ชีวิ.

ข้อมูลข่าวสารของราชการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

วศ กช
อว 60

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 7ว

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

นางสาวนพมาศ สะพู

นางรวิวรรณ อาจสำอาง

กลุ่มงานจุลชีววิทยา

กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

บทคัดย่อ

กลุ่มงานจุลชีววิทยาทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐานของ FDA BAM โดยลดปริมาณตัวอย่างจาก 50 กรัม ลงเหลือ 25 กรัม ใช้วิธีทดสอบทางสถิติ paired t test เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ทั้งสองในตัวอย่างอาหารชนิดต่างๆ 25 ตัวอย่าง โดยทำการทดสอบเป็นคู่ๆ ผลการทดสอบโดย paired t test พบว่าวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธีมาตรฐานและวิธีดัดแปลงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และได้ทำการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีดัดแปลงโดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ชนิด ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ ได้ค่า %RSD 0.45 – 1.76 ซึ่งถือว่าวิธีดัดแปลงเป็นวิธีที่มีความถูกต้องและแม่นยำ นอกจากนี้ยังได้เข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานในประเทศอังกฤษคือ Public Health Laboratory Service 4 ครั้ง และ Central Science Laboratory 1 ครั้ง ผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญดังกล่าวอยู่ในช่วงเป็นที่ยอมรับ ซึ่งเป็นสิ่งที่จะช่วยยืนยันในความถูกต้องและแม่นยำของวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐานของ FDA BAM

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	i
สารบัญตาราง	ii
1. บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่ได้รับ	2
1.4 ระยะเวลาดำเนินการ	2
1.5 วารสารปริทัศน์	2
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	5
3. ผลการทดลอง	14
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	23
5. สรุปผลการทดลอง	25
กิตติกรรมประกาศ	26
เอกสารอ้างอิง	27

เลขหมู่ วศ กช
ลล 60
เลขทะเบียน 11556
วันที่ 16 ธ.ค. 46

ด้วยอภินันทนาการ
จาก
กช.

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายละเอียดของตัวอย่าง	5
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธีมาตรฐานและวิธีดัดแปลง	16
ตารางที่ 3 ค่า $\log_{10}$ ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธีมาตรฐานและวิธีดัดแปลง	17
ตารางที่ 4 ค่า di และ di^2 ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธีมาตรฐาน และวิธีดัดแปลงของแต่ละตัวอย่าง	18
ตารางที่ 5 ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่างนมผงโดยวิธีดัดแปลง	19
ตารางที่ 6 ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่างไอศกรีมโดยวิธีดัดแปลง	20
ตารางที่ 7 ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์โดยวิธีดัดแปลง	21
ตารางที่ 8 ผลการหาค่า %RSD	22
ตารางที่ 9 ผลการเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญกับ PHLS รายการ aerobic count	22

1. บทนำ

1.1 ความเป็นมาและปัญหา

กลุ่มงานจุลชีววิทยามีหน้าที่วิเคราะห์ทดสอบอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม วิเคราะห์เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค นอกจากนี้ยังวิเคราะห์อาหารตามความต้องการของลูกค้ารวมทั้งตัวอย่างอาหารเพื่อการส่งออก การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เป็นรายการหนึ่งที่ต้องทดสอบ และทางกลุ่มงานจุลชีววิทยาได้เลือกใช้วิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน FDA Bacteriological analytical manual (FDA BAM) 8th ed. 1998[4] ของประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วโลก แต่ในรายละเอียดวิธีวิเคราะห์ทางกลุ่มงานจุลชีววิทยาได้ทำการดัดแปลงเพื่อให้เหมาะสมและสะดวกกับการนำมาใช้งานในห้องปฏิบัติการ โดยได้ลดน้ำหนักตัวอย่างจากวิธีของ FDA BAM 50 กรัมเป็น 25 กรัม ลดปริมาณสารละลายเจือจางที่ 10^{-1} จาก 450 มิลลิลิตร เป็น 225 มิลลิลิตร และลดปริมาณสารละลายเจือจาง 10 เท่าขั้นต่อ ๆ ไป จาก 90 มิลลิลิตร เป็น 9 มิลลิลิตร การใช้น้ำหนักของตัวอย่างมากไม่เหมาะสมกับงานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเนื่องจากตัวอย่างบางชนิดที่ลูกค้าส่งมาวิเคราะห์มีปริมาณไม่พอ เนื่องจากต้องวิเคราะห์หลายรายการ นอกจากนี้การใช้ตัวอย่างมากถึง 50 กรัม ทำให้ต้องใช้สารละลายเจือจางมาก โดยเฉพาะตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์สูงต้องทำการเจือจางตัวอย่างแบบสิบเท่าหลายครั้ง ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายและเสียเวลามากขึ้น ก่อนที่จะนำวิธีที่ดัดแปลงมาใช้จำเป็นต้องมีการยืนยันความถูกต้องโดยใช้วิธีทางสถิติที่เหมาะสมที่จะมาพิสูจน์ว่าวิธีที่ห้องปฏิบัติการดัดแปลงมาจากวิธีของ FDA BAM ใช้ได้และถูกต้องตามหลักวิชาการ

กลุ่มงานจุลชีววิทยาจึงได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้เทคนิคทางสถิติที่เรียกว่า paired t test เป็นการทดสอบว่าวิธีที่ห้องปฏิบัติการดัดแปลงมามีความถูกต้อง (accuracy) ตามหลักสถิติ และทดสอบความแม่นยำ (precision) โดยคำนวณค่า % relative standard deviation (RSD) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลจากการเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญกับ Public Health Laboratory Service (PHLS) ประเทศอังกฤษ กับ Central Science Laboratory ประเทศอังกฤษ โปรแกรม Food Examination Performance Assessment Scheme (FEPAS)

