<u>ตัวชี้วัดที่ 3.35</u> : ระดับความสำเร็จของการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ

ผลการวิเคราะห์สถานการณ์ตัวชี้วัด ความรู้ที่นำมาใช้ (รอบ 5 เดือนแรก)

- **ผลการวิเคราะห์สถานการณ์ตัวชี้วัด**

เชื้อ *Legionella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป หรือในแหล่งน้ำต่างๆ ทั้งแหล่งน้ำตามธรรมชาติและแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น โดยเชื้อสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ดีในแหล่งน้ำนิ่ง ที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 20 – 50 องศาเซลเซียสและทนต่ออุณหภูมิสูงได้ในช่วง 55-60 องศาเซลเซียส สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานหลายเดือนในสิ่งแวดล้อมที่มีความชื้นสูง เจริญเติบโตได้ภายใต้ไบโอฟิล์ม (Biofilm) ที่มีการสะสมตามผิวสัมผัสต่างๆที่ไม่มีการดูแลบำรุงรักษาอย่างถูกต้อง และสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในโปรโตซัว อะมีบา สาหร่ายและอินทรียวัตถุหลากหลายชนิดได้ ซึ่งพบมากตามหอผึ่งเย็น (cooling tower) ของระบบระบายความร้อนรวมที่มีตามอาคารขนาดใหญ่ต่างๆ เช่น โรงแรม โรงพยาบาล ตลอดจนเครื่องทำความร้อน ถังเก็บน้ำ ระบบกระจายน้ำและน้ำพุประดับอาคารหรือสถานที่ต่างๆ เชื้อ *Legionella* spp. ทำให้เกิดโรคลีเจียนเนลโลสิส (Legionellosis) ซึ่งมีอาการทางคลินิกได้ 2 ลักษณะ คือ หากมีภาวะปอดอักเสบ อาการรุนแรงและอัตราเสียชีวิตสูง เรียกว่า โรคลีเจียนแนร์ (Legionnaires disease) หากไม่มีภาวะปอดอักเสบ อาการไม่รุนแรง เรียกว่า โรคไข้ปอนเตียก (Pontiac fever) การระบาดของโรคไม่ได้เกิดจากการติดต่อจากคนสู่คน แต่เกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อจากแหล่งน้ำสู่คน โดยเชื้อแพร่กระจายจากแหล่งน้ำไปกับละอองฝอยของน้ำและแพร่กระจายผ่านทางอากาศ เมื่อสูดหายใจรับเอาละอองน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าสู่ร่างกายอาจก่อให้เกิดอาการของโรคได้ โดยกลุ่มคนที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อหรือเกิดโรคนี้ ได้แก่ ผู้สูงอายุ ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอหรือกำลังอยู่ระหว่างการรักษาโรคบางชนิด เช่น มะเร็ง เบาหวาน ไต HIV เป็นต้น ผู้ที่ดื่มสุราหรือสูบบุหรี่จัด และผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยยาบางชนิด รวมทั้งนักท่องเที่ยวที่ส่วนใหญ่เป็นชาวต่างชาติ โรคลีเจียนแนร์ถือเป็นปัญหาของนักท่องเที่ยวต่างชาติ จากข้อมูลสถานการณ์โรคลีเจียนแนร์ในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2556-2565 กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค พบผู้ป่วยสะสม 131 ราย เสียชีวิต 1 รายในปี 2563 พบผู้ป่วยรายล่าสุดเมื่อปี 2564 อายุเฉลี่ย 62 ปี (อายุต่ำสุด 23 ปี และอายุสูงสุด 85 ปี) ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเพศชายวัยกลางคนถึงสูงอายุ และเป็นนักท่องเที่ยวชาวต่างชาติที่เดินทางเข้ามาท่องเที่ยวในประเทศไทย และจากข้อมูลของ The European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet) ซึ่งเป็นหน่วยงานเฝ้าระวังโรคลีเจียนแนร์ในเขตเศรษฐกิจยุโรป พบจำนวนผู้ป่วยโรคลีเจียนแนร์ที่เกี่ยวข้องกับการเดินทาง (Travel-associated Legionnaires' Disease : TALD) ในปี 2564 จำนวน 895 ราย ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 38 % เมื่อเทียบกับปี 2563 การแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ ส่งผลกระทบโดยตรงต่อธุรกิจการท่องเที่ยวของหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งมีมูลค่าสูงในแต่ละปี ในทวีปยุโรปมีการจัดตั้งหน่วยงาน ELDSNet เพื่อเฝ้าระวังโรคนี้จากการท่องเที่ยวโดยเฉพาะ ขณะที่ประเทศไทยโรคลีเจียนแนร์ยังไม่ได้เป็นโรคในระบบเฝ้าระวัง ทำให้การเฝ้าระวังอาจไม่ทันต่อสถานการณ์ได้

