

การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมดิบ ด้วยเครื่อง Bactoscan

สมชาย วงศ์สมุทร มัญชุ อื้อสงวงศ์ กชพรรณ บวรชัยฤทธิ์ สุพัฒตรา คำแก้ว ทศนีย์ ไกรดงพลอง

บทคัดย่อ

BactoScan เป็นเครื่องตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในน้ำนมแบบอัตโนมัติ สำหรับตรวจนับปริมาณ bacteria ในน้ำนมดิบใช้หลักการ Flow Cytometry ร่วมกับการย้อมสีเซลล์ของแบคทีเรียด้วย Fluorescent dye-ethidium bromide โดยมีหน่วยการนับเป็น Individual Bacteria Count / μ l (IBC/ μ l) จำนวน 1,137 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์เทียบผลระหว่างวิธี AOAC,Petrifilm™ และวิธี BactoScan โดยวิเคราะห์ตัวอย่างแบบวิธี Duplicate (การทำซ้ำ) นำผลการวิเคราะห์แปลงค่าเป็น Log 10 เพื่อให้สอดคล้องกับข้อกำหนด ISO 21187:2004 สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างวิธี AOAC,Petrifilm™ และ BactoScan ค่า Sy,x จากสมการที่ได้มีค่า 0.28 และทำการวิเคราะห์การถดถอย จะได้สมการ $\text{Log}_{10}(\text{Total Viable Count}) = 1.03 \times \text{Log}_{10}(\text{IBC}) - 0.66$ $r^2 = 0.86$ ซึ่งยอมรับได้ตามข้อกำหนด ISO 21187:2004

คำสำคัญ: วิธีการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมด น้ำนมดิบ เครื่อง Bactoscan

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Development of Determination of Bacterial Count in Milk by using BactoScan

Somchai Wongsamut Monchu Oswong Kotchaplan Bowonchaiyarit
Supattra Kumkeaw Thatsanee Kraidongplong

Abstract

BactoScan is a bacterial count automatic equipment employed counting of bacteria which genetic materials have been stained with Fluorescent dye-ethidium bromide, using flow cytometry methods for enumeration of bacteria in milk as Individual Bacterial Count per microlitre(IBC/ μ l). To ameliorate of flow cytometry techniques for milk samples, a conversion from IBC to TVCs is needed. The experiment analysed 1,137 routine samples of raw milk that undertook duplicate analysis with reference standard method, AOAC,PetrifilmTM and BactoScan for comparison. The enumeration results were taken into Log₁₀ to meet ISO 21187:2004 for data analysis. The BactoScan conversion factor was determined to be: Log₁₀ (Total Viable Count) = 1.03x Log₁₀ (IBC)-0.66 and $r^2=0.86$, with Sy,x = 0.28. Results were complied with ISO 21187:2004.

Keywords: BactoScan, Bacterial Count, Milk

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

การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมดิบด้วยเครื่อง Bactoscan

สมชาย วงศ์สมุทร มัญชุ อื้อสงวษ์ กชพรรณ บวรชัยฤทธิ์ สุพัฒตรา คำแก้ว ทศนีย์ ไกรดงพลอง

บทนำ

ปัจจุบันมาตรฐานสินค้าเกษตร หรือ มกษ. 5003:2553 ได้กำหนดให้แบคทีเรียในน้ำนมดิบมีจำนวนไม่เกิน 500,000 cfu/mL เครื่องวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบแบบอัตโนมัติ หรือเครื่อง BactoScan เป็นเครื่องมือซึ่งใช้เทคนิค Flow Cytometry สามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบจำนวนมากได้อย่างรวดเร็วถึง 50 ตัวอย่างต่อ 1 ชั่วโมง และแสดงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเป็นหน่วย Individual Bacterial Count per microlitre (IBC/ μ L) หรือวิเคราะห์ความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียสามารถจะสร้างโคโลนี ซึ่งมีความแตกต่างจากโคโลนีที่เกิดขึ้นได้จริง โดยการตรวจวิเคราะห์จะเป็นผลมาจากการย้อมสี DNA หรือ RNA ของแบคทีเรียด้วย Fluorescent ethidium bromide ในขณะที่วิธีการมาตรฐาน ได้แก่ วิธี AOAC, Petrifilm™ ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นาน 48 ชั่วโมง แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเป็นหน่วย cfu/ml

