

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมดิบ ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Bactoscan

มัณฑุ อื้อสงวษ์ กชพรรณ บวรชัยฤทธิ์ สมชาย วงศ์สมุทร
ทัศนีย์ ไกรดงพลอง สุพัฒตรา คำแก้ว

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียในน้ำนมดิบด้วยเครื่องอัตโนมัติ BactoScan ซึ่งใช้เทคนิค Flow Cytometry เปรียบเทียบกับวิธี AOAC, Petrifilm™ โดยใช้ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากธรรมชาติ ทำการศึกษา Relative trueness และ Accuracy profile ตาม ISO 16140-2:2016 พบว่าวิธี AOAC, Petrifilm™ และ BactoScan มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง และเมื่อทำการวิเคราะห์ Bland-Altman Scatter Plot ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า AOAC, Petrifilm™ และ BactoScan มีความสอดคล้องกันในการวิเคราะห์ Accuracy profile พบว่า BactoScan ให้ผลเทียบเท่ากับวิธีอ้างอิงสำหรับการทดสอบตัวอย่างน้ำนมโคดิบที่ระดับการปนเปื้อนที่ทดสอบตั้งแต่ $3.7 \log_{10}$ cfu/ml ถึง $6.86 \log_{10}$ cfu/ml

คำสำคัญ: การตรวจสอบความใช้ได้, น้ำนมโคดิบ, การวิเคราะห์แบคทีเรีย, BactoScan

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Validation of Bacterial Count in Milk using BactoScan

Monchu Oswong Kotchaplan Bowonchaiyarit Somchai Wongsamut

Thatsanee Kraidongplong Supattra Kumkaew

Abstract

BactoScan, a flow cytometry technique, were validated comparing with reference method, AOAC, Petrifilm™. All samples were naturally contaminated milk, analysed both AOAC, Petrifilm™ and BactoScan. Results were statistical analysed via Relative trueness plot and Accuracy profile according to ISO 16140-2:2016, illustrated that the AOAC, Petrifilm™ and BactoScan were linearity correlated. A Bland-Altman Scatter Plot at confident level 95% show that the agreement of both method are accepted. Bacterial enumeration by BactoScan was equivalent to AOAC, Petrifilm™ for bacterial count in raw milk at contaminated levels from $3.7 \log_{10}$ cfu/ml to $6.86 \log_{10}$ cfu/ml

Keywords: Method Validation, Bacterial Count, Milk, BactoScan

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

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียในน้ำมันดิบ ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Bactoscan

มัณฑุ อัสวงษ์ กชพรรณ บวรชัยฤทธิ์ สมชาย วงศ์สมุทร
ทัศนีย์ ไกรดงพลอง สุพัฒตรา คำแก้ว

บทนำ

การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียในน้ำมันดิบก่อนการนำเข้าสู่กระบวนการแปรรูปเป็นขั้นตอนสำคัญอย่างหนึ่งซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงสุขภาพของฟาร์มและศูนย์รวบรวมน้ำมันดิบ จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ เพื่อให้การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียสามารถเป็นที่ยอมรับได้และมีความน่าเชื่อถือ ปัจจุบันวิธี AOAC, Petrifilm™ ซึ่งได้รับการยอมรับอย่างเป็นทางการสำหรับตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียในน้ำมันนั้นใช้ระยะเวลาจนถึง 48 ชั่วโมง ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเครื่องมืออัตโนมัติซึ่งใช้เทคนิค Flow cytometry ในการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำมัน โดยใช้หลักการตรวจนับสารฟลูออเรสเซนต์ผ่านการย้อมสีด้วย fluorescent-dye ethidium bromide ซึ่งให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วสามารถเชื่อถือได้ และยังสามารถตรวจน้ำมันดิบได้ครั้งละปริมาณมาก

อย่างไรก็ตามเทคนิค Flow cytometry เป็นเทคนิคที่ยังไม่ได้ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำมันดิบอย่างแพร่หลายเนื่องจากยังต้องการการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน AOAC, Petrifilm™ ที่มีความน่าเชื่อถือในระดับสากล จึงต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโดยอ้างอิงตาม ISO 16140:2016 เพื่อให้มีความมั่นใจว่าวิธีการดังกล่าวสามารถเทียบเคียงและใช้ทดแทนได้ก่อนนำมาในห้องปฏิบัติการ ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่การทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเพื่อนำมาใช้ในการปฏิบัติงานจริงในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำมันดิบซึ่งส่งตรวจประจำกับห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ซึ่งทำให้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์และค่าใช้จ่ายในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. วัตถุประสงค์

ศึกษาความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบของเครื่องวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบแบบอัตโนมัติ BactoScan เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน AOAC, Petrifilm™

