

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม ในน้ำนมโคด้วยเทคนิค Petrifilm

มัญชุ อีสวงษ์ กชพรรณ บวรชัยฤทธิ์ สมชาย วงศ์สมุทร
กิตติลักษณ์ ไม้เลียง ดวงรัตน์ ไกรกิจการ

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในน้ำนมโคด้วยเทคนิค Petrifilm โดยห้องปฏิบัติการได้ทำการดัดแปลงจาก Reference method AOAC Official Method 990.12 ในขั้นตอนการเจือจางตัวอย่าง (Dilution of sample) ทั้งนี้วิธีมาตรฐานระบุให้ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำนมก่อนลงแผ่นฟิล์ม Petrifilm ในอัตราส่วนตัวอย่างน้ำนม 11 ml ใน diluents ปริมาตร 99 ml โดยห้องปฏิบัติการได้ดัดแปลงวิธีการทดสอบในขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างเป็นปิเปตตัวอย่างน้ำนม 1 ml ใส่ใน diluents ปริมาตร 9 ml เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่าง 2 วิธีผลการทดสอบได้ค่า Critical level (3 cfu/ml) และ coefficient of variation (0.5772%) R^2 (0.9970) intercept (0.0141) Slope b (0.9916) และไม่มีนัยสำคัญของความแตกต่างทางสถิติ สรุปได้ว่า In-house method สามารถนำมาใช้ทดสอบหาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในตัวอย่างนมได้

คำสำคัญ แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม น้ำนม การตรวจสอบความใช้ได้

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation of Enumeration of total coliforms in milk by Petrifilm

Monchu Oswong Kotchaphan Bowonchaiyarit Somchai Wongsamoot
Kitiluck Maileang Duangrat Kraikitchakan

Abstract

In-house laboratory method was modified from Reference method AOAC Official Method 990.12 in part of sample dilution. The assessment was based on change volume of a sample dilution. Reference method recommend 11 ml of each milk sample to 99 ml diluent and In-house laboratory method use 1 ml of the milk sample to 9 ml of diluent. Evaluated results between 2 methods was analysed using ANOVA and paired t-test. Critical level (3 cfu/ml) and coefficient of variation (0.5772%), R^2 (0.9970), intercept (0.0141) Slope b (0.9916) have been shown that results from In-house method were equivalent to Reference method without statistical significantly differences. The obtained results were indicated that In-house laboratory method was suitable for enumeration of total coliforms in milk.

Keywords: coliforms, milk, Petrifilm, Method validation

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

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม ในน้ำนมโคด้วยเทคนิค Petrifilm

มัณฑุ อัสววงษ์ กชพรรณ บวรชัยฤทธิ์ สมชาย วงศ์สมุทร
กิตติลักษณ์ ไม่เลี้ยง ดวงรัตน์ ไกรกิจการ

บทนำ

แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ซึ่งสามารถพบเชื้อได้เป็นปกติในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น และพบเป็นจำนวนมากในอุจจาระ การพบโคลิฟอร์มในน้ำนมดิบจึงมีความสำคัญ และใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขลักษณะของฟาร์ม การปนเปื้อนสิ่งปนเปื้อนภายในฟาร์มและเป็นดัชนีบ่งชี้ความเสี่ยงที่จะพบจุลินทรีย์ก่อโรคได้ สำหรับมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 6003-2553 ระบุให้น้ำนมดิบสามารถตรวจพบจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มไม่เกิน 10^4 cfu /ml โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานของ ISO 4832 หรือวิธีอื่นที่มีความถูกต้องเทียบเท่า

ในปัจจุบันกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้ใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ *E. coli*/Coliform โดยการใช้แผ่นฟิล์ม Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count Plate เป็นวิธีมาตรฐานตาม Official Method of Analysis of AOAC International. 2012. 19th Method 991.14 ซึ่งสามารถวิเคราะห์เชื้อได้สะดวกและรวดเร็ว ซึ่งวิธีการตรวจสอบเชื่อดังกล่าวอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อไวโอลิตเรดไบส (VRB) โดยอาศัยหลักการการทำงานปฏิกิริยาจากเอ็นไซม์กลูคิวโรนิเดส และสีย้อมเพื่อช่วยในการนับจำนวน ทั้งนี้วิธีมาตรฐานระบุให้ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำนมก่อนลงแผ่นฟิล์ม Petrifilm ในอัตราส่วนตัวอย่างน้ำนม 1 ml ใน diluents ปริมาตร 99 ml ซึ่งเป็นการใช้ปริมาตรสารเคมีที่ค่อนข้างมีปริมาณมาก ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงได้ดัดแปลงวิธีการทดสอบหาในขั้นตอนการเจือจางตัวอย่าง (Dilution of sample) จากวิธีมาตรฐานระบุให้เป็นวิธีของห้องปฏิบัติการ (In-house method) โดยปิเปตตัวอย่างน้ำนม 1 ml ใส่ใน diluents ที่ 1 ปริมาตร 9 ml