เนื่องจากแบคทีเรียในน้ำนมดิบมีการแปรผันไปตามปัจจัยซึ่งมีความแตกต่างหลากหลาย เช่น สภาพภูมิอากาศ ความชื้น ภูมิประเทศ และอุณหภูมิ เป็นต้น ทำให้ความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียจะสามารถสร้างโคโลนีมีความแตกต่างกัน การใช้งานเครื่อง BactoScan จึงต้องมีการพัฒนาสมการเพื่อใช้ในการแปลงค่าระหว่างหน่วย IBC/ μ L และ cfu/ml ซึ่งเป็นค่าที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน ทั้งนี้เครื่อง BactoScan เป็นเครื่องมืออัตโนมัติที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์น้ำนมดิบจำนวนมาก เช่น น้ำนมดิบรายฟาร์ม หรือน้ำนมดิบตามศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบ หรือสหกรณ์โคนมที่ต้องการผลวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็ว แม่นยำ ใช้กำลังคนน้อย และไม่ต้องใช้เจ้าหน้าที่ที่มีความเชี่ยวชาญระดับสูงในการทำการวิเคราะห์

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง IBC และ cfu เพื่อให้การใช้งานเครื่อง BactoScan เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน เพื่อให้สามารถเป็นวิธีทางเลือกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบ

1. วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบของเครื่อง BactoScan เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน
2. สร้างสมการการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบเพื่อใช้กับเครื่อง BactoScan

2. ขอบข่าย

1. วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด หรือ Total Bacterial Count ในตัวอย่างน้ำนมโดยใช้เครื่อง BactoScan ซึ่งมีหลักการ Flow Cytometry ร่วมกับการย้อมสีสารฟลูออโรสของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Fluorescent dye ethidium bromide เปรียบเทียบกับ วิธี AOAC, Petrifilm™
2. ประชากร ได้แก่ น้ำนมดิบรายศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบทั่วประเทศ
3. กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ น้ำนมดิบรายศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบในเขต 1 จำนวน 35 ศูนย์ ส่งตรวจรายเดือนจำนวนอย่างน้อย 1 ตัวอย่างต่อหนึ่งศูนย์รวมน้ำนมดิบ

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมดิบจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว ผลทดสอบมีความถูกต้องเชื่อถือได้
2. เพื่อใช้เครื่องมืออัตโนมัติ BactoScan ในการแก้ไขปัญหาด้านสุขอนามัยของฟาร์ม และ ศูนย์รวมน้ำนมดิบ

4. วิธีดำเนินการ

ก. การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำนมดิบจำนวน 1,137 ตัวอย่าง เก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่เกิน 4.4 องศาเซลเซียสจากตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังรวมของสหกรณ์โคนม หรือ ถังรวมของศูนย์รวมน้ำนมดิบส่งตรวจวิเคราะห์เป็นประจำกับห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO17025:2005 ในขอบข่ายวิธี AOAC, Petrifilm™

ข. การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ตามวิธีมาตรฐาน AOAC, Petrifilm™

ปิเปตตัวอย่างน้ำนมดิบปริมาตร 1 ml ลงใน Butterfield's phosphate buffered water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1:100, 1:1000 และ 1:10000 และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Petrifilm Aerobic Plate Count ป่มที่อุณหภูมิ $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 48 ± 3 ชั่วโมง

การเตรียม bacterial control sample

เติมสารละลาย Re-hydration ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวด Bacterial Control Sample ปิดฝา กลับขวดไปมา 3 ครั้ง จนละลายเข้ากัน เทลงในภาชนะ ปิเปต Re-hydration ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวด Bacterial Control Sample เพื่อล้างสารที่ค้างอยู่ ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย Re-hydration จนได้ 100 มิลลิลิตร ± 2 เปอร์เซ็นต์ แซ่ตูเย็นที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถึงการวัดเนื่องจากความร้อนมีผลต่อ Mean Value

การเตรียม Preservative Stock Solution

ละลาย Boric acid, Potassium sorbate และ Glycerol ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร บั่นให้ละลายด้วยความร้อน 40 องศาเซลเซียส แซ่เย็นที่อุณหภูมิ 2 – 5 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย Re-hydration สำหรับ Bacterial Control Sample

