

การตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมด้วยเครื่อง Spiral Plate

หทัยชนก สมสุระ เสาวภา ปานศิริ พัทธร์พิมาน จงกลรัตน์ เนาวรัตน์ กำภูศิริ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมด้วยเครื่อง Spiral plate เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการทดสอบที่นำมาใช้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง เหมาะสม มีความน่าเชื่อถือ เทียบเท่ากับวิธีอ้างอิงมาตรฐาน ซึ่งห้องปฏิบัติการได้ทำการดัดแปลงจากวิธี APHA Thermoturic Count ในขั้นตอนการเจือจางและจ่ายตัวอย่างจาก Standard Plate Count Method เป็น Spiral Plate Count Method โดยตัวอย่างที่ใช้มาจากตัวอย่างน้ำนมที่ทดสอบประจำภายในห้องปฏิบัติการ แล้วนำไปผ่านกระบวนการ Pasteurization โดยบ่มตัวอย่างใน Water bath ที่อุณหภูมิ 62.8 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปทดสอบด้วยเทคนิค pour plate แล้วนำไปบ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง สำหรับการทดสอบด้วยเครื่อง Spiral plate เครื่องจะจ่ายตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 150 มิลลิเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกันกับเทคนิค pour plate ทำการประเมินผลเปรียบเทียบระหว่างสองวิธีโดยใช้ Relative trueness study และ Accuracy profile study ตามแนวทางของ ISO 16140-2 : 2016 พบว่าได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9754 มีค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทั้งสองวิธีอยู่ในขอบเขต Upper limit และ Lower limit ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เท่ากับ 0.337 และ -0.285 ตามลำดับ และมีค่า Upper β -ETI สูงสุดเท่ากับ 0.277 และค่า Lower β -ETI ต่ำสุดเท่ากับ -0.117 ซึ่งค่าทั้งหมดอยู่ในช่วง Acceptability limit เท่ากับ $\pm 0.5 \log$ แสดงให้เห็นว่า Spiral Plate Count Method เทียบเท่ากับวิธีอ้างอิงมาตรฐาน สามารถนำมาใช้ทดสอบจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมภายในห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ : จุลินทรีย์ทนร้อน, Standard Plate Count Method, Spiral Plate Count Method, Relative trueness study, Accuracy profile study

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation of thermoduric count in milk using Spiral Plate Method

Hathaichanok Somsura Saowapa Pansiri Phakphiman Chongkonrat Naovarat Kamposiri

Abstract

This study aims to validate thermoduric count in milk using Spiral Plate method and to consider that the alternative method could provide the accurate and reliable results similar to the reference method. In brief, APHA Thermoduric Count was modified by using Spiral Plate Count Method rather than Standard Plate Count Method in the sample dilution step. The routine milk samples were pasteurized at 62.8 ± 0.5 °C in water bath for 30 minutes then immediately cooled to 10 °C. The pasteurized samples were analyzed using pour plate technique and incubated at 32 ± 1 °C for 48 ± 3 hours. For the Spiral Plate method, 100 µL of pasteurized samples were delivered into 150 mm petri dish and incubated at the same conditions. The results were evaluated using Relative trueness study and Accuracy profile study according to ISO 16140-2 : 2016. From linear regression, the R^2 value was 0.9754. The result's average of both methods was between Upper limit (0.337) and Lower limit (-0.285) at 95% confidence level, the highest Upper β -ETI was 0.277 and the lowest Lower β -ETI was -0.117. In addition, these results comply with the Acceptability limit (± 0.5 log). The results indicate that Spiral Plate Count Method was similar to the reference method and could be used in the laboratory for the thermoduric count.

key words : Thermoduric Bacteria, Standard Plate Count Method, Spiral Plate Count Method, Relative trueness study, Accuracy profile study

Milk and Milk Products Quality Control Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

