

รายงานตัวชี้วัดตามคำรับรองการปฏิบัติราชการ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2567

(รอบ 5 เดือนแรก) ประจำปีเดือน ตุลาคม 2566 – กุมภาพันธ์ 2567

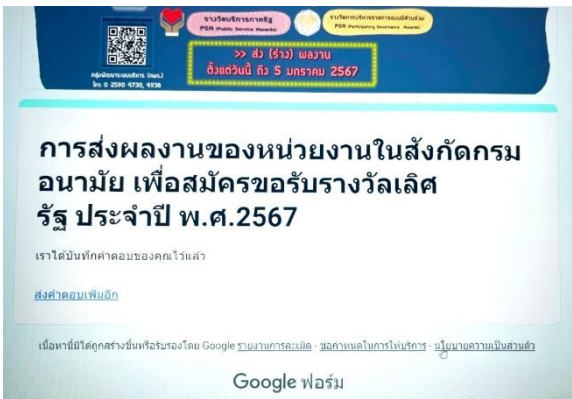
ตัวชี้วัดที่ 2.2 ระดับความสำเร็จของการจัดการความรู้ (Knowledge Management : KM) และการขับเคลื่อนการเป็นองค์กรแห่งการเรียนรู้ (Learning Organization : LO)

ระดับที่ 4 มีผลของการขับเคลื่อนการดำเนินงานวิชาการตามแผนและมาตรการที่กำหนดไว้ และผลดำเนินการสร้างผลงานวิชาการในรูปแบบต่างๆ / นวัตกรรมที่สอดคล้องกับภารกิจของหน่วยงาน

4.1 สรุปผลการดำเนินงานตามแผนปฏิบัติการดำเนินงานขับเคลื่อนการเป็นองค์กรแห่งการเรียนรู้ (LO)

แผนการดำเนินงาน/กิจกรรม	ผลการดำเนินงาน
1. โครงการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ (Knowledge Management : KM)	มีการศึกษาค้นคว้า แสวงหาองค์ความรู้ใหม่ของบุคลากรในหน่วยงาน โดยการนำเทคโนโลยีมาใช้ในการส่งเสริมการจัดการความรู้ และมีการแบ่งปันแลกเปลี่ยนความรู้ทุกวันที่ 15 ของเดือน ผ่านทาง https://phld2.anamai.moph.go.th/perform/link_gdt_user_view.php
2. กิจกรรมสัมมนาวิชาการ (Journal club)	จัดให้มีการกิจกรรมสัมมนาวิชาการ (Journal club) นำเสนอผลงานวิชาการในสัปดาห์ที่ 3 ของเดือน เดือนละ 2 เรื่อง เป็นประจำทุกเดือน ตั้งแต่เดือน ธันวาคม 2566 - กุมภาพันธ์ 2567 จำนวน 3 ครั้ง    

แผนการดำเนินงาน/กิจกรรม	ผลการดำเนินงาน
3. กิจกรรมLIKE Talk Award	กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย ส่งบทความสมัครเข้าร่วมกิจกรรม Like Talk Award ประจำปี 2567 ในวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2567 ชื่อผลงาน : “ฝากเอาไว้ในกายเธอ” ชื่อผู้นำเสนอ : นางสาวอาทิตย์ยา ฐานธรรม นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ นางสาวณฐมน ไทยสุริยะ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ Like Talk Award ปี 8 หน่วยงาน : กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย ชื่อผลงาน : “ฝากเอาไว้ในกายเธอ” ชื่อผู้นำเสนอ : นางสาวอาทิตย์ยา ฐานธรรม นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ นางสาวณฐมน ไทยสุริยะ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ “ฝากเอาไว้ในกายเธอ” สงสัยกันใช่ไหมคะว่านิยามคำนี้มาจากอะไร ซึ่งเรื่องที่เรามา นำเสนอในครั้งนี้เป็นการพูดถึงสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่มักแอบแฝงมากับอาหารที่ไม่ผ่านการปรุงสุก และไม่สะอาด รวมถึงผักสดที่เราทานกันอยู่บ่อยครั้ง แตกกันถูกไหมคะว่าคืออะไร เราจะยังไม่เฉลยตอนนี้ แต่วันนี้เรา จะยกตัวอย่าง “ผักสด” ผักสดเป็นอาหารที่อุดมไปด้วยโภชนาการที่สำคัญ มีประโยชน์ต่อสุขภาพ เป็นแหล่ง วิตามินและแร่ธาตุที่สำคัญต่อร่างกาย ในปัจจุบันผู้บริโภคหันมาดูแลสุขภาพมากขึ้น โดยการเลือกรับประทานผักสด เพื่อให้ได้รับสารอาหาร อย่างครบถ้วน เนื่องจากคุณค่าทางอาหารอาจลดลงหลังจากผ่านการปรุงสุก ผักสดจึงเป็นทางเลือกอันดับต้นๆ ที่ผู้บริโภคเลือกรับประทาน มากกว่าผักที่ผ่านกระบวนการปรุงสุก ถึงแม้การรับประทานผักสดจะได้รับคุณค่า ทางอาหารสูง แต่ในทางกลับกันก็มีโอกาสที่จะได้รับสิ่งปนเปื้อนที่อาจมีอยู่ในผักสดเช่นกัน ซึ่งสิ่งปนเปื้อน นั้นอาจได้รับตั้งแต่ขั้นตอนการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว และการขนส่ง สิ่งปนเปื้อนที่กล่าวถึง คือ “พยาธิ” “พยาธิ” มีแหล่งที่มาที่สำคัญ คือ ดินและน้ำที่ใช้ในการเพาะปลูก รวมถึงปุ๋ยอินทรีย์ที่ได้จากมูลสัตว์ ต่าง ๆ น้ำทิ้งและกากตะกอนจากระบบบำบัดสิ่งปฏิกูล ซึ่งเกษตรกรนิยมใช้สิ่งเหล่านี้สำหรับรดน้ำผักและเป็น ปุ๋ย แทนการใช้สารเคมี เพื่อเพิ่มสารอาหารในดิน ทำให้ผักแข็งแรง เจริญงอกงามดี แต่จะมีใครทราบหรือไม่ว่า น้ำทิ้งหรือกากตะกอนเหล่านี้มีความปลอดภัยสามารถนำมาใช้รดน้ำผักและใช้เป็นปุ๋ยได้ ซึ่งน้ำทิ้งจากระบบบำบัดสิ่งปฏิกูลเป็นของเหลวที่เหลือจากการกำจัดสิ่งปฏิกูล ส่วนกากตะกอนจาก ระบบบำบัดสิ่งปฏิกูลเป็นของแข็งที่เหลือจากการกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้ว ที่มาของน้ำทิ้งและกากตะกอนมาจากสิ่ง ปฏิกูลที่ได้จากครัวเรือน ซึ่งสิ่งปฏิกูลเหล่านี้ได้จากอุจจาระหรือปัสสาวะของคน หรือสิ่งอื่นสิ่งใดที่ปนเปื้อน อุจจาระหรือปัสสาวะ เนื่องจากอุจจาระและปัสสาวะเป็นแหล่งรวมของเชื้อโรคที่มาจากคน ดังนั้นการใช้น้ำทิ้ง และกากตะกอนจากระบบบำบัดเพื่อรดน้ำผักและใช้เป็นปุ๋ย อาจเป็นแหล่งแพร่กระจายของเชื้อโรคได้ นอกจากนี้ น้ำทิ้งและกากตะกอนเหล่านี้มีการปนเปื้อนไข่พยาธิอยู่ด้วย ผู้บริโภคผักที่ล้างไม่สะอาด หรือไม่ปรุงสุก ไข่พยาธิก็จะเจริญเป็นตัวอ่อนอยู่ในลำไส้เล็ก และเป็นตัวเต็มวัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพ ของผู้บริโภคได้ เช่น ทำให้เกิดอาการท้องผูก ท้องเสีย เกิดการสะสมของพิษในร่างกาย เกิดอาการโลหิตจาง ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและข้อ รวมทั้งมีโอกาที่จะทำให้พยาธิแพร่กระจายไปสู่กว้างได้ โดยพยาธิที่มักพบใน ผักสด เช่น พยาธิปากขอ (Hookworm), พยาธิเส้นด้าย (<i>Enterobius vermicularis</i>), พยาธิเส้นมี (Trichuris <i>trichiura</i>), พยาธิไส้เดือน (<i>Ascaris lumbricoides</i>) และพยาธิตัวตืด (<i>Taenia</i> spp.) เป็นต้น

