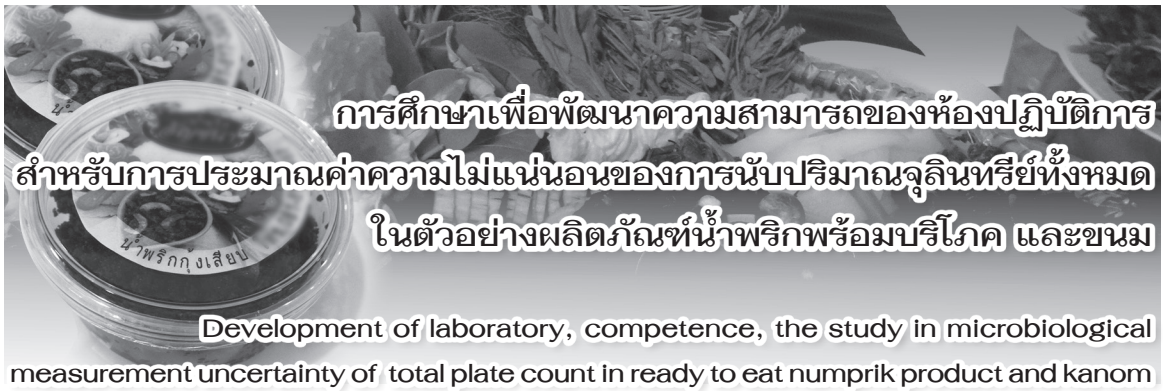

การศึกษาเพื่อพัฒนาความสามารถของห้องปฏิบัติการ สำหรับการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำพริกพร้อมบริโภค และขนม

Development of laboratory, competence, the study in microbiological measurement uncertainty of total plate count in ready to eat numprik product and kanom

พรทิพย์ ศรีศร[1] **มุทิตา คณฑา**[1] **จำรัส พูลเกื้อ**[2]
[1] *ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์*
[2] *ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต*

บทคัดย่อ

ในการพัฒนาความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025: 2005 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด เป็นข้อกำหนดหนึ่งในข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ ที่กำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการจัดทำข้อมูล ขั้นตอนหรือวิธีปฏิบัติในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด วิธีการแจงนับจุลินทรีย์เป็น empirical method ไม่สามารถ หาค่าจริง รวมถึงความเบี่ยงเบนได้ จึงต้องใช้การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในแนวคิดแบบ “top–down” หรือ “global” approach ที่ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดจากผลลัพธ์ของความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความทำซ้ำได้ (Standard deviation of reproducibility, S_R) ซึ่งภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน ส่วนใหญ่จะใช้ Intralaboratory standard deviation of reproducibility เนื่องจากสามารถรายงานร่วมกับรายงานผลตรวจวิเคราะห์ได้ ในปีงบประมาณ 2554 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ จึงได้จัดทำข้อมูลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยดำเนินการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์น้ำพริกพร้อมบริโภค และขนม จำนวน 33 และ 50 ตัวอย่างตามลำดับ เพื่อนำข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ของแต่ละผลิตภัณฑ์ ไปคำนวณค่า S_R และเมื่อได้ค่า S_R ของผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ซึ่งเท่ากับ ± 0.1462 และ ± 0.1970 ตามลำดับ จึงนำค่า S_R ที่ได้ไปคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty, *U*) ที่จะสามารถนำไปรายงานผลปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดพร้อมค่าความไม่แน่นอนของการวัดได้ในรูปแบบต่างๆ ต่อไป

คำสำคัญ: การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

FDA 1-2557 - by fon.indd 49 23/5/2557 16:10:14

Abstract

The development of laboratory, competence accordding to ISO/IEC 17025: 2005, measurement uncertainty is one of the general requirement that testing and calibration laboratories should have procedures for estimate uncertainty of measurement. Microorganism, count is the empirical method that can not show true and bias value, microbiological measurement uncertainty by "top–down" or "global" approach concept can be used for calculate from standard deviation of reproducibility (S_R). All most in the same laboratory always used Intralaboratory standard deviation of reproducibility that further used to report with the analytical report. In 2011, the Regeional Medical Science Center 3 Nakhon Sawan laboratory had analysed total plate count in food product ready to eat numprik and kanom 33 and 50 samples respectively, and calculated SR of each product , the results show that S_R is ± 0.1462 and± 0.1970 respectively and calculated expanded uncertainty (*U*) further, that can be used to report in many patterns of total plate count with the uncertainty of measurement.