บทนำ

แบคทีเรียทนร้อน (Thermophilic Bacteria) เป็นแบคทีเรียที่ทนต่ออุณหภูมิสูง สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงได้ แบคทีเรียทนความร้อนที่พบปนเปื้อนในน้ำนมดิบ ได้แก่ *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium* และแบคทีเรียกลุ่ม *Coryneform* ปริมาณจุลินทรีย์ทนความร้อนบ่งบอกถึงปฏิบัติการที่ไม่ถูกสุขลักษณะและใช้บ่งชี้ประสิทธิภาพในการทำความสะอาดเครื่องจักรและอุปกรณ์แปรรูปอาหาร แบคทีเรียทนร้อนปนเปื้อนในน้ำนมมาจาก อุปกรณ์ และเครื่องมือเครื่องใช้ที่ไม่สะอาด (APHA, 2004) เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร (microbial spoilage) ซึ่งจำนวนเชื้อแบคทีเรียทนร้อนในน้ำนมดิบ ต้องไม่มากกว่า 10^3 CFU/mL (มาตรฐานสินค้าเกษตร, 2553)

การฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ (Pasteurization) กรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2556) วัตถุประสงค์เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและไม่สร้างสปอร์ คุณภาพของอาหารจะแตกต่างจากวัตถุดิบไม่มากนัก แต่การฆ่าเชื้อในระดับพาสเจอร์ไรส์จะไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และไม่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนสูงได้ ดังนั้นจะต้องเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียสหรืออุณหภูมิต่ำเยือก เพราะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ ปริมาณเชื้อที่ยังคงมีอยู่ในอาหารจึงไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, ม.ป.ป.)

วิธีทดสอบสำหรับวิเคราะห์ Thermophilic bacteria เรียกว่า Laboratory pasteurization count เป็นการนำตัวอย่างน้ำนมผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 62.8 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อจำลองกระบวนการ Pasteurization เมื่อครบระยะเวลา นำตัวอย่างน้ำนมไปทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอดจากการผ่านความร้อนจะถูกวิเคราะห์ด้วย Standard Plate Count Method หรือ Alternative Method (APHA, 2004)

Spiral Plate Count Method เป็นวิธีที่ประยุกต์ใช้เพื่อทดสอบน้ำนมดิบ โดยใช้เครื่อง Spiral Plater ตัวอย่างของเหลวจะถูกดูดและจ่ายลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นแข็งในรูปแบบ Archimedes spiral โดยปริมาตรตัวอย่างจะลดลงเรื่อยๆ จากจุดศูนย์กลางไปจนถึงขอบจานอาหารวุ้นแข็ง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปบ่ม เมื่อครบกำหนดระยะเวลาจะปรากฏโคโลนีขึ้นตามแนวการจ่ายตัวอย่าง สามารถนับจำนวนโคโลนีได้โดยใช้แผ่น grid (APHA, 2004)

งานจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำนม จึงได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมด้วยเครื่อง Spiral Plate ซึ่งถือเป็นวิธีทางเลือกที่ใช้ในการทดสอบจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนม เพื่อช่วยลดขั้นตอนในการเจือจางตัวอย่างและทำให้มั่นใจว่าวิธีการวิเคราะห์ที่นำมาใช้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง เหมาะสม มีความน่าเชื่อถือ เทียบเท่ากับวิธีอ้างอิงมาตรฐาน

1. วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมด้วยเครื่อง Spiral Plate และเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการวิเคราะห์ที่นำมาใช้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง เหมาะสม มีความน่าเชื่อถือ เทียบเท่ากับวิธีอ้างอิงมาตรฐาน

2. ขอบข่าย

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมด้วยเครื่อง Spiral Plate ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่นำมาใช้ภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ตามแนวทางของ ISO 16140-2 (2016)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 ช่วยลดขั้นตอนในการเจือจางและจ่ายตัวอย่าง
- 3.2 สามารถนำวิธีการทดสอบจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมด้วยเครื่อง Spiral Plate มาใช้ตรวจวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการ โดยให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง เหมาะสม มีความน่าเชื่อถือ

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

- 4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์
 - 4.1.1 Spiral Plater ยี่ห้อ interscience รุ่น easySpiral Dilute[®]
 - 4.1.2 Spiral[®] counting grid
 - 4.1.3 จานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาด 150 × 15 มม.
 - 4.1.4 จานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาด 90 × 15 มม.
 - 4.1.5 Disposable micro beakers ขนาด 5 mL
 - 4.1.6 ขวดแก้ว ขนาด 2 L พร้อม Connectors
 - 4.1.7 Pipette aid
 - 4.1.8 Graduated pipette ขนาด 10 mL
 - 4.1.9 Graduated pipette ขนาด 1 mL
 - 4.1.10 Test tube
 - 4.1.11 Water bath อุณหภูมิ 62.8 ± 0.5 °C
 - 4.1.12 Incubator อุณหภูมิ 32 ± 1 °C
 - 4.1.13 นาฬิกาจับเวลา
- 4.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน
 - 4.2.1 EnzyClear[®]
 - 4.2.2 Sodium hypochlorite solution 0.5 %
 - 4.2.3 Sterile Distilled water