2. ขอบข่าย

วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบแบบอัตโนมัติโดยใช้หลักการ Flow Cytometry ร่วมกับการย้อมสีสารพันธุกรรมของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Fluorescent-dye ethidium bromide

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมดิบจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว

4. วิธีดำเนินการ

4.1. ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นตัวอย่างน้ำนมโคดิบธรรมชาติจากการสุ่มตัวอย่างถึงรวมรายฟาร์มของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดสระบุรีก่อนส่งเข้าถึงรวมนมของศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบก่อนทำการผลิต จำนวน 30 ตัวอย่าง

4.2. การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียตามวิธีมาตรฐาน

ปิเปตตัวอย่างน้ำนมดิบปริมาตร 1 ml ลงใน Butterfield's phosphate buffered water ปริมาตร 9 มิลลิลิตรทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1:100, 1:1000 และ 1:10000 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AOAC, Petrifilm™ ตาม Office Methods of Analysis of AOAC International. 2016.20th Method 986.33.

4.3. การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ BactoScan

แบ่งตัวอย่างชุดเดียวกับที่ใช้ทำการวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน AOAC, Petrifilm™ เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ BactoScan ในการศึกษานี้จะทำการวิเคราะห์ซ้ำ (duplicate) ทุกตัวอย่าง โดยเริ่มทำการวิเคราะห์แตกต่างจากวิธีมาตรฐานไม่เกิน 30 นาที

4.4.การศึกษา Relative Trueness

4.4.1. Scatter Plot

ผลทดสอบจะทำการวิเคราะห์โดยสร้างแผนภูมิการกระจาย (Scatter Plot) ระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือก โดยคำนวณค่า Log_{10} cfu/g ของวิธีมาตรฐานให้แทนในตัวแปร X และ Log_{10} cfu/g ของวิธีทางเลือกแทนที่ตัวแปร Y (ISO 16140-2:2016)

4.4.2. Bland-Altman Scatter Plot

ดำเนินการตามวิธีการ ISO 16140-2:2016 (E) ทำการหา Log_{10} cfu ของวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือก นำ Log_{10} cfu ของแต่ละคู่มาหาค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าความแตกต่างระหว่างผลทดสอบ (Difference, D) นำค่าความแตกต่างของทุกตัวอย่างมาหาค่าเฉลี่ย ($\bar{D}$) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard deviation, SD) นำมาเข้าสู่สูตร

$$\bar{D} \pm T \cdot S_D \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

เมื่อ n คือ จำนวนคู่ของผลทดสอบ

T คือ ค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ได้จาก Student-t โดยมี

$$\text{degree of freedom} = n - 1; T\left(\frac{1-\beta}{2}; (n-1)\right)$$

นำค่ามาพลอตกราฟระหว่างค่าความแตกต่างระหว่างตัวอย่างและค่าเฉลี่ย พร้อมแสดงเส้นตรงของคลาดเคลื่อน ขอบเขตบนและขอบเขตล่างของความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ต่อความคลาดเคลื่อน

4.5.การศึกษา Accuracy Profile

ดำเนินการตามวิธีการ ISO 16140-2:2016 โดยกำหนดให้ X_{ij} คือ ค่า Log_{10} ของผลทดสอบที่ได้จากวิธีวิเคราะห์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ BactoScan และ Y_{ij} คือค่า Log_{10} ของผลทดสอบที่ได้จากวิธีมาตรฐาน AOAC, Petrifilm™ เกณฑ์การยอมรับของความแตกต่างระหว่างวิธีมาตรฐาน AOAC, Petrifilm™ และ BactoScan อยู่ที่ $\pm 0.5 \log_{10}$