แผนการดำเนินงาน/กิจกรรม	ผลการดำเนินงาน																																																																						
4. การประเมินรางวัลบริการภาครัฐ (PSA)	กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย ส่งผลงานเพื่อสมัครขอรับรางวัลบริการภาครัฐ (TPSA) ประจำปี 2567 ประเภทนวัตกรรมบริการ ในหัวข้อเรื่อง ชุดทดสอบแอมโมเนีย-ไนโตรเจน สำหรับการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำทิ้ง (Ammonia-Nitrogen test kit) เมื่อวันที่ 29 กุมภาพันธ์ 2567  รายชื่อผลงานของกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย และหน่วยงานในสังกัดกรมอนามัยที่เสนอขอรับรางวัลเลิศรัฐ ประจำปี 2567 <table><tr><th>ลำดับ</th><th>หน่วยงาน</th><th>ผู้เขียนผลงาน/ผู้ประสานงาน</th><th>ประเภทรางวัล</th><th>ชื่อผลงาน</th></tr><tr><td>1</td><td>กรมอนามัย โดยกองนวัตกรรมการสุขภาพ, กองส่งเสริมความรู้และสื่อสารสุขภาพ, กองอนามัยฉุกเฉิน, สำนักคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ, กลุ่มพัฒนาระบบบริหาร</td><td>1.นายแพทย์ศุภฤกษ์ สิริรุ่งเรือง 2.นายสายชล คล้อยเอี่ยม 3.นายภิญญาพัชญ์ จุลสุข 4.นางสาวกมลทิพย์ ชำนาญคง 5.ว่าที่ร้อยตรีสมพร สมทอง</td><td>PSA-เลือกตอบ ขยายผล</td><td>กรมอนามัยเปิดใจ ส่งเสริมประชาชนรอบรู้สุขภาพดี (*ได้รับรางวัลการบริหารแบบมีส่วนร่วม ประเภทเปิดใจใกล้ชิดประชาชน ระดับดีเด่น ปี 2566)</td></tr><tr><td>2</td><td>สำนักคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ</td><td>1.นายสมพงษ์ ชัยโอภาณนท์ (นพ.) 2.นายไพโรจน์ ต้นสุต</td><td>PSA-นวัตกรรม การบริการ</td><td>ไทยเซฟไทย เซฟครัวเรือน ที่ทำงานไร้โควิด (Thai Safe Thai for Safe Household and Working without COVID)</td></tr><tr><td>3</td><td>สำนักทันตสาธารณสุข</td><td>1.นางสาวศิริวรรณ พิทยรังสฤษฎ์ 2.นางนันทินี ตั้งเจริญดี</td><td>PSA-บริการตอบ โต้ทันที</td><td>ส่งเสริมผู้ประกอบการพัฒนาแปรรูปคุณภาพเพื่ออนามัยช่องปากของประชาชน</td></tr><tr><td>4</td><td>สำนักทันตสาธารณสุข</td><td>1.นางสาวนพวรรณ โพธิ์บุบผ 2.นางสาววราสินี เกียรติศิริ</td><td>PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล</td><td>การขับเคลื่อนการคัดกรองรอยโรคเสี่ยงมะเร็งและมะเร็งช่องปากในประเทศไทย</td></tr><tr><td>5</td><td>สำนักโภชนาการ</td><td>1.นางสาวปณิธิ ทอมมอย 2.นางกุลนันท์ แสนคำ</td><td>PSA-นวัตกรรม การบริการ</td><td>เมนูสุขภาพเพื่อโภชนาการที่ดีของประชาชน</td></tr><tr><td>6</td><td>สำนักอนามัยการเจริญพันธุ์</td><td>1.ดร.นพ.บุญฤทธิ์ สุทธิรัตน์ 2.นางอรอุมา ทางดี</td><td>PSA-นวัตกรรม การบริการ</td><td>Teen Club ตอบโจทย์ ตรงใจ เข้าถึงง่าย</td></tr><tr><td>7</td><td>กองกิจกรรมทางกายเพื่อสุขภาพ</td><td>1.นางสาวสุพิชชา วงศ์จันทร์ 2.นางสาวณัฐนันท์ แซ่มเพชร</td><td>PSA-นวัตกรรม การบริการ</td><td>ก้าวทำใจ ส่งเสริมกิจกรรมทางกาย ป้องกันโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง</td></tr><tr><td>8</td><td>สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม</td><td>1.นางสาวปริญญ์ โหม่งเจริญศรี 2.นางสาวนิพร เป็นสุข</td><td>PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล</td><td>โรงแรมที่เป็นมิตรกับสุขภาพและสิ่งแวดล้อมเพื่อการท่องเที่ยวสุขภาพดี (GREEN Health Hotel)</td></tr><tr><td>9</td><td>สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม</td><td>1.นางปริญญ์ บุรณะภักดี 2.นางสาวณัฐรัตน์ แมนเมธี</td><td>PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล</td><td>การพัฒนาคุณภาพระบบบริการอนามัยสิ่งแวดล้อมขององค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น (Environmental Health Accreditation: EHA)</td></tr><tr><td>10</td><td>สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม</td><td>1.นางสาวลัดดา ควันเจริญ 2.นางลลิตา นนทเกียรติกุล 3.นางสาวปิยภัทร์ ชูแก้วงาม</td><td>PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล</td><td>การส่งเสริมพัฒนาสังคมของประเทศไทย</td></tr><tr><td>11</td><td>สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ</td><td>1.นายเอกชัย ชัยเดช 2.นางสาวอารยา วงศ์ป้อม 3.นางสาวชณัญญิศา เลิศกุลโภชนา</td><td>PSA-นวัตกรรม การบริการ</td><td>การพัฒนาแบบเทคโนโลยีดิจิทัลรองรับการดำเนินงานด้านสุขาภิบาลอาหาร</td></tr><tr><td>12</td><td>กองประเมินผลกระทบต่อสุขภาพ</td><td>1.นางสาวกรวิภา ปุณณศิริ 2.นางสาวพิชญ์กมล ภูมิพันธ์ 3.นางสาวศุภวรรณ เขียวจิตร</td><td>PSA-นวัตกรรม การบริการ</td><td>ระบบเฝ้าระวังสุขภาพจากฝุ่นจิ๋วด้วย 4healthPM2.5</td></tr><tr><td>13</td><td>กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุข</td><td>1.นางสาวชรีรา ช่อโสม 2.นางสาวประไพ บัวไข</td><td>PSA-นวัตกรรม การบริการ</td><td>ชุดทดสอบแอมโมเนีย-ไนโตรเจน สำหรับเฝ้าระวังคุณภาพน้ำทิ้ง (Ammonia-Nitrogen test kit)</td></tr></table>	ลำดับ	หน่วยงาน	ผู้เขียนผลงาน/ผู้ประสานงาน	ประเภทรางวัล	ชื่อผลงาน	1	กรมอนามัย โดยกองนวัตกรรมการสุขภาพ, กองส่งเสริมความรู้และสื่อสารสุขภาพ, กองอนามัยฉุกเฉิน, สำนักคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ, กลุ่มพัฒนาระบบบริหาร	1.นายแพทย์ศุภฤกษ์ สิริรุ่งเรือง 2.นายสายชล คล้อยเอี่ยม 3.นายภิญญาพัชญ์ จุลสุข 4.นางสาวกมลทิพย์ ชำนาญคง 5.ว่าที่ร้อยตรีสมพร สมทอง	PSA-เลือกตอบ ขยายผล	กรมอนามัยเปิดใจ ส่งเสริมประชาชนรอบรู้สุขภาพดี (*ได้รับรางวัลการบริหารแบบมีส่วนร่วม ประเภทเปิดใจใกล้ชิดประชาชน ระดับดีเด่น ปี 2566)	2	สำนักคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ	1.นายสมพงษ์ ชัยโอภาณนท์ (นพ.) 2.นายไพโรจน์ ต้นสุต	PSA-นวัตกรรม การบริการ	ไทยเซฟไทย เซฟครัวเรือน ที่ทำงานไร้โควิด (Thai Safe Thai for Safe Household and Working without COVID)	3	สำนักทันตสาธารณสุข	1.นางสาวศิริวรรณ พิทยรังสฤษฎ์ 2.นางนันทินี ตั้งเจริญดี	PSA-บริการตอบ โต้ทันที	ส่งเสริมผู้ประกอบการพัฒนาแปรรูปคุณภาพเพื่ออนามัยช่องปากของประชาชน	4	สำนักทันตสาธารณสุข	1.นางสาวนพวรรณ โพธิ์บุบผ 2.นางสาววราสินี เกียรติศิริ	PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล	การขับเคลื่อนการคัดกรองรอยโรคเสี่ยงมะเร็งและมะเร็งช่องปากในประเทศไทย	5	สำนักโภชนาการ	1.นางสาวปณิธิ ทอมมอย 2.นางกุลนันท์ แสนคำ	PSA-นวัตกรรม การบริการ	เมนูสุขภาพเพื่อโภชนาการที่ดีของประชาชน	6	สำนักอนามัยการเจริญพันธุ์	1.ดร.นพ.บุญฤทธิ์ สุทธิรัตน์ 2.นางอรอุมา ทางดี	PSA-นวัตกรรม การบริการ	Teen Club ตอบโจทย์ ตรงใจ เข้าถึงง่าย	7	กองกิจกรรมทางกายเพื่อสุขภาพ	1.นางสาวสุพิชชา วงศ์จันทร์ 2.นางสาวณัฐนันท์ แซ่มเพชร	PSA-นวัตกรรม การบริการ	ก้าวทำใจ ส่งเสริมกิจกรรมทางกาย ป้องกันโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง	8	สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม	1.นางสาวปริญญ์ โหม่งเจริญศรี 2.นางสาวนิพร เป็นสุข	PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล	โรงแรมที่เป็นมิตรกับสุขภาพและสิ่งแวดล้อมเพื่อการท่องเที่ยวสุขภาพดี (GREEN Health Hotel)	9	สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม	1.นางปริญญ์ บุรณะภักดี 2.นางสาวณัฐรัตน์ แมนเมธี	PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล	การพัฒนาคุณภาพระบบบริการอนามัยสิ่งแวดล้อมขององค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น (Environmental Health Accreditation: EHA)	10	สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม	1.นางสาวลัดดา ควันเจริญ 2.นางลลิตา นนทเกียรติกุล 3.นางสาวปิยภัทร์ ชูแก้วงาม	PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล	การส่งเสริมพัฒนาสังคมของประเทศไทย	11	สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ	1.นายเอกชัย ชัยเดช 2.นางสาวอารยา วงศ์ป้อม 3.นางสาวชณัญญิศา เลิศกุลโภชนา	PSA-นวัตกรรม การบริการ	การพัฒนาแบบเทคโนโลยีดิจิทัลรองรับการดำเนินงานด้านสุขาภิบาลอาหาร	12	กองประเมินผลกระทบต่อสุขภาพ	1.นางสาวกรวิภา ปุณณศิริ 2.นางสาวพิชญ์กมล ภูมิพันธ์ 3.นางสาวศุภวรรณ เขียวจิตร	PSA-นวัตกรรม การบริการ	ระบบเฝ้าระวังสุขภาพจากฝุ่นจิ๋วด้วย 4healthPM2.5	13	กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุข	1.นางสาวชรีรา ช่อโสม 2.นางสาวประไพ บัวไข	PSA-นวัตกรรม การบริการ	ชุดทดสอบแอมโมเนีย-ไนโตรเจน สำหรับเฝ้าระวังคุณภาพน้ำทิ้ง (Ammonia-Nitrogen test kit)
ลำดับ	หน่วยงาน	ผู้เขียนผลงาน/ผู้ประสานงาน	ประเภทรางวัล	ชื่อผลงาน																																																																			
1	กรมอนามัย โดยกองนวัตกรรมการสุขภาพ, กองส่งเสริมความรู้และสื่อสารสุขภาพ, กองอนามัยฉุกเฉิน, สำนักคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ, กลุ่มพัฒนาระบบบริหาร	1.นายแพทย์ศุภฤกษ์ สิริรุ่งเรือง 2.นายสายชล คล้อยเอี่ยม 3.นายภิญญาพัชญ์ จุลสุข 4.นางสาวกมลทิพย์ ชำนาญคง 5.ว่าที่ร้อยตรีสมพร สมทอง	PSA-เลือกตอบ ขยายผล	กรมอนามัยเปิดใจ ส่งเสริมประชาชนรอบรู้สุขภาพดี (*ได้รับรางวัลการบริหารแบบมีส่วนร่วม ประเภทเปิดใจใกล้ชิดประชาชน ระดับดีเด่น ปี 2566)																																																																			
2	สำนักคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ	1.นายสมพงษ์ ชัยโอภาณนท์ (นพ.) 2.นายไพโรจน์ ต้นสุต	PSA-นวัตกรรม การบริการ	ไทยเซฟไทย เซฟครัวเรือน ที่ทำงานไร้โควิด (Thai Safe Thai for Safe Household and Working without COVID)																																																																			
3	สำนักทันตสาธารณสุข	1.นางสาวศิริวรรณ พิทยรังสฤษฎ์ 2.นางนันทินี ตั้งเจริญดี	PSA-บริการตอบ โต้ทันที	ส่งเสริมผู้ประกอบการพัฒนาแปรรูปคุณภาพเพื่ออนามัยช่องปากของประชาชน																																																																			
4	สำนักทันตสาธารณสุข	1.นางสาวนพวรรณ โพธิ์บุบผ 2.นางสาววราสินี เกียรติศิริ	PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล	การขับเคลื่อนการคัดกรองรอยโรคเสี่ยงมะเร็งและมะเร็งช่องปากในประเทศไทย																																																																			
5	สำนักโภชนาการ	1.นางสาวปณิธิ ทอมมอย 2.นางกุลนันท์ แสนคำ	PSA-นวัตกรรม การบริการ	เมนูสุขภาพเพื่อโภชนาการที่ดีของประชาชน																																																																			
6	สำนักอนามัยการเจริญพันธุ์	1.ดร.นพ.บุญฤทธิ์ สุทธิรัตน์ 2.นางอรอุมา ทางดี	PSA-นวัตกรรม การบริการ	Teen Club ตอบโจทย์ ตรงใจ เข้าถึงง่าย																																																																			
7	กองกิจกรรมทางกายเพื่อสุขภาพ	1.นางสาวสุพิชชา วงศ์จันทร์ 2.นางสาวณัฐนันท์ แซ่มเพชร	PSA-นวัตกรรม การบริการ	ก้าวทำใจ ส่งเสริมกิจกรรมทางกาย ป้องกันโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง																																																																			
8	สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม	1.นางสาวปริญญ์ โหม่งเจริญศรี 2.นางสาวนิพร เป็นสุข	PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล	โรงแรมที่เป็นมิตรกับสุขภาพและสิ่งแวดล้อมเพื่อการท่องเที่ยวสุขภาพดี (GREEN Health Hotel)																																																																			
9	สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม	1.นางปริญญ์ บุรณะภักดี 2.นางสาวณัฐรัตน์ แมนเมธี	PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล	การพัฒนาคุณภาพระบบบริการอนามัยสิ่งแวดล้อมขององค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น (Environmental Health Accreditation: EHA)																																																																			
10	สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม	1.นางสาวลัดดา ควันเจริญ 2.นางลลิตา นนทเกียรติกุล 3.นางสาวปิยภัทร์ ชูแก้วงาม	PSA-ขับเคลื่อน เห็นผล	การส่งเสริมพัฒนาสังคมของประเทศไทย																																																																			
11	สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ	1.นายเอกชัย ชัยเดช 2.นางสาวอารยา วงศ์ป้อม 3.นางสาวชณัญญิศา เลิศกุลโภชนา	PSA-นวัตกรรม การบริการ	การพัฒนาแบบเทคโนโลยีดิจิทัลรองรับการดำเนินงานด้านสุขาภิบาลอาหาร																																																																			
12	กองประเมินผลกระทบต่อสุขภาพ	1.นางสาวกรวิภา ปุณณศิริ 2.นางสาวพิชญ์กมล ภูมิพันธ์ 3.นางสาวศุภวรรณ เขียวจิตร	PSA-นวัตกรรม การบริการ	ระบบเฝ้าระวังสุขภาพจากฝุ่นจิ๋วด้วย 4healthPM2.5																																																																			
13	กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุข	1.นางสาวชรีรา ช่อโสม 2.นางสาวประไพ บัวไข	PSA-นวัตกรรม การบริการ	ชุดทดสอบแอมโมเนีย-ไนโตรเจน สำหรับเฝ้าระวังคุณภาพน้ำทิ้ง (Ammonia-Nitrogen test kit)																																																																			

แผนการดำเนินงาน/กิจกรรม	ผลการดำเนินงาน
5. อบรม : พฤติกรรมบริการที่เป็นเลิศ (Excellence Service Behavior – ESB)	โครงการอบรมเรื่อง การพัฒนาความสามารถและพฤติกรรมบริการที่เป็นเลิศ (Excellence Service Behavior - ESB) วันที่ 18 ธันวาคม 2566 ณ โรงแรมแกรนด์ริชมอนด์ จังหวัดนนทบุรี  สรุปสาระสำคัญของกิจกรรม <u>กิจกรรมที่ 1</u> การวิเคราะห์ปัญหา/อุปสรรคที่กำลังเผชิญในการทำงาน ผู้เข้าร่วมการประชุมเลือกการดรูปรูปภาพที่ตรงหรือใกล้เคียงกับสภาพปัญหาและอุปสรรคในการทำงานที่กำลังเผชิญอยู่ในปัจจุบัน เพื่อสะท้อนปัญหาของแต่ละบุคคลออกมา <u>กิจกรรมที่ 2</u> สำรวจกรอบความคิดของตนเอง 1. กีดกันทางความคิดของคนทำงานส่วนใหญ่ ที่ทำให้ไม่สามารถพัฒนาไปสู่กรอบความคิดแบบก้าวหน้าได้ 2. วิธีพาตัวเองออกจากกีดกันทางความคิด สามารถฝึกฝนได้เพื่อปรับกรอบความคิด 3. วิธีพัฒนาตนเองให้มี Growth Mindset 4. ปรับมุมมองปลดล๊อคศักยภาพให้ตัวเอง <u>กิจกรรมที่ 3</u> วิธีการสื่อสารและรับมือกับคนแต่ละประเภท การฝึกปรับใช้ Growth Mindset กับการรับมือสถานการณ์ต่างๆ <u>กิจกรรมที่ 4</u> การสร้างทัศนคติเชิงบวกและหัวใจบริการ งานบริการงานที่มากด้วยคุณค่า 1. การบริการ 2. ลักษณะของการบริการที่ดี 3. การบริการที่ดีเป็นที่ยอมรับ 4. คุณสมบัติพื้นฐานของผู้ให้บริการที่ดี 5. บุคลิกภาพ 6. การวางตัวในฐานะตัวแทนของหน่วยงาน 7. การเสริมสร้างบุคลิกภาพให้เป็นมืออาชีพ 8. มาตรฐานการบริการ

แผนการดำเนินงาน/กิจกรรม	ผลการดำเนินงาน
5. อบรม : พฤติกรรมบริการที่เป็นเลิศ (Excellence Service Behavior – ESB) ต่อ	9. การพัฒนาบุคลากรภาพและพฤติกรรมการให้บริการสู่ความเป็นเลิศ 10. เทคนิคในการสื่อสารกับผู้รับบริการ <u>กิจกรรมที่ 5</u> สิ่งที่ยากปรับปรุง ด้านการบริการของกองห้องปฏิบัติการฯ สรุปข้อคิดเห็นจากบุคลากรผู้เข้าร่วมกิจกรรมกลุ่มทั้ง 5 กลุ่ม 1. พฤติกรรมการรับโทรศัพท์และการพูดคุยทางโทรศัพท์ เนื่องจากบุคลากรมีจำนวนจำกัด ทำให้การรับสายโทรศัพท์ลูกค้า ทำได้ล่าช้า และบางครั้งระบบโทรศัพท์ล่ม ทำให้ใช้ไม่ได้ จึงอยากให้มีการปรับปรุงระบบโทรศัพท์ให้ดีขึ้น 2. รูปแบบการรับสายโทรศัพท์อยากให้เป็นในรูปแบบเดียวกัน 3. การใช้คำพูด น้ำเสียง และการแสดงออกที่เหมาะสม กระตือรือร้น เต็มใจให้บริการ
6. การขับเคลื่อนการดำเนินงานเพื่อขอรับการรับรอง ISO/IEC 17025:2017	6.1 จัดทำเอกสารคู่มือการทดสอบ (TM) 6.2 จัดทำเอกสารการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (MV) การตรวจสอบความใช้ได้ของการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรต และซัลเฟต ในตัวอย่างน้ำ <u>วิธีปฏิบัติงาน</u> 1) กำหนดค่าสิ่งที่เจตนาวัด และค่าความไม่แน่นอนที่ยอมรับได้ การวิเคราะห์ปริมาณ ฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรต และซัลเฟต ในตัวอย่างน้ำบริโภคน้ำ โดยเทคนิค IC กำหนดค่าการกลับคืน (%Recovery) 90-110% ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 5 % ตลอดช่วงใช้งานของทุก 2) เลือกวิธีทดสอบที่เหมาะสม ใช้วิธีทดสอบ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th edition. 2023. Part 4110 B. ตาม คู่มือการวิเคราะห์ปริมาณ ฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรต และซัลเฟต ในตัวอย่างน้ำ <u>การแสดงความสอบกลับได้เชิงมาตรวิทยา</u> - วัสดุอ้างอิง/วัสดุอ้างอิงรับรอง สารละลายมาตรฐานอ้างอิงรับรอง (CRM) ของฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรต และซัลเฟต ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่สอบกลับได้ไปยัง SI unit สารละลายมาตรฐานอ้างอิง (RM) ของฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรต และซัลเฟต ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร - การสอบเทียบเครื่องมือและอุปกรณ์อื่นโดยหน่วยงานที่ได้รับการรับรอง ความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ได้แก่ ขวดวัดปริมาตรขนาด 100, 50 mL / Pipette 2 5 10 25 mL / Micropipette 20-200 uL / Micropipette 100-1000 uL

แผนการดำเนินงาน/กิจกรรม	ผลการดำเนินงาน
6. การขับเคลื่อนการดำเนินงานเพื่อขอรับการรับรอง ISO/IEC 17025:2017 (ต่อ)	การทวนสอบประสิทธิภาพเครื่องมือวิเคราะห์ด้วยวัสดุอ้างอิง/วัสดุอ้างอิงรับรองตามรายงาน Operational Qualification/Performance Verification, OQPV <u>การจัดทำคุณลักษณะเฉพาะที่แสดงสมบัติของวิธีทดสอบ</u> คุณลักษณะเฉพาะของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ ฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรต และซัลเฟต ในตัวอย่างน้ำโดยเทคนิค IC ที่ต้องจัดทำ ประกอบด้วยสภาพเชิงเส้น (Linearity) ขีดจำกัดการตรวจหา (MDL) ขีดจำกัดการวัดปริมาณ (LOQ) ความเอนเอียงของวิธี (Bias) ความเที่ยง (Precision) ผลกระทบจากเนื้อสาร (Matrix Effects) ช่วงใช้งาน (Working Range) และค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty) 6.3 จัดทำเอกสารการหาค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบทางเคมี (UM) 6.3.1 อบรมเรื่องการหาค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบทางเคมี (UM) ประกอบด้วย 1) การประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรต และซัลเฟตในตัวอย่างน้ำ ด้วยเครื่อง Ion Chromatography (IC) 2) การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดความกระด้างในตัวอย่างน้ำ 6.3.2 จัดทำเอกสารการหาค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบทางเคมี (UM) ประกอบด้วย 1) วิธีปฏิบัติงานเรื่อง การประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรต และซัลเฟตในตัวอย่างน้ำ ด้วยเครื่อง Ion Chromatography (IC) รหัสเอกสาร : WI-CH-14