4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.3.1 Plate Count Agar (PCA)

4.4 เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน

4.4.1 *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

5. วิธีดำเนินการ

5.1 Relative trueness study

- 5.1.1 คัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจำนวน 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างทดสอบควรมีระดับการปนเปื้อนที่เป็นตัวแทนของระดับการปนเปื้อนที่มีความหลากหลายตามธรรมชาติได้ ต้องครอบคลุมระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบและใช้ในการทดสอบด้วย

Categories : Raw milk and dairy products

Type : Raw milks

Item : Raw milks 20 sample

- 5.1.2 ทำการทดสอบจุลินทรีย์ที่ร้อนในตัวอย่างที่ได้คัดเลือกมา โดยนำตัวอย่างไปปั่นใน Water bath ที่อุณหภูมิ 62.8 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน (Standard Plate Count, APHA) และวิธีทางเลือก แล้วนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วย Scatter plot และ Bland-Altman difference plot โดยใช้ Bland-Altman Method

5.2 Accuracy profile study

- 5.2.1 คัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบที่มี Background ของเชื้อน้อยๆ จำนวน 6 ตัวอย่าง นำมา Spike เชื้อ *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) ลงไป โดยปนเปื้อนในระดับต่ำ (Low) 2 ตัวอย่าง ระดับปานกลาง (Intermediate) 2 ตัวอย่าง ระดับสูง (High) 2 ตัวอย่าง ดำเนินการทดสอบตัวอย่างละ 5 ซ้ำ (5 Test portions)

- 5.2.2 ตัวอย่างทดสอบควรมีระดับการปนเปื้อนที่เป็นตัวแทนของระดับการปนเปื้อนที่มีความหลากหลายตามธรรมชาติได้ ต้องครอบคลุมระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบและใช้ในการทดสอบด้วย โดยแบ่งเป็น 3 ระดับ

ระดับที่ 1 (Low level) : $10^1 - 10^2$ CFU/mL จำนวน 2 ตัวอย่าง

ระดับที่ 2 (Intermediate level) : 10^3 CFU/mL จำนวน 2 ตัวอย่าง

ระดับที่ 3 (High level) : $10^4 - 10^5$ CFU/mL จำนวน 2 ตัวอย่าง

- 5.2.3 ทำการทดสอบจุลินทรีย์ที่ร้อนในตัวอย่างที่ได้คัดเลือกมาโดยวิธีมาตรฐาน และวิธีทางเลือก แล้วนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยกราฟ Accuracy profile

6. ผลการทดลอง

6.1 Relative trueness study

ตารางที่ 1 แสดงการรวบรวมข้อมูลผลการทดสอบและผลการคำนวณค่า Average และ Difference ของการทดสอบหาจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมดิบ

Category	Type	Sample	result		result Log ₁₀		Average	Difference
			Reference method	Alternative method	Reference method	Alternative method		
Raw milk and dairy products	Raw milk	1	94	123	1.973	2.090	2.032	0.117
		2	280	318	2.447	2.502	2.475	0.055
		3	146	205	2.164	2.312	2.238	0.147
		4	46	73	1.663	1.863	1.763	0.201
		5	625	505	2.796	2.703	2.750	-0.093
		6	32	82	1.505	1.914	1.709	0.409
		7	1,235	1,488	3.092	3.173	3.132	0.081
		8	7,050	6,134	3.848	3.788	3.818	-0.060
		9	18,900	18,935	4.276	4.277	4.277	0.001
		10	10,650	9,881	4.027	3.995	4.011	-0.033
		11	2,700	3,343	3.431	3.524	3.478	0.093
		12	305	300	2.484	2.477	2.481	-0.007
		13	13,350	14,262	4.125	4.154	4.140	0.029
		14	26	23	1.415	1.362	1.388	-0.053
		15	31	27	1.491	1.431	1.461	-0.060
		16	8,050	8,984	3.906	3.953	3.930	0.048
		17	3,950	4,743	3.597	3.676	3.636	0.079
		18	340	186	2.531	2.270	2.400	-0.262
		19	3,250	1,928	3.512	3.285	3.398	-0.227
		20	117	132	2.068	2.121	2.094	0.052
							Average D ($\bar{D}$)	0.026
							SD	0.145
							T (0.025,19)	2.093