5. ผลการทดลอง

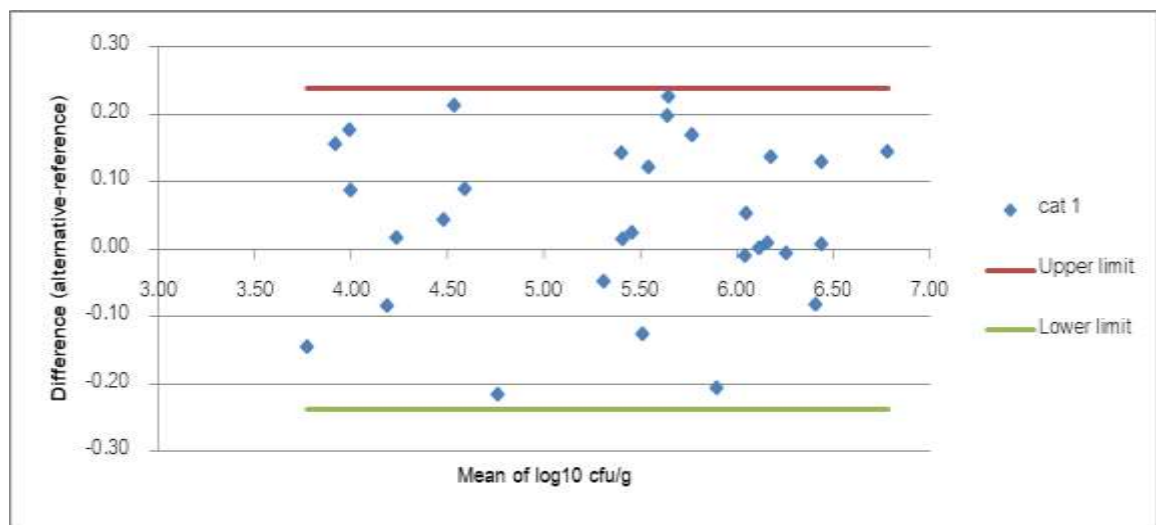
5.1.การศึกษา Relative trueness

เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้ Bland-Altman Scatter Plot พบว่าค่าความต่างของสองวิธีการสัมพันธ์กับค่าเฉลี่ย $\log_{10}$ cfu ของทั้งสองวิธีอยู่ในช่วงการยอมรับของขอบเขตบนและขอบเขตล่าง แสดงว่าทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกัน

ตาราง 1 ผลวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์เปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐาน และ BactoScan

Level	AOAC, Petrifilm™		BactoScan		Xi	Yi
	X ₁	X ₂	Y ₁	Y ₂		
low	5,000	5,000	7,000	7,000	3.70	3.85
low	10,000	6,000	7,000	6,000	3.89	3.81
low	11,000	10,000	9,000	6,000	4.02	3.87
low	12,000	10,000	8,000	7,000	4.04	3.87
low	14,000	9,000	17,000	12,000	4.05	4.15
low	17,700	17,818	17,000	16,000	4.25	4.22
low	32,000	31,000	29,000	32,000	4.50	4.48
low	43,000	43,000	35,000	31,000	4.63	4.52
low	44,000	40,000	27,000	30,000	4.62	4.45
low	45,000	44,000	74,000	61,000	4.65	4.83
medium	195,455	186,000	218,000	210,000	5.28	5.33
medium	260,000	300,000	251,000	237,000	5.45	5.39
medium	282,728	296,364	378,000	376,000	5.46	5.58
medium	295,455	280,909	279,000	269,000	5.46	5.44
medium	300,000	250,000	216,000	197,000	5.44	5.31
medium	400,000	360,000	303,000	296,000	5.58	5.48
medium	550,000	490,000	349,000	348,000	5.72	5.54
medium	580,000	470,000	345,000	342,000	5.72	5.54
medium	620,000	650,000	997,000	995,000	5.80	6.00

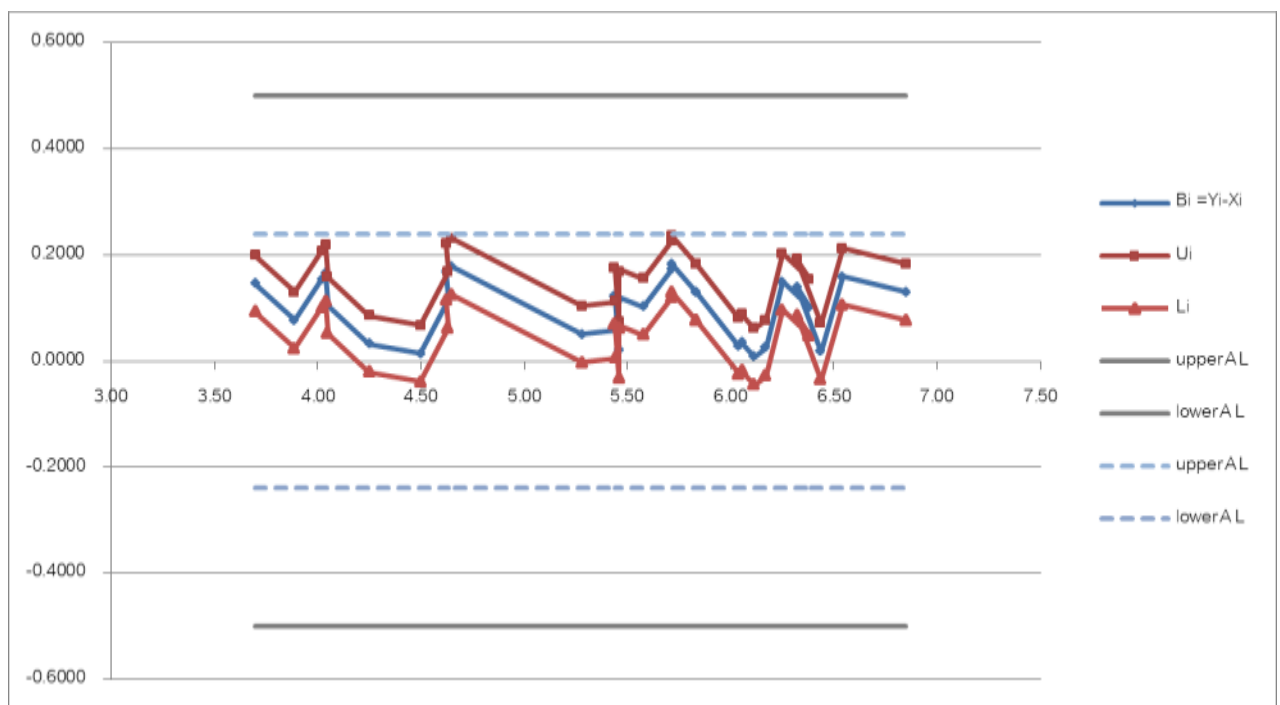
Level	AOAC, Petrifilm™		BactoScan		Xi	Yi
	X ₁	X ₂	Y ₁	Y ₂		
medium	720,000	650,000	487,000	531,000	5.84	5.71
high	1,100,000	1,090,000	1,125,000	936,000	6.04	6.01
high	1,200,000	1,070,000	1,062,000	1,030,000	6.05	6.02
high	1,310,000	1,290,000	1,305,000	1,247,000	6.11	6.11
high	1,460,000	1,510,000	1,428,000	1,378,000	6.17	6.15
high	1,770,000	1,800,000	1,293,000	1,236,000	6.25	6.10
high	1,800,000	3,200,000	1,829,000	1,976,000	6.38	6.28
high	2,350,000	1,872,727	2,837,000	294,8000	6.32	6.46
high	2,790,000	2,670,000	2,741,000	2,956,000	6.44	6.45
high	3,200,000	3,800,000	2,379,000	2,449,000	6.54	6.38
high	7,200,000	6,900,000	5,176,000	5,267,000	6.85	6.72