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อพิสูจน์ความถูกต้อง แม่นยำของวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.3.1 ได้วิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เหมาะสมกับการใช้งาน ประหยัดค่าใช้จ่าย รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ

1.3.2 ได้วิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการพิสูจน์ยืนยันความถูกต้องตามหลักสถิติเพื่อเกิดความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ทั้งลูกค้าและห้องปฏิบัติการ

1.4 ระยะเวลาดำเนินการ

กันยายน 2543 - เมษายน 2544

1.5 วารสารปริทัศน์

การวิเคราะห์/ทดสอบในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา จำเป็นต้องใช้หลักปฏิบัติที่ดีในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือและมีความสม่ำเสมอ คุณภาพของสิ่งที่เกี่ยวข้องในกระบวนการวิเคราะห์จึงเป็นสิ่งที่สำคัญ เช่นการปฏิบัติตามข้อกำหนดที่ตกลงยอมรับกัน การใช้วิธีวิเคราะห์และเครื่องมือที่เหมาะสม บุคลากรมีคุณสมบัติและความสามารถ ห้องปฏิบัติการได้รับการรับรองความสามารถ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นข้อกำหนดในมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 1999 General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratory ด้วย

ISO/IEC 17025 [7] ข้อ 5.4.5.2 กำหนดว่า ห้องปฏิบัติการจะต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ไม่เป็นมาตรฐาน วิธีตามมาตรฐานที่ถูกใช้นอกขอบข่ายที่กำหนดไว้ และการขยายและการดัดแปลงวิธีมาตรฐาน เพื่อยืนยันว่าวิธีนั้นเหมาะกับการใช้ตามที่ตั้งใจไว้ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ต้องมีขอบเขตเท่าที่จำเป็นเพื่อให้เป็นไปตามความต้องการของการใช้งานที่กำหนด หรือตามสาขาของการใช้งาน ห้องปฏิบัติการต้องบันทึกผลต่างๆ ที่ได้ ขั้นตอนที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้อง และข้อความระบุว่าวิธีนั้น ๆ เหมาะกับการใช้ตามวัตถุประสงค์หรือไม่

การตรวจสอบความถูกต้องคือ การยืนยันโดยการตรวจสอบ และจัดทำหลักฐานที่เป็นรูปธรรมเพื่อแสดงว่าข้อกำหนดพิเศษโดยเฉพาะต่างๆ สำหรับการใช้ตามที่ตั้งใจไว้โดยเฉพาะ สามารถบรรลุผลได้ครบถ้วน (จาก ISO/IEC 17025 ข้อ 5.4.5.1)

ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีจะต้องคำนึงถึงปัจจัยที่สำคัญคือ

1. **ความถูกต้อง (accuracy)** หมายถึง ความใกล้เคียงของค่าที่วัดได้กับค่ามาตรฐานหรือค่าจริง (true value) ของสิ่งที่ถูกวัด
2. **ความแม่นยำ (precision)** หมายถึงค่าที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลทดสอบตัวอย่างที่ทำการทดสอบซ้ำหลายครั้ง

ลักษณะของความแม่นยำจำแนกได้เป็น

1. Repeatability หมายถึง ความใกล้เคียงของการเป็นไปตามกันระหว่างผลของการวัดหลาย ๆ ครั้ง ของปริมาณที่ถูกวัดเดียวกันภายใต้เงื่อนไข คือวิธีการวัดเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือวัดเดียวกัน สถานที่ทำการวัดเดียวกัน กระทำในระยะเวลาอันสั้น

   (Repeatability: Closeness of the agreement between the result of successive measurement of the same measurand carried out subject to all the following: the same measurement procedure, the same observer, the same measuring instrument, used under the same conditions, the same location, repetition over a short period of time, VIM 3.6)[9]
2. Reproducibility หมายถึง ความใกล้เคียงของความเป็นไปตามกันระหว่างผลของการวัดของปริมาณที่ถูกวัดเดียวกัน ภายใต้เงื่อนไขที่เปลี่ยนแปลง เช่น วิธีการวัด ผู้ทดสอบ เครื่องมือวัด สถานที่ทำการวัด เงื่อนไขที่ใช้และเวลา

   (Reproducibility: Closeness of the agreement between the result of measurement of the same measurand, where the measurement are carried out under changed conditions such as principle or method of measurement, observer, measuring instrument, location, conditions of use and time)

การใช้สถิติในการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

การตรวจหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีที่นิยมทำกันได้แก่ การใช้สารอ้างอิงมาตรฐาน (standard reference material, SRM) หรือสารอ้างอิงมาตรฐานรับรอง (certified reference material, CRM) โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้วิธีที่ทดสอบต้องได้ค่าอยู่ในช่วงที่กำหนด อีกวิธีหนึ่งคือ การเติมสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณแน่นอนลงในตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารนั้นในตัวอย่างดังกล่าวตามวิธีที่ทดสอบ แล้วหาค่า % recovery วิธีดัง

กล่าวไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารเนื่องจากไม่สามารถจัดหาตัวอย่างที่รู้ค่าจุลินทรีย์ที่แท้จริง (true value) ได้ ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการหาค่า % recovery นอกจากนี้ยังไม่สามารถจัดหา reference materials ที่สัมพันธ์กับการวิเคราะห์อย่างเช่นการวิเคราะห์ทางเคมีสามารถจัดหาได้ แต่มีข้อยกเว้นในกรณีของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative) จะมี reference materials ซึ่งประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์นั้น ๆ โดยทำในรูปของ freeze-dried materials ซึ่งจะมีส่วนหนึ่งถูกทำให้ใช้สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ปกติแล้วจะทำในกรณีของการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (proficiency test) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ในลักษณะนี้ไม่สามารถจัดหาได้ตามปกติ ดังนั้นเทคนิคในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณทางจุลชีววิทยาวิธีหนึ่งที่นำเอาวิธีทางสถิติมาช่วยตัดสินคือการเปรียบเทียบวิธีที่ห้องปฏิบัติการต้องการพิสูจน์กับวิธีมาตรฐาน

