

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมด้วยเทคนิค Pour plate และ Petrifilm ตามแนวทางของ ISO 16140-3: 2021

เสาวภา ปานศิริ วรรณิกา คุณสมบัติ ดวงรัตน์ ไกรกิจการ อนัญญา บริรักษ์ เนาวรัตน์ กำภูศิริ

บทคัดย่อ

เทคนิค Pour plate และ Petrifilm เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมดิบโดยการนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมดิบโดยใช้เทคนิค Pour plate และ Petrifilm ตามแนวทางของ ISO 16140-3:2021 โดยคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียครอบคลุมช่วงการทดสอบ จากนั้นแบ่งตัวอย่างเป็น 2 Test portion และวิเคราะห์โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน เพื่อหาค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation, S_{IR} โดยเทคนิค Petrifilm จากนั้นออกแบบการทดลองเพื่อหาค่า eBias โดยการเติมเชื้อ inoculum ที่ทราบปริมาณลงในตัวอย่างน้ำนมดิบ จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์และคำนวณหาค่า absolute difference ระหว่างปริมาณเชื้อ ($\log_{10}$ CFU/mL) ใน inoculum และปริมาณเชื้อในตัวอย่างน้ำนมดิบ ($\log_{10}$ CFU/test portion) โดยเทคนิค Petrifilm และ Pour plate จากผลการวิเคราะห์พบว่าค่า S_{IR} ของผลการทวนสอบเทคนิค Petrifilm มีค่าเท่ากับ 0.05 ซึ่งน้อยกว่า $2S_R$ ของข้อมูลใน validation report จึงผ่านเกณฑ์ acceptability limit ค่า absolute difference (eBias) ของเทคนิค Petrifilm มีค่าเท่ากับ 0.11 $\log_{10}$, 0.07 $\log_{10}$ และ 0.10 $\log_{10}$ และค่า absolute difference (eBias) ของเทคนิค Pour plate มีค่าเท่ากับ 0.15 $\log_{10}$, 0.09 $\log_{10}$ และ 0.06 $\log_{10}$ ที่ระดับการปนเปื้อน low level (10^5 CFU/mL), intermediate level (10^6 CFU/mL) และ high level (10^7 CFU/mL) ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมด้วยเทคนิค Pour plate และ Petrifilm มาใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบในห้องปฏิบัติการได้ โดยให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือ

คำสำคัญ : จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด, น้ำนมดิบ, Pour pate, Petrifilm

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

**Method Verification of Enumeration of Aerobic Plate Count in Raw Milk
by Pour plate and Petrifilm technique according to ISO 16140-3:2021 guidelines**

Saowapa Pansiri Kannika Kunsombut Duangrat Kraikitkarn Ananya Boriruk Naovarat Kamposiri

Abstract

Pour plate and Petrifilm techniques were used to analyze the aerobic plate count in raw milk by counting the number of colonies on the culture medium. The aim of this study is to verify the method for enumeration of aerobic plate count in raw milk by Pour plate and Petrifilm technique according to ISO 16140-3:2021 guidelines. In this study, raw milk samples that cover the presentative range of the natural contamination were selected. Then the samples were divided into 2 test portions and analyzed by 2 analysts to determine the Intralaboratory reproducibility standard deviation, S_{IR} by Petrifilm technique. The known bacterial concentration inoculums were inoculated to the raw milk samples for calculated eBias. After that, the samples were analyzed and calculated the absolute difference between the results ($\log_{10}$ CFU/mL) of the inoculum and the results of artificial contamination raw milk samples ($\log_{10}$ CFU/test portion). The results shown that S_{IR} from verification study of Petrifilm technique was 0.05, which less than $2S_R$ from the validation report, so it passed the acceptability limit criteria. The absolute difference (eBias) of Petrifilm technique were 0.11 $\log_{10}$, 0.07 $\log_{10}$ and 0.10 $\log_{10}$ and the absolute difference (eBias) of Pour plate technique were 0.15 $\log_{10}$, 0.09 $\log_{10}$ and 0.06 $\log_{10}$ at the low contamination level (10^5 CFU/mL), Intermediate contamination level (10^6 CFU/mL) and high contamination level (10^7 CFU/mL) respectively, which passed the acceptability limit criteria. The absolute difference (eBias) must not exceed 0.5 $\log_{10}$. Therefore, the method for enumeration of aerobic plate count by Pour plate and Petrifilm technique can be used to analyze raw milk samples in the laboratory and provides accurate and reliable test results.

