ความแตกต่างของการหาความไม่แน่นอน ของการทดสอบทางเคมีและจุลชีววิทยา

เรียบเรียง...รวิวรรณ อาจสำอาง

คำสำคัญ ความไม่แน่นอนของการทดสอบ การทดสอบจุลชีววิทยา uncertainty

ในการทดสอบทางเคมีมักนิยมบอกถึงคุณสมบัติ (properties) ของวิธีเป็นความไว (sensitivity) ความถูกต้อง (accuracy) การทวนซ้ำ (repeatability) และการทำซ้ำ (reproducibility) แต่คุณลักษณะแบบนี้ไม่สามารถนำมาหาปริมาณสำหรับวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาได้ ปกติแล้วระดับของเชื้อจุลินทรีย์ที่ถือว่าเป็นค่าจริง (true value) ในตัวอย่างไม่สามารถหามาได้ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงและแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา และสำหรับตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วจะมีเพียงคุณลักษณะเดียว (characteristic) ที่ค่อนข้างแน่นอนและเหมาะสมในการประเมินค่า คือ การใช้ค่าการทวนซ้ำ (repeatability, degree of consistency between repeated analyses performed by the same analyst on the same sample under the same conditions)

ปัญหาที่สำคัญอันหนึ่งที่นักจุลชีววิทยาพบในการทำวิธีทดสอบให้เป็นมาตรฐาน (method standardization) คือไม่สามารถจัดหาวัสดุอ้างอิง (reference materials) ที่สัมพันธ์กับการทดสอบได้ แต่มีข้อยกเว้นในกรณีของการทดสอบเชิงคุณภาพ จะมีวัสดุอ้างอิงซึ่งประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบนั้น ๆ ทำในรูปของการทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็ง ซึ่งมีส่วนหนึ่งถูกทำไว้สำหรับการทดสอบเชิงปริมาณ โดยปกติมักทำในกรณีของการทดสอบความชำนาญ เพราะเชื้อจุลินทรีย์ในลักษณะนี้ไม่สามารถจัดหาได้ตามปกติ การทดสอบเชื้อจากการทำแห้งด้วยวิธีนี้แตกต่างจากการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหาร โดยเฉพาะจะขาดขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง และการทำการเจือจางขั้นต้น (primary dilution) อย่างไรก็ตามการเข้าร่วมโปรแกรมกิจกรรมทดสอบความชำนาญ โดยการวิเคราะห์เชื้อในรูปแบบดังกล่าวมีประโยชน์ถือว่าเป็นส่วนหนึ่งของการประกันคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

นักจุลชีววิทยาทราบได้อย่างดีว่าในค่าของการวิเคราะห์มีความแปรปรวนได้อย่างสูงสำหรับการทดสอบตัวอย่างเดียวกัน ค่าความแปรปรวนนี้มองเห็นได้ชัดจากวิธี plating method ผลการทดสอบที่ผู้วิเคราะห์ส่วนใหญ่สามารถอนุมานได้ว่าไม่ถูกต้อง โดยไม่ต้องใช้วิธีทางสถิติมาช่วยในการตัดสิน ได้แก่ความแตกต่างระหว่างความเจือจางเดียวกันกับความเจือจางที่ต่างกัน สิ่งสำคัญที่ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องจัดทำคือหาว่าความแปรปรวนที่เกิดนั้นสาเหตุมาจากความไม่ถูกต้องของวิธีปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ หรือว่ามีสาเหตุมาจากปรากฏการณ์ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อจุลินทรีย์

ในความเป็นจริงแล้วแต่ละตัวอย่างควรได้รับการคัดเลือกเพื่อที่จะให้เป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด

หรือทั้งชุดที่ต้องการทดสอบ ซึ่งเป็นงานที่ไม่ง่ายเลยสำหรับผลิตภัณฑ์ชุดการผลิตใหญ่ ๆ และอาหารที่เป็นของแข็ง ส่วนอาหารที่เป็นของเหลว เช่น น้ำและนมเป็นผลิตภัณฑ์ที่มี particles ขนาดเล็ก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทเดียวที่มีตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์ได้อย่างดี

ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างหนึ่ง มักไม่มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ จุลินทรีย์อาจจะมีอยู่ตรงพื้นผิวมากกว่าข้างในตัวอย่าง สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ต่างกันจะมีความไวที่บริเวณต่างกันในตัวอย่างเดียวกัน เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวนี้ ควรบดตัวอย่างให้เข้ากัน ซึ่งวิธีนี้ใช้ได้กับตัวอย่างที่เป็นทั้งของเหลวและของแข็ง การใช้เครื่องตีปั่น (stomacher) หรือเครื่องมืออื่น ๆ ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน จะทำให้แน่ใจว่าการกระจายตัวของจุลินทรีย์ในตัวอย่างเป็นไปอย่างสม่ำเสมอ