กรมอนามัยในฐานะหน่วยงานภาครัฐ ซึ่งมีภารกิจในการส่งเสริมให้ประชาชนมีสุขภาพดี โดยมีการศึกษา วิเคราะห์ วิจัย พัฒนาและถ่ายทอดองค์ความรู้และเทคโนโลยีด้านการส่งเสริมสุขภาพ การจัดการปัจจัยเสี่ยงต่อสุขภาพ และการจัดการอนามัยสิ่งแวดล้อมที่เอื้อต่อการมีสุขภาพดี รวมทั้งการประเมินผล

กระทบต่อสุขภาพ เพื่อมุ่งเน้นให้ประชาชนมีความรู้และทักษะในการดูแลตนเอง ครอบครัวและชุมชน รวมตลอดจนถึงการสนับสนุนให้หน่วยงานส่วนภูมิภาค องค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น และภาคีเครือข่ายทั้งภาครัฐและภาคเอกชน มีส่วนร่วมในการสร้างเสริมสุขภาพและจัดการอนามัยสิ่งแวดล้อมเพื่อส่งเสริมให้คนไทยมีสุขภาพดีโดยถ้วนหน้า ได้มีการออกประกาศกรมอนามัย พ.ศ.2544 เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อลีจิโอเนลลาในหอผึ่งเย็นของอาคารในประเทศไทย เพื่อกำกับ ควบคุมดูแล เฝ้าระวัง และสร้างความตระหนักในการป้องกันปัญหาการแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ และเป็นแนวทางสำหรับเจ้าหน้าที่ของรัฐ ผู้ประกอบการและประชาชนทั่วไป ได้มีความรู้ ความเข้าใจในเรื่องโรคลีเจียนแนร์ รวมทั้งสามารถใช้เป็นแนวทางในการบำรุงรักษาระบบน้ำหรือแหล่งน้ำที่ใช้ภายในอาคารสถานประกอบการต่างๆ ได้ ซึ่งถือเป็นการลดอุบัติการณ์และความเสี่ยงต่อการระบาดของโรคดังกล่าวในประเทศไทยได้ และยังเป็นการสร้างความเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยให้แก่ประชาชน นักท่องเที่ยวทั้งภายในประเทศและต่างประเทศอีกด้วย

กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย มีภารกิจหลักในการตรวจวิเคราะห์และทดสอบคุณภาพน้ำบริโภค/อุปโภค น้ำเสีย/น้ำทิ้งและน้ำประเภทอื่นๆ โดยการตรวจวิเคราะห์และทดสอบ ประกอบด้วยการตรวจวิเคราะห์ด้านกายภาพ ด้านเคมี-โลหะหนักและการทดสอบทางด้านจุลชีววิทยา ซึ่งรายการทดสอบทางจุลชีววิทยา ประกอบกอบด้วย การทดสอบ coliforms, fecal coliforms, *E. coli* และเชื้อก่อโรคอื่นๆ รวมทั้ง *Legionella* spp. โดยปัจจุบันวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน (Reference standard) คือ วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method) ซึ่งต้อง ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะและใช้เวลานานกว่า 15 วันในการดำเนินการ จากข้อจำกัดของการทดสอบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวอาจทำให้การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์ไม่ทันต่อสถานการณ์ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีดังกล่าว เพื่อให้ได้วิธีที่มีความรวดเร็ว มีความจำเพาะสูง และรองรับปริมาณตัวอย่างจำนวนมาก สำหรับใช้ทดสอบทางห้องปฏิบัติการ โดยวิธีที่ศึกษาในครั้งนี้ คือ วิธี Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) ซึ่งถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมหลายชนิด เช่น *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, SARS-CoV-2, enteroviruses และ adenoviruses เป็นต้น โดยเปรียบเทียบความสอดคล้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อเป็นข้อมูลความน่าเชื่อถือสำหรับนำวิธีไปใช้ในการเฝ้าระวังและป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ Legionella spp. ต่อไป

➢ ความรู้ที่นำมาใช้ประกอบการวิเคราะห์

1. การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method)

การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะเจาะจงและการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันคุณสมบัติของเชื้อ โดยวิธีทดสอบที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. อ้างอิงตามมาตรฐาน ISO 11731 : 2017 Water quality – Enumeration of Legionella โดยก่อนการทดสอบต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อเป้าหมาย (Concentration of sample) โดยวิธี Membrane filtration technique ใช้แผ่นกรองชนิด polycarbonate ที่มีขนาดรูกรอง (Pore size) 0.2 ไมโครเมตร กรณีที่ตัวอย่างมีตะกอนจำนวนมากไม่สามารถใช้วิธี Membrane filtration technique ได้ สามารถใช้วิธี Centrifugation technique แทน โดยปั่นเหวี่ยง

ตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 6,000 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดตัวอย่าง (Inoculate) ที่ผ่านการ Concentrate แล้ว (ด้วยวิธี Membrane filtration technique หรือ Centrifugation technique อย่างใดอย่างหนึ่ง) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GVPC agar (อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered charcoal yeast extract; BCYE ที่มีส่วนผสมของ glycine, vancomycin, polymyxin B และ cycloheximide) แล้ว spread plate ให้ตัวอย่างเกลี่ยทั่วผิวหน้าอาหาร นำอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน หากพบโคโลนีที่คาดว่าจะเป็น *Legionella* spp. (Typical colony) ให้เขี่ยเชื้อ (sub-culture) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ BCYE ที่มีส่วนประกอบของ L-cysteine (BCYE agar with L-cysteine) และ BCYE ที่ไม่มีส่วนประกอบของ L-cysteine (BCYE agar without L-cysteine) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน อ่านผลการทดสอบ หากเป็นเชื้อ *Legionella* spp. ต้องสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar with L-cysteine และ ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar without L-cysteine

2. การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR)

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ มีขั้นตอนเริ่มจากการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นขึ้น เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อเป้าหมาย (Concentration of sample) โดยอาจใช้วิธี Membrane filtration technique, Centrifugation technique หรือวิธีอื่นๆ ที่เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ มาสกัดเพื่อให้ได้สารพันธุกรรม (DNA/RNA) ของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายที่มีความบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เหมาะสม โดยทำตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่ระบุในชุดสกัด และสารพันธุกรรมที่สกัดได้นำไปทดสอบต่อในขั้นตอน Real-time PCR หรือกรณีที่ยังไม่นำไปทดสอบให้เก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

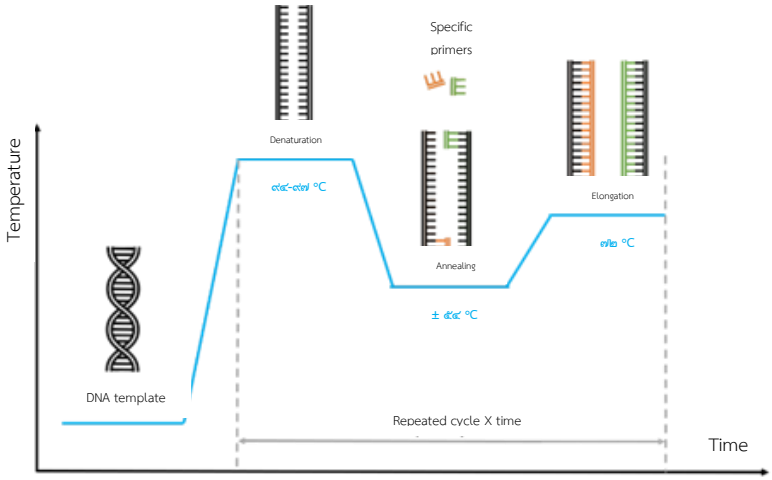
Real-time PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย ที่พัฒนาต่อจากเทคนิค PCR โดยตัดขั้นตอนการทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจวัด PCR product ออก แล้วใช้การติดตามวัดสัญญาณเรืองแสงที่เกิดขึ้น ขณะที่ DNA เป้าหมายเพิ่มจำนวนในทุกๆรอบ ตั้งแต่รอบแรกจนรอบสุดท้ายของการทำปฏิกิริยา (real-time detection) ปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ PCR product ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยา ซึ่งจะเป็นแบบทวีคูณ (exponential amplification) ในลักษณะกราฟรูปตัว S (S-shape / sigmoid curve) นอกจากนี้วิธี Real-time PCR ถูกใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรม โดยการตรวจตัวอย่างเปรียบเทียบค่าความเข้มข้น DNA อ้างอิงที่ทราบปริมาณ ที่อัตราเจือจางต่างๆ (Standard curve) จึงเรียกว่า quantitative PCR (qPCR)