Keywords: Measurement uncertainty, Total plate count

บทนำ

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดเป็นข้อกำหนดหนึ่งในข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ ISO/IEC 17025 : 2005 ที่กำหนดให้ห้องปฏิบัติการทดสอบต้องดำเนินการจัดทำข้อมูลขั้นตอนหรือวิธีปฏิบัติในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ในการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา วิธีการแจงนับปริมาณจุลินทรีย์เป็น empirical method จึงไม่สามารถหาค่าจริง รวมถึงความเบี่ยงเบน (bias) ได้ ผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ อาจมีความคลาดเคลื่อนของการวัดที่ควบคุมได้หรือไม่ได้เกิดขึ้นเสมอ จึงไม่มีการวัดครั้งใดที่ให้ผลถูกต้องที่สุดจำเป็นต้องดำเนินประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ซึ่งมี 2 แนวทางดังนี้

1. แนวคิดแบบ "bottom–up" approach เป็นการประมาณค่าจากทุกๆ ขั้นตอนของกระบวนการตรวจวิเคราะห์ (step–by–step) โดยนำค่าความไม่แน่นอนจากทุกแหล่งที่มีผลกระทบต่อการทดสอบมาพิจารณาตามขั้นตอนของการทดสอบ ซึ่งห้องปฏิบัติการทางเคมีส่วนใหญ่จะใช้แนวทางนี้

2. แนวคิดแบบ "top–down" approach เป็นการประมาณค่าจากผลลัพธ์ของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความทำซ้ำได้ (standard deviation of reproducibility, S_R) ซึ่งห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาส่วนใหญ่จะใช้แนวทางนี้

ดังนั้น ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางจุลชีววิทยา จึงใช้แนวคิดแบบ "top–down" หรือ "global" approach ที่ประมาณค่าความไม่แน่นอน

FDA 1-2557 - by fon.indd 50 23/5/2557 16:10:14

ของการวัดจากผลลัพธ์ของความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความทำซ้ำได้ (S_R) ซึ่งขึ้นอยู่กับความหลากหลายทั้งหมด (overall variability) ของกระบวนการตรวจวิเคราะห์ที่ทำให้ได้ผลลัพธ์ ความหลากหลายนี้รวมถึงความเที่ยงของการทดสอบ (observable precision) ซึ่งเป็นองค์ประกอบแบบสุ่มและความเบี่ยงเบน ซึ่งเป็นองค์ประกอบจากระบบ ที่เกิดจากความแตกต่างระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิงที่ยอมรับ ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดจากผลลัพธ์ของความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความทำซ้ำได้ มี 3 ทางเลือก ได้แก่

ทางเลือกที่ 1: Intralaboratory standard deviation of reproducibility

เป็นการประมาณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากผลของความทำซ้ำได้ ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน ซึ่งเป็นทางเลือกที่ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้ดำเนินการ เนื่องจากสามารถรายงานร่วมกับรายงานผลได้

ทางเลือกที่ 2: Standard deviation of reproducibility of the method derived from an interlaboratory study

เป็นการประมาณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากผลของความทำซ้ำได้ในการศึกษาความถูกต้องของวิธีทดสอบโดยห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่เข้าร่วมการทดสอบ

ทางเลือกที่ 3: Standard deviation of reproducibility of the method derived from an interlaboratory proficiency trial

เป็นการประมาณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากผลของความทำซ้ำได้ของห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่ เข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ[1]

เนื่องจากเป็นห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาด้านอาหาร แต่ละปีจำนวนตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ชุมชน ประเภทน้ำพริกพร้อมบริโภค และขนม ซึ่งนำส่งตรวจในรายการปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด จากสำนักงานสาธารณสุขในบริษัทรับผิดชอบมีปริมาณมาก ดังนั้น เพื่อเป็นการพัฒนาความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025: 2005 ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องดำเนินการจัดทำการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในรายการปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ดังกล่าว ซึ่งจะสามารถบ่งชี้คุณภาพของผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำและน่าเชื่อถือได้

วัตถุประสงค์

พัฒนาความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025: 2005 ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในรายการปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชุมชน ประเภทน้ำพริก พร้อมบริโภค และขนม

