

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Method)

3.1 เครื่องมือวิเคราะห์ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้

3.1.1 เครื่องมือวิเคราะห์

ลำดับ	รายชื่อเครื่องมือวิเคราะห์	ยี่ห้อ	รุ่น
1	Vortex Mixer	Scientific Industries	G560E
2	Biosafety Cabinet Class II	Faster	Safe Fast Classic 209
3	Biosafety Cabinet Class II	Scanlaf	MARS 1200
4	Incubator with Humidity Control	Binder	KMF 240
5	Autoclave Fume Hood	PROLAB	-
6	Sterilization Autoclave	Systec	VE-55
7	Decontamination Autoclave	Systec	VE-55
8	Weighing Balance 3 decimal place	Sartorius	ED323S-CW
9	Chemical Fume Hood	PROLAB	DAC 2500 Plus
10	Bag Sealer	Hawo	HD 260 MS
11	Hot Air Oven	Binder	FD 240
12	Water Bath	DIGITAL HEAT	DH-45-110
13	Multiparameter Meter	SCHOTT	Prolab 2000
14	Refrigerator 4 and -20 degree C	EVERMED	LCRF 625S PRO
15	Purify Water Generator Type I&II	TKA	UPW20, GENPURE UF/UV
16	Adjustable Autopipette (20-200 μ L)	BioHit	PROLINE
17	Adjustable Autopipette (100-1000 μ L)	BioHit	PROLINE
18	Media Dispenser	AES Laboratoire	PM05

3.1.2 เครื่องแก้ว / วัสดุอุปกรณ์ / วัสดุสิ้นเปลือง

ลำดับ	รายการเครื่องแก้ว / วัสดุอุปกรณ์ / วัสดุสิ้นเปลือง	ขนาด
1	Spatula or Spoon	-
2	Stirring Rod	-
3	Spread Rod	-
4	Autopipette Tip and Tip Box	200 μ L
5	Autopipette Tip and Tip Box	1000 μ L

ลำดับ	รายการเครื่องแก้ว / วัสดุอุปกรณ์ / วัสดุสิ้นเปลือง	ขนาด
6	Glass/Plastic Petri Dish and Stainless Steel Cans	Ø 90 X 15 mm
7	Glass Tube and Test Tube Rack Stainless	10 mL
8	Glass Tube and Test Tube Rack Stainless	15 mL
9	Glass Measuring Pipettes and Pipette Stainless Cans	10 mL
10	Duran Bottle	500 mL
11	Glass Beaker	250 mL
12	Glass Beaker	500 mL
13	Plastic Beaker	5 L
14	Plastic Cylinder	1 L
15	Forceps	-
16	Foggy Spray Bottle	500 mL
17	Autoclave Tape	0.5 inch
18	ถุงฟิล์ม (Autoclave Bag)	310 x 660 mm
19	Biohazard Bag	305 x 610 mm
20	ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Burner)	-
21	ถุงขยะพลาสติกใส่พร้อมยางรัด	24 x 36 inch
22	ปากกา Marker, ตัวหนีบ, กระจาดขาก	-
23	ถุงมือปราศจากเชื้อ	ขึ้นอยู่กับผู้ปฏิบัติงาน
24	กระดิกน้ำแข็ง	-
25	นาฬิกาจับเวลา	-
26	ฟอยล์	-
27	Thermocouples type T	-
28	Notebook	-
29	Thermo-Hygrometer	-
30	Data logger	-

3.1.3 สารเคมี / รีเอเจนต์

3.1.3.1 เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน (Microbiological standard)

ลำดับ	รายชื่อเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน	เกรด
1.	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 6538	Master Stock Cell Culture

3.1.3.2 สารเคมีที่ใช้ (Chemical, Reagent, Media and Biological Indicator)

ลำดับ	รายชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต / ประเทศผู้ผลิต	เกรด
1	Trypticase Soy Broth (TSB)	Merck KGaA / Germany	Microbiology Grade
2	Trypticase Soy Agar (TSA)	Merck KGaA / Germany	Microbiology Grade
3	Spore Strip ของ <i>Bacillus atrophaeus</i>	Raven Labs / USA	Biological Indicator ($\geq 1 \times 10^6$ CFU)
4	Spore Suspension ของ <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Raven Labs / USA	Biological Indicator ($\geq 1 \times 10^6$ CFU)
5	Spore Strip ของ <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Raven Labs / USA	Biological Indicator ($\geq 1 \times 10^6$ CFU)
6	95% Isopropyl Alcohol	P.P.M. Chemical / N/A	Commercial Grade
7	95% w/v Ethanol	ALCOH-A / N/A	Commercial Grade
8	12.5% w/v Sodium Hypochlorite	Ajax Finechem Pty Ltd. / Australia	Commercial Grade
9	7X Cleaning Solution	MP BIOMEDICALS / France	Laboratory Grade
10	DI Water Type II	-	-
11	น้ำแข็ง	-	-

3.2 การประเมินความเสี่ยงระบบ Decontamination system (Autoclave & Hot air oven) ในระดับห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพ

ขั้นตอนการดำเนินการเริ่มจากการประเมินความเสี่ยงของกระบวนการ การทำงาน และลักษณะเฉพาะของระบบ Decontamination system ซึ่งประกอบด้วยเครื่อง Autoclave และ Hot Air Oven และจำเป็นต้องคำนึงถึงตัวแปรที่มีผลกระทบต่อระบบ Decontamination system เช่น การออกแบบและสร้างอุปกรณ์ที่สามารถทำให้ปราศจากเชื้ออย่างสม่ำเสมอและเชื่อถือได้ในสภาวะที่ต้องการ, ต้องพิสูจน์ว่าเครื่องมือและอุปกรณ์ควบคุมที่สำคัญ ได้แก่ อุปกรณ์วัดความดันและอุณหภูมิ สามารถใช้งานได้ในขอบเขตของของค่าควบคุมในกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อของระบบ Decontamination system, เข้าใจหลักการตายของจุลินทรีย์ และความหมายของการปราศจากเชื้อ, เข้าใจลักษณะเฉพาะของวัสดุ (load) ที่จะทำให้ปราศจากเชื้อด้วยกระบวนการที่เหมาะสม, ตรวจสอบความถูกต้องรอบเวลาการทำ ให้ปราศจากเชื้อ (Validate cycle) ที่ใช้ เพื่อพิสูจน์ว่าสามารถทำให้ปราศจากเชื้อได้ตามที่กำหนดไว้ และคงสภาพการควบคุมและติดตามตรวจสอบ (monitor) เป็นประจำ ในกระบวนการผลิตไว้เพื่อให้มั่นใจว่าระบบ Decontamination system ได้มีคุณภาพปราศจากเชื้อในสภาวะที่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ เป็นต้น โดยใช้วิธี FMEA ซึ่ง