1.วัตถุประสงค์

เพื่อการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในน้ำนมด้วยเทคนิค Petrifilm

2.ขอบข่าย

ดำเนินการเปรียบเทียบวิธีการเจือจางตัวอย่างน้ำนม 2 วิธี ประกอบด้วย วิธี Official Method of Analysis of AOAC International. 2012. 19th Method 991.14 และ วิธีของห้องปฏิบัติการ (In-house method)

3. ผลประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ลดระยะเวลาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 ลดการใช้จ่ายในการซื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ

4.วิธีดำเนินการ

4.1 การเตรียมเชื้อมาตรฐาน

ใช้ loop ปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 จาก stock culture ลงใน TSB และ TSA plate ที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลาม้วนนำเชื้อที่ได้ไปทดสอบโดยเลือกโคโลนีเดี่ยวลงบน TSB tube จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวทดสอบย้อมสีแกรม และใช้ sterile pipette ขนาด 1 ml ถ่ายเชื้อจาก TSB ปริมาตร 1 ml ลงใน diluent 9 ml เจือจางจาก 10^{-1} จนถึง 10^{-9} ใช้ sterile plate ขนาด 1 ml ถ่ายเชื้อจาก diluent ที่ต้องการลงใน sterile plate เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงใน plate ผสมเข้ากับเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลาทำการนับจำนวนโคโลนี เมื่อทราบปริมาณเชื้อแล้วใช้ sterile pipette ขนาด 1 ml ถ่ายเชื้อจาก TSB ปริมาตร 1 ml ลงใน diluent 9 ml เจือจางจนระดับ dilution ที่ต้องการและเลือก dilution นำเชื้อที่ทำ serial dilution นำมานับจำนวนโดยวิธี pour plate ควบคู่ไปด้วยเพื่อดูจำนวนเชื้อที่แท้จริงที่เติมลงในตัวอย่าง

4.2 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และตัวอย่างน้ำนมโคดิบธรรมชาติจากศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบที่ส่งตรวจตัวอย่างเป็นประจำ

4.3 วิธีทดสอบ

ทดสอบตัวอย่างโดยดัดแปลงวิธีการทดสอบหาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในน้ำนมด้วยเทคนิค Petrifilm จากวิธีมาตรฐาน Official Method of Analysis of AOAC International. 2012. 19th Method 991.14 โดยดัดแปลงในขั้นตอนการเจือจางตัวอย่าง (Dilution of sample) จากวิธีมาตรฐานระบุให้ ปิเปตตัวอย่างน้ำนม 11 ml ใส่ใน diluents ที่ 1 ปริมาตร 99 ml เป็นวิธีของห้องปฏิบัติการ (In-house method) โดยปิเปตตัวอย่างน้ำนม 1 ml ใส่ใน diluents ที่ 1 ปริมาตร 9 ml ส่วนขั้นตอนอื่นให้ปฏิบัติตามวิธีมาตรฐาน

4.4 คำนวณหาค่า Critical level (LC)

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ให้มีระดับการปนเปื้อน 5 ระดับ ประกอบด้วย ระดับ 3, 10, 30, 100 cfu/ml ของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ ทำการทดสอบทั้ง 5 ระดับ ระดับละ 6 ซ้ำ โดยนำตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (เช่น นมยูเอชที) ใส่ขวดแก้วหรือหลอดแก้วปลอดเชื้อและเติมเชื้อที่เตรียมไว้ให้ได้สัดส่วน นม 9 ml : เชื้อ 1 ml นำตัวอย่างไปทดสอบตามวิธีของห้องปฏิบัติการ

4.5 สถิติที่ใช้ในการทดสอบ

ประเมินผลโดยการหาค่า % Coefficient of variation (% CV) การทดสอบทางสถิติโดยใช้ Paired t- test การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (Simple linear regression analysis) ค่า intercept y , Slope b , Residue standard deviation (STEYX) กำลังสองของค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ coefficient of determination ($R^2 = RSQ$), Residual plot และ Line fit plot โดยเกณฑ์การยอมรับ ค่า Intercept y ควรมีค่าเท่ากับ 0 หรือเข้าใกล้ 0, Slope b ควรมีค่าเท่ากับ 1 หรือเข้าใกล้ 1, Residue standard deviation (STEYX) ควรเข้าใกล้ 0, กำลังสองของค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ coefficient of determination ($R^2 = RSQ$) ควรมีค่า 0.90 ขึ้นไป, Line fit plots ควรได้กราฟเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า R square, ค่า Intercept (a) และ X variable 1 (b) โดยเมื่อ a เข้าใกล้ 0 และ b เข้าใกล้ 1 กราฟที่ได้จะเป็นเส้นตรง ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าวิธีที่ใช้ทดสอบมี accuracy