วิธีศึกษา

1. ตัวอย่าง : สุ่มเก็บจากร้านจำหน่ายของฝากและการนำส่งตรวจจากสำนักงานสาธารณสุขในพื้นที่รับผิดชอบ ดังรายละเอียด

1.1 ผลิตภัณฑ์น้ำพริกพร้อมบริโภค ได้แก่ น้ำพริกตาแดง น้ำพริกแมงดา เป็นต้น จำนวน 33 ตัวอย่าง

1.2 ผลิตภัณฑ์ขนม ได้แก่ ข้าวแต๋น ขนมกงกล้วยฉาบ เป็นต้น จำนวน 50 ตัวอย่าง

2. การตรวจวิเคราะห์[2, 3, 4, 6, 7] :

2.1 ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในแต่ละตัวอย่าง โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และใช้อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง เช่น ปิเปต เครื่องมือ อุปกรณ์จับเวลา อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ให้มีความแตกต่างกันมากที่สุด ตามวิธีมาตรฐาน BAM (Online) 2001 โดยใช้วิธี pour plate ดังนี้ สุ่มตัวอย่างแต่ละตัวอย่างจากหลายๆ ตำแหน่งของภาชนะบรรจุตัวอย่าง ใส่ภาชนะปราศจากเชื้อปริมาณ 50 ± 0.1 กรัม ทำให้เจือจาง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ โดยแต่ละระดับความเจือจางให้ทำอย่างน้อย 2 จาน เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 ± 1°C ลงในจานเพาะเชื้อ จานละประมาณ 12–15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ

FDA 1-2557 - by fon.indd 51 23/5/2557 16:10:14

35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยวางในลักษณะกลับจานเพาะเชื้อด้านล่างขึ้น นับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยเลือกจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 25–250 โคโลนี

2.2 บันทึกข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์

3. การคำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความทำซ้ำได้ (standard deviation of reproducibility, S_R)

คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความทำซ้ำได้ (S_R) โดยรวบรวมข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ของแต่ละผลิตภัณฑ์ มาคำนวณค่า S_R ดังสมการ (หากจำนวนโคโลนีที่แจงนับได้น้อยกว่า 10 โคโลนี จะไม่นำผลดังกล่าวมาใช้ในการคำนวณ) และหากกรณีตัวอย่างมีความหลากหลายไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ n = n–1

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\frac{(y_1 - y_2)^2}{2}} \longrightarrow (1)$$

4. การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยนำค่า S_R ที่คำนวณได้ของแต่ละผลิตภัณฑ์ (จากข้อ 3) มาเข้าสมการเพื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty, *U*) โดยที่ ค่าความไม่แน่นอนขยาย เป็นปริมาณที่กำหนดช่วงที่ผลของการวัดกระจายอยู่ภายใน ซึ่งค่าเหล่านี้สามารถแสดงลักษณะของสิ่งที่ถูกวัดที่คาดว่าจะเป็นอย่างสมเหตุสมผล ซึ่งมี 2 กรณี

4.1 กรณีทั่วไป

เมื่อผลการแจงนับจำนวน Y = log 10 X และมีค่า coverage factor เป็น 2 (95% confidence limit) สามารถคำนวณค่า *U* ได้จากสมการ 2 ในทุกกรณี โดยไม่ต้องพิจารณาว่าผลการแจงนับจำนวนมีปริมาณการปนเปื้อนมาก (high counts) หรือปริมาณการปนเปื้อนน้อย (low counts)

$$U = 2\sqrt{S_R^3 + \frac{0.18861}{\sum C}} \longrightarrow (2)$$

เมื่อ *U* = ความไม่แน่นอนขยาย

2 = ตัวประกอบครอบคลุม (k)

S_R = ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความทำซ้ำได้

$\sum C$ = ผลรวมของจำนวนโคโลนีจากทุกจานเลี้ยงเชื้อ

$\frac{0.18861}{\sum C}$ = variance component ซึ่งมาจาก Poisson distribution

4.2 กรณีทางเลือก

เมื่อมีการพิจารณาผลการแจงนับจำนวนมีปริมาณการปนเปื้อนมาก (high counts) หรือปริมาณการปนเปื้อนน้อย (low counts)