4.2 สรุปผลการดำเนินงานตามแผนดำเนินการสร้างหรือพัฒนาผลงานวิชาการ/นวัตกรรมที่สอดคล้องกับภารกิจของหน่วยงาน

4.2.1 การพัฒนาชุดทดสอบความเค็มในอาหาร

เพื่อสนับสนุนให้ภาคีเครือข่ายทุกภาคส่วน ชุมชนและประชาชน ร่วมเฝ้าระวังการบริโภคความเค็มที่มากเกินไปจนเป็นจำเป็น ซึ่งมีผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชนทุกกลุ่มวัย กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย จึงดำเนินการศึกษาและพัฒนาวัตกรรมการชุดทดสอบเพื่อการเฝ้าระวังความเค็มในอาหาร ที่ง่ายต่อการใช้งาน ชุดทดสอบดังกล่าว นอกจากจะมีความสะดวกในการใช้งาน และเกิดความคุ้มค่าแล้ว ยังเป็นการส่งเสริมให้ผู้ใช้งานตระหนักถึงการควบคุมปริมาณโซเดียมต่อวันมากขึ้นด้วย

1. วัตถุประสงค์

- 1.1. เพื่อพัฒนาชุดทดสอบต้นแบบสำหรับหาปริมาณความเค็ม (salinity) ในอาหาร
- 1.2. เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการเฝ้าระวังและลดผลกระทบต่อสุขภาพที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีความเค็มมากเกินไปจนเป็นจำเป็นของประชาชนทุกกลุ่มวัย

- 1.3. เพื่อพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่าย ที่ประชาชนสามารถเข้าถึงและนำไปใช้ในชีวิตประจำวันได้

2. เป้าหมายและตัวชี้วัดความสำเร็จ

- 2.1 ได้ชุดทดสอบต้นแบบสำหรับหาปริมาณความเค็ม (salinity) ที่สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ง่าย และรวดเร็ว
- 2.2 ได้ชุดทดสอบต้นแบบสำหรับหาปริมาณความเค็ม (salinity) ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ ไม่น้อยกว่าร้อยละ 85

3. พื้นที่ดำเนินการ

ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยในห้องปฏิบัติการของกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุข กรมอนามัย ในการพัฒนาชุดทดสอบและทดสอบการใช้ได้ของชุดทดสอบกับตัวอย่างในห้องปฏิบัติการและร้านอาหาร โรงครัว ของโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ 1-12 สสม.และ คอช.

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

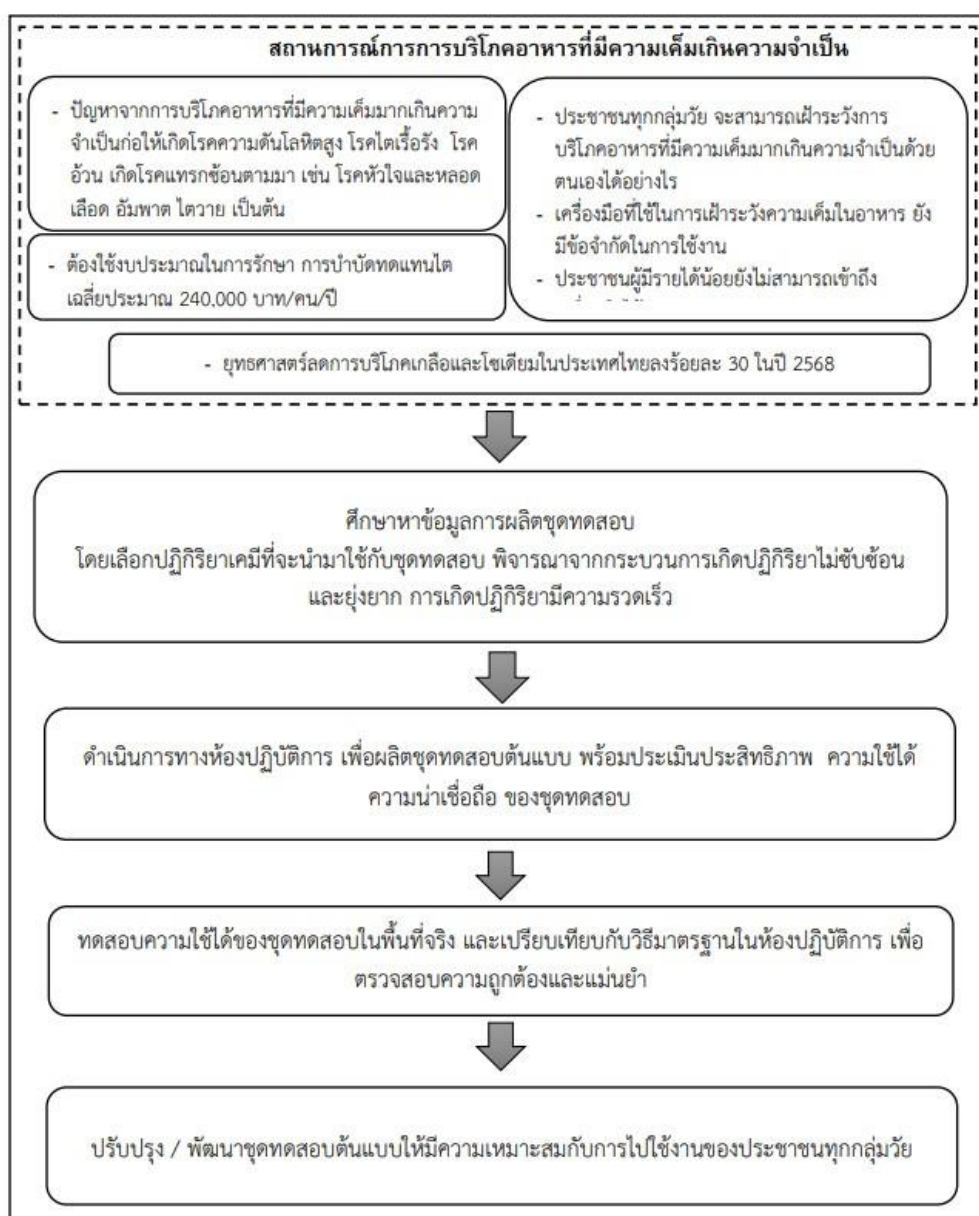
ได้ชุดทดสอบต้นแบบสำหรับหาปริมาณความเค็ม (salinity) เพื่อการเฝ้าระวังเฝ้าระวังและลดผลกระทบต่อสุขภาพที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีความเค็มมากเกินไปจนเป็นจำเป็นของประชาชนทุกกลุ่มวัย ที่ใช้งานได้ง่าย มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน พกพาสะดวก สามารถใช้งานและอ่านผลได้รวดเร็ว ณ จุดทดสอบ

5. กรอบแนวคิดงานวิจัย

ชุดทดสอบอย่างง่าย (test kit) มักใช้เพื่อทดสอบเบื้องต้นสำหรับคัดกรองตัวอย่าง ก่อนที่จะนำไปทดสอบอย่างละเอียดด้วยเครื่องมือที่มีความเที่ยงตรงและแม่นยำสูงในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ได้ผลถูกต้องมากขึ้นชุดทดสอบอย่างง่ายมีข้อดีหลายอย่างคือ การทดสอบทำได้ง่าย ใช้เวลาไม่นาน และไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการลงมือทดสอบ ที่สำคัญคือ

ต้นทุนต่ำ และผลการทดสอบน่าเชื่อถือ หลักการของชุดทดสอบอย่างง่ายส่วนใหญ่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเป้าหมายที่สนใจกับสารทดสอบที่มีความไวและจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารเป้าหมาย โดยทั้งนี้สารทดสอบมักถูกเคลือบหรือตรึงอยู่บนแผ่นทดสอบที่เป็นวัสดุรองรับ หรืออาจอยู่ในรูปสารละลายก็ได้ เมื่อสารทดสอบทำปฏิกิริยากับสารเป้าหมายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่มองเห็นด้วยตาเปล่า เช่น สีเปลี่ยนไปจากเดิม หรือการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางแสง เช่น เกิดการเรืองแสง หรือเกิดสารประกอบตัวใหม่หลังเกิดปฏิกิริยาเคมี หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าทางไฟฟ้า นอกจากนี้อาจมีการประกอบวงจรอย่างง่ายเข้าไปด้วยสำหรับแปรผลให้เป็นตัวเลขที่อ่านค่าได้โดยสะดวก

ทางผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการผลิตชุดทดสอบความเค็มในอาหารขึ้น ในรูปแบบของแผ่นทดสอบโดยใช้หลักการการเกิดปฏิกิริยาของสารเคมีที่ดูดซับในตัวแผ่นดูดซับ ที่ให้สีของปฏิกิริยาที่ชัดเจน ซึ่งผู้ใช้งานสามารถนำไปใช้วัดความเค็มในรูปแบบอื่นได้ และสามารถใช้วัดความเค็มกับตัวอย่างอาหารได้หลากหลายชนิด ชุดทดสอบดังกล่าว นอกจากจะมีความสะดวกในการใช้งาน และเกิดความคุ้มค่าแล้ว ยังเป็นการส่งเสริมให้ผู้ใช้งานตระหนักถึงการควบคุมปริมาณโซเดียมต่อวันมากขึ้นด้วย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดโครงการ การพัฒนาชุดทดสอบความเค็มในอาหาร

6. วิธีดำเนินการวิจัย

6.1 ขั้นตอนเบื้องต้นในการดำเนินงานวิจัย

- 6.1.1 สถานการณ์โรคที่เกิดจากความเค็มเป็นสาเหตุ
- 6.1.2 ศึกษาข้อมูลเอกสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาชุดทดสอบความเค็มในอาหาร
- 6.1.3 ศึกษาวิธีทดสอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบความเค็มในอาหาร
- 6.1.4 เลือกวิธีทดสอบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตชุดทดสอบความเค็มในอาหาร พร้อมเตรียมวัสดุอุปกรณ์สารเคมีสำหรับทดสอบทางห้องปฏิบัติการ
- 6.1.5 ประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบโดยวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบกับผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ
- 6.1.6 ทดสอบความใช้ได้ของชุดทดสอบความเค็มในอาหาร โดยเปรียบเทียบค่าปริมาณความเค็มที่ได้จากชุดทดสอบกับวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ เพื่อประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient : r) ในการประเมินความน่าเชื่อถือของชุดทดสอบ
- 6.1.7 ทดสอบความใช้ได้ของชุดทดสอบในพื้นที่จริง เทียบกับวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำมาปรับปรุง/พัฒนาชุดทดสอบต้นแบบ

6.2 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ ในห้องปฏิบัติการ

- 6.2.1 ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
- 6.2.2 ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, และ 10 มิลลิลิตร
- 6.2.3 ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร
- 6.2.4 แท่งแก้วคนสาร (Glass Stirring Rod)
- 6.2.5 กระดาษกรองเบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร
- 6.2.6 กระดาษมันชนิดกันน้ำ
- 6.2.7 ถาดย้อมกระดาษกรอง
- 6.2.8 ถาดอบกระดาษกรองที่ทนอุณหภูมิไม่น้อยกว่า 80 องศาเซลเซียส
- 6.2.9 ตู้อบลมร้อน ยี่ห้อ Binder รุ่น fd115
- 6.2.10 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BSA224S-CW
- 6.2.11 เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า ยี่ห้อ Hach

6.3 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์และจัดเตรียมชุดทดสอบ

- 6.3.1 ซิลเวอร์ ไนเตรท (silver nitrate, AgNO_3) เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Poch ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99 %
- 6.3.2 2',7'-ไดคลอโรฟลูออเรสซิน (2',7'-Dichlorofluorescein, $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}_5$) เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Sigma aldrich ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99 %
- 6.3.3 โซเดียม คลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Merck ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99 %

6.3.4 แอ็บโซลูท แอล (Absolute L, C_2H_5OH) ยี่ห้อ Merck ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.9 %

6.3.5 เอทานอล เข้มข้น 50 % โดยปริมาตร

6.3.6 โมโนโซเดียมกลูตาเมต (Monosodium glutamate) ยี่ห้อ Sigma Aldrich ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.0 %

6.3.7 ซูโครส (Sucrose) ยี่ห้อ KemAus ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.0 %

6.3.8 น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (Distilled Water) ที่มีค่าการนำไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 10 ไมโครซีเมนส์/เซ็นติเมตร ($\mu S/cm$)

6.4 การเตรียมสารละลายและแผ่นทดสอบความเค็มในชุดทดสอบความเค็ม

6.4.1 สารละลายซิลเวอร์ ไนเตรท

6.4.1.1 ละลายซิลเวอร์ ไนเตรท ให้เป็นสารละลายเข้มข้น 0.068 นอร์แมล (normal) ในสารละลายแอ็บโซลูท แอล 50 % v/v ติดฉลากเป็นสารละลาย Ag-1

6.4.1.2 ละลายซิลเวอร์ ไนเตรท ให้เป็นสารละลายเข้มข้น 0.171 นอร์แมล (normal) ในสารละลายแอ็บโซลูท แอล 50 % v/v ติดฉลากเป็นสารละลาย Ag-2

6.4.1.3 ละลายซิลเวอร์ ไนเตรท ให้เป็นสารละลายเข้มข้น 0.342 นอร์แมล (normal) ในสารละลายแอ็บโซลูท แอล 50 % v/v ติดฉลากเป็นสารละลาย Ag-3

6.4.2 สารละลาย 2',7'-ไดคลอโรฟลูออเรสซิน

6.4.2.1 ละลาย 2',7'-ไดคลอโรฟลูออเรสซิน ให้เป็นสารละลายเข้มข้น 0.0050 นอร์แมล (normal) ในสารละลายแอ็บโซลูท แอล ติดฉลากเป็นสารละลาย Flu-1

6.4.2.2 ละลาย 2',7'-ไดคลอโรฟลูออเรสซิน ให้เป็นสารละลายเข้มข้น 0.0125 นอร์แมล (normal) ในสารละลายแอ็บโซลูท แอล ติดฉลากเป็นสารละลาย Flu-2

6.4.2.3 ละลาย 2',7'-ไดคลอโรฟลูออเรสซิน ให้เป็นสารละลายเข้มข้น 0.0250 นอร์แมล (normal) ในสารละลายแอ็บโซลูท แอล ติดฉลากเป็นสารละลาย Flu-3

6.4.3 การเตรียมสารละลายย้อมแผ่นทดสอบความเค็ม

6.4.3.1 สารละลายย้อมแผ่นทดสอบความเค็ม สำหรับทดสอบความเค็มที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร (g/L) ในรูปของโซเดียม คลอไรด์ (salinity as NaCl) นำสารละลาย Ag-1 ผสมกับสารละลาย Flu-1 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

6.4.3.2 สารละลายย้อมแผ่นทดสอบความเค็ม สำหรับทดสอบความเค็มที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร (g/L) ในรูปของโซเดียม คลอไรด์ (salinity as NaCl) นำสารละลาย Ag-2 ผสมกับสารละลาย Flu-2 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

6.4.3.3 สารละลายย้อมแผ่นทดสอบความเค็ม สำหรับทดสอบความเค็มที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (g/L) ในรูปของโซเดียม คลอไรด์ (salinity as NaCl) นำสารละลาย Ag-3 ผสมกับสารละลาย Flu-3 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