key words : Aerobic Plate Count, Raw Milk, Pour plate, Petrifilm

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

บทนำ

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบมีที่มาจากหลายแหล่ง ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะทำให้เกิดการเน่าเสียและส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำนมดิบ ตามมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง น้ำนมโคดิบ (มกษ.6003-2553) กำหนดว่า จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดต้องไม่มากกว่า 500,000 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยให้ใช้เทคนิค pour plate หรือวิธีอื่นที่มีความถูกต้องเทียบเท่า (equivalent method) ในการวิเคราะห์ ดังนั้นกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์จึงเลือกใช้เทคนิค Pour plate และ Petrifilm มาใช้ในการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมโคดิบ

เทคนิค Pour plate เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Aerobic Plate Count) ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำนมดิบ โดยการเจือจางน้ำนมดิบในระดับการเจือจางที่เหมาะสม นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง จุลินทรีย์จะเจริญและสามารถนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นได้ เมื่อคำนวณผลจะทราบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในน้ำนมดิบต่อมิลลิลิตร (CFU/mL)

เทคนิค Petrifilm เป็นเทคนิคที่ใช้แผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน เจลที่ละลายได้ในน้ำเย็น และสีย้อมเพื่อช่วยในการนับจำนวนโคโลนี เมื่อเจือจางน้ำนมดิบในระดับการเจือจางที่เหมาะสม นำมาเพาะเลี้ยงบน Petrifilm Aerobic Count Plate บ่มที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งปนเปื้อนอยู่ในน้ำนมดิบจะเจริญเป็นโคโลนีสีแดงสามารถตรวจนับได้ และเมื่อคำนวณผลจะทราบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในน้ำนมต่อมิลลิลิตร (CFU/mL)

ตามข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ในหัวข้อการเลือกและทวนสอบวิธี (selection and verification of methods) กำหนดว่าห้องปฏิบัติการต้องใช้วิธีและขั้นตอนการดำเนินงานที่เหมาะสม โดยแนะนำให้ใช้วิธีการที่มีการตีพิมพ์ในมาตรฐานระหว่างประเทศ ระดับภูมิภาค หรือระดับประเทศ เป็นต้น และต้องทวนสอบว่าสามารถปฏิบัติตามวิธีได้อย่างถูกต้องก่อนนำวิธีนั้นมาใช้ รวมทั้งเอกสารต่างๆต้องได้รับการปรับปรุงให้ทันสมัยอยู่เสมอ

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method verification) หมายถึง กระบวนการทวนสอบที่จัดทำขึ้นเพื่อพิสูจน์ว่าวิธีทดสอบที่ห้องปฏิบัติการนำมาใช้ มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือและเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งาน โดยการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative method) ตามแนวทางของ ISO 16140-3: 2021 ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การประเมิน Implement verification (การหาค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation, S_{IR}) และการประเมิน (food) item verification (การหาค่า Estimated bias, eBias) ในกรณีที่วิธีทดสอบที่ใช้อ้างอิงเป็น non-validated reference methods ให้ทำการประเมินเฉพาะ (food) item verification (การหาค่า Estimated bias, eBias) เท่านั้น

1. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมด้วยเทคนิค Pour plate และ Petrifilm ตามแนวทางของ ISO 16140-3: 2021 เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ที่นำมาใช้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง เหมาะสม มีความน่าเชื่อถือเทียบเท่ากับวิธีอ้างอิงมาตรฐาน