ต้องมีการกำหนดระดับของความรุนแรง (Severity) โอกาสการเกิด (Probability) และความสามารถในการตรวจพบ ความเสี่ยงต่างๆ (Detection) และกำหนดระดับความเสี่ยง (Risk level) จากนั้นหาค่า RPN เพื่อจัดลำดับความเสี่ยงโดยคำนวณได้จากสมการที่ 1

$$\text{RPN} = \text{Severity} \times \text{Probability} \times \text{Detection} \dots\dots\text{สมการที่ 1}$$

จะได้ขั้นตอนวิกฤติ จากขั้นตอนวิกฤติที่ได้ นำมาจัดทำหัวข้อที่จำเป็นต้องทำการตรวจรับรอง (PQ Protocol) โดยต้องกำหนดหัวข้อที่ต้องทำการทดสอบ วิธีการทดสอบ การเก็บตัวอย่าง วิธีการวิเคราะห์และ ค่าเกณฑ์การยอมรับ หลังจากนั้นจะต้องมีการทบทวนและอนุมัติเพื่อดำเนินการทำการตรวจรับรอง

3.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนชื้นโดยใช้เครื่อง Autoclave

3.3.1 การจัดเตรียม

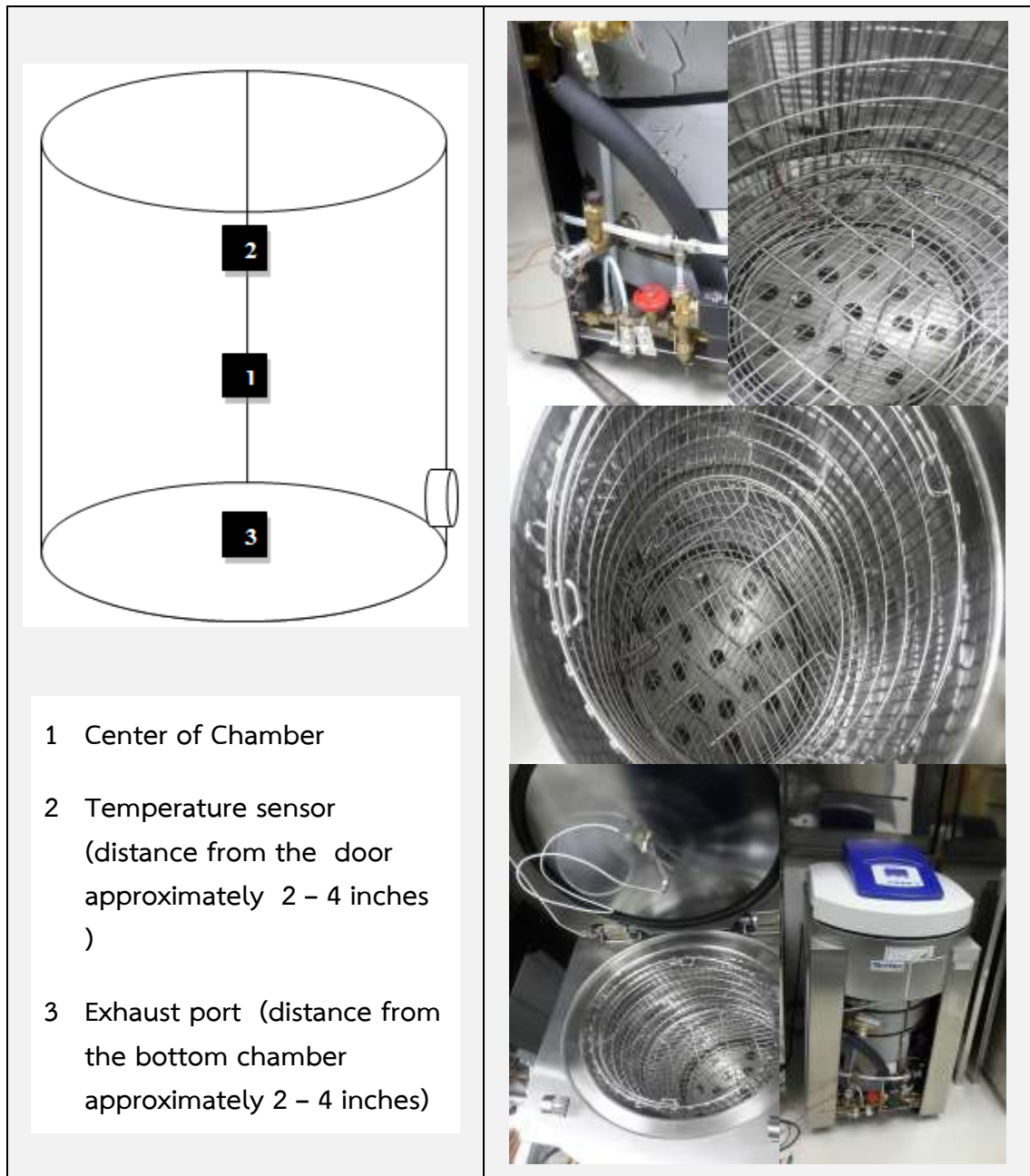
3.3.1.1 จัดทำ protocol ประกอบด้วย วัตถุประสงค์ ขอบเขต ผู้รับผิดชอบ การตรวจสอบ เกณฑ์การยอมรับเอกสารอ้างอิง ผู้จัดทำ ผู้มีอำนาจลงนาม และจัดเตรียมเครื่องมือวัดอุณหภูมิที่ผ่านการสอบเทียบ และเครื่องบันทึกอุณหภูมิ