การทดสอบแบบที (The Student t Test)

การทดสอบแบบที เป็นการทดสอบแบบหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบผลการทดลองสองชุดที่ได้จากตัวอย่างเดียวกัน ชุดหนึ่งทำการทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ต้องการทดสอบ (test method) และอีกชุดหนึ่งทำการวิเคราะห์โดยวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (standard method) โดยใช้ความรู้ทางสถิติคำนวณหาค่า t จากผลการทดลองของทั้งสองวิธี แล้วนำมาเปรียบเทียบกับค่า t ในตารางที่ 10 ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่าค่า t จากตาราง ก็แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธี แต่ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มีค่าไม่มากกว่าค่า t จากตาราง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธี

ในกรณีที่ต้องการทดสอบกับตัวอย่างหลายตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างจะต้องนำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธีมาตรฐานและวิธีที่ต้องการทดสอบควบคู่กันไป โดยวิเคราะห์วิธีละหนึ่งครั้ง เนื่องจากแต่ละตัวอย่างจะมีองค์ประกอบแตกต่างกันออกไป เรียกการทดสอบแบบนี้ว่า paired t test การทดสอบแบบนี้ให้หาค่าความแตกต่างกันระหว่างผลการทดลองทั้งสองวิธีของแต่ละตัวอย่าง แล้วหาค่าเฉลี่ยของผลต่างของตัวอย่างทั้งหมด หาค่าเบี่ยงเบนของผลต่างที่เกิดขึ้นของสองวิธีวิเคราะห์ที่มีผลต่อตัวอย่างแต่ละอันกับค่าเฉลี่ยของผลต่าง ทั้งหมดนี้นำมาคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหาค่า t ถ้าค่า t จากตารางมากกว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณ แสดงว่าวิธีทั้งสองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2. 1 รายละเอียดที่ใช้ในการทดลอง มี 25 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดของตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง
1	ซอสพริก
2	ซอสพริก
3	อาหารทางการแพทย์ชนิดผง
4	อาหารทางการแพทย์ชนิดผง
5	อาหารทางการแพทย์ชนิดผง
6	อาหารทางการแพทย์ชนิดผง
7	นมผง
8	นมผง
9	เนื้อไก่สด
10	เนื้อไก่สด
11	เนื้อไก่สด
12	เนื้อไก่สด
13	ไอศกรีมเต้าหู้รสกะทิ
14	ไอศกรีมเต้าหู้รสกาแฟ
15	ไอศกรีมเต้าหู้กลิ่นกล้วย
16	ไอศกรีมเต้าหู้กลิ่นส้ม
17	ไอศกรีมเต้าหู้รสชาเขียว
18	นมพาสเจอร์ไรส์รสจืด
19	นมพาสเจอร์ไรส์รสกาแฟ
20	นมพาสเจอร์ไรส์รสหวาน
21	นมพาสเจอร์ไรส์รสช็อกโกแลต
22	นมพาสเจอร์ไรส์รสสตอเบอร์รี่
23	นมผงผสมเครื่องปรุงบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป
24	น้ำแข็งผสมน้ำมันหอย
25	สับปะรดผสมไก่

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- ตู้เย็นซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิ 2-10 องศาเซลเซียส
- เครื่องตีป่น
- ตู้อบเพาะเชื้อซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส
- เครื่องฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้ง (hot air sterilizer) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 170-190 องศาเซลเซียส
- หม้อนึ่งอัด (autoclave) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 121 ± 1 องศาเซลเซียส
- เครื่องชั่งไฟฟ้าชั่งน้ำหนักได้ละเอียด 0.01 กรัม
- อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ของกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารสำเร็จรูป ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก 1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ

- เพลตเคานต์อะการ์ (plate count agar) ของ Difco

2.4 สารเคมี

- สารละลายเจือจาง (dilution fluid) เตรียมใช้เอง รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก

2.5 ขั้นตอนการดำเนินการ

2.5.1 เนื่องจากวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ของ FDA BAM 8th ed, 1998 ระบุว่าวิธีนี้ใช้ได้กับทั้งอาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร โดยไม่ได้ระบุลงไปเฉพาะว่าเป็นอาหารชนิดใด และก็ตรงกับวัตถุประสงค์ของกลุ่มงานจุลชีววิทยาที่จะนำมาใช้ในวิธีที่ดัดแปลงคือให้ใช้ได้กับทั้งอาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นการเลือกตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จึงพยายามเลือกตัวอย่างให้ครอบคลุมอาหารหลายๆ ชนิดที่ปกติทางห้องปฏิบัติการให้การบริการลูกค้าอยู่ รายละเอียดของตัวอย่างในตารางที่

2.5.2 ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธีที่ดัดแปลงโดยให้ได้การนับ (enumeration) อยู่ในช่วง 10^0-10^6 โคโลนี/กรัม หรือ โคโลนี/กรัม โดยแต่ละตัวอย่างให้ทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธีทั้งสองวิธีไปพร้อม ๆ กัน ถ้าตัวอย่างใดที่ไม่พบจุลินทรีย์จะไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

2.5.3 เมื่อหาค่าปริมาณจุลินทรีย์ได้แล้วให้เปลี่ยนเป็นค่า $\log_{10}$ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ paired t test

2.5.4 ส่วนการทดสอบความแม่นยำ ให้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีดัดแปลง ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง แล้วหาค่า % RSD