ส่วนประกอบหลักของปฏิกิริยา PCR (Master Mix) ได้แก่ template (ต้นฉบับของ DNA ที่เราต้องการจะเพิ่มจำนวน), primers (สาย DNA ที่เป็น single strand ที่จับคู่ได้กับปลายของ template ทั้งสองด้าน โดยจะมีด้าน 3' เป็น hydroxyl group ที่จะสามารถต่อกับ nucleotides อื่นได้), polymerase (เอนไซม์ที่จะใช้เพื่อการต่อสายของ DNA) และ nucleotides ทั้ง 4 ตัว (A-adenine, C-cytosine, G-guanine, T-thymine) ที่เอาไว้ต่อกันเป็น DNA สายใหม่ โดยขั้นตอนพื้นฐานของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่วนไปวนมา 30 ถึง 50 รอบ ในเครื่อง thermocycler ดังนี้

1) Denaturation: ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นการทำลายพันธะระหว่าง nucleotides ทำให้สาย DNA ที่ม้วนเกลียวอยู่เป็นคู่ แยกออกจากกันเป็นเส้นตรง 2 เส้น และที่อุณหภูมินี้ปฏิกิริยาต่างๆจากเอนไซม์ในรอบก่อนหน้านั้นจะหยุดลงทั้งหมด

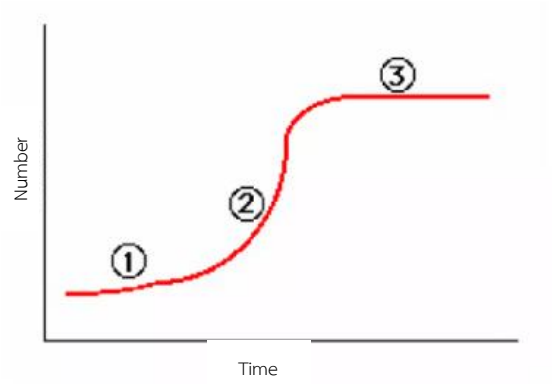
2) Annealing: ที่อุณหภูมิประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer สามารถเกาะติดกับ template เพื่อเตรียมตัวตั้งต้นต่อสายคู่ของ template

3) Extension and Elongation: ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ polymerase ทำให้มีการนำ nucleotides ต่างๆ มาต่อทางด้าน 3' ของ primer โดยต่อให้ complementary กับลำดับเบสบน template ที่ primer มาเกาะไว้แล้ว ทำให้เกิดการสร้าง DNA ต่อเนื่องได้มากเพราะเป็นการสร้างแบบเพิ่มจำนวนทวีคูณ ถ้าเริ่มจาก DNA template สายคู่สายเดียว เมื่อถึงวงจรที่สอง จะมีจำนวน PCR product เพิ่มขึ้นเป็น 2 คู่ แต่ละคู่ เมื่อผ่านขั้นตอนของ PCR ในรอบที่สามจะได้ PCR product ออกมาเป็น 2^3 คู่ การเพิ่มจะเป็นแบบ exponential ได้ product ใน n cycle เป็น 2^n คู่



ภาพที่ 1 ขั้นตอนพื้นฐานของปฏิกิริยา PCR

และเนื่องจากคุณสมบัติของส่วนประกอบข้างต้น รวมทั้งสภาวะของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละการทดสอบ ทำให้ปฏิกิริยาของ PCR ที่เกิดขึ้นเมื่อนำปริมาณ product ที่เพิ่มขึ้นมา plot เทียบกับเวลา จะได้กราฟรูปตัว S (S-shape / sigmoid curve) ในช่วงแรก product จะเพิ่มจำนวนทีละไม่มากนัก เรียกว่า lag phase (1) แต่เมื่อมีจำนวนมากขึ้นถึงระดับหนึ่ง จำนวน product จึงจะเพิ่มแบบทวีคูณ เรียกว่า exponential phase (2) จนกระทั่งไม่มี polymerase หรือ nucleotides เหลืออยู่ ทำให้ปริมาณคงที่เป็นระยะที่เรียกว่า plateau phase (3) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาของ PCR ที่เกิดขึ้น เมื่อนำปริมาณ product ที่เพิ่มขึ้นมา plot เทียบกับเวลา

3. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method validation) ทางจุลชีววิทยา

