้อผิดพลาด จากนั้นตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ โดยเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์ที่พบคำนวณในรูปของ \log_{10} CFU/g หรือ \log_{10} CFU/mL กับปริมาณจุลินทรีย์ที่เติม (inoculum suspension) เกณฑ์การยอมรับต่างกันไม่เกิน $0.5 \log_{10}$ CFU/g หรือ \log_{10} CFU/mL

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

ให้ดำเนินการทวนสอบเฉพาะ Implementation verification เพื่อยืนยันว่าห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีการตรวจยืนยันและการจำแนกดังกล่าวไปใช้ได้ถูกต้อง โดยโคโลนีของจุลินทรีย์ที่แยกมาได้ต้องให้ผลตรงกับผลที่คาดหวัง (expected results) ห้องปฏิบัติการต้องเลือก selective agar plate 1 ชนิด ที่ใช้ Validation study และเป็นชนิดที่ห้องปฏิบัติการใช้ ในกรณีที่ไม่มี selective agar plate ชนิดดังกล่าว ให้ใช้ non – selective agar ที่ใช้ใน Validation study นำจุลินทรีย์เป้าหมายและไม่ใช่เป้าหมาย อย่างละ 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้บน selective agar 1 ชนิด ที่ห้องปฏิบัติการใช้ และเป็น selective agar ที่ใช้ Validation study กรณีที่ห้องปฏิบัติการไม่มี selective agar ชนิดดังกล่าว ให้เลือกใช้ non selective agar ตามที่ Validation study จากนั้นเลือก typical colonies ไปทดสอบผลต้องสอดคล้องกัน 100%

10. การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่มีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบแล้ว – รูปแบบทางเทคนิคสำหรับการทวนสอบวิธี (Validated identification method - Technical protocol for verification)

ให้ดำเนินการทวนสอบเฉพาะ Implementation verification เพื่อแสดงว่าห้องปฏิบัติการสามารถใช้วิธีการตรวจยืนยันและการจำแนกของวิธีได้ถูกต้อง โดยโคโลนีของจุลินทรีย์ที่แยกออกมาทดสอบต้องให้ผลตรงกับผลที่คาดหวัง โดยเลือก selective agar ที่ใช้ศึกษาการตรวจสอบวิธีทดสอบและที่ห้องปฏิบัติการใช้ กรณีที่ Validation study ใช้อาหาร selective agar หลายชนิด ต้องนำทุกชนิดที่ใช้มาทวนสอบ กรณีที่ Validation study ไม่มีการใช้ selective agar ให้ทวนสอบโดยใช้อาหาร non – selective agar แทน ให้เลือกจำนวนสายพันธุ์จุลินทรีย์ (strains) ที่ต้องนำมาทดสอบ จะขึ้นอยู่กับขอบข่าย ของ Validation study และขอบข่ายการใช้งานของห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งได้ดังนี้

- วิธีการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ครอบคลุมหลายวงศ์ (families), หลายสกุล (genera) และหลายชนิด (species) จะต้องทดสอบ 15 สายพันธุ์ และควรมาจากต่างวงศ์ ต่างสกุล และต่างชนิดกันให้มากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้

- วิธีการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์จำกัดอยู่เพียงหลายสกุลภายในวงศ์เดียว จะต้องทดสอบ 10 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน และควรรวมจากต่างสกุลและต่างชนิดกันให้มากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้
- วิธีการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ภายในสกุลเดียว จะต้องทดสอบ 5 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน และควรรวมจากต่างชนิดกันให้มากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้

ให้เลือกสายพันธุ์ที่สามารถฟื้นตัวหรือเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ Selective agar ที่ใช้ทดสอบ การเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จะต้องอ้างอิงจากสายพันธุ์ที่เคยทดสอบในการตรวจสอบความใช้ได้วิธีทดสอบ แต่ละสายพันธุ์จะต้องถูกจำแนกรายละเอียดให้เพียงพอตามที่กำหนดไว้ โดยการใช้การทดสอบทางลักษณะปรากฏ (phenotypic) หรือการทดสอบทางโมเลกุล (molecular tests) ที่เกี่ยวข้อง จะต้องทราบวิธีการหรือหลักการของวิธีที่ใช้ในจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ สายพันธุ์ส่วนใหญ่ควรรวมจากกลุ่ม (อาหาร) ที่อยู่ในขอบข่ายการใช้งานของห้องปฏิบัติการ และครอบคลุมความหลากหลายทางชีวภาพที่พบในห้องปฏิบัติการทดสอบ หลังจากนั้นทำการประเมินผลการทดสอบ รายงานค่าความสอดคล้องในการจำแนกชนิด (Identification Agreements [IA]) และความเบี่ยงเบนในการจำแนกชนิด (Identification Deviations [ID]) ระหว่างผลที่คาดหวังกับผลที่ทดสอบได้จริง และต้องรายงานสายพันธุ์ที่ไม่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้ด้วย โดยเกณฑ์การยอมรับคือผลการทดสอบต้องสอดคล้องกัน 100%

เอกสารอ้างอิง

1. ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
2. ISO 16140-3:2021 AMENDMENT 1 2025-08 Microbiology of the food chain — Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory AMENDMENT 1 : Protocol for verification of validated identification method of microorganisms