2.6 วิธีการทดลอง

2.6.1 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธีที่ดัดแปลง

2.6.1.1 วิธีมาตรฐาน

2.6.1.1.1 ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม ลงในโถแก้วเครื่องตีป่น แล้วเติมสารละลายเจือจางลงไป 450 มิลลิลิตร นำไปตีป่นเป็นเวลา 2 นาที ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} ในกรณีที่เป็นของเหลวให้ปิเปตต์ตัวอย่างมา 50 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเจือจาง 450 มิลลิลิตร

2.6.1.1.2 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} มา 10 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าเร็ว ๆ 25 ครั้ง แต่ละครั้งมีระยะห่าง 30 เซนติเมตร ได้สารละลายที่มีความเจือจาง 10^{-2}

2.6.1.1.3 เตรียมสารละลายที่มีความเจือจาง 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} โดยปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} ขวดละ 10 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเจือจาง 90 มิลลิลิตร แต่ละขวดตามลำดับ

2.6.1.1.4 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ 2 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร ในแต่ละระดับความเจือจาง

2.6.1.1.5 เทอาหารเลี้ยงเชื้อเพลตเคานต์อะการ์ที่มีอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียสลงในจานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้อเบา ๆ เพื่อผสมตัวอย่างให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ เทอาหารเลี้ยงเชื้อเพลตเคานต์อะการ์ 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่ไม่ได้ใส่สารละลายตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมลบและทดสอบสภาพปลอดเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อเพลตเคานต์อะการ์ที่ใช้ รอจนอาหารแข็งตัวจึงคว่ำจาน นำไปอบเพาะเชื้อในตู้อบเพาะเชื้อที่มีอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง

2.6.1.1.6 นับจำนวนโคโลนีโดยดูวิธีการนับในข้อ 2.6.1.3

2.6.1.2 วิธีดัดแปลง

2.6.1.2.1 ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.1 กรัม ใส่ลงในสารละลายเจือจาง 225 มิลลิลิตร เขย่าเร็ว ๆ อย่างน้อย 25 ครั้ง ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} กรณีที่เป็นของเหลวให้ปิเปตต์ตัวอย่างมา 25 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเจือจาง 225 มิลลิลิตร

2.6.1.2.2 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} จากข้อ 2.6.1.2.1 มา 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเจือจาง 9 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-2}

2.6.1.2.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-3} โดยปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-2} มา 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเจือจาง 9 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางต่อเป็น 10^{-4} และ 10^{-5} โดยปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-3} และ 10^{-4} ลงในสารละลายเจือจาง 9 มิลลิลิตร

2.6.1.2.4 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ 2 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร ในแต่ละระดับความเจือจาง

2.6.1.2.5 เทอาหารเลี้ยงเชื้อเพลตเคานต์อะการ์ที่มีอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้อเบา ๆ เพื่อผสมตัวอย่างให้เข้า

กับอาหารเลี้ยงเชื้อ เทอาหารเลี้ยงเชื้อเพลตเคานต์อะการ์ 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่ไม่ได้ใส่สารละลายตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมลบและทดสอบสภาพปลอดเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อเพลตเคานต์อะการ์ที่ใช้ รอจนอาหารแข็งตัว จึงคว่ำจาน นำไปอบเพาะเชื้อในตู้อบเพาะเชื้อที่มีอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง

2.6.1.2.6 นับจำนวนโคโลนีโดยดูวิธีการนับในข้อ 2.6.1.3

2.6.1.3 การคำนวณ

2.6.1.3.1 จานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี นับจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี แล้วนำไปคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ดังนี้

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

N จำนวนโคโลนีต่อกรัม

$\sum C$ ผลรวมของจำนวนโคโลนีที่นับได้ทุกจานเพาะเชื้อ

n_1 จำนวนจานเพาะเชื้อของระดับความเจือจางแรกที่นับ

n_2 จำนวนจานเพาะเชื้อของระดับความเจือจางถัดมาที่นับ

d dilution factor แรกที่นับ

ตัวอย่างการคำนวณ

1:100	1:1000
232,244	33,28

$$N = \frac{(232+244+33+28)}{(2+0.1\times2)\times10^{-2}}$$

$$= \frac{537}{0.022}$$

$$= 24409$$

$$= 24000$$

ค่าที่คำนวณได้ให้รายงานผลเป็นตัวเลขเพียง 2 ลำดับ โดยปัดตัวเลขลำดับที่ 2 เพิ่มขึ้นอีก 1 ค่า ถ้าเลขลำดับที่ 3 มากกว่า 5 และถ้าตัวเลขลำดับที่ 3 น้อยกว่า 5 ให้ปรับตัวเลขในลำดับที่ 3 เป็นศูนย์ แต่ถ้าเลขในลำดับที่ 3 มีค่าเท่ากับ 5 ให้พิจารณาตัวเลขในลำดับที่ 2 ถ้าเป็นเลขคี่ให้ปัดตัวเลขในลำดับที่ 2 ขึ้น 1 ค่า และถ้าเป็นเลขคู่ให้ปรับตัวเลขลำดับที่ 3 เป็นศูนย์ ตัวอย่าง

คำนวณ	รายงาน
12,700	13,000
12,400	12,000
15,500	16,000
14,500	14,000

2.6.1.3.2 จานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 25 โคโลนี

ถ้าจำนวนโคโลนีที่นับได้ของความเจือจางแรกที่ใช้น้อยกว่า 25 โคโลนี ให้หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ $\times$ 1/*d* เมื่อ *d* เป็น dilution factor

ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ ถ้าเป็นเลขทศนิยม 0.5 ให้ปัดตัวเลขหน้าทศนิยมเพิ่มขึ้นอีก 1 ค่า เช่น 12.5 ให้ปัดเป็น 13