ผลการแจงนับจำนวนมีปริมาณการปนเปื้อน ($\sum C$) มาก จะไม่นำเทอม 0.18861/ $\sum C$ ของสมการ 2 มาใช้ในการคำนวณ ให้ใช้สมการ 3

$$U = 2\,S_R \longrightarrow (3)$$

ทั้งนี้ การจะใช้สมการ 2 หรือ 3 ในการคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย ให้พิจารณาจากค่า C_{lim} ดังสมการ

$$C_{lim} = \frac{(\log_{10} e)^2}{S_R^2 \times ((1-0.05)^2 - 1)} \sim \frac{1.75}{S_R^2} \longrightarrow (4)$$

โดยแบ่งการพิจารณาได้เป็น 2 กรณี คือ

4.2.1 $\sum C > C_{lim}$ เป็นกรณี high counts ให้ใช้สมการ 3 ในการประมาณค่า *U*

4.2.2 $\sum C \leq C_{lim}$ เป็นกรณี low counts ให้ใช้สมการ 2 ในการประมาณค่า *U*

FDA 1-2557 - by fon.indd 52 23/5/2557 16:10:14

5. การรายงานผล

สามารถรายงานผลการตรวจวิเคราะห์พร้อมค่าความไม่แน่นอนของการวัด ได้ 4 รูปแบบ ดังนี้

5.1 รายงานผลเป็นช่วงในรูปของ log (interval for log result)

$y \pm U$ [$\log_{10}$ (cfu/g)] หรือ

$y \pm U$ [$\log_{10}$ (cfu/ml)]

5.2 รายงานผลเป็นค่าสูงสุดและต่ำสุดในรูปของ log (decimal logarithmic result estimate with limits)

y [$\log_{10}$ (cfu/g)] [$y-U$, $y+U$] หรือ

y [$\log_{10}$ (cfu/ml)] [$y-U$, $y+U$]

5.3 รายงานผลเป็นค่าสูงสุดและต่ำสุดในรูปของ cfu (result estimate with absolute limits)

x cfu/g [10^{y-U}, 10^{y+U}] หรือ

x cfu/ml [10^{y-U}, 10^{y+U}]

5.4 รายงานผลเป็นค่าสูงสุดและต่ำสุดสัมพัทธ์ในรูปของ cfu (result estimate with relative limits)

x cfu/g [$-(1-10^{-U}) \times 100\%$, $+(1-10^{U}) \times 100\%$] หรือ

x cfu/ml [$-(1-10^{-U}) \times 100\%$, $+(1-10^{U}) \times 100\%$]

หมายเหตุ ค่าสูงสุดและต่ำสุดสัมพัทธ์นี้จะแปรตามค่า U เท่านั้น

ผลการศึกษา

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์น้ำพริกพร้อมบริโภค 33 ตัวอย่าง และขนม 50 ตัวอย่าง โดยไม่นำผลจำนวนโคโลนีที่แจงนับได้น้อยกว่า 10 โคโลนี มาใช้ในการคำนวณ สามารถนำไปดำเนินการ คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความทำซ้ำได้ (S_R) และประมาณค่าความไม่แน่นอนของการนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ดังนี้

1. การคำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความทำซ้ำได้ (S_R) ของผลิตภัณฑ์น้ำพริกพร้อมบริโภค 33 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) และขนม 50 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์น้ำพริกพร้อมบริโภค จำนวน 32 ข้อมูล (โดยไม่นำผลจำนวนโคโลนีที่แจงนับได้น้อยกว่า 10 โคโลนี มาใช้ในการคำนวณ)

Sample	Analyst 1 (y_1)	Analyst 2 (y_2)	Log (y_1)	Log (y_2)	Log (y_1-y_2)	Log $(y_1-y_2)^2$	Log $(y_1-y_2)^2/2$
1	52,000	48,000	4.7160	4.6812	0.0348	0.0012	0.0006
2	5,300	5,200	3.7243	3.7160	0.0083	0.0001	0.0000
3	140,000	92,000	5.1461	4.9638	0.1823	0.0332	0.0166
4	4,800	7,100	3.6812	3.8513	–0.1700	0.0289	0.0145
5	890	820	2.9494	2.9138	0.0356	0.0013	0.0006
6	140,000	130,000	5.1461	5.1139	0.0322	0.0010	0.0005
7	960,000	920,000	5.9823	5.9638	0.0185	0.0003	0.0002
8	110,000	96,000	5.0414	4.9823	0.0591	0.0035	0.0017
9	2,600	2,200	3.4150	3.3424	0.0726	0.0053	0.0026
10	1,500,000	1,100,000	6.1761	6.0414	0.1347	0.0181	0.0091