รูป 1 Bland-Altman Scatter Plot ของตัวอย่างน้ำมันดิบเปรียบเทียบความสอดคล้องระหว่างวิธีมาตรฐาน AOAC และวิธี BactoScan

5.2.การศึกษา Accuracy profile

เมื่อทำการพลอตกราฟ Accuracy profile ของตัวอย่างทดสอบน้ำมันดิบพบว่าช่วงความคลาดเคลื่อนที่คาดหวังขอบบน (β -expectation tolerance interval; β -ETI) มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับขอบบนและขอบล่าง (Acceptability limits) (รูป2) แสดงว่าวิธีวิเคราะห์โดยใช้ BactoScan ให้ผลเทียบเท่ากับวิธีอ้างอิงสำหรับการทดสอบตัวอย่างน้ำมันดิบที่ระดับการปนเปื้อนที่ทดสอบตั้งแต่ $3.7 \log_{10}$ cfu/ml ถึง $6.86 \log_{10}$ cfu/ml



รูป 2 Accuracy Profile Plot, B_i =Bias of Alternative method, U_i = upper limit, L_i = lower limit,

AL = Acceptability limit

6. สรุปผลการทดลอง

วิธีมาตรฐาน AOAC, PetrifilmTM และวิธีตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่องอัตโนมัติมีความสอดคล้องกันที่ความเชื่อมั่นที่ 95% ตาม Bland-Altman Scatter Plot และสามารถให้ผลเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐานสำหรับการทดสอบตัวอย่างน้ำมันดิบ

7. ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโคดิบด้วยเครื่องอัตโนมัติ BactoScan ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำแบบ duplicate จำนวน 30 ตัวอย่าง เพื่อผลการทดลองที่ชัดเจนยิ่งขึ้นควรทำการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง (Replicate) จึงจะสามารถเห็นการกระจายได้ชัดเจนยิ่งขึ้น และต้องรักษาตัวอย่างตามวิธีที่กำหนดและระยะเวลาจากที่เก็บตัวอย่างจนกระทั่งวิเคราะห์ควรน้อยที่สุด

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินการทดลองนี้

9. เอกสารอ้างอิง

- [1] Official Methods of Analysis of AOAC International. 2016.20TM Method 986.33.
Madden R.M., Gordon A., Concionivoschi N., (2017) “Determination of BactoScan
- [2] Conversion Factor for the United Kingdom”. Milk Science International 2017; 17-19
- [3] ISO 16140-2: 2016. Microbiology of the food chain – Method validation- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva. Switzerland
- [4] ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain Horizontal method for the enumeration of microorganisms Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. 9 pp. www.iso.org.
- [5] ISO 21187:2004. Milk Quantitative determination of bacteriological quality Guidance for establishing and verify a conversion relationship between routine methods results and anchor method results. 13 pp. www.iso.org.
- [6] คู่มือการแปลผล 3M PetrifilmTM *E. coli*/Coliform Count Plate.