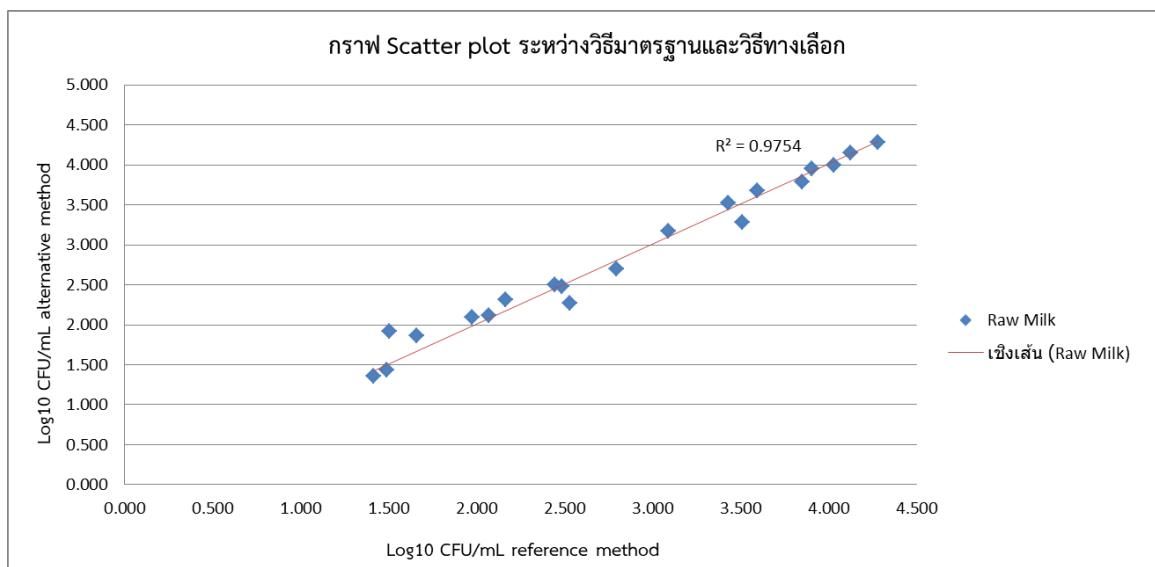
ค่า T (Percentile of a Student-t distribution) จากตาราง Student-t distribution จากการแทนค่า

$$T_{\left(\frac{1-\beta}{2}\right), (n-1)}$$

โดย β คือ ค่าช่วงระดับโอกาสความน่าจะเป็นที่จะเป็นที่ยอมรับ The chosen probability of the interval ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95% จะเท่ากับ 0.95

$n-1$ คือ ค่า degrees of freedom

6.1.1 สร้างกราฟ scatter plot จากค่า logarithm ฐาน 10 ของผลการทดสอบระหว่างวิธีมาตรฐาน และวิธีทางเลือก ด้วยโปรแกรม Excel



รูปที่ 1 แสดงกราฟ Scatter plot ระหว่างวิธีมาตรฐาน และวิธีทางเลือก

6.1.2 สร้างกราฟ Bland-Altman difference plot เพื่อแสดง degree of bias และ (lack of) agreement ของข้อมูล จากตารางที่ 1 ด้วยโปรแกรม Excel

6.1.2.1 คำนวณ limits of agreement ตามระบุในสูตร

$$\left[\bar{D} \pm T.SD \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \right]$$