ละลาย $\frac{1}{4}$ strenght Ringer Tablets ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติม Preservative Stock Solution ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลาย ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

การเตรียมสารละลาย Sheath Liquid

Sheath Liquid Stock Solution

ละลาย Buffer Powder 1 ถูกลงในน้ำกลั่น โดยให้ความร้อน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บั่นจนละลายหมด เติม Detergent 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนได้ 10 ลิตร ± 2 เปอร์เซ็นต์

Ready to use sheath Liquid

เทน้ำกลั่นปริมาตร 8 ลิตร $\pm 10\%$ ลงในถังขนาด 10 ลิตร เติมสารละลาย Sheath Liquid Stock ปริมาตร 2 ลิตร $\pm 10\%$ ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม Blank Solution

นำสารละลาย Sheath Liquid Stock ปริมาตร 50 มิลลิลิตร $\pm$ 10 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 1 ลิตร $\pm$ 10 เปอร์เซ็นต์

การเตรียม Staining Reagent stock solution

ละลาย Buffer powder 1 ถุง ลงในน้ำกลั่น โดยให้ความร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เติม BactoScan FC Staining medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเทลงใน Buffer powder ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 10 ลิตร

การเตรียมสารละลาย Incubation Reagent

นำสารละลาย Staining Reagent Stock Solution ปริมาตร 190 มิลลิลิตร ใส่ในขวด 1000 มิลลิลิตร เติม Enzyme mini 1 ซอง และ Detergent 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ใช้งานได้ 1 วัน

การเตรียมสารละลาย End of Day สำหรับ 1 สัปดาห์

นำสารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 10 ลิตร $\pm$ 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส

การเตรียม Rinse Solution

นำ Rinse Concentrate 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 50 ลิตร คนให้เข้ากัน เก็บน้ำยาไว้ที่อุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส

การเตรียม Particle Control Sample

นำขวด Particle Control Sample Concentrate วางบน Magnetic stirrer นาน 10 นาที นำ Particle Control Sample หยดลงในสารละลาย Blank ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 5 หยด กลับขวดไปมา Particle Control Sample สามารถใช้งานได้นานไม่เกิน 1 ชั่วโมง

วิธีการวิเคราะห์

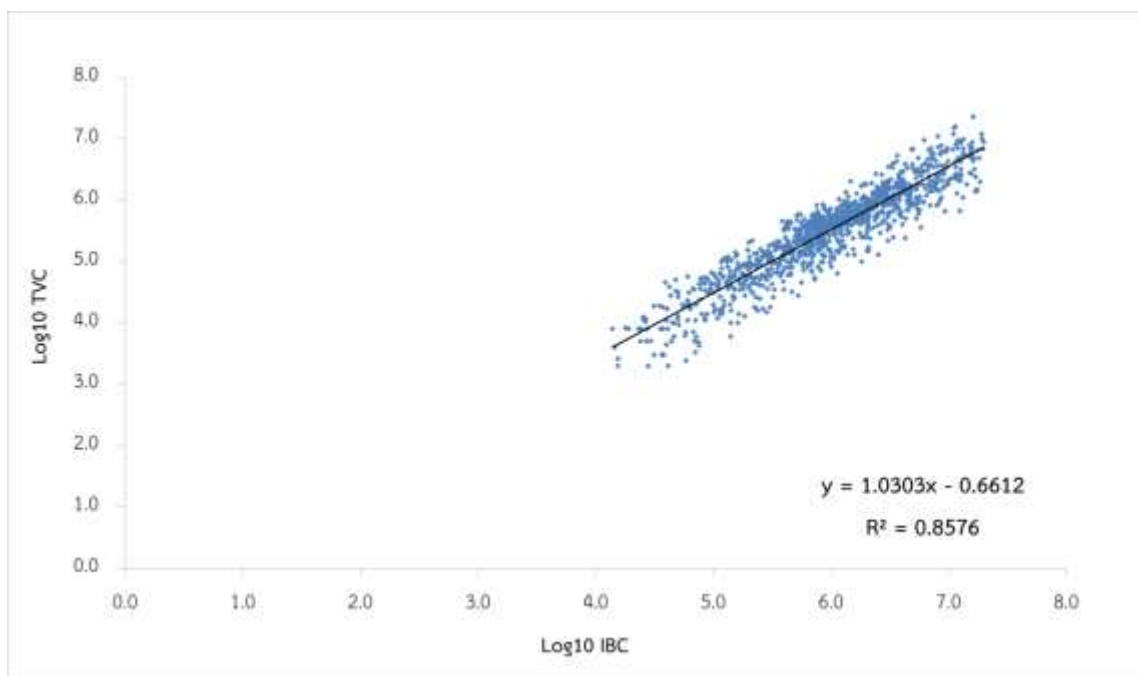
เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างวิธี AOAC, PetrifilmTM และเครื่อง BactoScan โดยให้ระยะเวลาวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีไม่เกิน 20 นาที โดยทุกวิธีวิเคราะห์โดยการทำซ้ำ (duplicate) นำผลวิเคราะห์มาทำการแปลงเป็นค่า $\log_{10}$ และวิเคราะห์ทางสถิติแบบถดถอยเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐาน และเครื่องวิเคราะห์แบบอัตโนมัติตาม ISO 21187:2004

5. ผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบจำนวน 1,137 ตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์เชิงเส้นแบบถดถอย กำหนดให้แกน x = IBC และแกน y = CFU จะได้สมการ

$$\text{Log}_{10} (\text{Total Viable Count}) = 1.030x \text{ Log}_{10} (\text{IBC}) - 0.661, r^2 = 0.857$$

โดยค่า Sy,x จากสมการที่ได้มีค่า 0.282 ดังรูป 1 เมื่อใช้สมการแปลงค่า IBC ไปเป็น CFU พบว่าค่าสูงสุดที่ได้คือ 7.2×10^6 cfu/ml และค่าต่ำที่สุดที่ไปได้ คือ 4.0×10^3 cfu/ml



รูป 1 ความสัมพันธ์ระหว่างแกน X; Log_{10} ผลวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย Petrifilm aerobic count และแกน Y; Log_{10} ผลวิเคราะห์ตัวอย่างจากเครื่อง BactoScan จำนวนทั้งหมด 1,137 ตัวอย่าง

6. สรุปผลการทดลอง

ตัวอย่างน้ำนมดิบ (n=1,137) ได้ทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธี AOAC, Petrifilm™ และเครื่อง BactoScan ผลการวิเคราะห์ได้นำไปใช้เป็นปัจจัยเพื่อทำการแปลงค่าของเครื่อง BactoScan ตามสมการ

$$\text{Log}_{10} (\text{Total Viable Count}) = 1.030x \text{ Log}_{10} (\text{IBC}) - 0.661, r^2 = 0.857$$

ซึ่งสมการนี้ได้ดำเนินการสอดคล้องกับ ISO 21187:2004 และระดับของความเที่ยงเป็นที่น่าพึงพอใจ คือ $Sy,x = 2.82 \log_{10}$ และตัวอย่างที่ใช้ทำการวิเคราะห์ได้ทำการวิเคราะห์โดยมีการควบคุมคุณภาพภายในตามมาตรฐาน ISO 7218 ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนต่ำ

7. ข้อเสนอแนะ

การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ BactoScan อาจมีความแตกต่างจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานเป็นอย่างมากหากตัวอย่างมีจำนวนเชื้อตายมากกว่าเชื้อที่มีชีวิต ทั้งนี้เนื่องจากวิธี AOAC, Petrifilm™ นับโคโลนีของเชื้อซึ่งเจริญมาจากเชื้อที่มีชีวิตเท่านั้นแต่ BactoScan จะนับปริมาณเชื้อทั้งเชื้อเป็นและตาย ทั้งนี้จะลดความแตกต่างได้เมื่อรักษาตัวอย่างตามวิธีที่กำหนด และระยะเวลาจากที่เก็บตัวอย่างจนกระทั่งวิเคราะห์ควรน้อยที่สุด และควรทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตาม ISO 16140:2016 เพื่อศึกษาความสอดคล้องของวิธีการก่อนนำมาใช้ในงานประจำ

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินการทดลอง

9. เอกสารอ้างอิง

- [1] Official Methods of Analysis of AOAC International. 2016. 20th 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.