2. ขอบข่าย

เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมด้วยเทคนิค Pour plate และ Petrifilm ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ตามแนวทางของ ISO 16140-3, (2021)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สร้างความเชื่อมั่นในการใช้วิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมด้วยเทคนิค Pour plate และ Petrifilm ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ โดยให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง เหมาะสม มีความน่าเชื่อถือ

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 Biohazard safety cabinet Class II
- 4.1.2 Hot air oven
- 4.1.3 Autoclave
- 4.1.4 Vortex mixer
- 4.1.5 เครื่องชั่ง
- 4.1.6 Sterile Graduated pipette ขนาด 10 ml
- 4.1.7 Pipette aid
- 4.1.8 Test tube พร้อมฝาเกลียว ขนาด 20 x 150 mm
- 4.1.9 ตะเกียงแก๊ส
- 4.1.10 Magnetic bar
- 4.1.11 Micropipette + Tip ขนาด 5 ml
- 4.1.12 Erlenmeyer Flask
- 4.1.13 กระบอกตวง ขนาด 1,000 ml, 250 ml, 100 ml, 25 ml
- 4.1.14 กรวยพลาสติก

4.1.15 แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)

4.1.16 ขวดแก้วใส่สารละลายขนาด 1000 ml และ 500 ml

4.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.1 70% Alcohol

4.2.2 น้ำกลั่น

4.2.3 Butterfield's Phosphate Buffered Water (BPB)

4.2.4 Plate Count Agar (PCA)

4.2.5 Petrifilm Aerobic Count Plate

4.2.6 Tryptic Soy Broth (TSB)

4.3 เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน

Enterobacter aerogenes ATCC 13048

5. วิธีดำเนินการ

5.1 การหาค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation, S_{IR}

5.1.1 คัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียครอบคลุมช่วงการทดสอบตัวอย่างที่รายงานผล จำนวน 10 ตัวอย่าง