FDA 1-2557 - by fon.indd 53 23/5/2557 16:10:14

ตารางที่ 1 ต่อ

Sample	Analyst 1 (y_1)	Analyst 2 (y_2)	Log (y_1)	Log (y_2)	Log (y_1–y_2)	Log (y_1–y_2)^2	Log (y_1–y_2)^2/2
11	11,000	7,200	4.0414	3.8573	0.1841	0.0339	0.0169
12	42,000	45,000	4.6232	4.6532	–0.0300	0.0009	0.0004
13	580,000	520,000	5.7634	5.7160	0.0474	0.0022	0.0011
14	4,400	4,200	3.6435	3.6232	0.0202	0.0004	0.0002
15	260,000	120,000	5.4150	5.0792	0.3358	0.1128	0.0564
16	2,200,000	1,300,000	6.3424	6.1139	0.2285	0.0522	0.0261
17	20	20	1.3010	1.3010	0.0000	0.0000	0.0000
18	26,000	7,000	4.4150	3.8451	0.5699	0.3248	0.1624
19	43,000	38,000	4.6335	4.5798	0.0537	0.0029	0.0014
20	240	350	2.3802	2.5441	–0.1639	0.0268	0.0134
21	34,000	27,000	4.5315	4.4314	0.1001	0.0100	0.0050
22	120,000	680,000	5.0792	5.8325	–0.7533	0.5675	0.2838
23	64,000	50,000	4.8062	4.6990	0.1072	0.0115	0.0057
24	38,000	28,000	4.5798	4.4472	0.1326	0.0176	0.0088
25	400,000	400,000	5.6021	5.6021	0.0000	0.0000	0.0000
26	120,000	110,000	5.0792	5.0414	0.0378	0.0014	0.0007
27	26,000	32,000	4.4150	4.5051	–0.0902	0.0081	0.0041
28	94,000	74,000	4.9731	4.8692	0.1039	0.0108	0.0054
29	6,000	6,400	3.7782	3.8062	–0.0280	0.0008	0.0004
30	78,000	54,000	4.8921	4.7324	0.1597	0.0255	0.0128
31	12,000,000	11,000,000	7.0792	7.0414	0.0378	0.0014	0.0007
32	11,000,000	7,900,000	7.0414	6.8976	0.1438	0.0207	0.0103
					Sum Log (y_1–y_2)^2/2		**0.6626**

จากสมการ $S_R = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\frac{(y_1 - y_2)^2}{2}}$

กรณีนี้ตัวอย่างมีความหลากหลายไม่เป็นเนื้อเดียวกันใช้ n = n–1 = 31

ดังนั้น ค่า S_R ผลิตภัณฑ์น้ำพริกพร้อมบริโภค = $\sqrt{1\,\frac{(0.6626)}{31}}$ = ± 0.1462

FDA 1-2557 - by fon.indd 54 23/5/2557 16:10:14

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ขนม จำนวน 37 ข้อมูล (โดยไม่นำผลจำนวนโคโลนีที่แจงนับได้น้อยกว่า 10 โคโลนี มาใช้ในการคำนวณ)