6.4.4 การย้อมแผ่นทดสอบความเค็ม

6.4.4.1 เทสารละลายสารละลายย้อมแผ่นทดสอบความเค็มลงในถาดย้อมกระดาษกรอง แต่ละความเข้มข้น

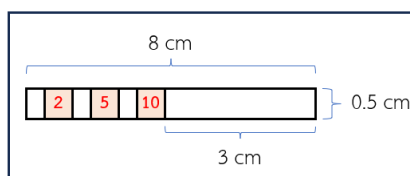
6.4.4.2 ชุบกระดาษกรองลงในสารละลาย และเมื่อสารละลายกระจายทั่วทั้งแผ่นให้ยกออกทันที

6.4.4.3 ห้ามทิ้งกระดาษกรองไว้ในถาดย้อมกระดาษกรอง เพราะจะเกิดการตกตะกอนและทำให้สารละลายกระจายตัวไม่สม่ำเสมอบนกระดาษกรอง

6.4.4.4 อบกระดาษกรองที่อุณหภูมิ 85 ± 5 องศาเซลเซียส ด้วยตู้อบลมร้อน เป็นเวลา 5 นาทีหรือจนกระดาษกรองแห้งสนิท

6.4.5 การเตรียมแผ่นทดสอบความเค็ม

6.4.5.1 พิมพ์ลายแผ่นตรวจวัดความเค็ม ดังภาพที่ 3.1 ลงบนกระดาษมันชนิดกันน้ำ ขนาด A4



ภาพที่ 3.1 ลักษณะและขนาดของแผ่นตรวจวัดความเค็ม

6.4.5.2 ตัดแผ่นทดสอบความเค็มให้ได้ขนาดความกว้าง 5 มิลลิเมตร ติดแผ่นทดสอบความเค็มลงบนตารางที่ได้พิมพ์ไว้ในกระดาษมันชนิดกันน้ำ ขนาด A4 ตามค่าความเข้มข้นที่ระบุไว้

6.4.5.3 ตัดแผ่นตรวจวัดความเค็มให้ได้ขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร และยาว 8 เซนติเมตร

6.4.5.4 บรรจุแผ่นตรวจสอบพร้อมซองกันชื้นลงในถุงทึบแสงและปิดผนึกซองด้วยเครื่องซีลปากถุง ติดสติ๊กเกอร์บนซองบรรจุภัณฑ์และบรรจุลงกล่องชุดทดสอบ

6.5 การประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบความเค็มในอาหาร

6.5.1 ประเมินระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบ

1) จุ่มแผ่นตรวจวัดความเค็ม จำนวน 5 แผ่น ในสารละลายสารละลายมาตรฐานความเค็มที่ความเข้มข้นที่ 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร (g/L) เป็นเวลา 2 วินาที

2) นำแผ่นตรวจวัดความเค็มออกจากสารละลาย ซับสารละลายส่วนเกินออกจากแผ่นตรวจวัดความเค็ม ด้วยกระดาษทิชชู

3) อ่านค่าความเข้มข้นบนแผ่นตรวจวัดความเค็ม ถ้าความเข้มข้นของสารละลายมากกว่าหรือเท่ากับค่าของแผ่นทดสอบความเค็ม สีของแผ่นทดสอบจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง และแผ่นทดสอบจะต้องเปลี่ยนสีพื้นที่มากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ทั้งหมด

4) ทดสอบตามขั้นตอนที่ 3.5.1.1. แต่เปลี่ยนระยะเวลาเป็น 4, 6, 8, 10 และ 12 วินาที เปรียบเทียบผลการทดสอบในแต่ละช่วงเวลา

6.5.2 ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test)

1) นำแผ่นตรวจวัดความเค็ม จำนวน 20 แผ่น ไปทดสอบสารละลายมาตรฐานความเค็มที่ความเข้มข้นที่ 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร โดยจุ่มลงไปในการละลายมาตรฐานความเค็มเป็นระยะเวลา 10 วินาที

2) อ่านค่าความเข้มข้นบนแผ่นตรวจวัดความเค็ม ถ้าความเข้มข้นของสารละลายมากกว่าหรือเท่ากับค่าของแผ่นทดสอบความเค็ม สีของแผ่นทดสอบจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง และแผ่นทดสอบจะต้องเปลี่ยนสีพื้นที่มากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ทั้งหมด

3) ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test) โดยรายงานค่าเป็นร้อยละ

6.5.3 ประเมินความแม่นยำ (Relative accuracy)

1) นำแผ่นตรวจวัดความเค็ม จำนวน 10 แผ่น ไปทดสอบสารละลายมาตรฐานความเค็มที่ความเข้มข้นที่ 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร โดยจุ่มลงไปในการละลายมาตรฐานความเค็มเป็นระยะเวลา 10 วินาที

2) อ่านค่าความเข้มข้นบนแผ่นตรวจวัดความเค็ม ถ้าความเข้มข้นของสารละลายมากกว่าหรือเท่ากับค่าของแผ่นทดสอบความเค็ม สีของแผ่นทดสอบจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง และแผ่นทดสอบจะต้องเปลี่ยนสีพื้นที่มากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ทั้งหมด

3) นำสารละลายมาตรฐานความเค็มที่ความเข้มข้นที่ 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ไปทดสอบหาความเค็มตามวิธีมาตรฐาน เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่อ่านได้จากแผ่นตรวจวัดความเค็ม

6.5.4 ประเมินความไว (Relative sensitivity)

1) นำแผ่นตรวจวัดความเค็ม จำนวน 10 แผ่น ไปทดสอบสารละลายมาตรฐานความเค็มที่ความเข้มข้นที่ 0, 2, 5, 8 และ 10 กรัมต่อลิตร โดยจุ่มลงไปในการละลายมาตรฐานความเค็มเป็นระยะเวลา 10 วินาที

2) อ่านค่าความเข้มข้นบนแผ่นตรวจวัดความเค็ม ถ้าความเข้มข้นของสารละลายมากกว่าหรือเท่ากับค่าของแผ่นทดสอบความเค็ม สีของแผ่นทดสอบจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง และแผ่นทดสอบจะต้องเปลี่ยนสีพื้นที่มากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ทั้งหมด

3) ประเมินความเป็นความไว (Relative sensitivity) โดยรายงานเป็นค่าความเค็มที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด ที่ทำให้แผ่นตรวจสอบความเค็มเป็นผลบวกที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร (g/L)

6.2.5 ประเมินความจำเพาะ (Relative specificity)

1) นำแผ่นตรวจวัดความเค็ม จำนวน 10 แผ่น ไปทดสอบ โดยจุ่มลงไปในการละลายมาตรฐานความเค็ม ความเข้มข้นที่ 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วินาที บันทึกผลที่ได้

2) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ ข้อ 3.5.5.1. แต่เปลี่ยนสารละลายมาตรฐานความเค็มเป็นสารละลายโมโนโซเดียมกลูตาเมต ที่ความเข้มข้น 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วินาที บันทึกผลที่ได้

3) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ ข้อ 3.5.5.1. แต่เปลี่ยนสารละลายมาตรฐานความเค็มเป็นสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (มีค่าความเค็ม 30 % ของความเค็มที่เกิดจากโซเดียมคลอไรด์) ที่ความเข้มข้น 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วินาที บันทึกผลที่ได้

4) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ ข้อ 3.5.5.1. แต่เปลี่ยนสารละลายมาตรฐานความเค็มเป็นสารละลายซูโครส ที่ความเข้มข้น 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วินาที บันทึกผลที่ได้

5) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ ข้อ 3.5.5.1. แต่เพิ่มสารละลายโมโนโซเดียมกลูตาเมต เข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ลงไปในสารละลายมาตรฐานความเค็ม

6) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ ข้อ 3.5.5.1. แต่เพิ่มสารละลายโมโนโซเดียมกลูตาเมต เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ลงไปในสารละลายมาตรฐานความเค็ม

7) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ ข้อ 3.5.5.1. แต่เพิ่มสารละลายโมโนโซเดียมกลูตาเมต เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ลงไปในสารละลายมาตรฐานความเค็ม

8) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ ข้อ 3.5.5.1. แต่เพิ่มสารละลายซูโครส เข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ลงไปในสารละลายมาตรฐานความเค็ม

9) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ ข้อ 3.5.5.1. แต่เพิ่มสารละลายซูโครส เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ลงไปในสารละลายมาตรฐานความเค็ม

10) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ ข้อ 3.5.5.1. แต่เพิ่มสารละลายซูโครส เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ลงไปในสารละลายมาตรฐานความเค็ม

11) อ่านค่าความเข้มข้นบนแผ่นตรวจวัดความเค็ม ในแต่ละการทดสอบ ประเมินความจำเพาะ (Relative specificity)

6.5.6 ประเมินความเสถียรของชุดทดสอบ (stability)

1) เตรียมแผ่นตรวจวัดความเค็ม แบ่งเป็น 4 ชุด A, B, C และ D อย่างละ 10 แผ่น

2) แผ่นตรวจวัดความเค็มชุด A จำนวน 10 แผ่น นำไปทดสอบโดยจุ่มลงไปในสารละลายมาตรฐานความเค็ม ความเข้มข้นที่ 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วินาที นำแผ่นตรวจวัดความเค็มออกจากสารละลาย บันทึกผลค่าความเค็มที่ได้

3) แผ่นตรวจวัดความเค็มชุด B จำนวน 10 แผ่น ทิ้งไว้ระยะเวลา 2 เดือน หลังจากครบระยะเวลา นำไปทดสอบ โดยจุ่มลงไปในการละลายมาตรฐานความเค็ม ความเข้มข้นที่ 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วินาที นำแผ่นตรวจวัดความเค็มออกจากสารละลาย บันทึกผลค่าความเค็มที่ได้

4) แผ่นตรวจวัดความเค็มชุด C จำนวน 10 แผ่น ทิ้งไว้ระยะเวลา 4 เดือน หลังจากครบระยะเวลา นำไปทดสอบ โดยจุ่มลงไปในการละลายมาตรฐานความเค็ม ความเข้มข้นที่ 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วินาที นำแผ่นตรวจวัดความเค็มออกจากสารละลาย บันทึกผลค่าความเค็มที่ได้

5) แผ่นตรวจวัดความเค็มชุด D จำนวน 10 แผ่น ทิ้งไว้ระยะเวลา 6 เดือน หลังจากครบระยะเวลา นำไปทดสอบ โดยจุ่มลงไปในการละลายมาตรฐานความเค็ม ความเข้มข้นที่ 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วินาที นำแผ่นตรวจวัดความเค็มออกจากสารละลาย บันทึกผลค่าความเค็มที่ได้

6) เปรียบเทียบความแตกต่างของการทดสอบ แผ่นตรวจวัดความเค็ม ชุด A, B, C และ D โดยใช้สถิติ ANOVA

6.6 ทดสอบความใช้ได้ของชุดทดสอบความเค็มในอาหาร โดยเปรียบเทียบค่าปริมาณความเค็มที่ได้จากชุดทดสอบกับวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ เพื่อประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient : r) ในการประเมินความน่าเชื่อถือของชุดทดสอบ

4.2.1 การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ

➤ สถานการณ์การระบาดของโรคเลิเจียนแนร์

เชื้อ *Legionella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป หรือในแหล่งน้ำต่างๆ ทั้งแหล่งน้ำตามธรรมชาติและแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น โดยเชื้อสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ดีในแหล่งน้ำนิ่งที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 20 – 50 องศาเซลเซียสและทนต่ออุณหภูมิสูงได้ในช่วง 55-60 องศาเซลเซียส สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานหลายเดือนในสิ่งแวดล้อมที่มีความชื้นสูง เจริญเติบโตได้ภายใต้ ไบโอฟิล์ม (Biofilm) ที่มีการสะสมตามผิวสัมผัสต่างๆที่ไม่มีการดูแลบำรุงรักษาอย่างถูกต้อง และสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในโปรโตซัว อะมีบา สาหร่ายและอินทรีย์วัตถุหลากหลายชนิดได้ ซึ่งพบมากตามหอผึ่งเย็น (cooling tower) ของระบบระบายความร้อนที่มีตามอาคารขนาดใหญ่ต่างๆ เช่น โรงแรม โรงพยาบาล ตลอดจนเครื่องทำความร้อน ถังเก็บน้ำ ระบบกระจายน้ำและน้ำพุประดับอาคารหรือสถานที่ต่างๆ เชื้อ *Legionella* spp. ทำให้เกิดโรคเลิเจียนแนร์ (Legionellosis) ซึ่งมีอาการทางคลินิกได้ 2 ลักษณะ คือ หากมีภาวะปอดอักเสบ อาการรุนแรงและอัตราเสียชีวิตสูง เรียกว่า โรคเลิเจียนแนร์ (Legionnaires disease) หากไม่มีภาวะปอดอักเสบ อาการไม่รุนแรง เรียกว่า โรคไขปนเดียก (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 ราย ในปี 2563 พบผู้ป่วยรายล่าสุดเมื่อปี 2564 อายุเฉลี่ย 62 ปี (อายุน้อยสุด 23 ปี และอายุสูงสุด 85 ปี) ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเพศชายวัยกลางคนถึงสูงอายุ และเป็นนักท่องเที่ยวชาวต่างชาติที่เดินทางเข้ามาท่องเที่ยวในประเทศไทย และจากข้อมูลของ The European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet) ซึ่งเป็นหน่วยงานเฝ้าระวังโรค ลีเจียนแนร์ในเขตเศรษฐกิจยุโรป พบจำนวนผู้ป่วยโรคลีเจียนแนร์ที่เกี่ยวข้องกับการเดินทาง (Travel-associated Legionnaires' Disease : TALD) ข้อมูลที่ได้ส่วนใหญ่เป็นรายงานผู้ป่วยชาวต่างชาติที่เดินทางมาพักยังโรงแรมในประเทศไทย โดยได้รับแจ้งผ่านสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ครั้งแรกในช่วงเดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2549 มีนักท่องเที่ยวชาวต่างชาติที่เดินทางกลับจากจังหวัดภูเก็ต แล้วป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์ จำนวน 6 ราย เป็นชาวสวีเดน 2 ราย ชาวฟินแลนด์ 2 ราย ชาวเยอรมนี 1 ราย และชาวเบลเยียม 1 ราย ทั้งนี้ไม่มีรายงานผู้เสียชีวิต เมื่อสอบสวนโรคพบว่าแหล่งแพร่ระบาดของเชื้อเกิดขึ้นที่โรงแรมแห่งหนึ่ง เนื่องจากผู้ป่วยทุกรายพักอยู่ในโรงแรมเดียวกันนี้ และพบสายพันธุ์ที่ตรงกับผู้ป่วย ต่อมาพบผู้ป่วยชาวต่างชาติจากยุโรปที่ป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์เกือบทุกปี โดยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 - 2553 มีรายงานผู้ป่วย จำนวน 109 ราย ในปี 2564 จำนวน 895 ราย ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 38 % เมื่อเทียบกับปี 2563 และผลการสอบสวนพบว่าผู้ป่วยได้รับเชื้อจากโรงแรมที่พัก ซึ่งสหภาพยุโรปได้แจ้งไปยังผู้ประกอบการ (Tour Operators) ของประเทศต่างๆ ในสหภาพยุโรปให้งดการส่งนักท่องเที่ยวมายังโรงแรมดังกล่าว จนกว่าทางโรงแรมจะมีมาตรการในการทำลายเชื้อในโรงแรมอย่างมีประสิทธิภาพ การแพร่ระบาดของโรคลีเจียนแนร์จึงจัดเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อธุรกิจการท่องเที่ยวของหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเพื่อเฝ้าระวังเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำใช้ของโรงแรม/รีสอร์ท โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งน้ำอุปโภค เช่น น้ำในถังเก็บน้ำ น้ำจากก๊อกน้ำ ฝักบัวในห้องพัก แหล่งน้ำในระบบระบายความร้อนหรือหอผึ่งเย็น ตลอดจนน้ำในบริเวณแวดล้อม ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายเชื้อไปสู่คนได้ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการกำหนดมาตรการป้องกันและควบคุมการเกิดโรคได้ เพื่อลดความเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อในกลุ่มนักท่องเที่ยวทั้งชาวไทยและต่างชาติที่เดินทางเข้าพักในโรงแรม รีสอร์ท สถานพักค้างแรมต่างๆ และยังเป็นการส่งเสริมภาพลักษณ์การท่องเที่ยวและสถานประกอบการในด้านความปลอดภัยจากเชื้อ *Legionella* spp.