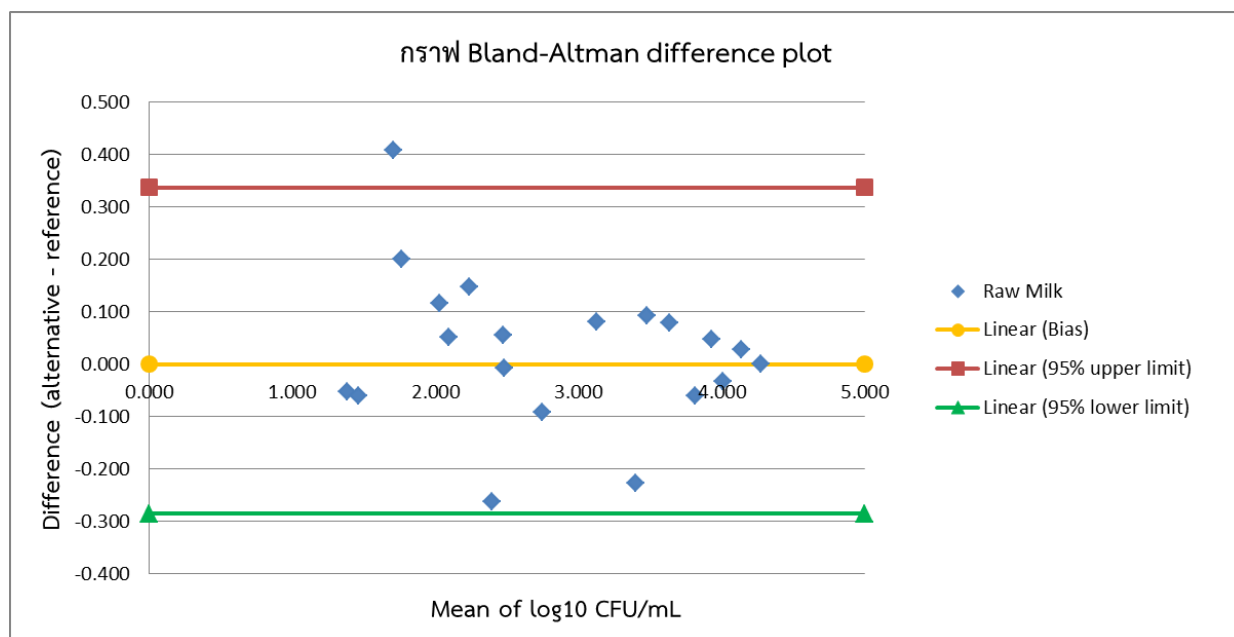
$$\text{Upper} = 0.026 + (2.093 \times 0.145) \sqrt{1 + \frac{1}{20}} = 0.337$$

$$\text{Lower} = 0.026 - (2.093 \times 0.145) \sqrt{1 + \frac{1}{20}} = -0.285$$

6.1.2.2 กรอกข้อมูลลงในโปรแกรมตามตารางที่ 2 เพื่อนำไปสร้างกราฟต่อไป
ตารางที่ 2 แสดงค่า upper, lower, bias

X Axis	Y Axis		
	upper	lower	bias
0	0.337	-0.285	0
5	0.337	-0.285	0

6.1.2.3 สร้างกราฟ Bland-Altman difference plot



รูปที่ 2 Bland-Altman difference plot ของการทดสอบหาจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมดิบ

6.2 Accuracy profile study

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบของการหาจุลินทรีย์ทนร้อนในน้ำนมดิบ

Category	Type	Item (level)	Reference method					Alternative method				
			t.p.1	t.p.2	t.p.3	t.p.4	t.p.5	t.p.1	t.p.2	t.p.3	t.p.4	t.p.5
Raw milk and dairy products	Raw milk	Sample 1 (low)	64	62	65	62	62	191	141	64	86	73
		Sample 2 (low)	475	520	465	515	420	514	559	482	495	477
		Sample 3 (intermediate)	3,000	3,200	3,200	3,900	3,100	4,418	3,960	4,086	3,941	4,595
		Sample 4 (intermediate)	8,250	8,150	8,600	8,200	8,250	10,500	8,838	9,717	11,074	8,154
		Sample 5 (high)	31,000	39,500	36,000	33,500	34,000	48,116	35,605	37,786	29,412	31,636
		Sample 6 (high)	445,000	510,000	390,000	445,000	440,000	510,145	539,130	464,694	466,667	515,942

t.p. = test portion.