Sample	Analyst 1 (y_1)	Analyst 2 (y_2)	Log (y_1)	Log (y_2)	Log (y_1–y_2)	Log (y_1–y_2)^2	Log (y_1–y_2)^2/2
1	160	160	2.2041	2.2041	0.0000	0.0000	0.0000
2	420	520	2.6232	2.7160	–0.0928	0.0086	0.0043
3	60	20	1.7782	1.3010	0.4771	0.2276	0.1138
4	100	140	2.0000	2.1461	–0.1461	0.0214	0.0107
5	60	80	1.7782	1.9031	–0.1249	0.0156	0.0078
6	290	240	2.4624	2.3802	0.0822	0.0068	0.0034
7	2,000	1,600	3.3010	3.2041	0.0969	0.0094	0.0047
8	320	300	2.5051	2.4771	0.0280	0.0008	0.0004
9	100	220	2.0000	2.3424	–0.3424	0.1173	0.0586
10	30	40	1.4771	1.6021	–0.1249	0.0156	0.0078
11	120	60	2.0792	1.7782	0.3010	0.0906	0.0453
12	120	140	2.0792	2.1461	–0.0669	0.0045	0.0022
13	8,600	1,200	3.9345	3.0792	0.8553	0.7316	0.3658
14	60	120	1.7782	2.0792	–0.3010	0.0906	0.0453
15	40	100	1.6021	2.0000	–0.3979	0.1584	0.0792
16	80	20	1.9031	1.3010	0.6021	0.3625	0.1812
17	20	20	1.3010	1.3010	0.0000	0.0000	0.0000
18	60	60	1.7782	1.7782	0.0000	0.0000	0.0000
19	60	60	1.7782	1.7782	0.0000	0.0000	0.0000
20	20	30	1.3010	1.4771	–0.1761	0.0310	0.0155
21	400	690	2.6021	2.8388	–0.2368	0.0561	0.0280
22	10	20	1.0000	1.3010	–0.3010	0.0906	0.0453

FDA 1-2557 - by fon.indd 55 23/5/2557 16:10:15

ตารางที่ 2 ต่อ

Sample	Analyst 1 (y_1)	Analyst 2 (y_2)	Log (y_1)	Log (y_2)	Log (y_1–y_2)	Log (y_1–y_2)^2	Log (y_1–y_2)^2/2
23	880	770	2.9445	2.8865	0.0580	0.0034	0.0017
24	10	30	1.0000	1.4771	–0.4771	0.2276	0.1138
25	1,800	1,400	3.2553	3.1461	0.1091	0.0119	0.0060
26	40	40	1.6021	1.6021	0.0000	0.0000	0.0000
27	6,700	11,000	3.8261	4.0414	–0.2153	0.0464	0.0232
28	590	660	2.7709	2.8195	–0.0487	0.0024	0.0012
29	60	200	1.7782	2.3010	–0.5229	0.2734	0.1367
30	15	30	1.1761	1.4771	–0.3010	0.0906	0.0453
31	40	40	1.6021	1.6021	0.0000	0.0000	0.0000
32	10	10	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
33	110	100	2.0414	2.0000	0.0414	0.0017	0.0009
34	40	20	1.6021	1.3010	0.3010	0.0906	0.0453
35	80	70	1.9031	1.8451	0.0580	0.0034	0.0017
36	60	70	1.7782	1.8451	–0.0669	0.0045	0.0022
37	260	250	2.4150	2.3979	0.0170	0.0003	0.0001
					Sum Log (y_1–y_2)^2/2		1.3975

จากสมการ $S_R = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\frac{(y_1 - y_2)^2}{2}}$

กรณีนี้ตัวอย่างมีความหลากหลายไม่เป็นเนื้อเดียวกันใช้ n = n–1 = 36

ดังนั้น ค่า S_R ผลิตภัณฑ์ขนม = $\sqrt{\frac{1\ (1.3975)}{36}}$ = ± 0.1970

2. การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

นำค่า S_R ที่ได้จากข้อ 1 ของแต่ละผลิตภัณฑ์ไปคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย เพื่อใช้ในการรายงานผลการตรวจวิเคราะห์พร้อมค่าความไม่แน่นอนของการวัด ดังตัวอย่าง

2.1 ผลิตภัณฑ์น้ำพริกพร้อมบริโภค

ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์น้ำพริกพร้อมบริโภค ได้ 200,000 cfu/g = 5.3 [log 10(cfu/g)] $\sum C$ = 220 (ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} นับได้ 202 โคโลนี และที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} นับได้ 18 โคโลนี)

FDA 1-2557 - by fon.indd 56 23/5/2557 16:10:15

ค่า S_R ที่ได้จากข้อ 1 ของผลิตภัณฑ์น้ำพริกพร้อมบริโภค
= ± 0.1462

หา C_{lim} จากสมการที่ 4
$C_{lim} \approx 1.75/ SR^2$

$\therefore C_{lim} \approx 1.75/(0.1462)^2 \approx 82$

เมื่อ $\sum C > C_{lim}$ จัดเป็นกรณี high counts

ดังนั้นการหาค่าความไม่แน่นอนขยาย (*U*) ต้องใช้สมการที่ 3

U = 2 S_R
= 2 (0.1462)
= 0.2924 ≈ 0.3
ค่าต่ำสุด = (5.3 – 0.3) log
ใส่ Antilog = 1.0 x 105 cfu/g
ค่าสูงสุด = (5.3 + 0.3) log
ใส่ Antilog = 4.0 x 105 cfu/g