Categories : Raw milk and dairy products

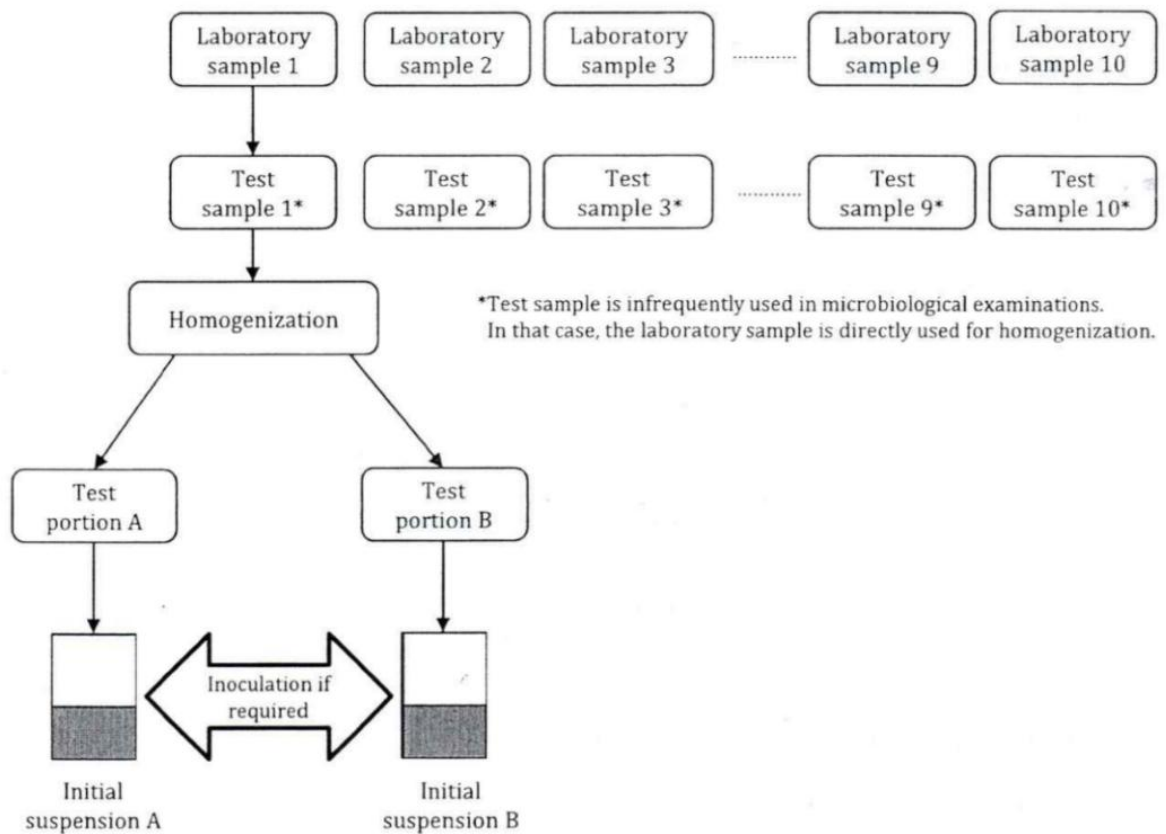
Type : Raw milks

Item : Raw milks 10 samples

5.1.2 เช็ดขวดตัวอย่างให้แห้งและสะอาด เช็ดขวดและปากขวดก่อนเปิดฝาด้วยแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นกลับขวดตัวอย่างไปมาประมาณ 25 ครั้ง ให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน (อย่าให้เกิดฟอง)

5.1.3 แบ่งตัวอย่างเป็น 2 Test portion (Test portion A และ Test portion B)

5.1.4 วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค Petrifilm (AOAC, 2023) (Test portion A วิเคราะห์โดยผู้วิเคราะห์ A และ Test portion B วิเคราะห์โดยผู้วิเคราะห์ B)



รูปที่ 1 การหาค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation, S_{IR} (ISO 16140-3, 2021)

5.1.5 คำนวณค่า S_{IR} จากสูตร

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

เมื่อ S_{IR} คือ intralaboratory reproducibility standard deviation

i คือ หมายเลขตัวอย่าง, $i = 1-10$

n คือ จำนวนตัวอย่าง

y_{iA}, y_{iB} คือ ผลการวิเคราะห์ในรูปแบบ $\log_{10}$ (cfu/ml) จากการวิเคราะห์

โดยผู้วิเคราะห์ A และ B ตามลำดับ

โดยมี Acceptability limit คือ ค่า S_{IR} ที่ได้ต้องมีค่าน้อยกว่า $2S_R$ ของข้อมูล validation study

5.2 การหาค่า eBias

5.2.1 การเตรียมเชื้อมาตรฐาน (inoculum)

5.2.1.1 ใช้ loop ปลอดเชื้อเชี่ยเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 จาก stock culture ลงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

5.2.1.2 เตรียม inoculum โดยใช้ sterile graduated pipette ขนาด 1 ml ถ่ายเชื้อจาก TSB ปริมาตร 1 ml ลงใน Butterfield's Phosphate Buffered Water (BPB) ปริมาตร 9 ml ทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution จากระดับการเจือจาง 10^{-1} จนถึง 10^{-9}

5.2.1.3 นำ inoculum ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Petrifilm (AOAC, 2023) และเทคนิค Pour plate (BAM, 2001) โดยวิเคราะห์ระดับการเจือจางละ 2 ซ้ำ