3.3.1.2 จัดเตรียมเครื่องมือวัดอุณหภูมิที่ผ่านการสอบเทียบ (calibration) และเครื่องบันทึกอุณหภูมิ

3.3.2 Heat Distribution Studies

3.3.2.1 Empty Chamber Temperature Distribution

ทำการศึกษาเพื่อดูการกระจายความร้อนภายในตู้ขณะที่ตู้ว่าง และตรวจสอบถึงความคงที่และสม่ำเสมออย่างทั่วถึงของอุณหภูมิภายในเครื่อง Autoclave โดยใช้ Thermocouples ที่ผ่านการ calibrate แล้วจำนวน 3 อันจะถูกจัดวางไว้ที่จุดต่าง ๆ ภายในเครื่อง Autoclave ดังแสดงในรูปที่ 30 โดยไม่ให้ probe สัมผัสกับพื้นผิวด้านในของ chamber ด้วยการใช้อุปกรณ์ เช่น เชือก ตัวหนีบหรือกระดาษกาวช่วยในการแขวนหรือยึดเครื่องมือวัดอุณหภูมิ ดำเนินการทำให้ปราศจากเชื้อในช่วง sterilization cycle คือ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที ดังแสดงในรูปที่ 31 หลังเสร็จสิ้นการทำให้ปราศจากเชื้อ ให้ตรวจสอบผลที่ได้เพื่อหาอุณหภูมิสูงสุด ต่ำสุด และค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลา จากนั้นทำการแปรผลจากอุณหภูมิที่ได้เทียบกับเกณฑ์การยอมรับการทำการตรวจสอบแบบนี้จะต้องทำ 3 ครั้ง โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ ในช่วง Sterilization cycle อุณหภูมิของ thermocouples แต่ละอันจะต้องไม่ต่างออกไปเกิน ± 1.5 องศาเซลเซียส มีค่า temperature stability ไม่เกิน ± 2.5 องศาเซลเซียส และมีค่า indicating temperature ไม่เกิน ± 1 องศาเซลเซียส



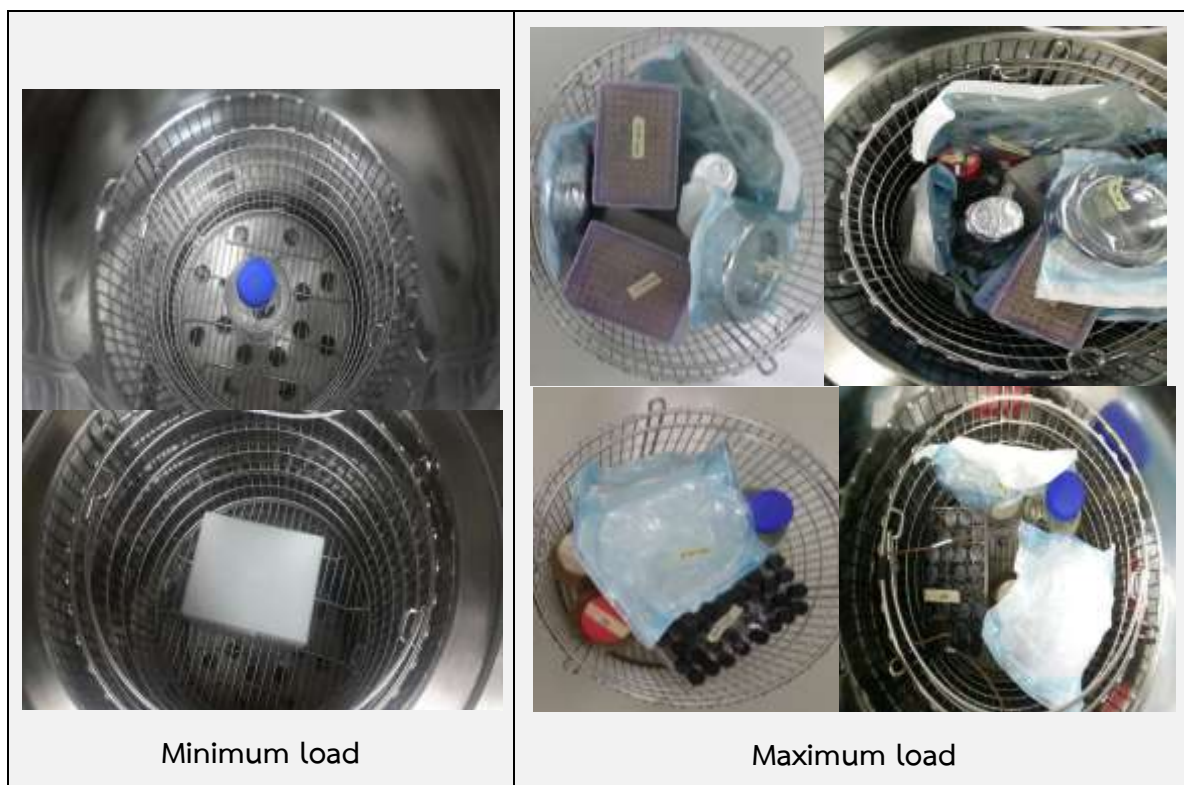
รูปที่ 30 การวางเครื่องมือวัดอุณหภูมิ ตามตำแหน่งต่างๆใน chamber ของเครื่อง Autoclave เมื่อทำการศึกษา Empty Chamber Temperature Distribution



รูปที่ 31 ดำเนินการทำให้ปราศจากเชื้อในช่วง sterilization cycle คือ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที เมื่อทำการศึกษา Empty Chamber Temperature Distribution