5.ผลการทดลอง

5.1 การทดสอบหาค่า Critical level (LC) ของการหาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มด้วยเทคนิค Petrifilm เพื่อจุลินทรีย์อ้างอิง : *Escherichia coli* ATCC 25922 จากการทดสอบการหาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มด้วยเทคนิค Petrifilm ในตัวอย่างน้ำนม ให้ผลการทดสอบดังนี้

1. ระดับที่ 1 3 cfu/ml = 3/6 ครั้ง
2. ระดับที่ 2 10 cfu/ml = 5/6 ครั้ง
3. ระดับที่ 3 30 cfu/ml = 6/6 ครั้ง
4. ระดับที่ 4 100 cfu/ml = 6/6 ครั้ง

จากการทดสอบการหาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มด้วยเทคนิค Petrifilm พบว่า ที่ระดับการปนเปื้อน 3 cfu/ml สามารถตรวจพบจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม 3 ครั้ง จากการทดสอบ 6 ครั้ง ระดับการปนเปื้อน 10 cfu/ml สามารถตรวจพบจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม 5 ครั้งจากการทดสอบ 6 ครั้ง ระดับการปนเปื้อนของเชื้อที่ 30-100 cfu/ml สามารถตรวจพบจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มพบ 6 ครั้งจากการทดสอบ 6 ครั้ง ดังนั้น Critical level (LC) ของวิธี In-house method ที่ห้องปฏิบัติการได้ดัดแปลงจาก Reference method : Official Method of Analysis of AOAC International. 2012. 19th Method 991.14 เท่ากับ 3 cfu/ml

5.2 การคำนวณหา Coefficient of Variation

ในการทดสอบด้วยวิธี reference method และ In-house method โดยทำการทดสอบหาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มด้วยเทคนิค Petrifilm ในตัวอย่างน้ำนมเป็นดังนี้

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบหาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มด้วยเทคนิค Petrifilm ในตัวอย่างน้ำนม

Sample	Reference (cfu/mL)	In-house (cfu/mL)	Log 10 Reference	Log 10 In-house	M_i	S_i
1	2,200	2,200	3.3424	3.3424	3.3424	0.0000
2	6,400	6,500	3.8062	3.8129	3.8095	0.0048
3	6,500	6,400	3.8129	3.8062	3.8095	0.0048
4	7,800	7,600	3.8921	3.8808	3.8865	0.0080

Sample	Reference (cfu/mL)	In-house (cfu/mL)	Log 10 Reference	Log 10 In-house	<i>Mi</i>	<i>Si</i>
5	79,000	78,000	4.8976	4.8921	4.8949	0.0039
6	150,000	140,000	5.1761	5.1461	5.1611	0.0212
7	7,600	8,000	3.8808	3.9031	3.8920	0.0158
8	130,000	110,000	5.1139	5.0414	5.0777	0.0513
9	14,000	13,000	4.1461	4.1139	4.1300	0.0228
10	1400	1400	3.1461	3.1461	3.1461	0.0000
11	4,400	4,000	3.6435	3.6021	3.6228	0.0293
12	13,000	12,000	4.1139	4.0792	4.0966	0.0246
13	93000	92000	4.9685	4.9638	4.9661	0.0033
14	120	120	2.0792	2.0792	2.0792	0.0000
15	560	760	2.7482	2.8808	2.8145	0.0938
16	26,000	24,000	4.4150	4.3802	4.3976	0.0246
17	1,000	860	3.0000	2.9345	2.9672	0.0463
18	22,000	20,000	4.3424	4.3010	4.3217	0.0293
19	58,000	55,000	4.7634	4.7404	4.7519	0.0163
20	6,400	6,600	3.8062	3.8195	3.8129	0.0094
21	12,000	11,000	4.0792	4.0414	4.0603	0.0267
22	6,100	7,000	3.7853	3.8451	3.8152	0.0423
23	17,000	14,000	4.2304	4.1461	4.1883	0.0596
24	1,300	1,300	3.1139	3.1139	3.1139	0.0000
25	1,700	1,800	3.2304	3.2553	3.2429	0.0176
26	600	520	2.7782	2.7160	2.7471	0.0439
27	590	540	2.7709	2.7324	2.7516	0.0272
28	520	470	2.7160	2.6721	2.6941	0.0310