2.6.1.4 การประเมินผลทางสถิติ

2.6.1.4.1 ผลของการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้จากวิธีมาตรฐานและวิธีดัดแปลง ต้องนำมาเปลี่ยนให้เป็นค่า log10 ก่อนที่จะนำมาตรวจสอบทางสถิติเพื่อที่จะได้การกระจายที่เป็นแบบ normal distribution[6] แล้วใช้การทดสอบ paired t test ตามสูตรต่อไปนี้[1, 3]

$$Sd^2 = \frac{\sum di^2 - \left[\left(\sum di\right)^2 / N\right]}{N-1}$$

$$t = \frac{\sum di / N}{Sd / \sqrt{N}}$$

di ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์โดยวิธีทั้งสองของแต่ละตัวอย่าง (ต้องคิดเครื่องหมายบวกลบด้วย)

$\sum di$ ผลรวมของความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ของแต่ละตัวอย่างโดยวิธีทั้งสอง

N จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

Sd ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของผลการวิเคราะห์โดยวิธีทั้งสอง

หมายเหตุ ค่า t ที่คำนวณได้ไม่ต้องคิดเครื่องหมายบวกลบ

ค่า t จากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ degree of freedom *N-1*

ถ้าค่า t จากตารางมากกว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณ แสดงว่าวิธีทั้งสองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

2.6.2 การหาค่า repeatability

2.6.2.1 การหาค่า repeatability ได้เลือกอาหาร 3 ชนิดคือนมผง ไอศกรีม และนมพาสเจอร์ไรส์ เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่มีลูกค้าส่งมาให้วิเคราะห์เป็นประจำและเป็นตัวอย่างที่มีปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในช่วงต่าง ๆ กัน โดยทำการทดสอบตัวอย่างอาหารทั้ง 3 โดยวิธีดัดแปลง โดยวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างแบบซ้ำ 5 ครั้ง วิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดปฏิบัติตามวิธีดัดแปลง ข้อ 2.6.1.2

2.6.2.2 คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ของการทำซ้ำ 5 ครั้ง

คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

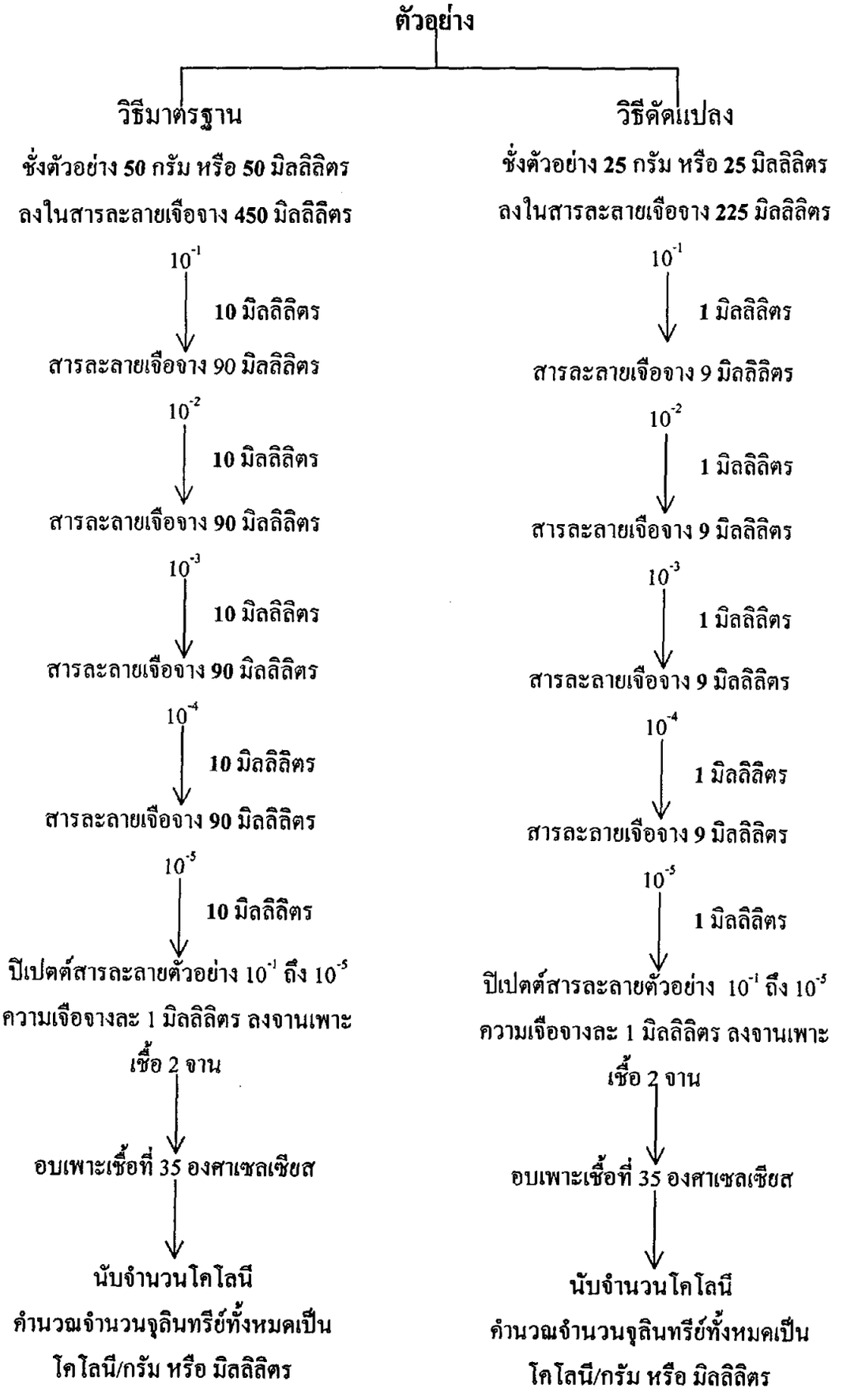
และหาค่า%RSD จากสูตร

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{mean} \times 100$$

2.6.3 การเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ

กลุ่มงานจุลชีววิทยาได้เข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญกับ PHLS และ FEPAS

แผนภูมิที่ 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด



3. ผลการทดลอง

3.1 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธีที่ดัดแปลงของตัวอย่างทั้งหมด 25 ตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 2 และ 3 ส่วนค่าความแตกต่างของผลการวิเคราะห์โดยวิธีทั้งสองของแต่ละตัวอย่างและค่ายกกำลังสองของผลความแตกต่างดังกล่าวแสดงในตารางที่ 4

เมื่อนำค่า $\sum di$ และ $\sum di^2$ ไปแทนค่าในสมการที่ 1 ดังนี้

$$Sd^2 = \frac{\sum di^2 - \left[\left(\sum di\right)^2 / N\right]}{N-1} \quad \text{.....สมการที่ 1}$$

$$= \frac{1.0629 - [0.3642/25]}{25-1}$$

$$Sd^2 = 0.0437$$

$$Sd = 0.2090$$

$$t = \frac{\sum di/N}{Sd/\sqrt{N}} \quad \text{.....สมการที่ 2}$$

$$= \frac{-0.6035/25}{0.2090/\sqrt{25}}$$

$$t = 0.5775$$

เมื่อแทนค่าในสมการที่ 2 ได้ค่า t เท่ากับ 0.58

ส่วนค่า t ที่ได้จากการเปิดตารางในภาคผนวก 2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ degree of freedom 24 (N-1 = 25-1) = 24 ได้ค่า t = 2.06 ซึ่งมากกว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณ ดังนั้นจึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธี แสดงถึงความถูกต้องของวิธีที่ดัดแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

3.2 การทดสอบความแม่นยำ ได้ทำการหาค่า repeatability ของตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 5, 6 และ 7 ได้ค่า % RSD ในตัวอย่างนมผง ไอศกรีม และนมพาสเจอร์ไรส์ เท่ากับ 1.2837, 1.7800 และ 0.4716 ตามลำดับ

3.3 ผลการเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญรายการ aerobic count กับ PHLS 4 ครั้ง FEPAS 1 ครั้ง

- ตัวอย่างของ PHLS จะเป็นตัวอย่าง freeze dried mixed cultures ส่วนการให้คะแนนของ PHLS จะให้ 2 คะแนนเต็ม ถ้าผลของห้องปฏิบัติการอยู่ในช่วง ± 0.5 log ของค่า participant median ผลการเข้าร่วมโปรแกรมกับ PHLS แสดงในตารางที่ 9 ซึ่งทุกครั้งได้คะแนนเต็ม 2

- ส่วนการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญกับ FEPAS มี 1 ครั้ง Series M09 round 24 เมื่อเดือนมิถุนายน 2544 เป็นตัวอย่าง milk powder ได้ z-score เท่ากับ 0

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธีมาตรฐานและวิธีดัดแปลง

ตัวอย่างที่	วิธีมาตรฐาน โคโลนี/กรัม หรือ มิลลิลิตร	วิธีดัดแปลง โคโลนี/กรัม หรือ มิลลิลิตร
1	2.0×10^1	3.0×10^1
2	2.0×10^1	2.0×10^1
3	3.0×10^1	3.0×10^1
4	1.0×10^1	6.0×10^1
5	1.4×10^2	1.2×10^2
6	1.3×10^2	5.0×10^1
7	1.4×10^2	1.6×10^2
8	1.0×10^2	1.0×10^2
9	3.2×10^4	4.8×10^4
10	4.0×10^3	3.0×10^3
11	9.0×10^4	8.8×10^4
12	2.4×10^4	2.4×10^4
13	1.0×10^5	9.0×10^4
14	2.1×10^4	2.0×10^4
15	6.3×10^4	5.6×10^4
16	1.0×10^5	6.4×10^4
17	6.4×10^4	1.3×10^5
18	1.7×10^4	1.9×10^4
19	1.6×10^5	1.8×10^5
20	1.7×10^6	1.1×10^6
21	9.2×10^3	9.0×10^3
22	3.2×10^3	2.8×10^3
23	3.0×10^1	4.0×10^1
24	1.5×10^3	1.6×10^3
25	6.2×10^3	6.8×10^3

ตารางที่ 3 ค่า $\log_{10}$ ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธีมาตรฐานและวิธีดัดแปลง

ตัวอย่างที่	วิธีมาตรฐาน $\log_{10}$ ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โคโลนี/กรัม หรือมิลลิลิตร	วิธีดัดแปลง $\log_{10}$ ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โคโลนี/กรัม หรือมิลลิลิตร
1	1.3010	1.4771
2	1.3010	1.3010
3	1.4771	1.4771
4	1.0000	1.7782
5	2.1461	2.0792
6	2.1139	1.6990
7	2.1461	2.2041
8	2.0000	2.0000
9	4.5051	4.6812
10	3.6021	3.4771
11	4.9542	4.9445
12	4.3802	4.3802
13	5.0000	4.9542
14	4.3222	4.3010
15	4.7993	4.7482
16	5.0000	4.8062
17	4.8062	5.1139
18	4.2304	4.2788
19	5.2041	5.2553
20	6.2304	6.0414
21	3.9638	3.9542
22	3.5051	3.4472
23	1.4771	1.6021
24	3.1761	3.2041
25	3.7924	3.8325

ตารางที่ 4 ค่า *di* และ di^2 ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธีมาตรฐานและวิธีดัดแปลงของแต่ละตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	วิธีมาตรฐาน $\log_{10}$ ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โคโลนี/กรัม หรือมิลลิลิตร	วิธีดัดแปลง $\log_{10}$ ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โคโลนี/กรัม หรือมิลลิลิตร	*di*	di^2
1	1.3010	1.4771	-0.1761	0.0310
2	1.3010	1.3010	0.0000	0.0000
3	1.4771	1.4771	0.0000	0.0000
4	1.0000	1.7782	-0.7782	0.6055
5	2.1461	2.0792	0.0669	0.0045
6	2.1139	1.6990	0.4150	0.1722
7	2.1461	2.2041	-0.0580	0.0034
8	2.0000	2.0000	0.0000	0.0000
9	4.5051	4.6812	-0.1761	0.0310
10	3.6021	3.4771	0.1249	0.0156
11	4.9542	4.9445	0.0098	0.0001
12	4.3802	4.3802	0.0000	0.0000
13	5.0000	4.9542	0.0458	0.0021
14	4.3222	4.3010	0.0212	0.0004
15	4.7993	4.7482	0.0512	0.0026
16	5.0000	4.8062	0.1938	0.0376
17	4.8062	5.1139	-0.3078	0.0947
18	4.2304	4.2788	-0.0483	0.0023
19	5.2041	5.2553	-0.0512	0.0026
20	6.2304	6.0414	0.1891	0.0357
21	3.9638	3.9542	0.0095	0.0001
22	3.5051	3.4472	0.0580	0.0034
23	1.4771	1.6021	-0.1249	0.0156
24	3.1761	3.2041	-0.0280	0.0008
25	3.7924	3.8325	-0.0401	0.0016
		ผลรวม (Σ)	**-0.6035**	**1.0629**

di = ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์โดยวิธีทั้งสองของแต่ละตัวอย่าง

ตารางที่ 5 ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่างนมผงโดยวิธีดัดแปลง

Replicate No.	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โคโลนี/กรัม	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด $\log_{10}$ โคโลนี/กรัม
1	4.2×10^2	2.6232
2	5.0×10^2	2.6990
3	4.2×10^2	2.6232
4	4.6×10^2	2.6628
5	4.8×10^2	2.6812
ค่าเฉลี่ย		**2.6579**
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)		**0.0341**
% RSD		**1.2837**

ตารางที่ 6 ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่างไอศกรีมโดยวิธีดัดแปลง

Replicate No.	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โคโลนี/กรัม	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด $\log_{10}$ โคโลนี/กรัม
1	1.4×10^4	4.1461
2	1.0×10^4	4.0000
3	1.0×10^4	4.0000
4	1.3×10^4	4.1139
5	1.0×10^4	4.0000
ค่าเฉลี่ย		**4.0520**
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)		**0.0721**
% RSD		**1.7800**

ตารางที่ 7 ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์โดยวิธีดัดแปลง

Replicate No.	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โคโลนี/มิลลิลิตร	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด $\log_{10}$ โคโลนี/มิลลิลิตร
1	1.5×10^5	5.1761
2	1.4×10^5	5.1461
3	1.6×10^5	5.2041
4	1.4×10^5	5.1461
5	1.5×10^5	5.1761
ค่าเฉลี่ย		**5.1697**
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)		**0.0244**
% RSD		**0.4716**

ตารางที่ 8 ผลการหาค่า % RSD

ตัวอย่าง	mean	SD	%RSD
นมผง	2.6579	0.0341	1.2837
ไอศกรีม	4.0520	0.0721	1.7800
นมพาสเจอร์ไรส์	5.1697	0.0244	0.4716

ตารางที่ 9 ผลการเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญกับ PHLS รายการ aerobic count

Distribution number	Distribution Date	คะแนนที่ได้
084	24 มกราคม 2543	2
086	13 มีนาคม 2543	2
088	15 พฤษภาคม 2543	2
090	4 สิงหาคม 2543	2

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของ FDA BAM กำหนดให้ใช้ตัวอย่าง 50 กรัม ในสารละลายตัวอย่าง 450 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 1:10 และทำการเจือจางขั้นต่อไปใช้สารละลายตัวอย่างจาก 1:10 มา 10 มิลลิลิตร ในสารละลายเจือจาง 90 มิลลิลิตร แต่เนื่องจากน้ำหนักของตัวอย่างและสารละลายเจือจางปริมาณดังกล่าว ไม่เหมาะสมกับการใช้งานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เนื่องจากต้องใช้ตัวอย่างมาก ตัวอย่างบางชนิดที่ลูกค้าส่งมาวิเคราะห์มีปริมาณไม่มากพอ เนื่องจากต้องวิเคราะห์หลายรายการ นอกจากนี้การใช้ตัวอย่างมากถึง 50 กรัม ทำให้ต้องใช้สารละลายเจือจางมาก บางตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนมากต้องทำการเจือจางตัวอย่างมากถึง 10 เท่าหรือมากกว่า ทำให้ต้องใช้อุปกรณ์ในการทำการเจือจางมากขึ้น เป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และทำให้พื้นที่ในการทำงานน้อยลงเพราะต้องวางอุปกรณ์ในการทำการเจือจางมากขึ้น ประกอบกับทำให้เกิดความล่าช้าในการปฏิบัติงาน ดังนั้นจึงได้ดัดแปลงลดปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการทำสารละลายตัวอย่าง 1 : 10 ลง คือใช้ตัวอย่าง 25 กรัม ในสารละลายเจือจาง 225 มิลลิลิตร ซึ่งใน Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods[8] ได้กล่าวถึงการใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อสารละลายเจือจางอาจใช้ตัวอย่าง 10 กรัม ในสารละลายเจือจาง 90 มิลลิลิตร หรือใช้ตัวอย่าง 11 กรัม ในตัวอย่าง 99 มิลลิลิตร ซึ่งก็เป็นอัตราส่วน 1:10 แต่ในกรณีที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาใช้ 25 กรัม ก็นับว่าเป็นปริมาณที่ไม่น้อยเกินกว่าวิธีมาตรฐานอื่นๆ ระบุไว้ นอกจากนี้ยังลดปริมาณสารละลายเจือจางขั้นต่อๆ ไป จาก 90 มิลลิลิตร เป็น 9 มิลลิลิตร โดยให้ใช้สารละลายตัวอย่าง จาก 1:10 มา 1 มิลลิลิตร

การดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน FDA BAM ดังกล่าว ต้องมีการพิสูจน์ความถูกต้อง ของวิธีโดยใช้หลักทางสถิติที่เรียกว่า paired t test[2] โดยวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร 25 ตัวอย่าง โดยพยายามเลือกอาหารประเภทต่าง ๆ โดยคำนึงถึงประเภทของตัวอย่างที่ลูกค้าส่งมาวิเคราะห์อยู่เป็นประจำ วิเคราะห์แต่ละตัวอย่างโดยวิธีสองวิธีเปรียบเทียบกันทำไปพร้อมกัน ได้ผลการวิเคราะห์ออกมาเป็นค่า t เรียกว่า t ที่ได้จากการคำนวณซึ่งน้อยกว่าค่า t จากตาราง ทำให้สรุปได้ว่าวิธีทั้งสองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์โดยวิธีดัดแปลง หาค่า %RSD แต่ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีมาตรฐานหรือเอกสารจากหน่วยงานใดกำหนดค่า %RSD สำหรับค่าความ

แม่นยำของการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาอาหาร จึงไม่สามารถอ้างอิงตัวเลขที่ยอมรับได้ อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาได้กำหนดเกณฑ์การยอมรับความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณไว้ที่ %RSD ต้องน้อยกว่า 10 และจากการวิเคราะห์ตัวอย่างแบบซ้ำ 5 ครั้ง 3 ตัวอย่าง ได้ค่า %RSD น้อยมากคือได้ตั้งแต่ 0.47 ถึง 1.76 % ซึ่งทำให้ยืนยันได้ว่าวิธีนี้มีความแม่นยำสูง

ผลของการเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญก็เป็นสิ่งหนึ่งที่จะช่วยยืนยันในวิธีที่ดัดแปลงว่าเป็นวิธีที่ถูกต้อง เนื่องจากผลที่ได้จากการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ 5 ครั้ง ได้ผลเป็นที่น่าพอใจอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

5. สรุปผลการทดลอง

การนำวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานมาใช้ในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องได้รับการพิสูจน์ยืนยันความถูกต้อง ผลจากการใช้เทคนิคทางสถิติคือ paired t test มาทดสอบพบว่าวิธีที่ดัดแปลงมาซึ่งใช้ตัวอย่าง 25 กรัมเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานของ FDA BAM ซึ่งใช้ตัวอย่าง 50 กรัมแล้ว ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบความแม่นยำของวิธีดัดแปลงโดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง แบบซ้ำ 5 ครั้ง ได้ค่า % RSD 0.47 ถึง 1.76 % ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ชนิด ทำให้ได้วิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่เหมาะสม ให้ค่าที่ถูกต้องและแม่นยำ ทำให้ลูกค้าและห้องปฏิบัติการเกิดความมั่นใจในผลวิเคราะห์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสุจินต์ ศรีคงศรี ผู้อำนวยการกอง กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คุณปรีชา ธรรมนิยม คุณสุนทรี เปรื่องการ คุณอารี ชูวิสิฐกุล ที่ช่วยให้คำปรึกษาและแนะนำทำให้ผลงานชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานจุลชีววิทยาทุกท่านในความช่วยเหลือและสนับสนุนจนทำให้ผลงานชิ้นนี้ดำเนินไปอย่างราบรื่น

เอกสารอ้างอิง

1. ศุภชัย ใช้เทียมวงศ์ **ปฏิบัติการเคมีปริมาณวิเคราะห์** พิมพ์ครั้งที่ 6 พศ. 2543 สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 37-42
2. AOAC International Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation, Journal of AOAC International Vol.82, No.2, 1999
3. Dixon, J. W. and Massey, F. J. Introduction to Statistical Analysis. McGRaw-Hill, Inc. 1969, p. 119-122.
4. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 8th ed., AOAC International, 1998 Chapter 3, p 3.01-3.05.
5. Freeman F. Elzey. Introductory Statistics: A microcomputer Approach. Brooks/Cole Publishing Company, A Division of Wadsworth, Inc. 1985. p 264
6. Lenore S. Clesceri., et al. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, 20th de., 1998.
7. ISO/IEC 17025 : 1999, General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratory.
8. Speck, L.M. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Second edition, Compiled by the APHA Technical Committee on Microbiological Methods for Foods, American Public Health Association, 1984.
9. VIM, International vocabulary of basic and general terms in metrology, issued by BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP and OIML

สารบัญภาคผนวก

หน้า

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 29

ภาคผนวก ข

Critical values of t 30

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

เพลตเคานต์อะการ์ (plate count agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทน	5	กรัม
ยีสต์เอกซแทรกต์	2.5	กรัม
เดกซโทรส	1	กรัม
วุ้น	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เติมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายก่อนบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก เตรียมอีกส่วนแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางหลอดให้เอียงเป็นสแลนท์

ความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายกับ 7.0 ± 0.2 องศาเซลเซียส

สารเคมี

สารละลายเจือจาง

เตรียมดังนี้

1 สารละลายโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate) 34 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2 แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2 สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เตรียมโดยใช้สารละลายที่ได้จากข้อ 1 ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

บรรจุสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในหลอดทดลองฝาเกลียวปริมาตร 18 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ภาคผนวก ข

Critical values of t [5]

	α Levels for Two-Tailed Test					
df	.2	.1	.05	.02	.01	.001
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	636.619
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.924
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.869
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.408
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.551
60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.460
120	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.373
∞	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.291
	.10	.05	.025	.01	.005	.0005
	α Levels for a One-Tailed Test					