เพราะฉะนั้น รายงานผล

2.0×10^5 cfu/g (1.0×10^5, 4.0×10^5)

2.2 ผลิตภัณฑ์ขนม

ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ นับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ขนม ได้ 100 cfu/g = 2.0 [log 10(cfu/g)] $\sum C$ = 11 (ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} นับได้ 8 โคโลนี และที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} นับได้ 3 โคโลนี)

ค่า S_R ที่ได้จากข้อ 1 ของผลิตภัณฑ์ขนม = ± 0.1970

หา C_{lim} จากสมการที่ 4
$C_{lim} \approx 1.75/ SR^2$

$\therefore C_{lim} \approx 1.75/(0.1970)^2 \approx 45$

เมื่อ $\sum C < C_{lim}$ จัดเป็นกรณี low count

ดังนั้นการหาค่าความไม่แน่นอนขยาย (*U*) ต้องใช้สมการที่ 2 เท่านั้น

$$U = 2\sqrt{S_R^3 + \frac{0.18861}{\sum C}}$$

$$= 2\sqrt{(0.1970)^2 + \frac{0.18861}{\sum C}}$$

= 0.4729 ≈ 0.5
ค่าต่ำสุด = (2.0 – 0.5) log
ใส่ Antilog = 3.2 x 10 cfu/g
ค่าสูงสุด = (2.0 + 0.5) log
ใส่ Antilog = 3.2 x 102 cfu/g

เพราะฉะนั้น รายงานผล

1.0×10^2 cfu/g (3.2×10, 3.2×10^2)

สรุปผล

ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาด้านอาหาร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ สามารถจัดทำข้อมูลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดรายการปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ในผลิตภัณฑ์ชุมชนประเภทน้ำพริกพร้อมบริโภค และขนม โดยได้ค่า SR ของผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 เท่ากับ ± 0.1462 และ ± 0.1970 ตามลำดับ และค่า SR นี้สามารถนำไปคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (*U*) เพื่อนำไปใช้ในการรายงาน พร้อมผลการตรวจวิเคราะห์ ตามเงื่อนไข/ข้อกำหนดของวิธีทดสอบหรือความต้องการของลูกค้า หรือระดับผลการทดสอบที่วิกฤต โดยการพิจารณาผลการทดสอบกับเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดหนึ่งทางด้านวิชาการ ว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005

FDA 1-2557 - by fon.indd 57 23/5/2557 16:10:15

ข้อเสนอแนะ

ในการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา โดยวิธีการแจงนับจุลินทรีย์ ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ไม่สามารถหาค่าจริงได้ จึงไม่มีการวัดครั้งใดที่ให้ผลถูกต้องที่สุด ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องดำเนินการจัดทำการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในรายการนับปริมาณอื่นๆ และครอบคลุมในหลากหลายผลิตภัณฑ์ที่ตรวจวิเคราะห์ เพื่อบ่งชี้คุณภาพของผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางจุลชีววิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2553.
2. Maturin L. and Peeler JT., chapter editors. Chapter 3. Aerobic Plate Count. In: U.S. FDA, Center for Food Safety & Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual.(Online) January 2001. Available from: http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam–3.html.
3. Midura, T.F. and Bryant, R.G. Sampling plans, sample collection, shipment and preparation for analysis. In: Downes, F.P., Ito, K., editors. Compendium of methods for the microbiological exami–nation of foods. 4th ed. Washington DC: American Public Health Association. 2001.
4. International Organization for Standardization. ISO/TS 11133–2. Microbiology of food and animal feeding stuffs–Microbiology of food and animal feeding stuffs–Guidelines on preparation and production of culture media. Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media. Geneva. 2003.
5. International Organization for Standardization. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva. 2005.
6. International Organization for Standardization. ISO 7218. Microbiological of food and animal feeding stuffs –General requirements and guidance for micro–biological examinations. Geneva. 2007.
7. International Organization for Standardization. ISO/TS 11133–1. Microbiology of food and animal feeding stuffs–Guidelines on preparation and production of culture media. Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. Geneva. 2009.

FDA 1-2557 - by fon.indd 58 23/5/2557 16:10:15