Sample	Reference (cfu/mL)	In-house (cfu/mL)	Log 10 Reference	Log 10 In-house	Mi	Si
29	280	300	2.4472	2.4771	2.4621	0.0212
30	340	260	2.5315	2.4150	2.4732	0.0824
				MED(Mi)	3.8112	
					Sr	0.0220

$$\begin{aligned}\text{สูตร \% CV} &= \frac{Sr}{MED(Mi)} \times 100 \\ \text{แทนค่า} &= \frac{0.0220}{3.8112} \times 100 \\ &= 0.5772\end{aligned}$$

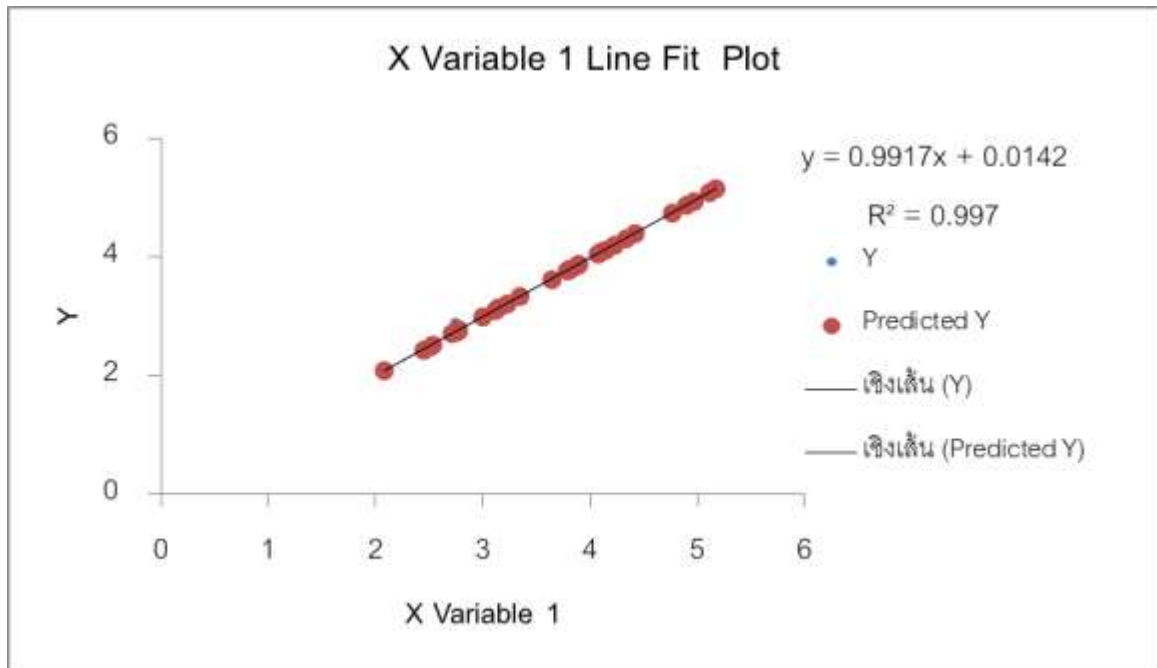
จากผลการทดสอบ พบว่าค่า Coefficient of Variation (CV %) จากการคำนวณเท่ากับ 0.5772 ผ่านตามเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งเกณฑ์กำหนดค่า Coefficient of Variation ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 เกณฑ์การยอมรับ Coefficient of Variation (% CV) $\leq 10\%$