5.2.2 เลือก inoculum ที่มีปริมาณเชื้อในระดับการปนเปื้อนที่ต้องการ ดังนี้

ระดับที่ 1 (Low level) : 10^5 cfu/ml

ระดับที่ 2 (Intermediate level) : 10^6 cfu/ml

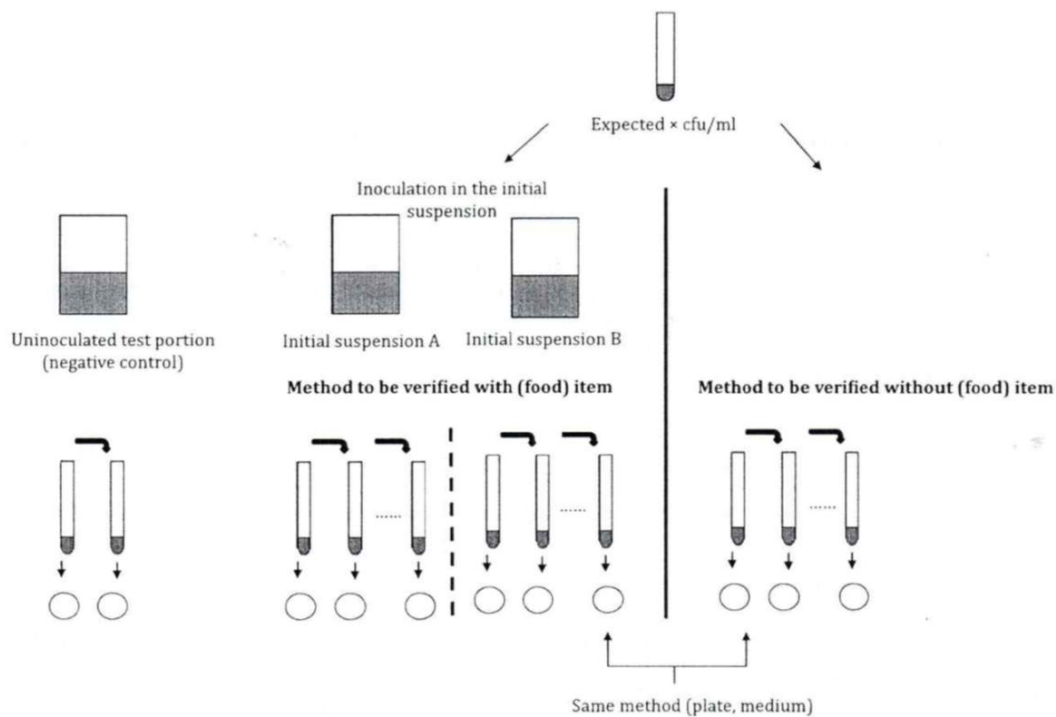
ระดับที่ 3 (High level) : 10^7 cfu/ml

5.2.3 ใช้ sterile graduated pipette ขนาด 1 ml ถ่ายเชื้อจาก inoculum ปริมาตร 1 ml ลงในตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต่ำมาก (ประมาณ 10^3 cfu/ml) ปริมาตร 9 ml (ทำทั้ง 3 ระดับ ระดับละ 2 test portion) จะได้ตัวอย่างน้ำนมดิบ (artificial contaminated (food) item)

5.2.4 นำตัวอย่างน้ำนมดิบ (artificial contaminated (food) item) ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Petrifilm (AOAC, 2023) และเทคนิค Pour plate (BAM, 2001) (วิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ)

5.2.5 นำตัวอย่างน้ำนมดิบ (uninoculated) ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Petrifilm (AOAC, 2023) และเทคนิค Pour plate (BAM, 2001) (วิเคราะห์จำนวน 2 ซ้ำ) เพื่อหาจำนวนจุลินทรีย์ background

5.2.6 คำนวณค่า eBias โดยหาค่า absolute difference ระหว่างปริมาณเชื้อ ($\log_{10}$ cfu/ml) ใน inoculum และค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อในตัวอย่างน้ำนมดิบ ($\log_{10}$ cfu/test portion) (ปริมาตร test portion เท่ากับ 10 ml) โดยมี Acceptability limit คือ ค่า absolute difference (eBias) ต้องไม่เกิน $0.5 \log_{10}$



รูปที่ 2 การออกแบบการทดลองเพื่อหาค่า eBias (ISO 16140-3, 2021)