➤ ศึกษาข้อมูลเอกสารทางวิชาการ งานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp.

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 โดย

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็วรอบ 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) ให้เชื้อเชื้อ (sub-culture) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ BCYE ที่มีส่วนผสมของ L-cysteine (BCYE agar with L-cysteine) และ BCYE ที่ไม่มีส่วนผสมของ 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

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

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

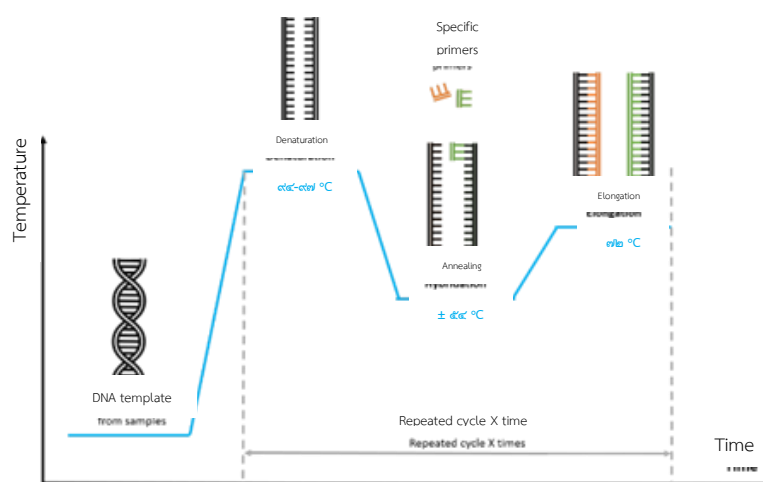
Real-time PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย ที่พัฒนาต่อจากเทคนิค PCR โดยตัดขั้นตอนการทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจวัด PCR product ออก แล้วใช้การติดตามวัดสัญญาณเรืองแสงที่เกิดขึ้น ขณะที่ DNA เป้าหมายเพิ่มจำนวนในทุกๆ รอบ ตั้งแต่รอบแรกจนรอบสุดท้ายของการทำปฏิกิริยา (real-time detection) ปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ PCR product ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยา ซึ่งจะเป็นแบบทวีคูณ (exponential amplification) ในลักษณะกราฟรูปตัว S (S-shape / sigmoid curve) นอกจากนี้วิธี Real-time PCR ถูกใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรม โดยการตรวจตัวอย่างเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้น 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 และที่อุณหภูมินี้ปฏิกิริยาต่างๆจากเอนไซม์ในรอบก่อนหน้านี้จะหยุดลงทั้งหมด

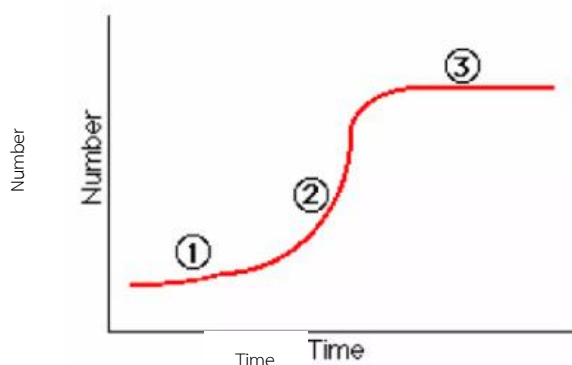
2) Annealing: ที่อุณหภูมิประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer สามารถเกาะติดกับ template เพื่อเตรียมตัวตั้งต้นต่อสายคู่ของ template

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 เมื่อถึงวงจรที่สองจะมีจำนวน PCR product เพิ่มขึ้นเป็น 2 คู่ แต่ละคู่เมื่อผ่านขั้นตอนของ 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 ปฏิกริยาของ PCR ที่เกิดขึ้น เมื่อนำปริมาณ product ที่เพิ่มขึ้นมา plot เทียบกับเวลา

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) เป็นการเปรียบเทียบค่าปริมาณต่ำสุดของจุลินทรีย์ที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีทางเลือกและด้วยวิธีอ้างอิง โดยต้องทำการศึกษาในตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples)

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

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

แปลผล

ค่าสถิติ kappa	ขนาดความสอดคล้อง (Strangeness of agreement)
<0.00	แย่มาก (Poor)
0.00 - 0.20	น้อย (Slight)
0.21 - 0.40	พอใช้ (Fair)
0.41 - 0.60	ปานกลาง (Moderate)
0.61 - 0.80	ดี (Substantial)
0.81 - 1.00	ดีมาก/ค่อนข้างสมบูรณ์ (Almost Perfect)

1 การ
ควม

สอดคล้อง (Strangeness of agreement) ของค่าสถิติ kappa

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผู้ศึกษาได้ดำเนินการทบทวนวรรณกรรม งานวิจัย บทความ และเอกสารวิชาการ มีรายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะทางระบาดวิทยาของผู้ป่วยโรคฮีเจียนแนร์ แหล่งที่อาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อ และเชื้อก่อโรค ดังนี้

นිරา คงกันคง และคณะ (2543) ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในระบบน้ำทางทันตกรรมในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ช่วงเดือนเมษายน – พฤษภาคม 2543 โดยเก็บตัวอย่างน้ำ 156 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6.00) ⁽¹⁾

ทัศนีย์ สุโกศล (2551) ได้ตรวจและควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคลีเจียนแนร์ในระบบปรับอากาศ ปิ๊งประมาณ 2546 – 2547 โดยได้เก็บตัวอย่างน้ำจากหอผึ่งเย็น จำนวน 21 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำจากถาดรองน้ำในเครื่องปรับอากาศที่มีอายุการใช้งาน 1 ปีขึ้นไป จำนวน 30 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย รวมทั้ง *Staphylococcus* spp. แต่พบแบคทีเรียรวมจากตัวอย่างน้ำหอผึ่งเย็นเฉลี่ย 7.03×10^3 CFU/ml และตัวอย่างน้ำจากจากถาดรองน้ำในเครื่องปรับอากาศเฉลี่ย 4.12×10^5 CFU/ml รวมทั้งพบ biofilm ในตัวอย่างหอผึ่งเย็นที่มีการดูแลรักษาด้วยการเติมสารชีวฆาต และสารเคมีป้องกันการกัดกร่อนและเกิดตะกอนด้วย ⁽²⁾

อติเทพ จินา และคณะ (2551) ทำการสอบสวนสิ่งแวดล้อมในสถานที่เกิดโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวเดนมาร์ก ตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา มิถุนายน 2551 โดยเก็บตัวอย่างน้ำส่งตรวจเพื่อหาเชื้อ *Legionella* spp. ผลการสอบสวนพบผู้ป่วยยืนยันโรคลีเจียนแนร์ เป็นชาวเดนมาร์ก 2 รายรายแรกเป็นผู้ป่วยเพศหญิงอายุ 52 ปี ส่วนรายที่ 2 เป็นผู้ป่วยเพศชายไม่ทราบอายุ ตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR and culture ให้ผลยืนยันเชื้อ *L. pneumophila* serogroup 1 และผลการเพาะเชื้อ *Legionella* spp. จากน้ำในแหล่งต่าง ๆ จำนวน 14 ตัวอย่าง swab จากอุปกรณ์ในห้องน้ำ จำนวน 15 ตัวอย่าง รวมเป็น 29 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Legionella* spp. จำนวน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 58.62) โดยตัวอย่างที่พบเชื้อเป็นตัวอย่างน้ำ 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 64.29) และตัวอย่าง swab จากอุปกรณ์ในห้องน้ำ 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) และผลการตรวจแยกเชื้อในห้องพักรักษาทั้งสองราย จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบสายพันธุ์ *L. pneumophila* serogroup 1 (ร้อยละ 64.7) *Legionella* spp. (ร้อยละ 23.5) ⁽³⁾

โรม บัวทอง และคณะ (2556) ทำการสอบสวนการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป ภายหลังจากการเดินทางมาท่องเที่ยวในจังหวัดภูเก็ต ธันวาคม 2549 – มกราคม 2550 เนื่องจากได้รับแจ้งจากสถานทูตอังกฤษประจำประเทศไทยว่า มีนักท่องเที่ยว 4 ราย ป่วยด้วยโรคลีเจียนแนร์ภายหลังจาก มาเที่ยวในจังหวัดภูเก็ต ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2549 ทำการศึกษาโดยค้นหาผู้ป่วยเพิ่มเติมโดยใช้นิยามตาม European Working Group for *Legionella* Infection (EWGLI) Network และเก็บตัวอย่างน้ำส่งตรวจเพื่อเพาะเชื้อ *Legionella* spp. ได้แก่ น้ำในหอผึ่งเย็น น้ำในห้องพักรวม ผลการสอบสวนพบผู้ป่วยยืนยัน 5 ราย และผู้ป่วยเข้าข่าย 1 ราย ทั้งหมดเป็นชาวสแกนดิเนเวีย เชื้อที่เป็นสาเหตุคือ *L. pneumophila* serogroup 1 และผลการเพาะเชื้อจากแหล่งน้ำต่างๆ ในโรงแรม พบเชื้อ *Legionella* spp. ซึ่งได้แก่ น้ำจากฝักบัว น้ำจากอ่างล้างหน้า โดยไม่พบในหอผึ่งเย็น ผลแยกเชื้อพบ *L. bozemanii* จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *L. pneumophila* serogroup 1 จำนวน 2 ตัวอย่าง ⁽⁴⁾

อริชา มหาโยธา และคณะ (2557) ได้ศึกษาเรื่องการเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อ *Legionella* spp. ในแหล่งน้ำที่ใช้ในโรงแรมหรือรีสอร์ทในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปี 2556 โดยได้เก็บตัวอย่างน้ำจากหอผึ่งเย็น น้ำจากก๊อกน้ำหรือฝักบัวในห้องพักรวม บ่อหรือถังพักน้ำ ระบบทำน้ำอุ่นหรือน้ำเย็น น้ำจากห้องสเปา ระบบกรองน้ำ และสระบายน้ำ รวมทั้งสิ้นจำนวน 200 ตัวอย่าง จากโรงแรมและรีสอร์ท 75 แห่ง โดยใช้วิธีการเพาะเชื้อ และตรวจยืนยันชนิดของเชื้อ ด้วยวิธี PCR ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. จำนวน 48 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.7) จากโรงแรมและรีสอร์ทจำนวน 24 แห่ง (ร้อยละ 32) เป็นตัวอย่างก๊อกน้ำ/ฝักบัวในห้องพักรวม 36 ตัวอย่าง หอผึ่งเย็น 10 ตัวอย่าง เครื่องผลิตน้ำอุ่น - น้ำร้อน 1 ตัวอย่าง และถังพักน้ำ/แทงค์น้ำ 1 ตัวอย่าง ⁽⁵⁾

มาลิตา อานนท์ และคณะ (2558) ทำสอบสวนการระบาดของโรคลีเจียนแนร์ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรป หมู่ที่ 5 ตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ระหว่างวันที่ 2 - 5 มิถุนายน 2558 หลังได้รับแจ้งจากเครือข่ายลีเจียนแนร์ของสหภาพยุโรป (European Legionnaires' Disease Surveillance Network : ELDSNet) ผ่านสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ว่ามีนักท่องเที่ยว 2 ราย ป่วยเป็นโรคลีเจียนแนร์ หลังจากมาพักที่โรงแรมแห่งหนึ่งในตำบลคึกคัก อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ทีมได้ดำเนินการสอบสวนโรค โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากห้องพักผู้ป่วย บ่อพักน้ำ น้ำจากห้องส้วม และ swab สุขภัณฑ์ เช่น ก๊อกอ่างล้างหน้า หัวฝักบัวสระน้ำ และหัวฝักบัวในห้องพัก ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ผลการสอบสวนพบผู้ป่วยทั้งหมด 6 ราย เป็นผู้ป่วยยืนยัน 2 ราย ผู้ป่วยสงสัย 4 ราย ทั้งหมดเป็นชาวยุโรป อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง เท่ากับ 2 : 1 ผลการเก็บตัวอย่างน้ำส่งตรวจ จำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบเชื้อ 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.50) จากน้ำเย็นที่อ่างล้างหน้า 3 ตัวอย่าง น้ำร้อนจากฝักบัว 3 ตัวอย่าง และน้ำอุ่นที่อ่างอาบน้ำ 3 ตัวอย่าง จำแนกเป็นเชื้อ *Legionella pneumophila* serogroup 1 จำนวน 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 33.33) และ *Legionella* spp. 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.17) swab สุขภัณฑ์จำนวน 12 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.00) จากก๊อกอ่างล้างหน้า 1 ตัวอย่าง หัวฝักบัวห้องผู้ป่วย 1 ตัวอย่าง และหัวฝักบัวสระว่ายน้ำ 1 ตัวอย่าง จำแนกเป็นเชื้อ *Legionella pneumophila* serogroup 1 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.67) *Legionella pneumophila* serogroup 2-14 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.00) และ *Legionella* spp. 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8.33) ⁽⁶⁾

อริชา มหาโยธา และคณะ (2559) ได้ศึกษาเรื่องเครือข่ายการเฝ้าระวังการแพร่เชื้อ *Legionella* spp. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปี 2557 – 2558 โดยได้ดำเนินการตรวจเยี่ยมโรงแรมที่เข้าร่วมเครือข่าย จำนวน 23 แห่ง และได้สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ จำนวน 129 ตัวอย่าง ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. จำนวน 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.7) ⁽⁷⁾

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการศึกษา

รูปแบบการศึกษาเป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental Research) เพื่อพัฒนาศักยภาพการทดสอบทางห้องปฏิบัติการของกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย ในการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. โดยห้องปฏิบัติการได้พัฒนาวิธีสำหรับตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real time - polymerase chain reaction (Real-time PCR) ขึ้น และดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธีมาตรฐาน (วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ) และวิธีที่พัฒนาขึ้น (วิธี Real - time PCR) ซึ่งต้องให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกัน โดยขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบปฏิบัติตามมาตรฐาน ISO 16140-2 : 2016 “Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method ประกอบด้วยการศึกษาความไว (Sensitivity), ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Relative level of detection; RLOD) และความจำเพาะ (specificity) โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในครั้งนี้ เป็นตัวอย่างน้ำที่ส่งตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ (naturally contaminated samples) และตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples)

3.2 เครื่องมือ/วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์, สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

3.2.1 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Real-time PCR) ยี่ห้อ Analytik Jena รุ่น qTOWER³
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance) รุ่น ME-T3002T ยี่ห้อ Mettler Toledo
- เครื่องวัดความเป็นกรด – เบส (pH meter) รุ่น S20 ยี่ห้อ Mettler Toledo
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SX-700 ยี่ห้อ Tomy อุณหภูมิ 121 ± 3 องศาเซลเซียส
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) รุ่น NU-543 ยี่ห้อ NuAire
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) รุ่น KB720 ยี่ห้อ Binder อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Eppendorf, Germany)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น BAD-12 ยี่ห้อ RAYPA อุณหภูมิ 50 ± 1 องศาเซลเซียส
- ชุดกรองตัวอย่างน้ำ (Membrane filtration equipment)
- เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex shaker) ยี่ห้อ Heidolph
- เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie2 ยี่ห้อ Genie
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 1-10 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Eppendorf
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 100-1,000 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Eppendorf
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 10-100 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Eppendorf
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 0.5-10 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Eppendorf