5.3 การประมวลผลทางสถิติ

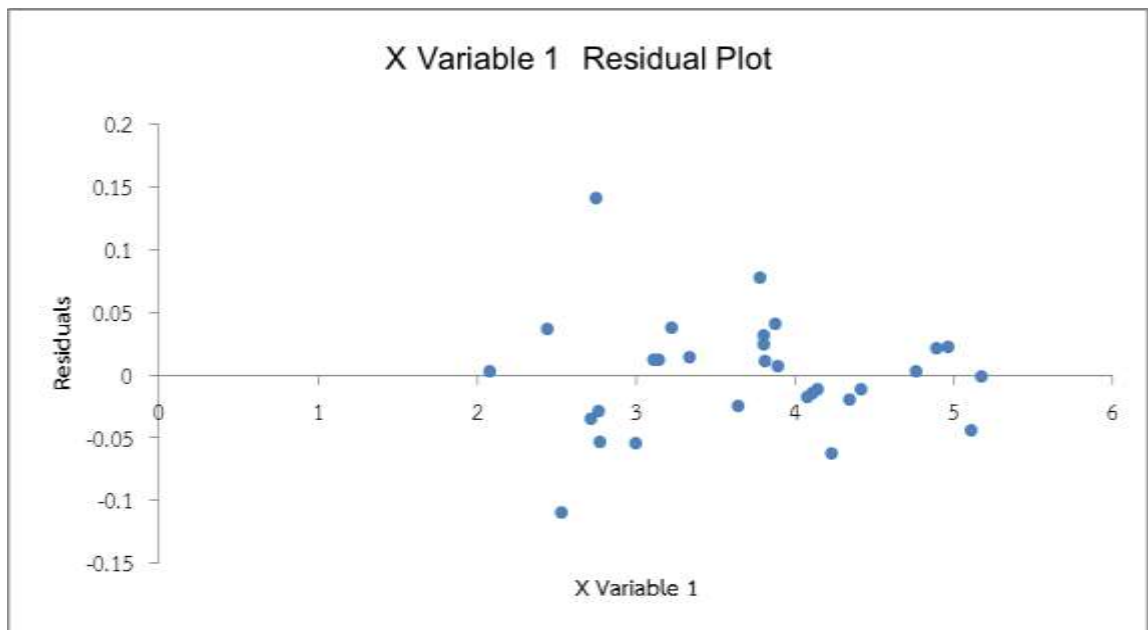
5.3.1 ผลการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (Simple linear regression analysis) เปรียบเทียบความแตกต่างและความสัมพันธ์ระหว่างวิธี Reference method และ In-house method โดยวิเคราะห์การทดสอบเชิงเส้นอย่างง่าย (Sample linear regression analysis) พบว่าค่า Slope b = 0.9916 ค่า Intercept y = 0.0141 Residue standard deviation (STEYX) = 0.0467 กำลังสองของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ Coefficient of determination (R^2) = 0.9970

Residual plot (กราฟแสดง linearity หรือ lack of fit) ค่าอยู่ในช่วง ± 0.15 แสดงว่า no lack of accuracy and linear (รูป 2) Line fit plots ได้กราฟเส้นตรง ซึ่งดูความสัมพันธ์จากสมการเส้นตรง พิจารณาจากค่า R square = 0.9970 ค่า Intercept y = 0.0141 และ Slope b = 0.9916 (รูป 1) โดยเมื่อ a เข้าใกล้ 0 และ b เข้าใกล้ 1 กราฟที่ได้จะเป็นเส้นตรง ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าวิธีนี้ใช้ทดสอบ accuracy

รูป 1 แสดง Line fit plot



รูป 2 กราฟแสดงการกระจายตัวของข้อมูล Residual plot



5.3.2 การทดสอบทางสถิติโดยใช้ Paired t-test

ผลการเปรียบเทียบค่า t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ degree of freedom = N -1 พบว่า t-stat (-1.9575) < t Critical two-tail (2.0484) (ตารางที่ 2) แสดงว่า In-house method ให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ Reference method

	Variable 1	Variable 2
Mean	3.687509587	3.704661
Variance	0.729435065	0.739165
Observations	29	29
Pearson Correlation	0.998506037	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	28	
t Stat	-1.95755268	
P(T<=t) one-tail	0.03015869	
t Critical one-tail	1.701130908	
P(T<=t) two-tail	0.06031738	
t Critical two-tail	2.048407115	

6.สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบทั้งหมดพบว่าการหาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มตาม Reference method และ In-house method เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วมีค่าทางสถิติไม่แตกต่างกัน ดังนั้นสรุปได้ว่า In-house method ที่ห้องปฏิบัติการได้ดัดแปลงจาก Reference method AOAC Official Method 990.12 สามารถนำมาใช้ทดสอบหาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในตัวอย่างนม ภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยากลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมได้

7.ข้อเสนอแนะ

ขณะปล่อยสารละลายลงบนแผ่นฟิล์ม Petrifilm ควรระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศเนื่องจากมีผลต่อการอ่านผลทดสอบ

8.กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ นายไพโรจน์ อารังโภาส ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ เจ้าหน้าที่กลุ่ม ตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ที่ช่วยดำเนินการในครั้งนี้จนแล้วเสร็จ

9.เอกสารอ้างอิง

- [1] ISO. 2016. 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
- [2] Methods of Analysis of AOAC International. 2016. 20th Method 991.14.
- [3] คู่มือการแปลผล 3M PetrifilmTM *E. coli*/Coliform Count Plate.