อย่างไรก็ตามควรตระหนักว่าอาจจะมีความแตกต่างกันอย่างมากในประสิทธิภาพของวิธีการบดตัวอย่างดังกล่าว ทั้งนี้เนื่องจากอาหารโดยธรรมชาติ มักไม่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน พวกที่มีส่วนประกอบที่มี particles เป็นไขมัน หรือ particles อื่น หรือสารอื่น ๆ อาจมีการกระจายตัวของจุลินทรีย์แบบไม่เป็นเนื้อเดียวกัน แม้แต่หลังจากการผสมให้เข้ากันแล้วก็ตาม เนื่องจากจุลินทรีย์จะอยู่ในลักษณะที่เป็น particles

ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งควรจัดทำวิธีการสำหรับการบดตัวอย่างให้เข้ากันของอาหารแต่ละประเภทไว้ สำหรับห้องปฏิบัติการที่มีตัวอย่างประเภทเดียวกันเป็นจำนวนมาก การจัดทำวิธีการบดตัวอย่างสำหรับอาหารแต่ละประเภทมีความสำคัญมาก และจะส่งผลถึงผลการทดสอบที่สม่ำเสมอในแต่ละครั้ง

จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ อาจจะอยู่ในรูปของ particle เดี่ยว ๆ หรือกลุ่มของ particles (single particle or agglomerations) กลุ่มเหล่านั้นถูกสร้างขึ้นมาตามธรรมชาติโดยการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร ดังนั้นการทดสอบจุลินทรีย์จึงต้องนำเอาหลักเกณฑ์นี้มาใช้ด้วย จึงให้มีการรายงานผลเป็น colony forming units (CFU) ไม่ใช่จำนวนของจุลินทรีย์ ดังนั้น 1 colony forming unit อาจเป็นกลุ่มของแบคทีเรียซึ่งเกิดมาจากจุลินทรีย์เซลล์เดียวหรือมากกว่าหนึ่งแล้วค่อย ๆ แบ่งตัวมาเรื่อย ๆ จนมีจำนวนมากขึ้น

จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จะแสดงลักษณะแตกต่างกันในของเหลว บางชนิดเป็นอนุภาคเดี่ยว ๆ ในขณะที่บางชนิดเป็นกลุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่สร้างแคปซูล หรือสร้างสารที่เป็นเมือก เช่น ซูโดโมแนส (Pseudomonas spp) ดังนั้นเพื่อเป็นการลดความสามารถในการเกาะเป็นกลุ่ม ให้เติมสารพวก surface-active compounds ลงในสารละลายเจือจางและอาหารเลี้ยงเชื้อ ถึงแม้ว่าการสุ่มตัวอย่างจะมีการควบคุมอย่างดีและมีการใช้วิธีบดตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุด แต่ยังคงมีปัญหาเกี่ยวกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ จุลินทรีย์จะมีการแบ่งตัวในผลิตภัณฑ์และในตัวอย่างหลังจากการสุ่มตัวอย่างแล้ว รวมทั้งในขั้นตอนต่าง ๆ ตลอดจนถึงการเพาะเชื้อครั้งสุดท้าย ดังนั้นมีวิธีเดียวที่สามารถลดปัญหาเหล่านี้ได้ คือ การควบคุมอุณหภูมิ และทำการปรับระยะเวลาของแต่ละขั้นตอนการทดสอบ

ขั้นตอนการดำเนินการที่แตกต่างกันในการทดสอบมีผลกระทบอย่างมากกับผลการทดสอบถึงแม้ว่าห้องปฏิบัติการจะมีการประกันคุณภาพอย่างดี มีการควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง การควบคุมอุณหภูมิ และในขั้นตอนอื่น ๆ แต่ความไม่สม่ำเสมอ ก็สามารถเกิดขึ้นได้ในช่วงของการชั่งตัวอย่าง การปิเปต และขั้นตอนอื่นๆ รวมถึงการสัมผัสกับตัวอย่างโดยเครื่องมือต่างๆ ด้วย

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ หลังจากการบดตัวอย่าง คือ ขั้นตอนการเจือจางหลายครั้ง การใช้เครื่องมือในการทำให้กลุ่มของจุลินทรีย์แยกจากกันแต่ละครั้ง แม้กระทั่งการปิเปตถ้ามีการดูดอย่างแรง บริเวณปลายแคบ ๆ ของปิเปต (pipette - tips) ย่อมทำให้กลุ่มของจุลินทรีย์แยกจากกัน และส่งผลให้จำนวน CFU เพิ่มมากขึ้นทั้งสิ้น