3.2.2 วัสดุ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

- แผ่นกรอง (Membrane filter) ชนิด polycarbonate ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร (PALL, USA)
- ปิเปตทิป (pipette tip) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- ปิเปตทิปแบบมีแผ่นกรอง (pipette filter tip) ขนาด 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
- หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
- ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (test tube rack)
- จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- ขวดแก้วขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- หลอด PCR ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

3.2.3 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

- *Legionella pneumophila* (DMST 12800)
- *Escherichia coli* (DMST 4212)
- *Klebsiella pneumoniae* (DMST 7592)
- *Klebsiella aerogenes* (DMST 8841)

- *Staphylococcus aureus* (DMST 8013)
- *Staphylococcus epidermidis* (DMST 5868)
- *Pseudomonas aeruginosa* (DMST 4739)
- *Salmonella* Typhimurium (DMST 562)

3.2.4 สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture)

- Glycine vancomycin polymyxin B cycloheximide agar (GVPC)
- Buffered charcoal yeast extract agar with L-cysteine (BCYE)
- Buffered charcoal yeast extract agar without L-cysteine (BCYE-cys)
- Tryptic Soy Agar (TSA)
- Tryptic Soy Broth (TSB)
- Plate Count Agar (PCA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ (buffered water)

สำหรับตรวจสอบสารพันธุกรรม ด้วยวิธี Real time PCR

- ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำหรับแบคทีเรีย (GenUP™ Bacteria gDNA Kit, Berlin, Germany)
- ชุดน้ำยา PCR สำหรับตรวจสอบสารพันธุกรรมของ *Legionella* spp. (PCR max™)

3.2.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลายบัฟเฟอร์

3.2.5.1 Glycine vancomycin polymyxin B cycloheximide agar (GVPC)

ส่วนประกอบ

BCYE agar base

- | | |
|----------------------|---------------|
| - Activated Charcoal | 2 กรัม |
| - Yeast Extract | 10 กรัม |
| - Agar | 15 กรัม |
| - น้ำกลั่น | 500 มิลลิลิตร |

GVPC Supplement

- | | |
|------------------------|------------------|
| - Glycine | 1.5 กรัม |
| - Vancomycin | 0.0005 มิลลิลิตร |
| - Polymyxin B Sulphate | 40000 IU |
| - Cycloheximide | 0.04 กรัม |

- น้ำกลั่น sterile 10 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar base 13.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- ละลาย GVPC Supplement ด้วยน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในขวด BCYE agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- เขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อและ GVPC Supplement ให้เข้ากัน จากนั้นเทแบ่งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับใช้งาน

3.2.5.2 Buffered charcoal yeast extract agar with L-cysteine (BCYE)

ส่วนประกอบ

BCYE agar base

- Activated Charcoal 2 กรัม
- Yeast Extract 10 กรัม
- Agar 15 กรัม
- น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

BCYE Growth Supplement

- ACES Buffer (N-2-Acetamido-2-Aminoethanesulfonic acid) 5 กรัม
- Potassium Hydroxide 1.4 กรัม
- Ferric Pyrophosphate 0.125 กรัม
- Potassium Alfa-Ketoglutarate 0.5 กรัม
- L-Cysteine HCl 0.2 กรัม
- Sterile solvent 10 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar base 13.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- ละลาย BCYE Growth Supplement ด้วย Sterile solvent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในขวด BCYE agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

- เขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อและ BCYE Growth Supplement ให้เข้ากัน จากนั้นเทแบ่งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับใช้งาน

3.2.5.3 Buffered charcoal yeast extract agar without L-cysteine (BCYE-cys)

ส่วนประกอบ

BCYE agar base

- Activated Charcoal 2 กรัม
- Yeast Extract 10 กรัม
- Agar 15 กรัม
- น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

BCYE without Cysteine Supplement

- ACES Buffer (N-2-Acetamido-2-Aminoethanesulfonic acid) 5 กรัม
- Potassium Hydroxide 1.4 กรัม
- Ferric Pyrophosphate 0.125 กรัม
- Potassium Alfa-Ketoglutarate 0.5 กรัม
- Sterile solvent 10 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar base 13.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- ละลาย BCYE without Cysteine Supplement ด้วย Sterile solvent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในขวด BCYE agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- เขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อและ BCYE without Cysteine Supplement ให้เข้ากัน จากนั้นเทแบ่งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับใช้งาน

3.2.5.4 Tryptic Soy Agar (TSA)

ส่วนประกอบ

- Pancreatic Digest of Casein 15 กรัม
- Papaic Digest of Soybean 5 กรัม
- Sodium Chloride 5 กรัม
- Agar 15 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 40 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดหรือหลอดตามปริมาณที่ต้องการใช้งาน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2.5.5 Tryptic Soy Broth (TSB)

ส่วนประกอบ

- | | |
|-------------------------------|-----------------|
| - Pancreatic Digest of Casein | 17 กรัม |
| - Papaic Digest of Soybean | 3 กรัม |
| - Dextrose | 2.5 กรัม |
| - Sodium Chloride | 5 กรัม |
| - Dipotassium Phosphate | 2.5 กรัม |
| - น้ำกลั่น | 1,000 มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดหรือหลอดตามปริมาณที่ต้องการใช้งาน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2.5.6 Plate Count Agar (PCA)

ส่วนประกอบ

- | | |
|-------------------------------|-----------------|
| - Pancreatic Digest of Casein | 5 กรัม |
| - Yeast Extract | 2.5 กรัม |
| - Dextrose | 1 กรัม |
| - Agar | 15 กรัม |
| - น้ำกลั่น | 1,000 มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 23.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดตามปริมาณที่ต้องการใช้งาน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2.5.7 สารละลายบัฟเฟอร์ (buffered water)

ส่วนประกอบ

- 1) phosphate buffer stock solution

- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 34 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 ± 0.5 โดยใช้ 1 N NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2) magnesium chloride stock solution

- magnesium chloride (MgCl_2 หรือ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 38 หรือ 81.1 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง magnesium chloride ตามสัดส่วน ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ปิเปต phosphate buffer stock solution ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และ magnesium chloride stock solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2 ± 0.1
- แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการใช้งาน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

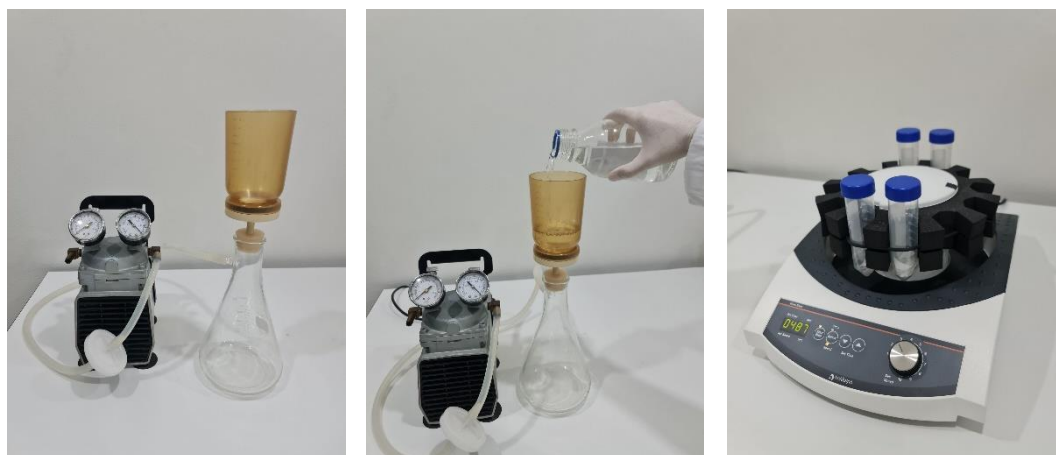
3.3 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ

การทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

3.3.1 การทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น (Sample concentration)

เป็นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทดสอบ เพื่อให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นมากขึ้น เหมาะสมสำหรับนำไปทดสอบในขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR ต่อไป โดยในการศึกษาครั้งนี้ทำการ concentrate ตัวอย่างด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นกรอง (Membrane filtration) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- 1) นำตัวอย่างปริมาตร 250 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรอง ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร
- 2) นำแผ่นกรองที่ผ่านการกรองตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และ resuspend ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- 3) นำไป Vortex ประมาณ 15 นาที เพื่อชะให้เชื้อหลุดออกจากแผ่นกรอง ได้เป็นตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเพียงพอสำหรับนำไปทดสอบต่อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น ด้วยวิธีการกรอง (Membrane filtration)

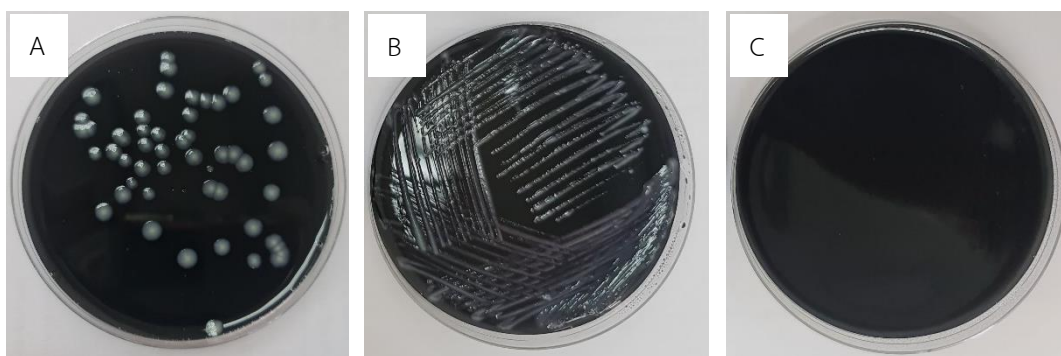
3.3.2 การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

- 1) ทำการ Inoculate ตัวอย่างที่ผ่านการ Concentrate ด้วยวิธี Membrane filtration ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GVPC plate
- 2) spread plate ให้ตัวอย่างเกลี่ยทั่วผิวน้ำอาหาร



ภาพที่ 9 ขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค Spread plate

- 3) นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-10 วัน
- 4) ถ้าพบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม มันวาว สีขาว-เทาเกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ GVPC และเมื่อนำไปย้อมสีแกรมพบลักษณะ gram negative rod ให้นำโคโลนีดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE ที่มีส่วนประกอบของ L-cysteine (BCYE) และ BCYE ที่ไม่มีส่วนประกอบของ L-cysteine (BCYE-cys) เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน
- 5) กรณีเชื้อสามารถเจริญได้เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE ที่มีส่วนประกอบของ L-cysteine เท่านั้น ให้บันทึกผลเป็น Detected (พบเชื้อ *Legionella* spp.) แต่หากเชื้อเจริญหรือไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ให้บันทึกผลเป็น Not Detected (ไม่พบเชื้อ *Legionella* spp.)



ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Legionella* spp. ที่ขึ้นบน plate GVPC agar (A) จากนั้นไปเพาะเลี้ยงต่อ (re-streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE (B) และ BCYE-cys (C)

3.3.3 การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real-time PCR

- 1) นำตัวอย่างที่ผ่านการ Concentrate ด้วยวิธี Membrane filtration ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาสกัด DNA โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำหรับแบคทีเรีย (GenUP™ Bacteria gDNA Kit, Berlin, Germany) ทำตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่ระบุในชุดสกัด



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม GenUP™ Bacteria gDNA Kit

- 2) DNA ที่สกัดได้ นำไปตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อ *Legionella* ด้วยวิธี Real-time PCR หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสสำหรับรอการทดสอบต่อ
- 3) เตรียมส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR (master mix) ลงในหลอด PCR ซึ่งปริมาตรที่ใช้ แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR (Master Mix) สำหรับ 1 ตัวอย่างทดสอบ (Reaction)

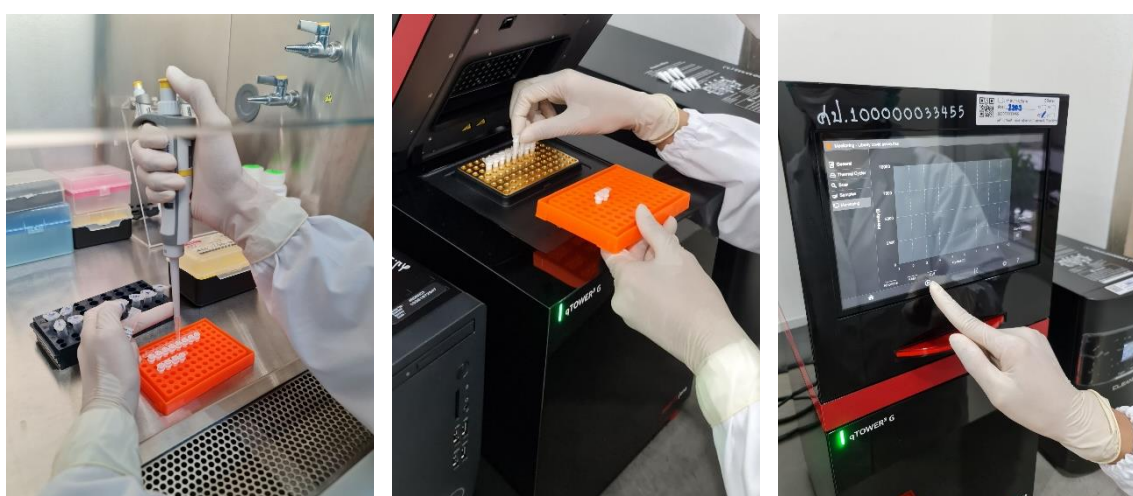
ส่วนประกอบ/ 1 reaction	
2X qPCR Master Mix	10 ไมโครลิตร
Legionella spp. Primer/probe mix	1 ไมโครลิตร
Internal Extraction Control Primer/probe mix	1 ไมโครลิตร
nuclease-free water	3 ไมโครลิตร
DNA sample (Template)	5 ไมโครลิตร
Final volume	20 ไมโครลิตร

- 4) นำหลอด PCR ที่บรรจุส่วนประกอบหลักของปฏิกิริยา PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Real-time PCR) ยี่ห้อ Analytik Jena รุ่น qTOWER3 โดยใช้ DNA ของเชื้อ *Legionella pneumophila* เป็นตัวควบคุมผลบวก และ nuclease-free water เป็นตัวควบคุมผลลบ โดยสภาวะของปฏิกิริยา PCR ตั้งค่าดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สภาวะของปฏิกิริยาสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* spp.

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Enzyme activation	95 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	10 วินาที	50 รอบ
Annealing and extension *	60 องศาเซลเซียส	60 วินาที	

* เป็นขั้นตอนที่มีการเก็บข้อมูลการเรืองแสงของสารเรืองแสงเป้าหมาย คือ FAM

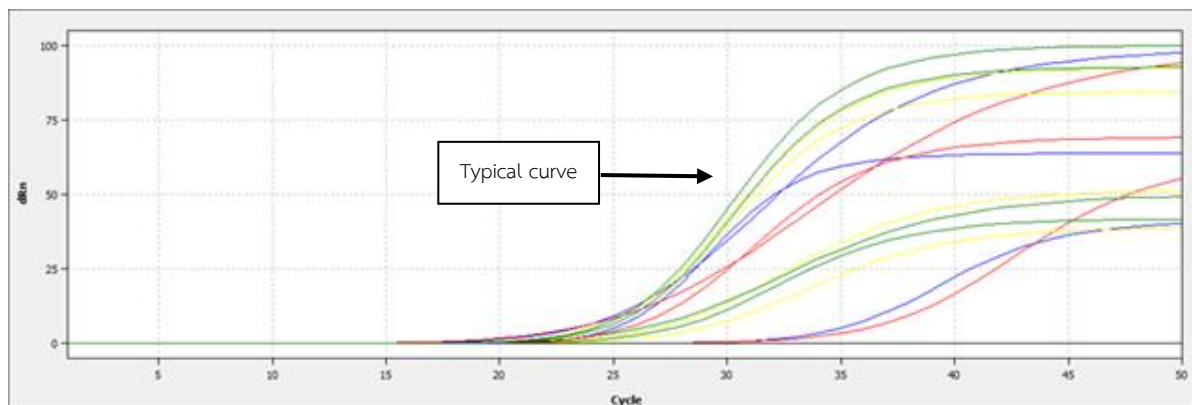


ภาพที่ 12 ขั้นตอนการเตรียม master mix และการตั้งค่าสภาวะของปฏิกิริยาสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* spp.