6.2.1 ขั้นตอนการคำนวณ

6.2.1.1 การการคำนวณ Step 1 - Step 7

Step 1 แปลงผลการทดสอบวิธีมาตรฐานของแต่ละตัวอย่างเป็นค่า Log_{10} จากนั้นคำนวณค่ากลาง (central value, Median) X_i

$$X_i = \text{median}(x_{ij})$$

Step 2 แปลงผลการทดสอบวิธีอ้างอิงของแต่ละตัวอย่างเป็นค่า Log_{10} จากนั้นคำนวณค่ากลาง (central value, Median) Y_i

$$Y_i = \text{median}(y_{ij})$$

Step 3 คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของตัวอย่าง i (standard deviation) $s_{alt,i}$ โดยใช้สมการ

$$s_{alt,i} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2} \quad \text{โดย } n = \text{number of test portion}$$

Step 4 คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานรวม ของวิธีทางเลือก (combined standard deviation) s_{alt} โดยใช้สมการ

$$s_{alt} = \sqrt{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q s_{alt,i}^2} \quad \begin{array}{l} \text{โดย } q = \text{number of samples} \\ = \text{จำนวนชุดข้อมูล} \end{array}$$

Step 5 คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานรวมของวิธีมาตรฐาน (combined standard deviation) s_{ref} ที่สอดคล้องกับ Step 3 และ 4 โดยใช้สมการ

$$s_{ref,i} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2} \quad \text{โดย } n = \text{number of test portion}$$

combined standard deviation

$$s_{ref} = \sqrt{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q s_{ref,i}^2} \quad \begin{array}{l} \text{โดย } q = \text{number of samples} \\ = \text{จำนวนชุดข้อมูล} \end{array}$$

Step 6 สำหรับแต่ละตัวอย่าง i ให้คำนวณค่า absolute bias ซึ่งเป็นค่าต่างระหว่างมัธยฐาน (Medians) ของทั้งสองวิธี คือ ค่า $B_i = Y_i - X_i$ เป็นการประมาณ lack ได้ จากผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก

Step 7 สำหรับแต่ละตัวอย่าง i คำนวณค่า β -expectation tolerance interval (B-ETI) ซึ่งเป็นช่วงที่คาดว่าอัตราของผลทดสอบในอนาคตด้วยวิธีทางเลือกจะอยู่ในช่วง β สำหรับแต่ละตัวอย่างค่า β -ETI คำนวณได้จากสมการ

$$\left[B_i \pm T \times s_{alt,i} \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \right] \quad \text{โดย } T = T_{\left(\frac{1-\beta}{2}\right), q(n-1)}$$

โดย T เป็นค่า percentile ซึ่งอ่านจากตาราง Student-t distribution สำหรับค่าโอกาสความน่าจะเป็น β ที่ถูกเลือก (chosen probability) ที่ 80% และค่า degrees of freedom คือ $q(n-1)$ ค่า T เป็นค่า coverage factor ของ β -ETI สำหรับตัวอย่างที่ทดสอบความถูกต้อง โดยกำหนดเป็นค่า upper limit U_i และ lower limit L_i ตามสมการ

$$\left[U_i = B_i + T \times s_{alt,i} \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \right] \quad \text{และ} \quad \left[L_i = B_i - T \times s_{alt,i} \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \right]$$

6.2.1.2 บันทึกผลที่คำนวณได้ของแต่ละตัวอย่างตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการบันทึกผลการคำนวณ Step 1 - Step 7

Method	จำนวนซ้ำ	ผลการทดสอบ					
		ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6
Reference ($\log_{10}$)	1	1.806	2.677	3.477	3.916	4.491	5.648
	2	1.792	2.716	3.505	3.911	4.597	5.708
	3	1.813	2.667	3.505	3.934	4.556	5.591
	4	1.792	2.712	3.591	3.914	4.525	5.648
	5	1.792	2.623	3.491	3.916	4.531	5.643
Step 1 (Median)	X_i	1.792	2.677	3.505	3.916	4.531	5.648
Alternative ($\log_{10}$)	1	2.281	2.711	3.645	4.021	4.682	5.708
	2	2.149	2.747	3.598	3.946	4.552	5.732
	3	1.806	2.683	3.611	3.988	4.577	5.667
	4	1.934	2.695	3.596	4.044	4.469	5.669
	5	1.863	2.679	3.662	3.911	4.500	5.713
Step 2 (Median)	Y_i	1.934	2.695	3.611	3.988	4.552	5.708
Step 3	Salt, i	0.201	0.028	0.030	0.054	0.082	0.028
	n	5	5	5	5	5	5
Step 4	Salt	0.0935					
Step 5	Sref, i	0.010	0.038	0.045	0.009	0.039	0.041
	Sref	0.0336					
Step 6	$Y_i - X_i$	0.142	0.018	0.106	0.072	0.021	0.060
	$\text{Salt} \cdot \sqrt{1 + 1/n}$	0.1024					
	$T(0.1, 24)$	1.318					
Step 7	$T \cdot \text{Salt} \cdot \sqrt{1 + 1/n}$	0.1350					
	U_i	0.277	0.153	0.241	0.207	0.156	0.195
	L_i	0.007	-0.117	-0.029	-0.063	-0.114	-0.075

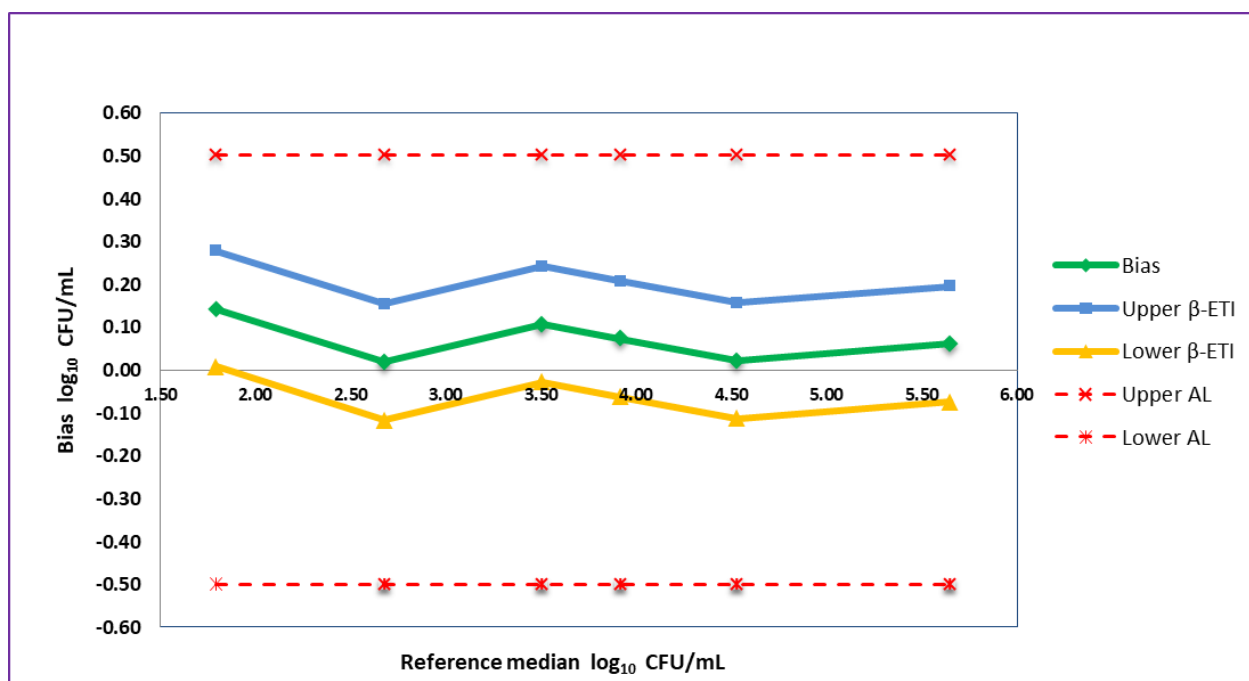
6.2.1.3 บันทึกสรุปที่คำนวณได้ของแต่ละตัวอย่างลงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงการบันทึกสรุปผลการคำนวณ

ตัวอย่าง	Central value (Ref) X_i	Central value (Alt) Y_i	Bias ($Y_i - X_i$)	Upper β -ETI (U_i)	Lower β -ETI (L_i)	Upper AL	Lower AL
ตัวอย่างที่ 1	1.792	1.934	0.142	0.277	0.007	0.5	-0.5
ตัวอย่างที่ 2	2.677	2.695	0.018	0.153	-0.117	0.5	-0.5
ตัวอย่างที่ 3	3.505	3.611	0.106	0.241	-0.029	0.5	-0.5
ตัวอย่างที่ 4	3.916	3.988	0.072	0.207	-0.063	0.5	-0.5
ตัวอย่างที่ 5	4.531	4.552	0.021	0.156	-0.114	0.5	-0.5
ตัวอย่างที่ 6	5.648	5.708	0.060	0.195	-0.075	0.5	-0.5

ใน ISO 16140-2 : 2016 กำหนดขีดจำกัดการยอมรับผลทดสอบ (acceptability limit , AL) เท่ากับ $\pm 0.5 \log_{10}$ units ซึ่งแสดงขอบเขตของค่าความแตกต่างระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือกที่ยอมรับได้

6.2.1.4 สร้างกราฟ Accuracy profile



รูปที่ 3 Accuracy profile ของการเปรียบเทียบ Reference Method และ Alternative Method ในการหาจุลินทรีย์ทนร้อนในนํ้านมดิบ

7. สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษา Relative trueness จากกราฟ Scatter plot พบว่า จุดตัวอย่างทุกจุดอยู่บนเส้นหรืออยู่ใกล้ line of identity มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9754 ซึ่งแสดงว่าวิธีทางเลือกและวิธีมาตรฐานให้ผลสอดคล้องกัน ส่วนกราฟ Bland – Altman difference plot มีค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทั้งสองวิธี อยู่ในขอบเขต Upper limit เท่ากับ 0.337 และ Lower limit เท่ากับ -0.285 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับการศึกษา Accuracy profile ครอบคลุมระดับการปนเปื้อน โดยแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 10^1 - 10^2 CFU/mL (Low level) 10^3 CFU/mL (Intermediate level) และ 10^4 - 10^5 CFU/mL (High level) จากกราฟ Accuracy profile พบว่า มีค่า Upper β -ETI สูงสุดเท่ากับ 0.277 และค่า Lower β -ETI ต่ำสุดเท่ากับ -0.117 ซึ่งค่าทั้งหมดอยู่ในช่วง Acceptability limit เท่ากับ $\pm 0.5 \log$ แสดงว่าวิธีทางเลือกสามารถยอมรับได้ว่ามีความเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน

8. ข้อเสนอแนะ

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในนํ้านมเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อคุณภาพนํ้านม นอกจากเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนแล้ว ยังมีกลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งหมดและกลุ่มโคลิฟอร์ม ซึ่งการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบจุลินทรีย์ทนร้อนในนํ้านมด้วยเครื่อง Spiral Plate สามารถใช้เป็นแนวทางในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวโดยใช้เครื่อง Spiral Plate ได้เช่นเดียวกัน

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้ความสนับสนุน นายสัตวแพทย์สมชาย วงศ์สมุทร ผู้เชี่ยวชาญด้านการตรวจสอบคุณภาพนํ้านมและผลิตภัณฑ์นม ที่ปรึกษา และบุคลากรกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ที่ช่วยให้การศึกษานี้สำเร็จได้ด้วยดี

10. เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. (ม.ป.ป.). *การใช้ความร้อนฆ่าเชื้อในอาหาร*. สืบค้นข้อมูลจาก <https://bsc.dip.go.th/th/category/production2/qs-heatinfoods>.
- กระทรวงสาธารณสุข. (2556). ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 352). *ผลิตภัณฑ์ของนม* สืบค้นข้อมูลจาก http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P352.pdf.
- มัญชุ อ้อสงข, กษพรณ บวรชัยฤทธิ์ และคณะ. (2561). *การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนในนํ้านม*, 9(2), 1-9.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. (2553). *มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 6003-2553 นํ้านมโคดิบ*. กรุงเทพมหานคร.
- ลดาพรรณ แสงคล้าย, และกรุณา ตีรสมิทธิ์. (2560, มกราคม). *แนวทางการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณภายในห้องปฏิบัติการเดียว โดยการศึกษาเปรียบเทียบวิธี, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*.
- American Public Health Association. (2004). *Standard methods for then examination of dairy products* (17th ed). Washington DC: Victor Graphics.
- Interscience. (n.d.). *easySpiral Dilute[®] : Installation Guide and User's Manual*. St Nom La Breteche: (n.p.).
- ISO. (2013). *ISO 7218: Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*, (3rd ed), 18-19.
- ISO. (2016). *ISO 16140-2: Microbiology of the food chain – Method validation- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference Method*, (1st ed).