3.3.2.2 Load Chamber Temperature Distribution

ทำการศึกษความสม่ำเสมอของอุณหภูมิที่มีผลกระทบจากรูปแบบการเรียง (load pattern) และจำนวนของที่เข้า autoclave ซึ่งจะศึกษาความสม่ำเสมอของอุณหภูมิภายใน chamber ของ autoclave เมื่อทำการจัดเรียงผลิตภัณฑ์ แบบ maximum load และ minimum load อย่างน้อย 1 ครั้ง โดยใช้ probes 3 อันวางตำแหน่งต่างๆ (ไม่ได้สอดเข้าไปในผลิตภัณฑ์) ของ chamber ดังแสดงในรูปที่ 32 และดำเนินการทำให้ปราศจากเชื้อในช่วง sterilization cycle คือ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที ดังแสดงในรูปที่ 31 หลังเสร็จสิ้นการทำให้ปราศจากเชื้อ ให้ตรวจสอบผลที่ได้เพื่อหาอุณหภูมิสูงสุด ต่ำสุด และค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลา จากนั้นทำการแปรผลจากอุณหภูมิที่ได้เทียบกับเกณฑ์การยอมรับ โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ ในช่วง Sterilization cycle อุณหภูมิของ thermocouples แต่ละอันจะต้องไม่ต่างออกไปเกิน ± 1.5 องศาเซลเซียส มีค่า temperature stability ไม่เกิน ± 2.5 องศาเซลเซียส และมีค่า indicating temperature ไม่เกิน ± 1 องศาเซลเซียส



รูปที่ 32 การวางเครื่องมือวัตถุหมุ่ตามตำแหน่งต่างๆใน chamber ของเครื่อง Autoclave เมื่อทำการศึกษา Load Chamber Temperature Distribution

3.3.3 Heat Penetration Studies

ทำการศึกษาและประกันว่าผลิตภัณฑ์ตรงตำแหน่งที่ได้รับความร้อนน้อยที่สุดใน load pattern ได้รับความร้อนเพียงพอที่จะทำให้ปราศจากเชื้อ และตำแหน่งที่ได้รับความร้อนสูงสุด ไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมสลาย โดยทำการศึกษาแบบ Maximum load โดยทำการตรวจสอบ 3 ครั้ง โดยวาง thermocouples ในสิ่งของในตำแหน่งที่คาดว่าไอน้ำจะแพร่เข้าไปได้ยากที่สุด จากนั้นดำเนินการทำให้ปราศจากเชื้อในช่วง sterilization cycle คือ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที ดังแสดงในรูปที่ 31 หลังเสร็จสิ้นการทำให้ปราศจากเชื้อจะต้องหาเวลาที่น้อยที่สุดสำหรับ sterilization temperature ของ thermocouple ทุกตำแหน่ง ซึ่งอย่างน้อยจะต้องไม่ต่ำกว่า 15 นาทีที่ 121 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 33



รูปที่ 33 การวางเครื่องมือวัดอุณหภูมิ ตามตำแหน่งต่างๆใน chamber ของเครื่อง Autoclave เมื่อทำการศึกษา Heat Penetration

3.3.4 Microbiological Challenge Studies

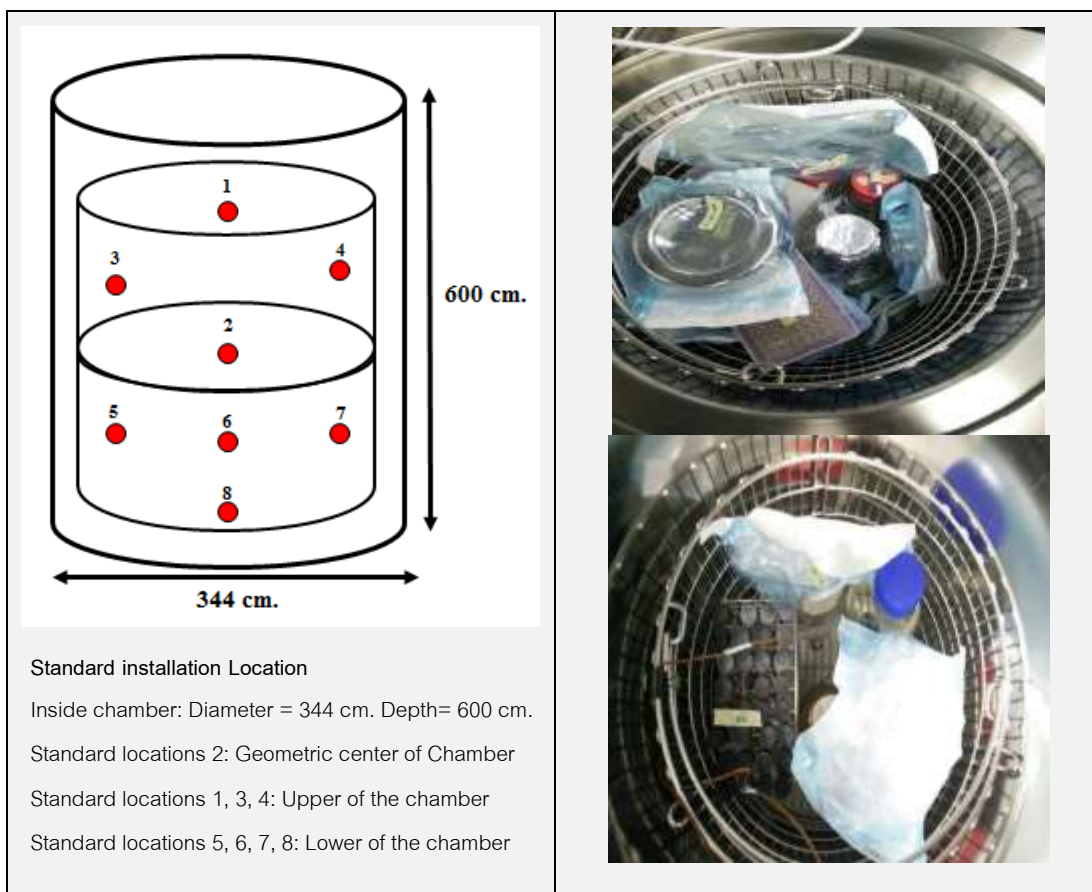
ทำการศึกษาความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ ภายใต้สภาวะที่กำหนดโดยใช้ Biological Indicators (BI) ดังแสดงในรูปที่ 34 ซึ่งเป็นตัวแทนของสปอร์จุลินทรีย์ที่ทนความร้อนสูง เพื่อทดสอบความสามารถทำลายสปอร์จุลินทรีย์ โดยการทำการ loaded chamber microbiological challenge studies ควรจะทำไปพร้อม ๆ กับการทำการศึกษา heat penetration โดยใช้ spore strip และ spore suspension ของ *Geobacillus stearothermophilus* ซึ่งมี spore count ประมาณ 1.0×10^6 CFU การวาง spore strip และ spore suspension ควรวางในตำแหน่งคู่กับ penetration thermocouple ดังแสดงในรูปที่ 35 และ 36 จากนั้นดำเนินการทำให้ปราศจากเชื้อในช่วง sterilization cycle คือ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที ดังแสดงในรูปที่ 31



รูปที่ 34 Biological Indicators (BI) คือ spore strip และ spore suspension ของ *Geobacillus stearothermophilus*



รูปที่ 35 การใส่ spore strip และ spore suspension ในวัสดุอุปกรณ์ที่ต้องการทำให้ปราศจากเชื้อ



รูปที่ 36 การวาง spore strips ตามตำแหน่งต่างๆใน chamber ของเครื่อง Autoclave เมื่อทำการศึกษา Microbiological challenge

หลังเสร็จสิ้นการทำให้ปราศจากเชื้อ นำตัวอย่าง spore strip และ spore suspension ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที บ่มตัวอย่าง spore strip และ spore suspension, positive control และ negative control ใน incubator ที่อุณหภูมิ 57 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ± 12 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 37 หลังการบ่ม ถ้าพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองให้รายงานผลเป็น (+) ถ้าไม่พบว่ามีสีเปลี่ยนสี (ยังคงเป็นสีม่วง) ให้รายงานผลเป็น (-)



รูปที่ 37 การบ่มตัวอย่าง spore strip, spore suspension, positive และ negative control

ในการตรวจสอบ spore strip และ spore suspension ควรทำ positive control (non-sterilized spore strips) และ negative controls (อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ Biological Indicators (BI)) ไปพร้อม ๆ กัน ผลที่ได้จากการตรวจสอบของตัวอย่าง spore strip, spore suspension และ negative control จะต้องไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น หรือไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ยังคงเป็นสีม่วง) และ positive control จะต้องมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นหรือมีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง จึงถือว่ายอมรับได้ ดังแสดงในรูปที่ 38



รูปที่ 38 ผลที่ได้จากการตรวจสอบของตัวอย่าง spore strip, spore suspension, positive และ negative control

3.3.5 จัดทำการสรุปผล

จัดทำรายงานบรรยายถึงผลที่ได้จากการศึกษาในขั้นตอนต่างๆ และกล่าวถึงลักษณะของการ load ที่ทำการตรวจสอบด้วย

3.4 การตรวจสอบประสิทธิภาพการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนแห้ง โดยใช้เครื่อง Hot Air Ovens

3.4.1 การจัดเตรียม

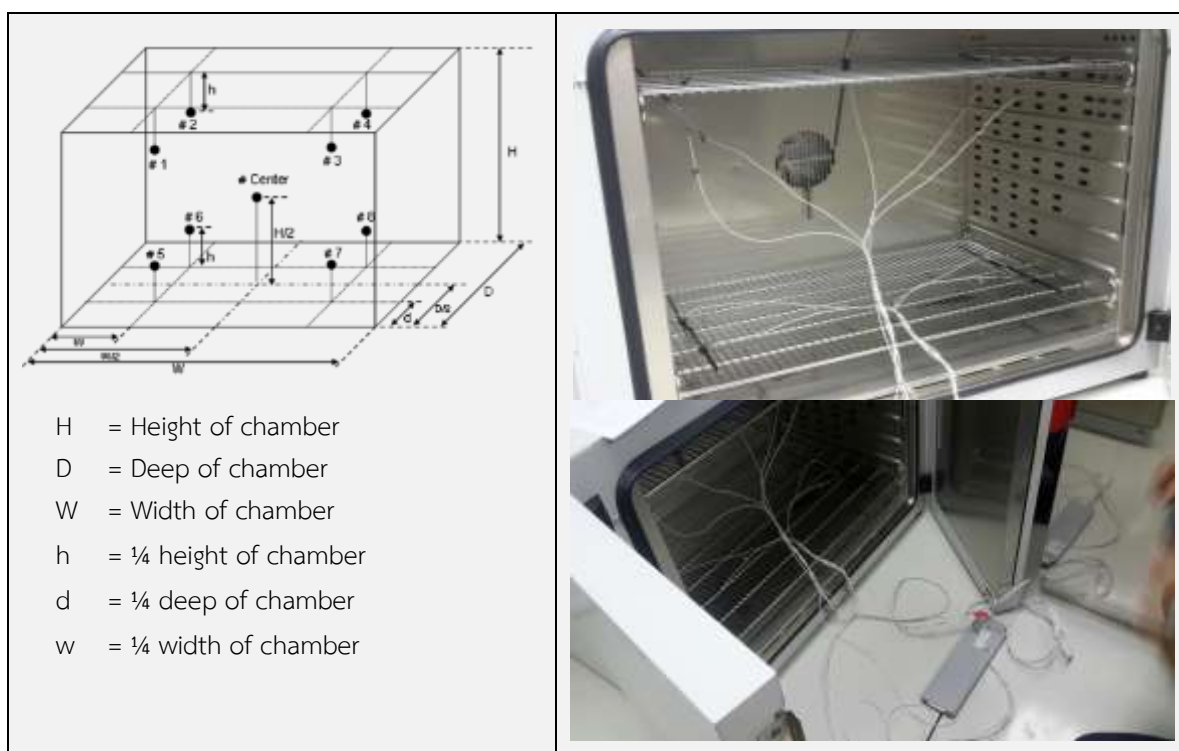
3.4.1.1 จัดทำ protocol ประกอบด้วย วัตถุประสงค์ ขอบเขต ผู้รับผิดชอบ การตรวจสอบ เกณฑ์การยอมรับเอกสารอ้างอิง ผู้จัดทำ ผู้มีอำนาจลงนาม และจัดเตรียมเครื่องมือวัดอุณหภูมิที่ผ่านการสอบเทียบ และเครื่องบันทึกอุณหภูมิ

3.4.1.2 จัดเตรียมเครื่องมือวัดอุณหภูมิที่ผ่านการสอบเทียบ (calibration) และเครื่องบันทึกอุณหภูมิ

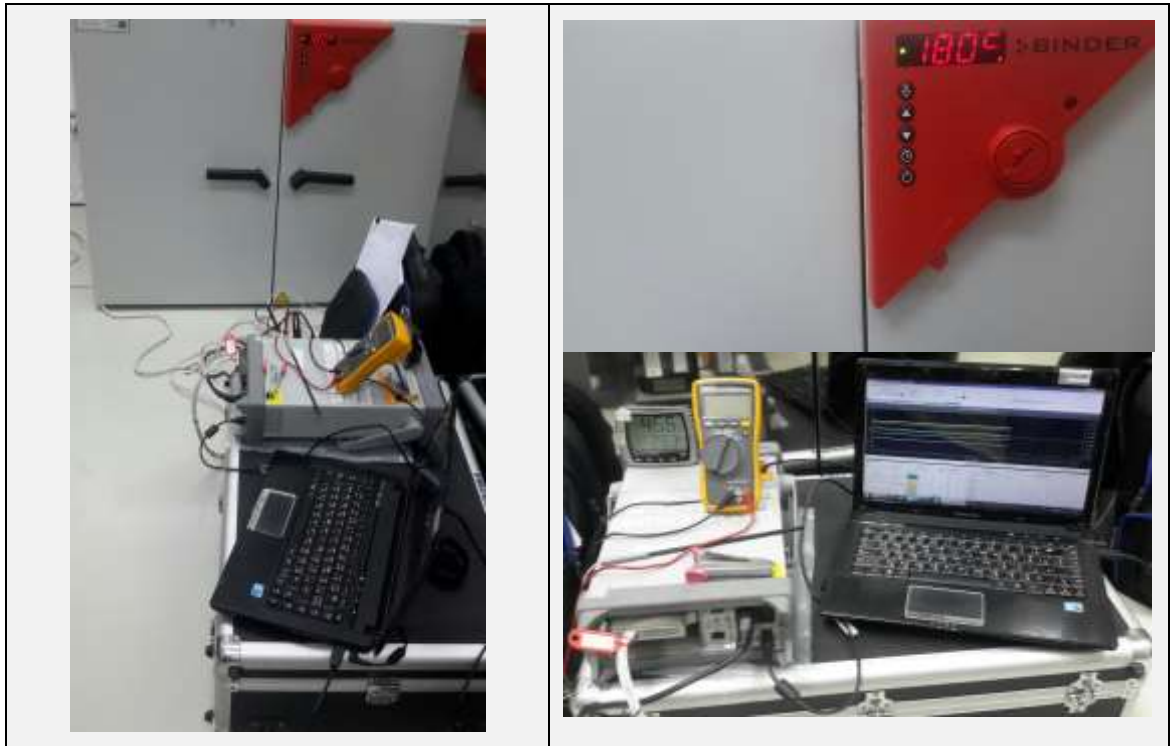
3.4.2 Heat Distribution Studies

3.4.2.1 Empty Chamber Temperature Distribution

ทำการศึกษาเพื่อดูการกระจายความร้อนภายในตู้ขณะที่ตู้ว่าง และตรวจสอบถึงความคงที่และสม่ำเสมออย่างทั่วถึงของอุณหภูมิภายในเครื่อง Hot air oven โดยใช้ Thermocouples ที่ผ่านการ calibrate แล้วจำนวน 9 อันจะถูกจัดวางไว้ที่จุดต่าง ๆ ภายในเครื่อง Hot air oven ดังแสดงในรูปที่ 39 โดยไม่ให้ probe สัมผัสกับพื้นผิวด้านในของ chamber ด้วยการใช้อุปกรณ์ เช่น เชือก ตัวหนีบหรือกระดาษกาวช่วยในการแขวนหรือยึดเครื่องมือวัดอุณหภูมิ ดำเนินการทำให้ปราศจากเชื้อในช่วง sterilization cycle คือ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 40 หลังเสร็จสิ้นการทำให้ปราศจากเชื้อ ให้ตรวจสอบผลที่ได้เพื่อหาอุณหภูมิสูงสุด ต่ำสุด และค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลา จากนั้นทำการแปรผลจากอุณหภูมิที่ได้เทียบกับเกณฑ์การยอมรับการทำการตรวจสอบแบบนี้จะต้องทำ 3 ครั้ง โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ ในช่วง Sterilization cycle อุณหภูมิของ thermocouples แต่ละอันจะต้องไม่ต่างออกไปเกิน ± 5 องศาเซลเซียส มีค่า temperature stability ต้องไม่เกิน ± 1 องศาเซลเซียส มีค่า temperature uniformity ต้องไม่เกิน ± 4 องศาเซลเซียส และมีค่า overall variation ต้องไม่เกิน ± 7 องศาเซลเซียส



รูปที่ 39 การวางเครื่องมือวัดอุณหภูมิ ตามตำแหน่งต่างๆใน chamber ของเครื่อง Hot air oven เมื่อทำการศึกษา Empty Chamber Temperature Distribution



รูปที่ 40 ดำเนินการทำให้ปราศจากเชื้อในช่วง sterilization cycle คือ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง เมื่อทำการศึกษา Empty Chamber Temperature Distribution

3.4.2.2 Load Chamber Temperature Distribution

ทำการศึกษาความสม่ำเสมอของอุณหภูมิที่มีผลกระทบจากรูปแบบการเรียง (load pattern) และจำนวนของที่เข้า Hot air oven ซึ่งจะศึกษาความสม่ำเสมอของอุณหภูมิภายใน chamber ของ Hot air oven เมื่อทำการจัดเรียงผลิตภัณฑ์ แบบ maximum load อย่างน้อย 1 ครั้ง โดยใช้ probes 9 อันวางตำแหน่งต่างๆ (ไม่ได้สอดเข้าไปในผลิตภัณฑ์) ของ chamber ดังแสดงในรูปที่ 41 และดำเนินการทำให้ปราศจากเชื้อในช่วง sterilization cycle คือ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 40 หลังเสร็จสิ้นการทำให้ปราศจากเชื้อ ให้ตรวจสอบผลที่ได้เพื่อหาอุณหภูมิสูงสุด ต่ำสุด และค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลา จากนั้นทำการแปรผลจากอุณหภูมิที่ได้เทียบกับเกณฑ์การยอมรับการ โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ ในช่วง Sterilization cycle อุณหภูมิของ thermocouples แต่ละอันจะต้องไม่ต่างออกไปเกิน ± 5 องศาเซลเซียส มีค่า temperature stability ต้องไม่เกิน ± 1 องศาเซลเซียส มีค่า temperature uniformity ต้องไม่เกิน ± 4 องศาเซลเซียส และมีค่า overall variation ต้องไม่เกิน ± 7 องศาเซลเซียส



รูปที่ 41 การวางเครื่องมือวัดอุณหภูมิ ตามตำแหน่งต่างๆใน chamber ของเครื่อง Hot air oven เมื่อทำการศึกษา Load Chamber Temperature Distribution

3.4.3 Heat Penetration Studies

ทำการศึกษาและประกันว่าผลิตภัณฑ์ตรงตำแหน่งที่ได้รับความร้อนน้อยที่สุดใน load pattern ว่าได้รับความร้อนเพียงพอที่ทำให้ปราศจากเชื้อ และตำแหน่งที่ได้รับความร้อนสูงสุด ไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมสลาย โดยทำการศึกษาแบบ Maximum load โดยทำการตรวจสอบ 3 ครั้ง โดยวาง thermocouples ในสิ่งของในตำแหน่งที่คาดว่าความร้อนจะแพร่เข้าไปได้ยากที่สุด จากนั้นดำเนินการทำให้ปราศจากเชื้อในช่วง sterilization cycle คือ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 40 หลังเสร็จสิ้นการทำให้ปราศจากเชื้อจะต้องหาเวลาที่น้อยที่สุดสำหรับ sterilization temperature ของ thermocouple ทุกตำแหน่ง ซึ่งอย่างน้อยจะต้องไม่ต่ำกว่า 3 ชั่วโมงที่ 180 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 42



รูปที่ 42 การวางเครื่องมือวัดอุณหภูมิ ตามตำแหน่งต่างๆใน chamber ของเครื่อง Hot air oven เมื่อทำการศึกษา Heat Penetration แบบ Maximum load

3.4.4 Microbiological Challenge Studies

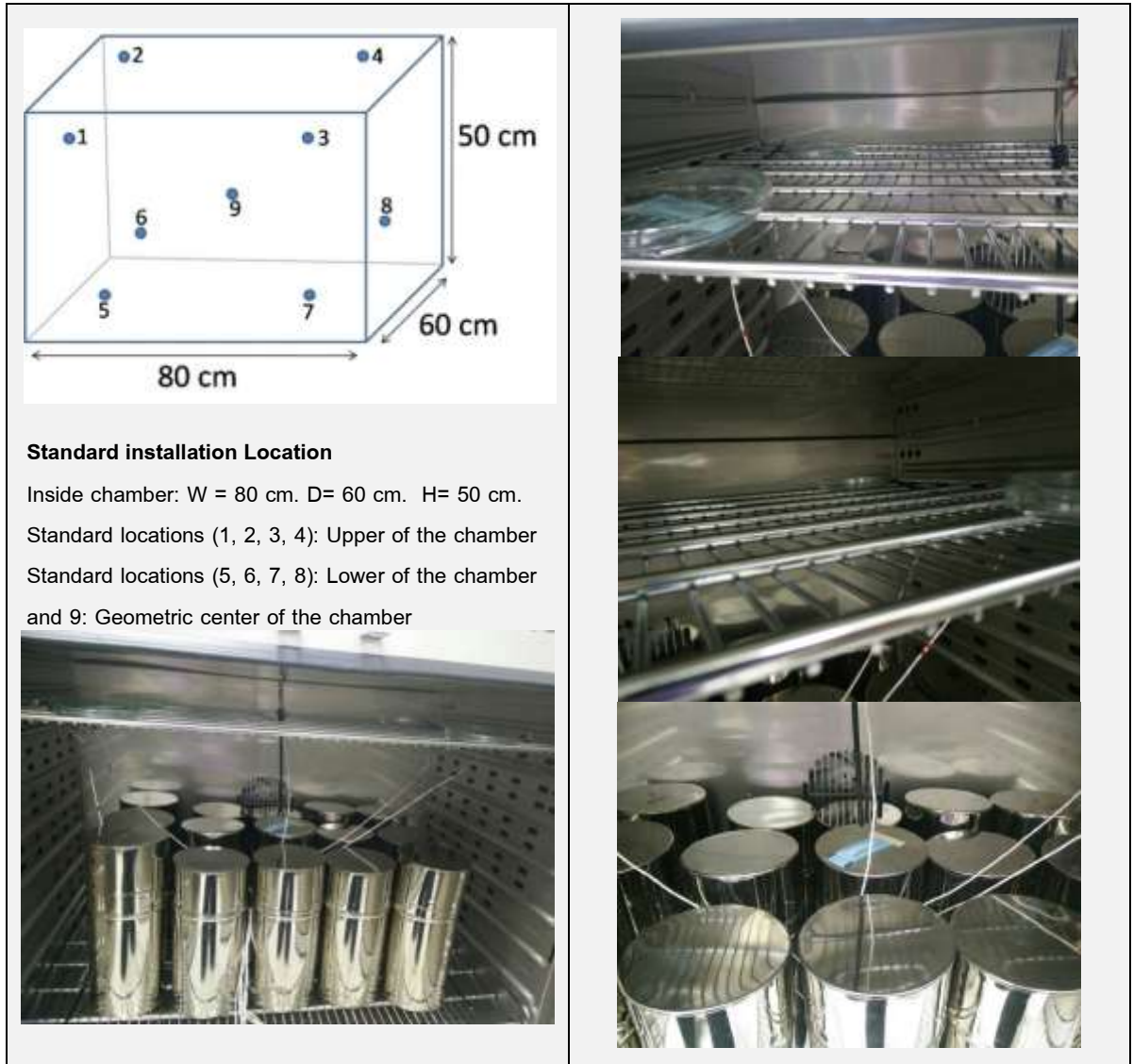
ทำการศึกษาความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ ภายใต้สภาวะที่กำหนดโดยใช้ Biological Indicators (BI) ดังแสดงในรูปที่ 43 ซึ่งเป็นตัวแทนของสปอร์จุลินทรีย์ที่ทนความร้อนสูง เพื่อทดสอบความสามารถทำลายสปอร์จุลินทรีย์ โดยการทำให้ loaded chamber microbiological challenge studies ควรจะทำไปพร้อม ๆ กับการทำการศึกษา heat penetration โดยใช้ spore strip ของ *Bacillus atrophaeus* ซึ่งมี spore count ประมาณ 1.0×10^6 CFU การวาง spore strip ควรวางในตำแหน่งคู่กับ penetration thermocouple ดังแสดงในรูปที่ 44 และ 45 จากนั้นดำเนินการทำให้ปราศจากเชื้อในช่วง sterilization cycle คือ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 40



รูปที่ 43 Biological Indicators (BI) คือ spore strip ของ *Bacillus atrophaeus*

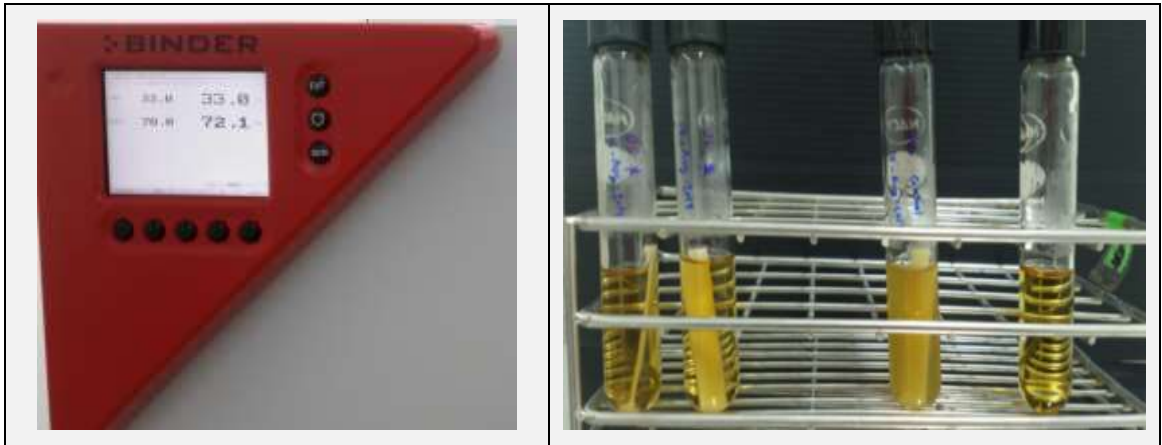


รูปที่ 44 การใส่ spore strip ในวัสดุอุปกรณ์ที่ต้องการทำให้ปราศจากเชื้อ



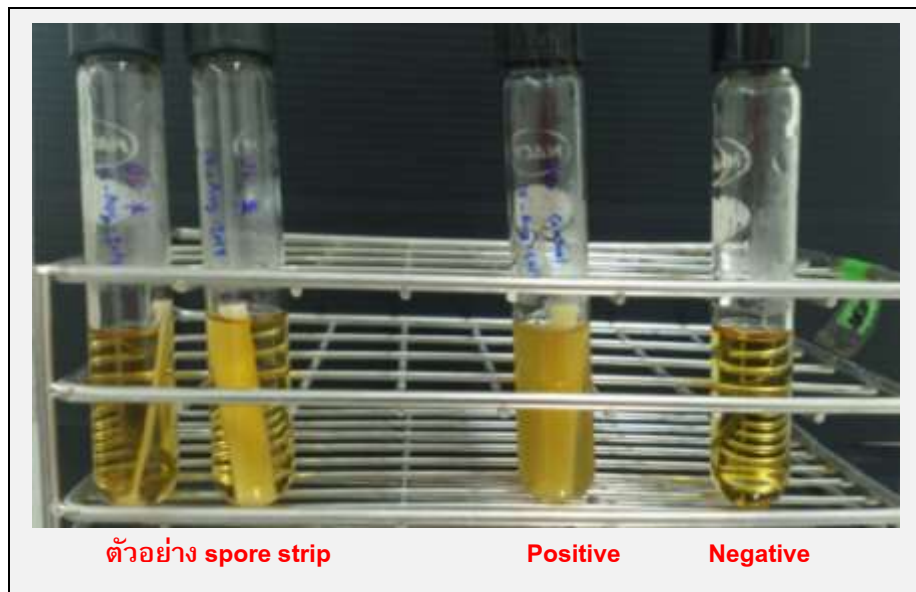
รูปที่ 45 การวาง spore strip ตามตำแหน่งต่างๆใน chamber ของเครื่อง Hot air oven เมื่อทำการศึกษา Microbiological challenge

หลังเสร็จสิ้นการทำให้ปราศจากเชื้อ นำตัวอย่าง spore strip ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที บ่มตัวอย่าง spore strip, positive control และ negative control ใน incubator ที่อุณหภูมิ 33 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ± 12 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 46 หลังการบ่ม ถ้าพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นให้รายงานผลเป็น (+) ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขึ้น ให้รายงานผลเป็น (-)



รูปที่ 46 การบ่มตัวอย่าง spore strip, positive และ negative control

ในการตรวจสอบ spore strip ควรทำ positive control (non-sterilized spore strips) และ negative controls (อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ Biological Indicators (BI)) ไปพร้อม ๆ กัน ผลที่ได้จากการตรวจสอบของตัวอย่าง spore strip และ negative control จะต้องไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น และ positive control จะต้องมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น จึงถือว่ายอมรับได้ ดังแสดงในรูปที่ 47



รูปที่ 47 ผลที่ได้จากการตรวจสอบของตัวอย่าง spore strip, positive และ negative control

3.4.5 จัดทำการสรุปผล

จัดทำรายงานบรรยายถึงผลที่ได้จากการศึกษาในขั้นตอนต่างๆ และกล่าวถึงลักษณะของการ load ที่ทำการตรวจสอบด้วย