6. ผลการทดลอง

6.1 การหาค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation, S_{IR}

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation, S_{IR} ของวิธี

วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมด้วยเทคนิค Petrifilm

Test sample	Result A CFU/mL	Result B CFU/mL	$\log_{10} A$ (y_{iA})	$\log_{10} B$ (y_{iB})	($y_{iA} - y_{iB}$)	($y_{iA} - y_{iB}$) ²
1	73,000	78,000	4.863	4.892	-0.029	0.001
2	85,000	130,000	4.929	5.114	-0.185	0.034
3	100,000	110,000	5.000	5.041	-0.041	0.002
4	230,000	220,000	5.362	5.342	0.019	0.000
5	470,000	440,000	5.672	5.643	0.029	0.001
6	820,000	700,000	5.914	5.845	0.069	0.005
7	1,100,000	1,300,000	6.041	6.114	-0.073	0.005
8	1,200,000	1,200,000	6.079	6.079	0.000	0.000
9	2,600,000	2,400,000	6.415	6.380	0.035	0.001
10	4,000,000	3,900,000	6.602	6.591	0.011	0.000

คำนวณค่า S_{IR} จากสูตร

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

เมื่อ S_{IR} คือ intralaboratory reproducibility standard deviation

i คือ หมายเลขตัวอย่าง, $i = 1-10$

n คือ จำนวนตัวอย่าง

y_{iA}, y_{iB} คือ ผลการวิเคราะห์ในรูปแบบ $\log_{10}$ (cfu/ml) จากการวิเคราะห์

โดยผู้วิเคราะห์ A และ B ตามลำดับ

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2(10)} \sum_{i=1}^{10} (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{20} * 0.049}$$

$$S_{IR} = 0.05$$

ค่า S_{IR} จากข้อมูลการวิเคราะห์เท่ากับ 0.05 ซึ่งน้อยกว่า $2S_R$ ของข้อมูล validation report ที่มีค่าน้อยที่สุด (Reproducibility standard deviation (high level) ; $S_R = 0.235$) Validation study according to EN ISO 16140-2:2016 Neogen® Petrifilm® Aerobic Count Plate (Certificate number: 3M 01/01 - 09/89) for the enumeration of mesophilic aerobic flora in all human food, pet food and production environmental samples ซึ่งผ่านเกณฑ์ Acceptability limit

6.2 การหาค่า eBias

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ค่า eBias ของวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมด้วยเทคนิค Petrifilm (ปริมาตร test portion = 10 mL)

	Artificially contaminated (food) item						Inoculum suspension without (food) item		eBias (absolute difference)
Test sample	Test portion	Result CFU/mL	log ₁₀ CFU/mL	Result (CFU/test portion)	log ₁₀ Result (CFU/test portion)	Mean log ₁₀ Result (CFU/test portion)	Result CFU/mL	log ₁₀ Result CFU/mL	
Sample 1	A	20,300	4.31	203,000	5.31	5.26	140,000	5.15	0.11
	B	16,300	4.21	163,000	5.21				
Sample 2	A	181,000	5.26	1,810,000	6.26	6.27	1,580,000	6.20	0.07
	B	192,000	5.28	1,920,000	6.28				
Sample 3	A	1,620,000	6.21	16,200,000	7.21	7.23	13,600,000	7.13	0.10
	B	1,810,000	6.26	18,100,000	7.26				

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ค่า eBias ของวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมด้วยเทคนิค Pour plate (ปริมาตร test portion = 10 mL)

	Artificially contaminated (food) item						Inoculum suspension without (food) item		eBias (absolute difference)
Test sample	Test portion	Result CFU/mL	log ₁₀ CFU/mL	Result (CFU/test portion)	log ₁₀ Result (CFU/test portion)	Mean log ₁₀ Result (CFU/test portion)	Result CFU/mL	log ₁₀ Result CFU/mL	
Sample 1	A	18,000	4.26	180,000	5.26	5.27	130,000	5.11	0.15
	B	19,000	4.28	190,000	5.28				
Sample 2	A	173,000	5.24	1,730,000	6.24	6.25	1,460,000	6.16	0.09
	B	184,000	5.26	1,840,000	6.26				
Sample 3	A	1,950,000	6.29	19,500,000	7.29	7.25	15,400,000	7.19	0.06
	B	1,640,000	6.21	16,400,000	7.21				