นอกเหนือจากปัจจัยทางด้านชีววิทยาดังได้กล่าวมาแล้ว ยังต้องนำเอาค่าความไม่แน่นอนทางสถิติมาคำนวณด้วยในการสุ่มตัวอย่าง เมื่อต้องการจะสร้างวิธีทดสอบหรือขั้นตอนในการทดสอบขึ้นมาและสำหรับการแสดงค่าความไม่แน่นอนของผลการทดสอบ เมื่อต้องการคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบ เราจำเป็นต้องแน่ใจว่ามีข้อมูลเพียงพอจากการวัดหลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าทฤษฎีของการกระจายแบบปกติใช้ได้ ทำให้สามารถคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยได้

นอกจากนั้นยังหาค่าการทวนซ้ำและการทำซ้ำได้อีกด้วย ซึ่งวิธีดังกล่าวนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการเคมี และต่อมายึดพื้นฐานจากปัจจัยเหล่านี้ ทำให้หาค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบได้

สำหรับการนับ particles ปกติแล้วจะไม่กระจายตัวแบบปกติ ทำให้การใช้โมเดลทางคณิตศาสตร์มาใช้ยากขึ้น ส่วนการใช้ ค่า log ในผลการทดสอบแต่ละครั้งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างปกติในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ส่วนการใช้วิธีการทดสอบตัวอย่างใดตัวอย่างหนึ่งแต่ทำหลายซ้ำเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงาน

โดยภาพรวมแล้วการใช้ทฤษฎีการกระจายแบบปกติ ไม่นิยมใช้กันในการหาปริมาณจุลินทรีย์ แต่ในทางกลับกันทฤษฎีนี้จะถูกนำมาใช้บ่อยมากสำหรับการเปรียบเทียบกลุ่ม (groups) และ treatments สำหรับวัตถุประสงค์เพื่อการวิจัย ดังนั้นการคำนวณโดยการยึดหลักข้อมูลการหาปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างเดียวที่ผ่านมาโดยใช้การกระจายแบบพัวซอง (Poisson Distribution) จะถูกนำมาใช้ในทางชีววิทยา โอกาสที่จะพบจุลินทรีย์แต่ละชนิดในแต่ละส่วนของตัวอย่าง และปริมาณต่างๆ จะเป็นแบบสุ่ม เมื่อมีการนับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละส่วน เราจะพบว่าการกระจายตัวของจุลินทรีย์จะเป็นแบบพัวซอง การกระจายตัวของจุลินทรีย์ในอาหารก็เป็นตัวอย่างหนึ่งของการกระจายตัวแบบนี้

ในปัจจุบันนี้ ISO 19036 เป็นแนวทางการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบนี้ ใช้แนวทางของ global approach ซึ่งได้จากความแปรปรวนทั้งหมดจากกระบวนการทดสอบ ความแปรปรวนเหล่านี้ คือ ความเที่ยงที่สังเกตได้และความลำเอียงของการวัด (bias) อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติการทดสอบทางจุลชีววิทยาทางอาหารจะนำเฉพาะค่าความเที่ยงมาใช้ในการประมาณค่าความไม่แน่นอน

การประมาณค่าความไม่แน่นอนตามแนวทางของ global approach ได้จากการทดลองหาความเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำ (reproducibility) ของการทดสอบ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานนี้จะสัมพันธ์กับค่า combined standard uncertainty

ถ้าห้องปฏิบัติการใดไม่ได้จัดทำการหาค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบ จะทำให้ห้องปฏิบัติการนั้นไม่สามารถทราบได้ว่าผลการทดสอบถูกต้อง (valid) หรือใช้ได้ตรงตามความต้องการของลูกค้าหรือไม่ ดังนั้น ISO/IEC 17025 จึงได้มีข้อกำหนดสำหรับการหาค่าความไม่แน่นอนของทุกการทดสอบ อย่างไรก็ตามมีบางโอกาสที่ห้องปฏิบัติการตัดสินใจที่จะไม่รายงานค่าความไม่แน่นอนให้ลูกค้า

ในปัจจุบันนี้ห้องปฏิบัติการทดสอบทางจุลชีววิทยาอาจจะไม่รายงานค่าความไม่แน่นอน ยกเว้นในกรณีที่ลูกค้าต้องการ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากค่าความไม่แน่นอนทางจุลชีววิทยามีค่าใหญ่มากและลูกค้ายังไม่พร้อมที่จะเข้าใจและยอมรับเรื่องนี้ ในการรายงานค่าความไม่แน่นอนทางจุลชีววิทยา ต้องระบุลักษณะของวิธีที่นำมาใช้ในการหาค่าความไม่แน่นอน เนื่องจากมีหลายวิธีใช้อยู่ในปัจจุบันนี้ มีบางวิธีให้ค่าที่ต่ำกว่าค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นจริง

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/TS 19036 : 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.

2. NMKL procedure No 8, 1999: Measurement of Uncertainty in Microbiological Examination of Foods.

สำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ
กรมวิทยาศาสตร์บริการ
โทร. 0 2201 7332-3
e-mail : raviwan@dss.go.th