ห้องปฏิบัติการทดสอบที่มีการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 : 2017 “ข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ” ต้องเลือกวิธีทดสอบที่เป็นไปตามความต้องการของลูกค้าและเหมาะสมสำหรับตัวอย่างทดสอบ ในกรณีที่ลูกค้าไม่ได้ระบุวิธีทดสอบ ห้องปฏิบัติการต้องเลือกใช้วิธีที่เป็นปัจจุบัน ในระดับวิธีมาตรฐานระหว่างประเทศ ระดับภูมิภาค หรือระดับประเทศ หรือเป็นวิธีในตำราหรือวารสารทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องซึ่งรับรองโดยหน่วยงานด้านวิชาการที่เชื่อถือได้ ถ้าห้องปฏิบัติการต้องการใช้วิธีที่ไม่เป็นมาตรฐาน (non-standard method) วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเอง วิธีที่มีการขยายหรือดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (modified method) รวมทั้งการใช้วิธีมาตรฐานนอกขอบข่ายที่กำหนดไว้ หรือวิธีที่พัฒนาเป็นชุดทดสอบอย่างง่ายและ/หรือให้ผลรวดเร็ว ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบนั้นๆ ที่เรียกว่า วิธีทางเลือก (alternative method) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานหรือวิธีอ้างอิง (reference method) ตามขั้นตอนในวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ของวิธี เพื่อทดสอบยืนยันว่าวิธีทางเลือกนั้นเหมาะกับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ ในขอบเขตการยอมรับว่าผลทดสอบมีความถูกต้องเชื่อถือได้

ในปัจจุบันเอกสารอ้างอิงสำหรับดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาที่นิยมใช้อ้างอิง คือ ISO 16140 - 2 : 2016 “Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method” ซึ่งเป็นฉบับหนึ่งในกลุ่มวิธีมาตรฐาน ISO 16140 ภายใต้ชื่อเรื่อง “Microbiology of the food chain - Method validation” มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นแนวปฏิบัติในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว (rapid methods) และ/หรือวิธีทดสอบอย่างง่าย (easier methods) ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อการค้า (proprietary methods) หรือวิธีทดสอบที่จะนำมาใช้ทดแทนวิธีอ้างอิง

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตาม ISO 16140 - 2 : 2016 ที่ดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการหลัก (organizing laboratory) ประกอบด้วย 3 ส่วน ดังต่อไปนี้

1) การศึกษาความไว (Sensitivity study) เป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือกว่ามีค่าความไว (sensitivity) ที่แตกต่างกันหรือไม่ สามารถศึกษาในตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (naturally contaminated samples) หรือตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples) ก็ได้

2) การศึกษาค่า relative level of detection; RLOD (RLOD study) เป็นการเปรียบ เทียบค่าปริมาณต่ำสุดของจุลินทรีย์ที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีทางเลือกและด้วยวิธีอ้างอิง โดยต้องทำการศึกษาในตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples)

3) การศึกษา Inclusivity/Exclusivity ของวิธีทางเลือก โดย Inclusivity study เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงความสามารถของวิธีทางเลือกในการตรวจพบเชื้อเป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ส่วน Exclusivity study เป็นการศึกษากับเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมายที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์จำนวนหลายๆ สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีทางเลือกไม่ควรตรวจพบเชื้อเหล่านี้ (เชื้อที่จะคัดเลือกมาทดสอบ ควรเป็นเชื้อที่มีโอกาสเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อเป้าหมาย หรือมีโอกาสให้ผลทดสอบบวกเช่นเดียวกับเชื้อเป้าหมาย)

4. การประเมินความสอดคล้องของข้อมูลด้วยสถิติ Kappa analysis

Kappa coefficient หรือ Cohen's kappa coefficient นั้นเป็นค่าสถิติที่ใช้ทดสอบความสอดคล้อง (Consistency) กันของข้อมูล 2 กลุ่ม ในบางกรณีอาจใช้สำหรับเปรียบเทียบการประเมินค่าของข้อมูลชุดเดียวกันจากผู้ประเมิน 2 คนหรือวิธีทดสอบ 2 วิธี โดย Kappa coefficient นั้นไม่จำเป็นต้องอาศัยสมมุติฐานที่ว่าข้อมูลที่สนใจนั้นมีการแจกแจงแบบปกติ (Normal distribution) หรือที่เรียกว่า Non-parametric statistic ผลลัพธ์ที่ได้จาก Kappa coefficient นั้นจะอธิบายถึงความสอดคล้องระหว่างกันของ 2 ชุดข้อมูลว่าให้ผลเชิงบวกเหมือนกันหรือให้ผลเชิงลบเหมือนกัน โดยการแปลความหมายของค่าสถิติ Kappa ที่คำนวณได้พิจารณาดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแปลผลความสอดคล้อง (Strange of agreement) ของค่าสถิติ kappa

ค่าสถิติ kappa	ขนาดความสอดคล้อง (Strange of agreement)
<0.00	แย่ (Poor)
0.00 - 0.20	น้อย (Slight)
0.21 - 0.40	พอใช้ (Fair)
0.41 - 0.60	ปานกลาง (Moderate)
0.61 - 0.80	ดี (Sub Stantial)
0.81 - 1.00	ดีมาก/ค่อนข้างสมบูรณ์ (Almost Perfected)