5) การแปลผลการทดสอบ

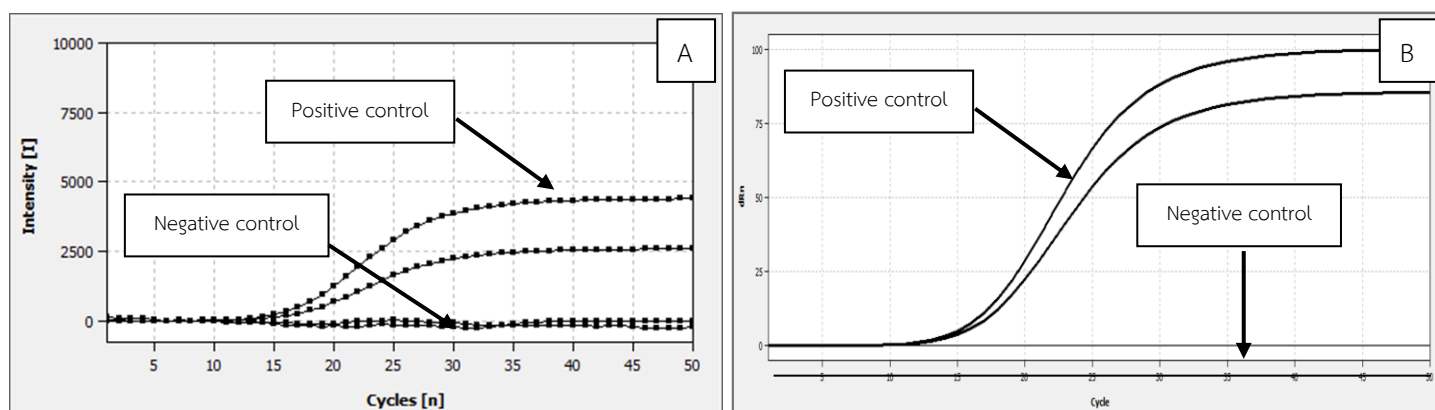
5.1) ก่อนการแปลผลการทดสอบตัวอย่างต้องตรวจสอบค่าการควบคุมคุณภาพการทดสอบ ทุกครั้ง ดังนี้

- ตรวจสอบลักษณะ curve ของ real time plot ว่าเป็น curve ที่มีลักษณะปกติ (S curve: Typical curve)



ภาพที่ 13 ลักษณะของกราฟที่มีลักษณะปกติ (S curve: Typical curve)

- Positive control ต้องให้ค่า Ct value อยู่ในช่วงที่กำหนด (อยู่ในช่วง 16 ถึง 23)
- Negative control ใช้ Nuclease free water เป็น Negative control ทุกครั้งในการทำปฏิกิริยา PCR ต้องซึ่งต้องไม่มีค่า Ct values



ภาพที่ 14 ลักษณะของกราฟ Positive control และ Negative control

(A) คือ raw data (B) คือ calculate Ct

- Internal control ใช้สำหรับตรวจสอบคุณภาพของขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างและการเกิดปฏิกิริยา amplification ซึ่งในการทดสอบต้องแสดงค่า Ct ของ Internal control เพื่อยืนยันว่าขั้นตอนการสกัดและการเกิดปฏิกิริยา amplification เป็นไปอย่างสมบูรณ์
- Duplication เป็นตัวอย่างที่มาจากการทำซ้ำ โดยทำซ้ำอย่างน้อย 10% ของตัวอย่างแต่ละชุดที่ทดสอบ ซึ่งต้องให้ผลการทดสอบเหมือนกับตัวอย่างเดียวกัน

กรณีค่าการควบคุมคุณภาพไม่ผ่านต้องมีการหาสาเหตุและแก้ไขจนค่าการควบคุมคุณภาพ

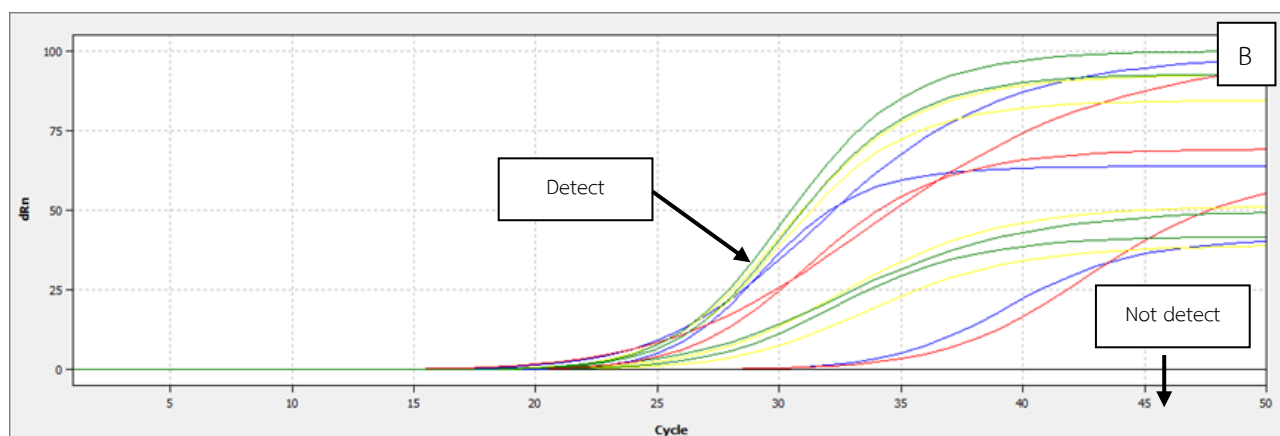
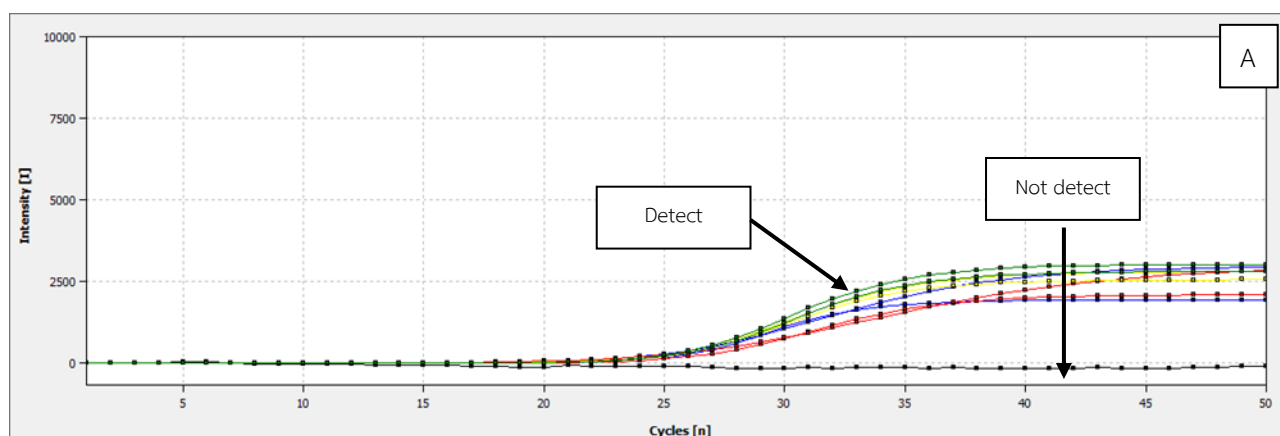
ผ่านจึงสามารถแปลผลการทดสอบได้

5.2) การแปลผลการทดสอบตัวอย่าง

การอ่านผลจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจนสามารถตรวจวัดได้ (Cycles) และปริมาณแสง Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ถ้าในตัวอย่างมีสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* spp. อยู่ จะแสดงลักษณะกราฟเป็น S-curve ถ้าไม่มีจะแสดงลักษณะกราฟเป็นเส้นตรง โดยจากกราฟสามารถรายงานได้เป็นค่า Ct ซึ่งค่า Ct คือ จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย จนถึงระดับที่เครื่อง PCR สามารถตรวจวัดได้ การรายงานผลทดสอบดำเนินการดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การแปลผลการทดสอบ โดยพิจารณาจากค่า Ct และค่าการควบคุมคุณภาพ

Target	Internal control	Positive control	Negative control	การแปลผล
≤ 30	+ / -	+	-	พบเชื้อ (Detect)
> 30	+	+	-	พบเชื้อ (Detect)
> 30	-	+	-	พบเชื้อ (Detect)
-	+	+	-	ไม่พบเชื้อ (Not detect)



ภาพที่ 15 ลักษณะกราฟของตัวอย่างที่พบเชื้อ (Detect) และไม่พบเชื้อ (Not detect)

(A) คือ raw data (B) คือ calculate Ct

3.4 ขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ตาม ISO 16140-2 : 2016 - Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method

ประกอบด้วยการศึกษา 3 ส่วน ดังนี้

3.4.1 การศึกษาความไว (Sensitivity)

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือกว่ามีค่าความไว (sensitivity) ที่แตกต่างกันหรือไม่ ดำเนินการดังนี้

3.4.1.1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างทดสอบ/จำนวนตัวอย่าง

1) กลุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างที่ผู้วิจัยดำเนินการศึกษา คือ กลุ่มตัวอย่างน้ำ (categories) ประกอบด้วยตัวอย่าง 3 ประเภท (types) ได้แก่

- ตัวอย่างน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ
- ตัวอย่างน้ำจากก๊อกน้ำ
- ตัวอย่างน้ำพุประดับอาคาร

โดยนำตัวอย่างแต่ละประเภทมาทดสอบเบื้องต้นเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ผลไม่พบเชื้อ ทำให้ไม่สามารถหาตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติได้ (naturally contaminated samples) ในงานวิจัยครั้งนี้จึงใช้เป็นตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อแทน (artificially contaminated samples)

2) จำนวนตัวอย่าง ในการทดสอบตัวอย่างแต่ละประเภท (types) ทำการทดสอบประเภทละ 20 ตัวอย่าง รวมเป็น 60 ตัวอย่าง

3.4.1.2 การเตรียมตัวอย่างให้ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (artificially contaminated samples) โดยวิธี Spiking สำหรับการทดสอบความไว (Sensitivity)

1) การเตรียมตัวอย่างทดสอบ ในการศึกษาความไว (Sensitivity) ตัวอย่างทดสอบแต่ละประเภทต้องพบสัดส่วนของผลบวก (fractional positive result) อยู่ในช่วง 25-75% ของตัวอย่างแต่ละประเภท (ตัวอย่างที่ทดสอบไม่ควรให้ผลบวกทั้งหมด หรือผลลบทั้งหมด) ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ คือ 250 มิลลิลิตรต่อ test portion โดยจำนวนตัวอย่างที่ต้องเตรียม แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงประเภทตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่าง สำหรับการศึกษความไว (Sensitivity)

ประเภทตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อที่เติม	เชื้อที่เติม
น้ำจากฝักบัวอาบน้ำ	5	ไม่เติมเชื้อ (0 cfu/ml)	<i>L. pneumophila</i> (DMST 12800)
	5	ต่ำ (10^2 cfu/ml)	
	5	กลาง (10^4 cfu/ml)	
	5	สูง (10^6 cfu/ml)	
น้ำจากก๊อกน้ำ	5	ไม่เติมเชื้อ (0 cfu/ml)	<i>L. pneumophila</i> (DMST 12800)
	5	ต่ำ (10^2 cfu/ml)	
	5	กลาง (10^4 cfu/ml)	
	5	สูง (10^6 cfu/ml)	
น้ำพุประดับอาคาร	5	ไม่เติมเชื้อ (0 cfu/ml)	<i>L. pneumophila</i> (DMST 12800)
	5	ต่ำ (10^2 cfu/ml)	
	5	กลาง (10^4 cfu/ml)	
	5	สูง (10^6 cfu/ml)	

3.4.1.3 ขั้นตอนการทดสอบ

เมื่อเตรียมตัวอย่างในแต่ละประเภทเรียบร้อยแล้ว นำไปทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR ตามข้อ 3.3

3.4.1.4 การแปลผลการทดสอบ

- นำผลการทดสอบจากทั้ง 2 วิธี วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR มาคำนวณ หาค่า Sensitivity ของวิธีทางเลือก (SE_{alt}), Sensitivity ของวิธีอ้างอิง (SE_{ref}), Relative trueness (RT), False positive ratio ของวิธีทางเลือก (FPR)
- แปลผลการทดสอบของแต่ละตัวอย่าง ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การแปลผลการทดสอบจากวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก

วิธีทดสอบ	วิธีอ้างอิง (วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ) +	วิธีอ้างอิง (วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ) -
วิธีทางเลือก (Real-time PCR) +	+ / + (PA)	- / + (PD)
วิธีทางเลือก (Real-time PCR) -	+ / - (ND)	- / - (NA)

หมายเหตุ

- Positive Agreement (PA) คือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งวิธีทางเลือก (+) และวิธีอ้างอิง (+)
- Negative Deviation (ND) คือ ตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธีทางเลือก (-)
แต่ให้ผลบวกด้วยวิธีอ้างอิง (+)
- Positive Deviation (PD) คือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธีทางเลือก (+)
แต่ให้ผลลบด้วยวิธีอ้างอิง (-)
- Negative Agreement (NA) คือ ตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้งวิธีทางเลือก (-) และวิธีอ้างอิง (-)

3) จากข้อมูลสรุปการแปลผลการทดสอบในตาราง นำข้อมูลมาคำนวณหาค่าต่อไปนี้

$$\text{- Sensitivity ของวิธีทางเลือก (SE}_{alt}) = \frac{PA+PD}{PA+ND+PD} \times 100$$

$$\text{- Sensitivity ของวิธีอ้างอิง (SE}_{ref}) = \frac{PA+ND}{PA+ND+PD} \times 100$$

$$\text{- Relative trueness (RT) = } \frac{PA+NA}{NA+PA+PD+ND} \times 100$$

$$\text{- False positive ratio (FPR) ของวิธีทางเลือก = } \frac{PD}{NA} \times 100$$

$$\text{- Positive predictive value (PPV) = } \frac{PA}{PA+PD} \times 100$$

$$\text{Negative predictive value (NPV)} = \frac{NA}{NA+ND} \times 100$$

- 4) ตัดสินผลการทดสอบของวิธีทางเลือก โดยคำนวณความแตกต่างระหว่าง (ND-PD) และคำนวณผลรวมของ (ND+PD) แล้วนำค่าที่คำนวณได้ ไปตรวจสอบว่าอยู่ในช่วงของขีดจำกัดการยอมรับ (Acceptability Limit; AL) หรือไม่ หากผลการคำนวณอยู่ในช่วงขีดจำกัดการยอมรับ แสดงว่าวิธีทางเลือกผ่านเกณฑ์การยอมรับ

ตารางที่ 7 การตัดสินผลการทดสอบของวิธีทางเลือก

จำนวนกลุ่มตัวอย่าง (categories)	(ND – PD)	(ND + PD)
1	3	6

หมายเหตุ

ND = จำนวนตัวอย่างที่ให้ผล Negative Deviation

(ให้ผลลบด้วยวิธีทางเลือก แต่ให้ผลบวกด้วยวิธีมาตรฐาน)

PD = จำนวนตัวอย่างที่ให้ผล Positive Deviation

(ให้ผลบวกด้วยวิธีทางเลือก แต่ให้ผลลบด้วยวิธีมาตรฐาน)