7. สรุปผลการทดลอง

จากการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนม (Aerobic Plate Count) ด้วยเทคนิค Pour plate และ Petrifilm ตามแนวทางของ ISO 16140-3:2021 ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การประเมิน Implement verification โดยคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียครอบคลุมช่วงการทดสอบ จากนั้นแบ่งตัวอย่างเป็น 2 test portion และวิเคราะห์โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน เพื่อหาค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation, S_{IR} (วิเคราะห์เฉพาะเทคนิค Petrifilm) และการประเมิน (food) item verification โดยการเติมเชื้อ inoculum ที่ทราบปริมาณลงในตัวอย่างน้ำนมดิบ จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์และคำนวณหาค่า absolute difference ระหว่างปริมาณเชื้อ ($\log_{10}$ CFU/mL) ใน inoculum และปริมาณเชื้อในตัวอย่างน้ำนมดิบ ($\log_{10}$ CFU/test portion)

จากผลการวิเคราะห์พบว่าค่า S_{IR} ของผลการทวนสอบเทคนิค Petrifilm มีค่าเท่ากับ 0.05 ซึ่งน้อยกว่า $2S_R$ ของข้อมูล validation report ที่มีค่าน้อยที่สุด (Reproducibility standard deviation (high level) ; $S_R = 0.235$) จึงผ่านเกณฑ์ acceptability limit ค่า absolute difference (eBias) ของเทคนิค Petrifilm มีค่าเท่ากับ $0.11 \log_{10}$, $0.07 \log_{10}$ และ $0.10 \log_{10}$ ค่า absolute difference (eBias) ของเทคนิค Pour plate มีค่าเท่ากับ $0.15 \log_{10}$, $0.09 \log_{10}$ และ $0.06 \log_{10}$ ที่ระดับการปนเปื้อน low level (10^5 CFU/mL), intermediate level (10^6 CFU/mL) และ high level (10^7 CFU/mL) ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ acceptability limit คือ ค่า absolute difference (eBias) ต้องไม่เกิน $0.5 \log_{10}$ ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนม (Aerobic Plate Count) ด้วยเทคนิค Pour plate และ Petrifilm มาใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบในห้องปฏิบัติการได้โดยให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือ

8. ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลที่น่ามาใช้ในการคำนวณค่า Intralaboratory reproducibility standard deviation, S_{IR} ในการศึกษาครั้งนี้มีตัวแปรที่ต่างกันเพียง 1 ตัวแปร คือ ผู้วิเคราะห์ ดังนั้นจึงควรศึกษาปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย เช่น lot ของ Butterfield's Phosphate Buffered Water (BPB), Plate Count Agar (PCA), Petrifilm Aerobic Count และเครื่องมือต่างๆที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ incubator, autoclave ที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ค่าที่มีความถูกต้องมากขึ้น

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้ความสนับสนุน และบุคลากรกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมที่ช่วยให้การศึกษานี้สำเร็จได้ด้วยดี

10. เอกสารอ้างอิง

- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. (2553). *มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 6003-2553 น้ำนมโคดิบ*. กรุงเทพมหานคร.
- Adria. (2025). *Validation study according to EN ISO 16140-2:2016 Neogen® Petrifilm® Aerobic Count Plate (Certificate number: 3M 01/01 - 09/89) for the enumeration of mesophilic aerobic flora in all human food, pet food and production environmental samples*.
- AOAC. (2023). *AOAC Official Methods 986.33 Bacterial and Coliform Counts in Milk*.
- ISO. (2020). *ISO 6887-5: Microbiology of the food chain-Preparation of test samples initial suspension and decimal dilution for microbiological examination-Part: Specific rules for the preparation of milk and milk products*.
- ISO. (2021). *ISO 16140-3: Microbiology of the food chain – Method validation- Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory, (1st ed)*.
- L.J. Maturin and J.T. Peeler. (2001). *Bacteriological Analytical Manual (online): chapter 3 Aerobic plate count*.