3.4.2 การศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (relative level of detection: RLOD) เป็นการศึกษาเพื่อประเมินระดับการปนเปื้อนของเชื้อ *Legionella* spp. ที่วิธี Real-time PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ สามารถตรวจพบได้ (level of detection; LOD) และคำนวณเป็นค่า Relative level of detection (RLOD)

3.4.2.1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างทดสอบ/จำนวนตัวอย่าง

- 1) กลุ่มตัวอย่าง สำหรับการศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (RLOD) ตัวอย่างที่ใช้จะคัดเลือกจากตัวอย่างเพียง 1 ประเภท โดยตัวอย่างที่ผู้วิจัยเลือกดำเนินการศึกษา คือ ตัวอย่างน้ำประปหาน้ำจากฝักบัวอาบน้ำ เพื่อใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างทดสอบโดยในงานวิจัยครั้งนี้ใช้เป็นตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ (artificially contaminated samples)
- 2) จำนวนตัวอย่าง ในการทดสอบต้องมีการเติมเชื้อ 3 ระดับ รวม 30 ตัวอย่าง

3.4.2.2 การเตรียมตัวอย่างให้ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (artificially contaminated samples) โดยวิธี Spiking สำหรับการหาค่า RLOD

- 1) การเตรียมตัวอย่างทดสอบ ในการศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (RLOD) ใช้ตัวอย่างที่เติมเชื้อ ≥ 3 ระดับๆ ละหลายซ้ำ ดังนี้

- ระดับที่ 1 ไม่เติมเชื้อ (negative control level) ทดสอบอย่างน้อย 5 ซ้ำ (ต้องไม่พบผลบวก หากพบผลบวก ต้องทำการทดสอบใหม่ ทุกระดับ)
- ระดับที่ 2 เติมเชื้อระดับต่ำ (low level) ซึ่งเป็นระดับที่ให้ผลบวก (fractional recovery) จำนวน 25-75% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด โดยทดสอบอย่างน้อย 20 ซ้ำ
- ระดับที่ 3 เติมเชื้อระดับสูงขึ้น (higher level) ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าระดับต่ำเล็กน้อย ทดสอบอย่างน้อย 5 ซ้ำ

ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ คือ 250 มิลลิลิตรต่อ test portion โดยจำนวนตัวอย่างที่ต้องเตรียม แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงประเภทตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่าง สำหรับ การศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (RLOD)

ประเภทตัวอย่าง	ระดับการเติมเชื้อ	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อที่เติม	เชื้อที่เติม
น้ำจากฝักบัวอาบน้ำ	ไม่เติมเชื้อ	5	(0 cfu/ml)	<i>L. pneumophila</i> (DMST 12800)
	เชื้อระดับต่ำ (low level)	20	($10^1 - 10^2$ cfu/ml)	
	เชื้อระดับสูงขึ้น (higher level)	5	($10^3 - 10^4$ cfu/ml)	

3.4.2.3 ขั้นตอนการทดสอบ

เมื่อเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว นำไปทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR โดยดำเนินการตาม ข้อ 3.3

3.4.2.4 การแปลผลการทดสอบ

- การคำนวณและการแปลผลค่า RLOD

- 1) RLOD หมายถึง อัตราส่วนระหว่างค่า LOD ของวิธีทางเลือก (วิธี Real-time PCR) และค่า LOD ของวิธีอ้างอิง (วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ)

$$RLOD = \frac{LOD_{alt}}{LOD_{ref}}$$

- 2) สำหรับแต่ละกลุ่มตัวอย่าง (category) ค่า RLOD จะประมาณในรูปของcomplementary-log-log (CLL) model คำนวณใช้โปรแกรม Excel RLOD calculation program
- 3) นำค่า RLOD ที่คำนวณได้เทียบกับขีดจำกัดการยอมรับ Acceptability Limit (AL) โดยค่า AL กำหนดไว้ที่ 1.5 หมายถึง ค่า LOD ของวิธีทางเลือกจะต้องไม่เกิน 1.5 เท่าของค่า LOD ของวิธีอ้างอิง และเป็นที่ยอมรับ หากค่า LOD ของวิธีทางเลือกต่ำกว่าค่า LOD ของวิธีอ้างอิง นั่นหมายถึง วิธีทางเลือกมีโอกาสตรวจพบเชื้อได้ในระดับการปนเปื้อนที่ต่ำกว่าวิธีอ้างอิง

3.4.3 การศึกษาความจำเพาะ (specificity)

เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงความสามารถของวิธีทางเลือกในการตรวจพบเชื้อเป้าหมาย (Target microorganism) และตรวจไม่พบเชื้อที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย (Non-target microorganism)

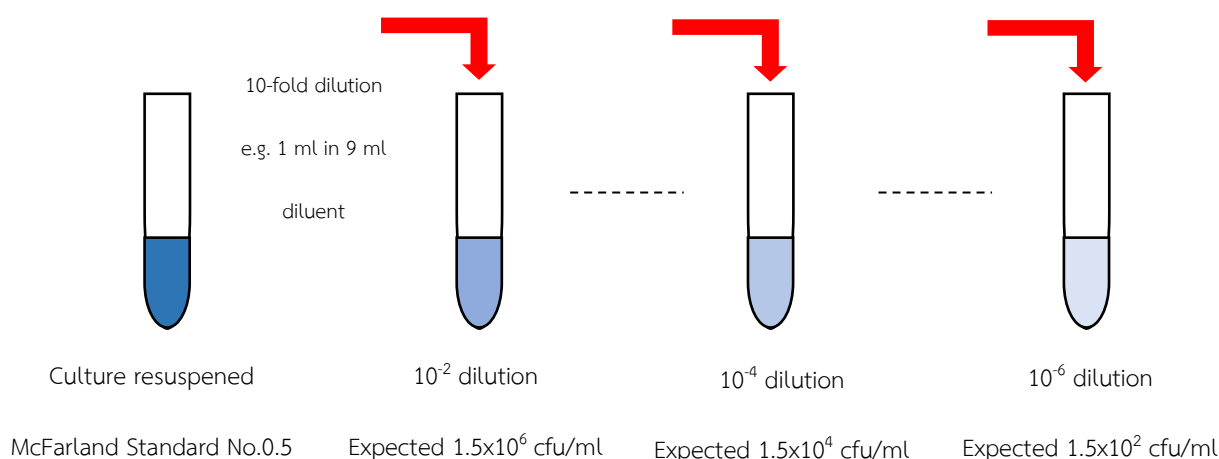
3.4.3.1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างทดสอบ/จำนวนตัวอย่าง

การศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของวิธีทดสอบครั้งนี้ ตรวจสอบโดยใช้เชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่พบได้ในน้ำจากสิ่งแวดล้อม จำนวน 8 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella Typhimurium*

3.4.3.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)

1) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้นสำหรับเป็นเชื้อเป้าหมาย (Target microorganism)

- 1.1) นำเชื้อ *L. pneumophila* (DMST 12800) จาก stock culture มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ buffered charcoal yeast extract agar (BCYE agar) ที่มีส่วนประกอบของ L-cysteine นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน
- 1.2) นำโคโลนีเชื้อ *L. pneumophila* ละลาย (resuspended) ในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland Standard No.0.5 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 cfu/ml
- 1.3) ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จนถึงระดับความเข้มข้น 10^2 cfu/ml (ปริมาณเชื้อสำหรับใช้งาน คือ ประมาณ 1.5×10^2 cfu/ml) ดังภาพที่ 20
- 1.4) ทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจาง ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน
- 1.5) นับจำนวนโคโลนีบน BCYE agar plate ทราบปริมาณเชื้อตั้งต้นจริง (cfu/ml)



ภาพที่ 16 การเจือจางเชื้อ *L. pneumophila* สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)

2) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตั้งต้นสำหรับเป็นเชื้อที่ไม่ใช่เป้าหมาย (Non-target microorganism)

2.1) เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะ จำนวน 7 สายพันธุ์
แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะ

การทดสอบ	เชื้อทดสอบ	รหัสเชื้อจุลินทรีย์	ปริมาณเชื้อ
ความจำเพาะ (specificity)	<i>Escherichia coli</i>	DMST 4212	10 ⁴ cfu/ml
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DMST 7592	
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	DMST 8841	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	DMST 8013	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DMST 5868	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DMST 4739	
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	DMST 562	

2.2) นำเชื้อทดสอบตามสายพันธุ์ข้างต้น จาก stock culture มา streak ลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 °C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง

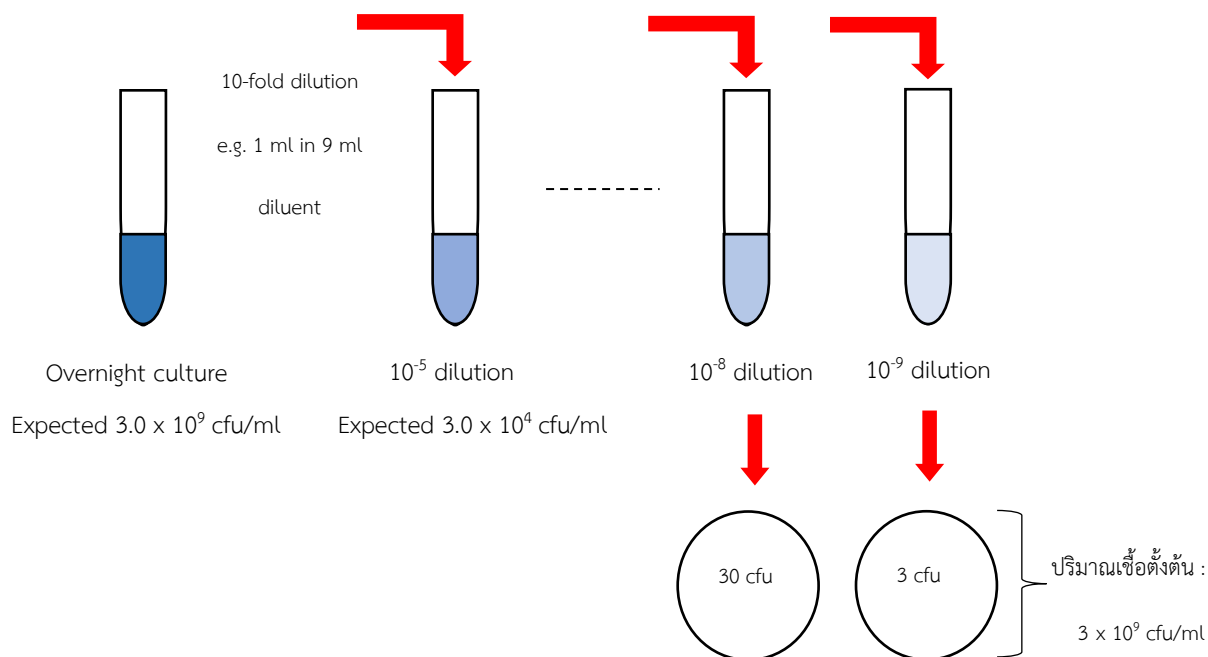
2.3) เลือกโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเพาะเลี้ยงลงใน Tryptic Soy Broth (TSB) 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35±1 °C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง

2.4) ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ตั้งแต่ 10⁻¹ จนถึง 10⁻⁹

2.5) ทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจาง ด้วยเทคนิค pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) นำไปบ่มที่ 35±1°C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง ดังภาพที่ 21

2.6) นับจำนวนโคโลนีบน PCA จะทราบปริมาณเชื้อตั้งต้น (cfu/ml)

2.7) ทำการเจือจางเชื้อแบบ serial 10-fold dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ให้ได้เชื้ออยู่ในระดับที่ต้องการ คือ 10⁴ cfu/ml



ภาพที่ 17 การเจือจางเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย สำหรับศึกษาความจำเพาะ (specificity)

3.4.3.3 ขั้นตอนการทดสอบ

นำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน ตามปริมาณที่คาดหวังมาทดสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR โดยดำเนินการตาม ข้อ 3.3.2 และ 3.3.3

3.4.3.4 การแปลผลการทดสอบ

เชื้อเป้าหมาย (Target microorganism) สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีที่ทดสอบ และเชื้อที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย (Non-target microorganism) ต้องตรวจไม่พบด้วยวิธีดังกล่าว

3.5 การประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี โดยใช้สถิติ kappa analysis

3.5.1 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างทดสอบ/จำนวนตัวอย่าง

- 1) กลุ่มตัวอย่าง สำหรับการประเมินความสอดคล้องระหว่างวิธี Real-time PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างน้ำที่ส่งตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ (naturally contaminated samples) และตัวอย่างที่เติมเชื้อ (artificially contaminated samples) อย่างละ 35 ตัวอย่าง จำนวนรวม 70 ตัวอย่าง

3.5.2 การเตรียมตัวอย่างให้ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (artificially contaminated samples) โดยวิธี Spiking สำหรับประเมินความสอดคล้อง

- 1) การเตรียมตัวอย่างทดสอบ ใช้ตัวอย่างทดสอบ จำนวน 2 ชุด ดังนี้
 - ชุดที่ 1 ตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยไม่เติมเชื้อ จำนวน 35 ตัวอย่าง
 - ชุดที่ 2 ตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยเติมเชื้อ จำนวน 35 ตัวอย่าง

ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ คือ 250 มิลลิลิตรต่อ test portion โดยจำนวนตัวอย่างที่ต้องเตรียม แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ประเภทตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และปริมาณเชื้อสำหรับเติมในตัวอย่าง สำหรับการประเมิน ความสอดคล้องระหว่างวิธี

ชุดที่	ประเภทตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อที่เติม	เชื้อที่เติม	3.4.2.5 ขั้นตอน การ ทดสอบ เมื่อ
1	ตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้อ	35	0 cfu/ml	<i>L. pneumophila</i>	
2	ตัวอย่างที่เติมเชื้อ	35	$10^2 - 10^3$ cfu/ml	(DMST 12800)	

เตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว นำไปทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR โดยดำเนินการตาม ข้อ 3.3

3.4.2.6 การแปลผลการทดสอบ

นำผลการทดสอบที่ได้ มาคำนวณทางสถิติ

- คำนวณอัตราส่วน Kappa

$$\text{Kappa} = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

โดย P_o คือ ผลรวมของผลทดสอบที่ตรงกันจากการทดสอบ

$$P_o = (PA + NA) / N$$

P_e คือ ผลรวมของความน่าจะเป็นที่ตรงกันจากค่าคาดหวัง (Expected)

$$P_e = (PA_{(\text{expected})} + NA_{(\text{expected})}) / N$$

- การแปลความหมายของค่าสถิติ Kappa ที่คำนวณได้พิจารณาดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 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)

แบบฟอร์มการจัดทำรายละเอียดตัวชี้วัด (KPI Template)

ตามคำรับรองการปฏิบัติราชการของหน่วยงานในสังกัดกรมอนามัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566

เอกสารแนบท้ายที่ 1

ผลการพัฒนาผลงานวิชาการ/ นวัตกรรมที่สอดคล้องกับภารกิจของหน่วยงาน (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 - 2567)

หน่วยงาน กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย

ลำดับ	ชื่อประเด็นผลงาน	ประเภทผลงาน	ระยะเวลาดำเนินการ	ความก้าวหน้า (✓)						ผู้รับผิดชอบ
				ศึกษา รวบรวม ข้อมูล	โครง ร่าง/KM	ดำเนินการ วิจัย/ ทดลองใช้	สรุปผล	เผยแพร่	นำไปใช้	
1	การพัฒนาชุดทดสอบความเค็มในอาหาร	นวัตกรรม	1 ต.ค. 2566 – 30 ก.ย. 2567	✓	✓	✓				กลุ่มงานเคมี - กายภาพ
2	การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ <i>Legionella</i> spp. ในตัวอย่างน้ำ	พัฒนา ผลงาน วิชาการ	1 ต.ค. 2566 – 30 ก.ย. 2567	✓	✓	✓				กลุ่มงานจุลชีววิทยา



นางสาวพชรกร แก้วสำราญ

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ

ประธาน กพว.กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุข