

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ ในน้ำนมโคดิบโดยเทคนิค Flow cytometry

ปารัช ขุนพรม¹ สมชาย วงศ์สมุทร¹

บทคัดย่อ

ผลงานวิชาการฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบตามมาตรฐานวิธีทดสอบ ISO13366-2 : 2006 และมาตรฐาน ISO 8196-3: 2009 รวมถึงทำการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ผลการศึกษาพบพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการทวนสอบประกอบด้วย การตรวจสอบการไม่มีอยู่ของโซมาติกเซลล์ การปนเปื้อนข้ามระหว่างตัวอย่าง ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ความแม่นยำ ซีดจำกัดล่างและขีดจำกัดบน ความเที่ยงประจำวันและความเสถียรระยะสั้น และความเที่ยง ผลการทวนสอบพบค่าเฉลี่ยการตรวจสอบการไม่มีอยู่ของโซมาติกเซลล์เท่ากับ 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การปนเปื้อนข้ามระหว่างตัวอย่างน้ำนมที่มีจำนวนโซมาติกเซลล์ 774,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 0.28% วิธีทดสอบมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 105,000 ถึง 1,034,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซีดจำกัดล่างเท่ากับ 105,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและขีดจำกัดบน เท่ากับ 1,034,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การทดสอบความแม่นยำโดยใช้วัสดุอ้างอิงน้ำนมโคดิบ 5 ระดับ พบว่าค่าเฉลี่ยของการทดสอบไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % การทดสอบความเที่ยงประจำวันและความเสถียรระยะสั้นที่ระดับจำนวนโซมาติกเซลล์ 170,000 570,000 และ 940,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันการทำซ้ำและค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันการทำซ้ำในระยะเวลาต่างกันทุกระดับอยู่ในเกณฑ์ยอมรับและไม่พบการเบี่ยงเบนของผลการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % ความเที่ยงของการทดสอบตัวอย่างน้ำนมโคดิบถึงรวมรายฟาร์มที่แตกต่างกันจำนวน 20 ตัวอย่างพบผลทดสอบแต่ละตัวอย่างทั้งหมดเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด ทั้งนี้ ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ในแต่ละพารามิเตอร์พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสมกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์และสามารถใช้ข้อมูลในการขอรับการรับรอง ISO/IEC 17025:2017 ได้ รวมถึงห้องปฏิบัติการอื่นสามารถใช้เป็นแนวทางเพื่อทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบได้

คำสำคัญ: ทวนสอบความใช้ได้ของวิธี โซมาติกเซลล์ น้ำนมโคดิบ เทคนิค flow cytometry

เลขทะเบียนวิชาการ : 65(2)-0304-041

¹ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

91 หมู่ที่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000

Method verification for enumeration of somatic cells in raw cow milk by flow cytometry technique

Paruch Kunprom¹ Somchai Wongsamoot¹

Abstract

This research paper aimed to study the appropriate performance parameter of verification for enumeration of somatic cells in raw cow milk by flow cytometry technique according to ISO 13366-2: 2006 and ISO 8196-3: 2009. In addition, the test method of the Bureau of Quality Control of Livestock Products is verified. The results of the appropriate parameter should be considered in the verification including blank checks, carry-over effect, linearity, accuracy, lower limits and upper limit, daily precision and short-term stability and precision. The result showed the mean of blank checks is 100 cells/mL. The calculated carry-over effect for 774,000 cells/mL was 0.28 %. The results were shown the linear range from 105,000 to 1,034,000 cells/mL. The lower limit of quantification is 105,000 cells/mL. The upper limit of quantification is 1,034,000 cells/mL. The accuracy test using five levels of raw cow milk reference material was not significant statistically different between test value and reference value at 95% confidence level. The data of daily precision and short-term stability in samples at 170,000 570,000 and 940,000 cells/mL were used to calculate the coefficient variation of repeatability ($\%S_{r,daily}$) and coefficient variation of daily reproducibility ($\%S_{R,daily}$). The $\%S_{r,daily}$ and $\%S_{R,daily}$ complied with limits in the entire range. No significant deviation of the test result was observed at 95% confidence level. The precision was evaluated on 20 individual raw herd bulk cow milk samples. The precision was calculated for each milk sample. The results were compiled with the limits. The results of this verification were within the acceptance criteria. Therefore, this method fitted for the intended usage. The results from this study can be used for ISO/IEC 17025: 2017 accreditation. Other laboratories can also use as guidelines for verifying their method enumeration of somatic cells in raw cow milk.

Keywords : method verification, somatic cells, raw cow milk, flow cytometry technique

Registered No : 65(2)-0304-041

¹Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

91 Moo 4 Tiwanon road, Bangkadee subdistrict, Muang district, Pathumthani province, Thailand, 12000

บทนำ

จำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบจากถังรวมนมของฟาร์มสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดถึงระดับปัญหาเต้านมอักเสบได้ทั้งแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการ (Li *et al.*, 2014) ทั้งนี้ปัญหาเต้านมอักเสบส่งผลต่ออายุการเก็บรักษาและคุณภาพทางประสาทสัมผัส (sensory quality) ของผลิตภัณฑ์นมได้ (Ma *et al.*, 2000) มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 6003-2553 เรื่อง น้ำนมโคดิบ โดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กำหนดให้น้ำนมโคดิบมีจำนวนโซมาติกเซลล์ไม่เกิน 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ประกาศคณะกรรมการอาหารนมเพื่อเด็กและเยาวชน เรื่อง หลักเกณฑ์และวิธีการดำเนินงานโครงการอาหารเสริม (นม) โรงเรียน ประจำปีการศึกษา 2564 ระบุว่าคุณสมบัติของผู้ประกอบการผลิตภัณฑ์นมที่เข้าร่วมโครงการ ณ วันรับสมัครต้องมีผลวิเคราะห์คุณภาพน้ำนมเฉลี่ยย้อนหลังของจำนวนโซมาติกเซลล์ ไม่เกิน 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและในการผลิตนมโรงเรียนผู้ประกอบการผลิตภัณฑ์นมที่เข้าร่วมโครงการต้องใช้ น้ำนมโคดิบจากศูนย์รวบรวมน้ำนมหรือฟาร์มโคนมที่มีจำนวนโซมาติกเซลล์ไม่เกิน 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมของกรมปศุสัตว์เป็นผู้ดำเนินการทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบดังกล่าว

การทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบโดยกรมปศุสัตว์ดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ร่วมกับห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ทั้ง 7 แห่ง ประกอบกับนโยบายของกรมปศุสัตว์ที่ต้องการให้การทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบมีมาตรฐานเดียวกัน สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ในฐานะหน่วยงานหลักที่มีหน้าที่กำกับดูแลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำนมโคดิบ จึงต้องมั่นใจในคุณภาพการทดสอบของห้องปฏิบัติการและคำนึงถึงความถูกต้องแม่นยำของผลทดสอบเป็นสำคัญ รวมถึงพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการโดยการขอรับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2017 เพื่อให้ได้รับการยอมรับในระดับสากล สอดคล้องตามกรอบแผนงานโครงการภายใต้แผนปฏิบัติการด้านโคนมและผลิตภัณฑ์นม ระยะที่ 1 (ปี 2564-2570) แผนปฏิบัติการย่อยที่ 2 การพัฒนาการผลิตน้ำนมโคและอุตสาหกรรมโคนมให้ได้มาตรฐานสากล กลยุทธ์ 4 พัฒนาระบบประกันคุณภาพของน้ำนมดิบ แนวทางที่ 4.1 พัฒนาห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบของศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบและโรงงานแปรรูปให้เข้าสู่ระบบมาตรฐานสากล ซึ่งมีสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์รับผิดชอบในการถ่ายทอดแนวทางการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการให้แก่หน่วยงานภายในกรมปศุสัตว์รวมถึงภาคเอกชน

ปัจจุบันการทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบโดยห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ทั้งหมดใช้เครื่องอัตโนมัติ fluoro-opto-electronic counters โดยเทคนิค flow cytometry ซึ่งมีหลักการทำงาน คือ ตัวอย่างน้ำนมถูกผสมกับบัฟเฟอร์และสีย้อมแล้วถูกป้อนไปยังส่วนตรวจนับที่เป็น capillary flow cell (flow cytometry) โซมาติกเซลล์ที่ถูกย้อมสีจะถูกตรวจจับการเรืองแสง

ด้วยตัวกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสซินโดยสัญญาณที่ได้จะถูก กรอง ขยาย บันทึก และประมวลผล ซึ่งเป็นการทดสอบตามวิธีมาตรฐาน ISO 13366-2: 2006 ดังนั้น เมื่อห้องปฏิบัติการทดสอบตามวิธีมาตรฐานจึงจำเป็นต้องทำการทวนสอบประสิทธิภาพของวิธีการตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2017 ข้อ 7.2.1.5 ที่ระบุไว้ว่า ห้องปฏิบัติการต้องทวนสอบวิธีที่สามารถดำเนินการได้ตามวิธีมาตรฐานได้อย่างถูกต้องก่อนนำวิธีการนั้นมาใช้งาน ทั้งนี้ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ใช้เครื่องมือในการทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ คือ Fossomatic cell counter รุ่น FC จากรายงานสรุปการทดสอบความใช้ได้ของเครื่อง Fossomatic FC (Summary of the MicroVal Validation of the Fossomatic FC) อ้างอิงถึงมาตรฐาน ISO 8196-3:2009 ซึ่งเป็นมาตรฐานที่เกี่ยวกับวิธีการประเมินและการตรวจสอบความถูกต้องโดยรวมของวิธีทางเลือกในเชิงปริมาณของการวิเคราะห์นม ทั้งนี้ พารามิเตอร์ (performance parameter) สำคัญที่ต้องพิจารณาในกระบวนการทวนสอบของวิธีจะขึ้นอยู่กับลักษณะของวิธีทดสอบและกลุ่มตัวอย่างที่อาจพบได้ การประเมินผลต้องใช้จำนวนตัวอย่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติและครอบคลุมช่วงการใช้งานตามวัตถุประสงค์ (NATA,2018)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบตามมาตรฐานวิธีทดสอบ ISO 13366-2 : 2006 และมาตรฐาน ISO 8196-3: 2009 รวมถึงทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการขอรับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2017 และเป็นแนวทางการทวนสอบแก่ห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์และภาคเอกชน เพื่อให้ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำนมโคดิบเป็นมาตรฐานเดียวกัน

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องอัตโนมัติ Fossomatic™ รุ่น FC ยี่ห้อ FOSS
2. เครื่อง conveyor รุ่น 4000 ยี่ห้อ FOSS
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส รุ่น W760 ยี่ห้อ Memmert
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 43 ± 2 องศาเซลเซียส รุ่น WNB45 ยี่ห้อ Memmert
5. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U5412-PB ยี่ห้อ PHCbi
6. ขวดใส่ตัวอย่างทดสอบ
7. pipette aids และ pipette 25 มิลลิลิตร
8. magnetic stirrer
9. erlenmeyer flask

สารมาตรฐานและสารเคมี

1. วัสดุอ้างอิงน้ำหนักโคติบ ซึ่งมีระดับของจำนวนโซมาติกเซลล์ 5 ระดับ โดยได้รับรองมาตรฐาน DAkkS number D-RM-20961-01-00 for DIN EN ISO 17034 : 2016 lot D19M01Y21 ยี่ห้อ QSE GmbH ประเทศ Germany
2. สารละลาย stock solution ยี่ห้อ FOSS
3. สารละลาย buffer diluent Solution ยี่ห้อ FOSS
4. สารละลาย rinse/sheath liquid ยี่ห้อ FOSS
5. สารละลาย Fossomatic Dye ยี่ห้อ FOSS
6. สารละลาย FM Adjustment Sample ยี่ห้อ FOSS
7. น้ำบริสุทธิ์ ค่าการนำไฟฟ้าไม่เกิน 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาข้อมูลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบโซมาติกเซลล์ในน้ำหนักโคติบ
ศึกษาพารามิเตอร์การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบรวมถึงเกณฑ์กำหนดที่ใช้ในการประเมินผล และสรุปพารามิเตอร์และแนวทางที่เหมาะสมในการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำหนักโคติบ
2. ทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์
 - 2.1 ตัวอย่างที่ศึกษา
 - 2.1.1 ตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบการไม่มีอยู่ของโซมาติกเซลล์ ใช้ตัวอย่าง blank solution ที่เตรียมจากสารละลาย rinse/sheath liquid
 - 2.1.2 ตัวอย่างสำหรับทดสอบการปนเปื้อนข้ามระหว่างตัวอย่าง ใช้น้ำหนักโคติบถึงรวมรายฟาร์มที่มีระดับจำนวนโซมาติกเซลล์ไม่น้อยกว่า 750,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ ตัวอย่าง blank solution ที่เตรียมจากสารละลาย rinse/sheath liquid
 - 2.1.3 ตัวอย่างสำหรับทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ซีดจำกัดล่าง ซีดจำกัดบน และความแม่นยำ ใช้วัสดุอ้างอิงน้ำหนักโคติบทั้ง 5 ระดับ ทั้งนี้ก่อนการใช้งานวัสดุอ้างอิงจะถูกเก็บรักษาไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส
 - 2.1.4 ตัวอย่างสำหรับทดสอบความเที่ยงประจำวันและความเสถียรระยะสั้น ใช้น้ำหนักโคติบถึงรวมรายฟาร์มที่มีจำนวนโซมาติกเซลล์ 3 ระดับ ที่อยู่ในช่วง 100,000 ถึง 1,000,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ระดับละ 1 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างแบ่งเป็น 20 ขวด เก็บรักษาตัวอย่างในตู้แช่อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซลเซียส
 - 2.1.5 ตัวอย่างสำหรับทดสอบความเที่ยงใช้น้ำหนักโคติบถึงรวมรายฟาร์มที่แตกต่างกัน จำนวน 20 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างแบ่งเป็น 20 ขวด เก็บรักษาตัวอย่างในตู้แช่อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซลเซียส

2.2 การทดสอบตัวอย่าง

ทดสอบตัวอย่างน้ำมันโคติบด้วยเครื่อง Fossomatic™ รุ่น FC โดยก่อนทำการทดสอบให้อุ่นตัวอย่างน้ำมันโคติบในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรณีวัสดุอ้างอิงต้องให้อุ่นตัวอย่างในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 43 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที หลังจากให้อุ่นตัวอย่างเสร็จให้นำตัวอย่างออกพลิกกลับไปมาอย่างเบาเพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากัน นำตัวอย่างจัดเรียงลงในภาชนะและนำไปวิเคราะห์โดยเลือก Job type เป็นแบบ Normal

2.3 การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

2.3.1 การตรวจสอบการไม่มีอยู่ของโซมาติกเซลล์ (blank checks) โดยทดสอบตัวอย่าง blank solution จำนวน 10 ซ้ำ ประเมินผลทดสอบโดยหาค่าเฉลี่ย มีเกณฑ์การยอมรับที่ $< 3,000$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และค่าผลทดสอบ มีเกณฑ์การยอมรับที่ $< 8,000$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.3.2 การทดสอบหาการปนเปื้อนข้ามระหว่างตัวอย่าง (carry – over effect) โดยการศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างที่มีจำนวนโซมาติกเซลล์เท่ากับ 774,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (M) 1 ตัวอย่าง และตัวอย่าง blank solution (B) 2 ตัวอย่าง จัดเรียงเป็นชุดดังนี้ M,B₁,B₂ จำนวน 5 ชุด ทำการทดสอบ ชุดละ 1 ซ้ำ ต่อเนื่องกันทั้ง 5 ชุด ประเมินผลจากการคำนวณ carry – over effect value (CO) ตามสมการ

$$CO = \frac{(\sum B_1 - \sum B_2)}{(\sum M - \sum B_2)} \times 100$$

โดย B₁ คือ ค่าจากการวัด blank solution ที่ 1

B₂ คือ ค่าจากการวัด blank solution ที่ 2

M คือ ค่าจากการวัดตัวอย่างน้ำมัน

2.3.3 การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) โดยทดสอบตัวอย่างวัสดุอ้างอิงน้ำมันโคติบทั้งหมด 5 ระดับ ทำการวัดระดับละ 10 ซ้ำ ประเมินผลทดสอบจากกราฟ simple linear regression โดยค่าอ้างอิงเป็นแกน x และ ค่าที่วัดได้จากเครื่องเป็นแกน y คำนวณหาค่า the ratio of residual range to signal values range (r_c) ตามสมการ

$$r_c = \frac{(e_{max} - e_{min})}{(M_{max} - M_{min})} \times 100$$

โดย e_{max} คือ ค่า residual ที่สูงที่สุดจาก regression

e_{min} คือ ค่า residual ที่ต่ำที่สุดจาก regression

M_{max} คือ ค่าเฉลี่ยสูงสุดที่วัดได้จากเครื่อง

M_{min} คือ ค่าเฉลี่ยต่ำสุดที่วัดได้จากเครื่อง

2.3.4 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) โดยใช้ผลทดสอบจากข้อ 2.3.3 คำนวณหาค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับ ประเมินผลโดยใช้หลักสถิติทดสอบค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงโดยใช้ t-test เปรียบเทียบค่า t ที่ได้จากการคำนวณ (t_{cal}) กับค่า t ทางสถิติจากตาราง ($t_{critical}$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อ t_{cal} น้อยกว่าค่า $t_{critical}$ แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าจากการทดสอบกับค่าอ้างอิง โดยคำนวณ t_{cal} ตามสมการ

$$t_{cal} = (\bar{x} - \mu) \frac{\sqrt{n}}{s}$$

เมื่อ $\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ย
 μ คือ ค่าอ้างอิง
 s คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)
 n คือ จำนวนครั้งที่วิเคราะห์

2.3.5 การทดสอบขีดจำกัดล่างและขีดจำกัดบน (lower limits and upper limit) โดยการทดสอบหาความเที่ยงและความแม่นยำที่ระดับจำนวนโซมาติกเซลล์ต่ำสุดของวัสดุอ้างอิงและที่ระดับจำนวนโซมาติกเซลล์สูงสุดของวัสดุอ้างอิง ประเมินผลความแม่นยำตามข้อ 2.3.4 และประเมินความเที่ยงจากคำนวณหาค่า coefficient variation of repeatability (% S_r) ตามสมการ

$$\%S_r = \frac{S_r}{\bar{X}} \times 100$$

โดย S_r คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)
 $\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลทดสอบวัสดุอ้างอิงแต่ละระดับ

2.3.6 การทดสอบความเที่ยงประจำวันและความเสถียรระยะสั้น (daily precision and short-term stability) การศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างทั้งหมด 3 ระดับ โดยมีจำนวนโซมาติกเซลล์ เท่ากับ 170,000 570,000 และ 940,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ละตัวอย่างแบ่งเป็น 20 ขวด โดยทดสอบทีละ 1 ขวดของทุกระดับ ขวดละ 3 ซ้ำ ทุก 20 นาที จนครบทั้ง 20 ขวด ประเมินผลทดสอบจากการคำนวณหาค่า coefficient variation of daily repeatability (% $S_{r,daily}$) และ coefficient variation of daily reproducibility (% $S_{R,daily}$) ตามสมการ

แต่ละชุดตัวอย่างทดสอบ, j ($j = 1 \dots q$) ให้คำนวณค่าเฉลี่ย

$$\bar{x}_j = \sum x_{ij} / n, \quad \bar{x} = \sum \bar{x}_j / q$$

โดย X_i คือ ค่าที่ได้จากการวัดแต่ละซ้ำ
 n คือ จำนวนที่วัดซ้ำ ($n=3$)
 q คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมดของชุดทดสอบ ($q = 20$)

standard deviation (S_{rj})	$S_{rj} = [\Sigma(x_{ij} - \bar{x}_j)^2 / (n - 1)]^{1/2}$
standard deviation of daily repeatability ($S_{r,daily}$)	$S_{r,daily} = (\Sigma S_{rj}^2 / q)^{1/2}$
coefficient variation of daily repeatability ($\%S_{r,daily}$)	$\%S_{r,daily} = \frac{S_{r,daily}}{\bar{X}} \times 100$
standard deviation of means ($S_{\bar{X}}$)	$S_{\bar{X}} = \left\{ \left[\Sigma \bar{x}_j^2 - \frac{(\Sigma \bar{x}_j)^2}{q} \right] / (q - 1) \right\}^{1/2}$
standard deviation between checks (S_C)	$S_C = \left(\frac{S_{\bar{X}}^2 - S_r^2}{n} \right)^{1/2}$
standard deviation of daily reproducibility ($S_{R,daily}$)	$S_{R,daily} = (S_C^2 + S_r^2)^{1/2}$
coefficient variation of daily reproducibility ($\%S_{R,daily}$)	$\%S_{R,daily} = \frac{S_{R,daily}}{\bar{X}} \times 100$

และสร้างกราฟความเสถียรของวิธีทดสอบระหว่างชุดทดสอบโดยให้ลำดับชุดทดสอบเป็นแกน x และค่าที่วัดได้จากเครื่องเป็นแกน y รวมถึงตรวจสอบการเบี่ยงเบนของผลการทดสอบโดย F – test ของ one-way ANOVA ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel® ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หากค่าที่ได้จากการคำนวณ F_{cal} น้อยกว่าค่า $F_{critical}$ แสดงว่าไม่พบการเบี่ยงเบนของผลการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.3.7 การทดสอบความเที่ยง (precision)

2.3.7.1 repeatability ใช้น้ำนมโคดิบถึงรวมรายฟาร์มที่แตกต่างกัน 20 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างแบ่งเป็น 20 ขวด แต่ละขวดทำการทดสอบ 2 ซ้ำ โดยทดสอบภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือทดสอบเดียวกัน ผู้ทดสอบเดียวกัน คำนวณหาค่าความแตกต่างระหว่างผลทดสอบ 2 ซ้ำของแต่ละขวด (absolute difference between two independent single test results, r) เกณฑ์การยอมรับ คือ ค่า r ที่ได้ ต้องน้อยกว่าเกณฑ์ค่า r ไม่น้อยกว่า 95 % ของการทดสอบตัวอย่าง

2.3.7.2 intralaboratory reproducibility ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างเดิมจากข้อ 2.3.7.1 ทดสอบเป็นซ้ำที่ 3 ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือทดสอบเดียวกัน โดยผู้ทดสอบต่างกัน ในช่วงเวลาที่ต่างกัน 3 - 4 ชั่วโมงหลังจากทดสอบครั้งแรก คำนวณค่าความแตกต่างระหว่างผลทดสอบระหว่างซ้ำที่ 1 กับซ้ำที่ 3 (absolute difference between two independent single test results, R) เกณฑ์การยอมรับ คือ ค่า R ที่ได้ ต้องน้อยกว่าเกณฑ์ค่า R ไม่น้อยกว่า 95 % ของการทดสอบตัวอย่าง

เกณฑ์ค่า r และ R ของโซมาติกเซลล์แต่ละตัวอย่าง สามารถคำนวณได้โดยนำค่าเฉลี่ยจำนวนโซมาติกเซลล์ที่ทดสอบมาประมาณค่าในช่วง (Interpolation) สอดคล้องตาม Berger and Luginbuhl (2016) และ Orlandini and Bijgaart (2011) โดย เมื่อทราบค่า (x_1, y_1) และ (x_2, y_2) ของวิธีมาตรฐาน ISO 13366-2: 2006 (ตารางที่ 1) แล้ว สามารถประมาณค่าของ y ได้จากสมการ

$$y = y_1 + (x - x_1) \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)}$$

โดย	y	คือ เกณฑ์ค่า r หรือ R ที่ต้องการประมาณค่าในช่วง
	x	คือ ค่าเฉลี่ยจำนวนโซมาติกเซลล์ที่ทดสอบ (เซลล์ต่อมิลลิเมตร)
	x ₁	คือ จำนวนโซมาติกเซลล์ที่ต่ำกว่าค่า x
	x ₂	คือ จำนวนโซมาติกเซลล์ที่สูงกว่าค่า x
	y ₁	คือ เกณฑ์ค่า r หรือ R ของค่า x ₁
	y ₂	คือ เกณฑ์ค่า r หรือ R ของค่า x ₂

ผลและวิจารณ์

1. พารามิเตอร์ที่เหมาะสมและแนวทางในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบ

ผลการศึกษาพบพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบระบุในมาตรฐานทางวิชาการ ดังนี้ 1) วิธีมาตรฐาน ISO 13366-2: 2006 ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิงที่ใช้การทดสอบ 2) มาตรฐาน ISO 8196-3: 2009 ว่าด้วยการประเมินความถูกต้องโดยรวมของวิธีทางเลือกในการวิเคราะห์น้ำนมซึ่งมีรายละเอียดเกี่ยวกับขั้นตอนการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ในภาพรวมของการประเมินวิธีทางเลือกใหม่เทียบกับวิธีมาตรฐานซึ่งสามารถใช้กับการทดสอบองค์ประกอบน้ำนมและการหาจำนวนโซมาติกเซลล์ได้ 3) หลักเกณฑ์ EURL MMP (2013) ของห้องปฏิบัติการอ้างอิงของสหภาพยุโรปสำหรับนมและผลิตภัณฑ์นมว่าด้วยเรื่องเกณฑ์การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบซึ่งใช้วิธีการทดสอบและเกณฑ์ร่วมกันระหว่าง ISO 8196-3: 2009 และ ISO 13366-2: 2006 รวมถึงศึกษามาตรฐานสากล AOAC (2007) และ NATA (2018) ทั้งนี้พบพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

- การตรวจสอบการไม่มีอยู่ของโซมาติกเซลล์ (blank checks)
- การปนเปื้อนข้ามระหว่างตัวอย่าง (carry-over effect)
- ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity)
- ขีดจำกัดล่างและขีดจำกัดบน (lower limits and upper limit)
- ช่วงการใช้งาน (working range)
- ความเที่ยงประจำวันและความเสถียรระยะสั้น (daily precision and short-term stability)
- ความเที่ยง (precision)
- ความแม่นยำโดยรวม (overall accuracy) และ ความแม่นยำ (accuracy)

การศึกษาครั้งนี้ได้พิจารณาความเหมาะสมของพารามิเตอร์ที่สำคัญที่ต้องทดสอบดังต่อไปนี้ พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบที่ระบุในวิธีมาตรฐาน ISO 13366-2: 2006 เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถดำเนินการได้ตามข้อกำหนดของวิธีมาตรฐานสอดคล้องตาม ISO/IEC 17025: 2017

ข้อ 7.2.1.5 ได้แก่ การตรวจสอบการไม่มีอยู่ของโซมาติกเซลล์ การปนเปื้อนข้ามระหว่างตัวอย่าง ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ความเที่ยง โดยใช้วิธีการทดสอบและเกณฑ์กำหนดของแต่ละพารามิเตอร์ ตาม ISO 13366-2: 2006 ในการนี้เพื่อให้มั่นใจในความสม่ำเสมอและความถูกต้องของผลทดสอบจึง ทวนสอบพารามิเตอร์ของการทดสอบความเที่ยงประจำวันและความเสถียรระยะสั้นโดยใช้วิธีทดสอบ และเกณฑ์กำหนดตาม ISO 8196-3: 2009

ขีดจำกัดล่างและขีดจำกัดบนสามารถหาได้จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (ISO 8196-3: 2009) ทั้งนี้ช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบถูกกำหนดให้เป็นช่วงระหว่างขีดจำกัดล่างและ ขีดจำกัดบนของการวิเคราะห์ซึ่งที่ขีดจำกัดดังกล่าวนั้นมีความเที่ยงตรง ความแม่นยำ และมีความ ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่เหมาะสม (NATA, 2018) ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงยืนยันขีดจำกัดล่าง และขีดจำกัดบนร่วมกับการหาช่วงการใช้งานตาม ISO 13366-2 (2006) โดยใช้วัสดุอ้างอิงน้ำมันโคดิบ

มาตรฐาน ISO 8196-3: 2009 กล่าวถึงการทดสอบความแม่นยำโดยรวม (overall accuracy) ซึ่งเป็นการประเมินโดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีทางเลือกใหม่และวิธีมาตรฐานซึ่งเป็น ลักษณะของการตรวจสอบความใช้ได้ (validation) ทั้งนี้การศึกษาในครั้งนี้เป็นการทวนสอบความ ใช้ได้ของวิธีมาตรฐานที่มีการตรวจสอบความใช้ได้แล้ว (verification of previously validated methods) และในส่วนของมาตรฐานวิธีทดสอบ ISO 13366-2 :2006 ไม่มีรายละเอียดเกี่ยวกับ ความแม่นยำ ในขณะที่ AOAC (2007) และ NATA (2018) ระบุว่าพารามิเตอร์ที่เป็นข้อกำหนดที่สำคัญ (critical requirements) ที่ต้องทำการทวนสอบ คือ ความแม่นยำ และ ความเที่ยง การศึกษาครั้งนี้จึง กำหนดให้มีการทวนสอบในพารามิเตอร์ความแม่นยำโดยใช้วัสดุอ้างอิงน้ำมันโคดิบที่ได้รับการรับรองตาม ISO 17034: 2016 และใช้หลักสถิติทดสอบค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงว่า เป็นไปตามเกณฑ์โดยใช้ t-test ซึ่งจะสอดคล้องตาม NATA (2018) และ Miller and Miller (2010) สรุปแนวทางและเกณฑ์การยอมรับการทวนสอบแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สรุปแนวทางและเกณฑ์การยอมรับการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวน โซมาติกเซลล์ในน้ำมันโคดิบตามหลักการของมาตรฐาน

พารามิเตอร์	การทวนสอบ	เกณฑ์การยอมรับ
blank checks	ทดสอบ blank solution จำนวน 10 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย < 3,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ค่าผลทดสอบ < 8,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
linearity	ทดสอบตัวอย่างวัสดุอ้างอิงอย่างน้อย 5 ระดับโดยวัดระดับละ 10 ซ้ำ	ratio, $r_c < 2\%$
accuracy		$t_{cal} < t_{critical}$ ที่ความเชื่อมั่น 95 %
lower limit		ขีดจำกัดล่าง ยืนยันที่ระดับจำนวนโซมาติกเซลล์ต่ำสุด มี $t_{cal} < t_{critical}$ ที่ความเชื่อมั่น 95 % และ $\%S_r < 6$
upper limit		ขีดจำกัดบน ยืนยันที่ระดับจำนวนโซมาติกเซลล์สูงสุด มี $t_{cal} < t_{critical}$ ที่ความเชื่อมั่น 95 % และ $\%S_r < 3$
carry-over effect	ทดสอบชุดตัวอย่างที่มีโซมาติกเซลล์จำนวนไม่ น้อยกว่า 750,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 1 ตัวอย่าง ตามด้วย blank solution 2 ตัวอย่าง จำนวน 5 ชุด	carry - over effect value, CO < 2%

พารามิเตอร์	การทวนสอบ	เกณฑ์การยอมรับ												
Daily precision and short-term stability	ทดสอบตัวอย่าง 3 ระดับ ที่มีจำนวนโซมาติกเซลล์อยู่ในช่วง 100,000 ถึง 1,000,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ระดับละ 1 ตัวอย่าง แบ่งตัวอย่างเป็น 20 ขวด ทดสอบขวดละ 3 ซ้ำ ทุก 20 นาที	daily repeatability , %S _{r,daily} < 4 daily reproducibility , %S _{R,daily} < 5 F _{cal} < F _{critical} ที่ความเชื่อมั่น 95 %												
precision	repeatability ทดสอบตัวอย่างที่มีจำนวนโซมาติกเซลล์แตกต่างกันอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง ต่อเนื่องกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือทดสอบเดียวกัน ผู้ทดสอบเดียวกัน	เปรียบเทียบค่า r ที่ได้ ต้องน้อยกว่าเกณฑ์ค่า r ไม่น้อยกว่า 95 % ของการทดสอบตัวอย่าง โดยมีเกณฑ์ค่า r ดังนี้ <table><tr><td>cell count level (cells/mL)</td><td>เกณฑ์ค่า r (cells/mL)</td></tr><tr><td>150,000</td><td>25,000</td></tr><tr><td>300,000</td><td>42,000</td></tr><tr><td>450,000</td><td>50,000</td></tr><tr><td>750,000</td><td>63,000</td></tr><tr><td>1,500,000</td><td>126,000</td></tr></table> และสามารถหาเกณฑ์ค่า r ได้จากการ Interpolation	cell count level (cells/mL)	เกณฑ์ค่า r (cells/mL)	150,000	25,000	300,000	42,000	450,000	50,000	750,000	63,000	1,500,000	126,000
	cell count level (cells/mL)	เกณฑ์ค่า r (cells/mL)												
150,000	25,000													
300,000	42,000													
450,000	50,000													
750,000	63,000													
1,500,000	126,000													
	intralaboratory reproducibility ทดสอบตัวอย่างที่มีจำนวนโซมาติกเซลล์แตกต่างกันอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง ทดสอบ ต่อเนื่องกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน โดยอาจใช้ผู้ทดสอบต่างกัน เครื่องมือต่างกัน ในช่วงเวลาที่ต่างกันภายในไม่กี่ชั่วโมง	เปรียบเทียบค่า R ที่ได้ ต้องน้อยกว่าเกณฑ์ค่า R ไม่น้อยกว่า 95 % ของการทดสอบตัวอย่าง โดยมีเกณฑ์ค่า R ดังนี้ <table><tr><td>cell count level (cells/mL)</td><td>เกณฑ์ค่า R (cells/mL)</td></tr><tr><td>150,000</td><td>29,000</td></tr><tr><td>300,000</td><td>50,000</td></tr><tr><td>450,000</td><td>63,000</td></tr><tr><td>750,000</td><td>84,000</td></tr><tr><td>1,500,000</td><td>168,000</td></tr></table> และสามารถหาเกณฑ์ค่า R ได้จากการ Interpolation	cell count level (cells/mL)	เกณฑ์ค่า R (cells/mL)	150,000	29,000	300,000	50,000	450,000	63,000	750,000	84,000	1,500,000	168,000
cell count level (cells/mL)	เกณฑ์ค่า R (cells/mL)													
150,000	29,000													
300,000	50,000													
450,000	63,000													
750,000	84,000													
1,500,000	168,000													

2. ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

การตรวจสอบการไม่มีอยู่ของโซมาติกเซลล์ พบค่าเฉลี่ยของผลทดสอบ blank solution 10 ซ้ำ เท่ากับ 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และไม่มีค่าผลทดสอบที่เกิน 8,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงใน ตารางที่ 2 ดังนั้นจึงผ่านเกณฑ์การยอมรับที่ค่าเฉลี่ยต้องไม่เกิน 3,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และค่าผลทดสอบไม่เกิน 8,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

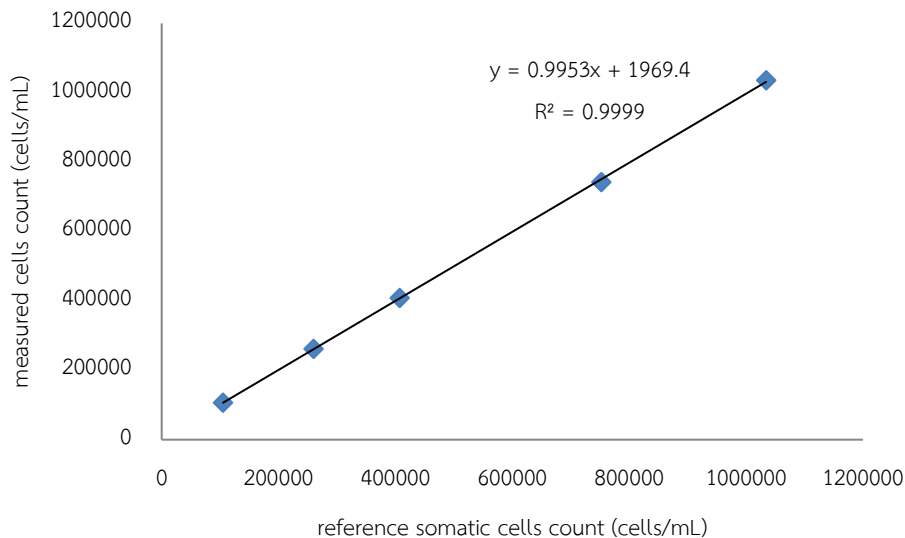
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ blank solution 10 ซ้ำ

จำนวนซ้ำ	ผลทดสอบ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	1,000
ค่าเฉลี่ย	100

ผลการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง พบช่วงจำนวนโซมาติกเซลล์ 105,000 ถึง 1,034,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีค่า ratio, r_c เท่ากับ 1.33 % ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ratio, $r_c < 2\%$ ทดสอบความแม่นยำจากการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิง พบว่าค่าจำนวนโซมาติกเซลล์ทั้งหมด 5 ระดับ มีค่าอยู่ในช่วง reference value $\pm$ uncertainty และ ค่า t_{cal} ของทั้ง 5 ระดับ ที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่า $t_{critical}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของการทดสอบมีค่าไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และผลการทดสอบความเที่ยงที่ระดับจำนวนโซมาติกเซลล์ต่ำสุดและสูงสุด พบค่า % S_r อยู่ในช่วงการยอมรับ ดังนั้นจึงมีช่วงการใช้งาน (working range) เท่ากับ 105,000 ถึง 1,034,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีขีดจำกัดล่างเท่ากับ 105,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและขีดจำกัดบนเท่ากับ 1,034,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 3 และ ภาพที่ 1

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบวัสดุอ้างอิงน้ำหนักโคดิบทั้ง 5 ระดับ

level No.	reference value $\pm$ uncertainty (cells/mL)	Mean (M) (cells/mL)	residual (e)	standard deviation	t_{cal}	$t_{critical}$	% S_r
1	105,000 $\pm$ 9,200	106,800	321.02	3,489.67	1.631	2.262	3.27
2	260,000 $\pm$ 12,300	262,000	1,244.93	6,565.91	0.963	2.262	2.51
3	407,000 $\pm$ 28,700	408,500	1,431.48	13,377.01	0.355	2.262	3.27
4	752,000 $\pm$ 46,900	742,800	-7,657.24	14,289.08	-2.036	2.262	1.92
5	1,034,000 $\pm$ 64,100	1,035,800	4,659.81	18,103.41	0.314	2.262	1.75



ภาพที่ 1 กราฟ simple linear regression ของการวัดวัสดุอ้างอิงนํ้านมโคดิบ

ทั้งนี้ ชีตจำกัดล่างและชีตจำกัดบนสามารถต่ำลงหรือสูงขึ้นได้ถ้ามีค่าอ้างอิงที่ถูกต้องที่ระดับอื่นๆ มาใช้ในการทดสอบ โดยที่ระดับดังกล่าวต้องแสดงถึงความแม่นยำ ความเที่ยง และมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (NATA, 2018) การศึกษานี้เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงความสามารถของเครื่องมือที่อยู่ในช่วง 100,000 - 1,500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าช่วงการใช้งานจากการทวนสอบแคบกว่าช่วงความสามารถของเครื่อง เมื่อพิจารณาช่วงการใช้งานแล้วพบว่าครอบคลุมตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (มกษ.6003-2553) และประกาศคณะกรรมการอาหารนมเพื่อเด็กและเยาวชน ซึ่งกำหนดให้นํ้านมโคดิบมีจำนวนโซมาติกเซลล์ไม่เกิน 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รวมถึงสอดคล้องตามค่าแบ่งชี้สำหรับช่วงการสอบเทียบที่ระบุใน ISO 13366-2: 2006 คือควรมีจำนวนโซมาติกเซลล์ในช่วง 100,000 – 1,000,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยทั่วไปวัสดุอ้างอิงโซมาติกเซลล์ของนํ้านมในเชิงพาณิชย์ในสหรัฐอเมริกาประกอบด้วยนํ้านม 4 ตัวอย่างที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน แต่จากมุมมองของการวิเคราะห์ทางสถิติจำนวนโซมาติกเซลล์ 4 ระดับในช่วงตั้งแต่ 100,000 ถึง 1,000,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรนั้นไม่มีประสิทธิภาพสำหรับการปรับความชัน slope และ intercept ของเครื่องมือ (Marzo ,2016)

ผลการทดสอบหาการปนเปื้อนข้าม ได้ค่า carry – over effect value ของตัวอย่างที่มีโซมาติกเซลล์ 774,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 0.28% ผ่านเกณฑ์การยอมรับ carry – over effect value < 2% (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับการศึกษาของ Gonzalo (1993) ที่พบการปนเปื้อนข้ามน้อยกว่า 5% เมื่อตรวจตัวอย่างนํ้านมที่มีจำนวนเซลล์ต่ำสลับกับตัวอย่างที่มีจำนวนเซลล์สูงที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบการปนเปื้อนข้าม

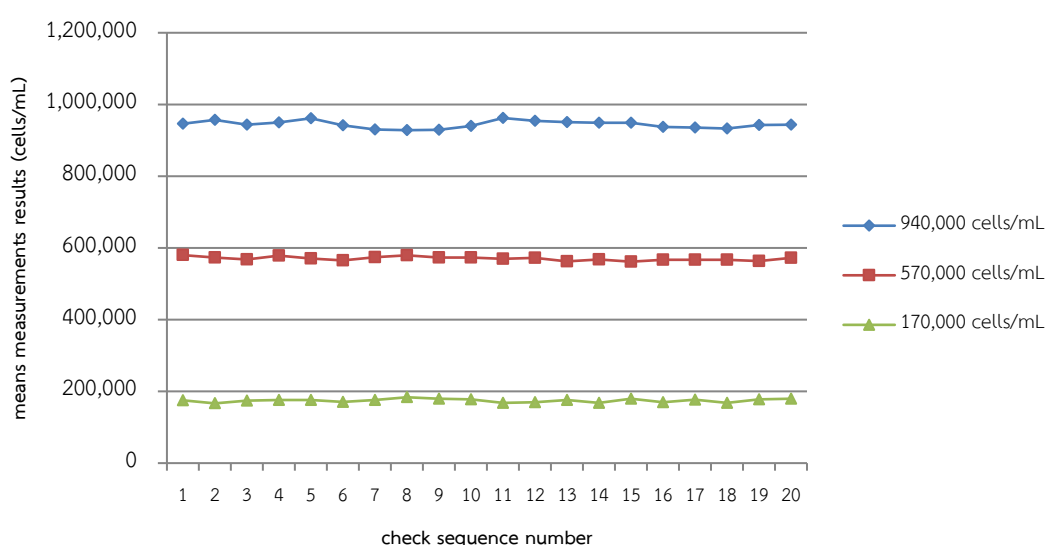
ลำดับที่	ผลทดสอบ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	ตัวอย่างน้ำนม (M)	first blank (B ₁)	second blank (B ₂)
1	774,000	3,000	0
2	783,000	2,000	0
3	768,000	3,000	0
4	771,000	2,000	1,000
5	774,000	2,000	0
ผลรวม	3,870,000	12,000	1,000

$$CO = \frac{(\sum B_1 - \sum B_2)}{(\sum M - \sum B_2)} \times 100 = 0.28 \%$$

ผลการทดสอบความเที่ยงประจำวันและความเสถียรระยะสั้น พบว่าตัวอย่างทุกระดับของโซมาติกเซลล์ มีค่า % S_{r,daily} และ % S_{R,daily} ผ่านตามเกณฑ์ยอมรับทั้งหมด (ตารางที่ 5) และกราฟความเสถียรของวิธีทดสอบระหว่างชุดทดสอบแสดงไว้ที่ภาพที่ 2

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยงประจำวันและความเสถียรระยะสั้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

จำนวนโซมาติกเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	% S _{r,daily}	เกณฑ์การยอมรับ	
		% S _{r,daily}	% S _{R,daily}
170,000	3.67	<4	4.09
570,000	1.09	<4	1.30
940,000	1.40	<4	1.57



ภาพที่ 2 กราฟความเสถียรระหว่างวันโดยแสดงค่าเฉลี่ยของผลทดสอบของโซมาติกเซลล์ทั้ง 3 ระดับ

ผลการตรวจสอบการเบี่ยงเบนของผลการทดสอบในช่วงระยะเวลาสั้น โดย F – test ของ one-way ANOVA พบค่า F_{cal} ที่คำนวณได้น้อยกว่า $F_{critical}$ ที่โซมาติกเซลล์ทั้ง 3 ระดับ ดังนั้นจึงไม่พบการเบี่ยงเบนของผลการทดสอบในช่วงระยะเวลาสั้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % แสดงว่าเครื่องมือมีความสม่ำเสมอในการวัดตลอดช่วงเวลาระหว่างวัน แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลทดสอบ F – test ที่ความเชื่อมั่น 95 % ของ one-way ANOVA ของโซมาติกเซลล์ทั้ง 3 ระดับ

cell count level	Source of Variation	SS	df	MS	F_{cal}	$F_{critical}$
170,000 cells/mL	Between Groups	1340316667	19	70542982	1.67	1.85
	Within Groups	1684666667	40	42116667		
	Total	3024983333	59			
570,000 cells/mL	Between Groups	1693650000	19	89139474	1.75	1.85
	Within Groups	2038000000	40	50950000		
	Total	3731650000	59			
940,000 cells/mL	Between Groups	5860316667	19	308437719	1.67	1.85
	Within Groups	7406666667	40	185166667		
	Total	13266983333	59			

ผลการทดสอบน้ำหนักโคติบถึงรวมรายฟาร์มที่แตกต่างกัน 20 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่าง แบ่งเป็น 20 ขวด แต่ละขวดทำการทดสอบ 2 ซ้ำ พบตัวอย่างที่ค่าความแตกต่างระหว่าง ซ้ำที่ 1 และ ซ้ำที่ 2 ที่น้อยกว่าเกณฑ์ค่า r จาก Interpolation จำนวน 19 ตัวอย่าง ทั้งนี้ตัวอย่าง no. 20 พบค่าความแตกต่างระหว่าง ซ้ำที่ 1 และ ซ้ำที่ 2 มากกว่าเกณฑ์ค่า r จำนวน 1 ค่า คือ ค่าความแตกต่างของขวดที่ 12 ซึ่งได้เท่ากับ 86,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาแล้วพบว่าผลการทดสอบ repeatability ผ่านเกณฑ์การยอมรับทุกตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ repeatability ของตัวอย่างน้ำหนักโคติบ

ตัวอย่าง no.	Mean result (cells/mL)	เกณฑ์ค่า r จาก Interpolation	ผลทดสอบน้ำหนักโคติบ repeatability		
			จำนวนค่าความแตกต่างระหว่าง ซ้ำที่ 1 และซ้ำที่ 2 ที่น้อยกว่า เกณฑ์ค่า r จาก Interpolation	คิดเป็นร้อยละที่ ผ่านเกณฑ์ ยอมรับ	ผลการ ประเมิน
1	152,250	25,255	20	100	ผ่าน
2	200,900	30,769	20	100	ผ่าน
3	236,600	34,815	20	100	ผ่าน
4	256,925	37,118	20	100	ผ่าน
5	306,400	42,341	20	100	ผ่าน
6	384,775	46,521	20	100	ผ่าน
7	449,600	49,979	20	100	ผ่าน
8	486,750	51,593	20	100	ผ่าน
9	500,950	52,208	20	100	ผ่าน
10	505,775	52,417	20	100	ผ่าน

ตัวอย่าง no.	Mean result (cells/ml)	เกณฑ์ค่า r จาก Interpolation	ผลทดสอบซ้ำนํ้ามโคดิบ repeatability		
			จำนวนค่าความแตกต่างระหว่าง ซ้ำที่ 1 และซ้ำที่ 2 ที่น้อยกว่า	คิดเป็นร้อยละที่ ผ่านเกณฑ์	ผลการ ประเมิน
			เกณฑ์ค่า r จาก Interpolation	ยอมรับ	
11	562,375	54,870	20	100	ผ่าน
12	612,000	57,020	20	100	ผ่าน
13	620,600	57,393	20	100	ผ่าน
14	699,900	60,829	20	100	ผ่าน
15	707,600	61,163	20	100	ผ่าน
16	766,500	64,386	20	100	ผ่าน
17	818,675	68,769	20	100	ผ่าน
18	825,825	69,369	20	100	ผ่าน
19	893,500	75,054	20	100	ผ่าน
20	903,625	75,905	19	95	ผ่าน

หมายเหตุ เกณฑ์การยอมรับของ repeatability คือ ร้อยละที่ผ่านเกณฑ์ต้องไม่น้อยกว่า 95

ทำการทดสอบซ้ำนํ้ามโคดิบถึงรวมรายฟาร์มที่แตกต่างกัน 20 ตัวอย่างเป็นซ้ำที่ 3 พบค่าความแตกต่างระหว่างผลทดสอบระหว่างซ้ำที่ 1 กับซ้ำที่ 3 ที่น้อยกว่าเกณฑ์ค่า R จาก Interpolation ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ดังนั้นผลการทดสอบ intralaboratory reproducibility จึงผ่านเกณฑ์การยอมรับทุกตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบ intralaboratory reproducibility ของตัวอย่างนํ้ามโคดิบ

ตัวอย่าง no.	Mean result (cells/ml)	เกณฑ์ค่า R จาก Interpolation	ผลทดสอบซ้ำนํ้ามโคดิบ intralaboratory reproducibility		
			จำนวนค่าความแตกต่างระหว่าง ซ้ำที่ 1 และซ้ำที่ 3 ที่น้อยกว่า	คิดเป็นร้อยละที่ ผ่านเกณฑ์	ผลการ ประเมิน
			เกณฑ์ค่า R จาก Interpolation	ยอมรับ	
1	152,250	29,315	20	100	ผ่าน
2	200,900	36,126	20	100	ผ่าน
3	236,600	41,124	20	100	ผ่าน
4	256,925	43,970	20	100	ผ่าน
5	306,400	50,555	20	100	ผ่าน
6	384,775	57,347	20	100	ผ่าน
7	449,600	62,965	20	100	ผ่าน
8	486,750	65,573	20	100	ผ่าน
9	500,950	66,567	20	100	ผ่าน
10	505,775	66,904	20	100	ผ่าน
11	562,375	70,866	20	100	ผ่าน
12	612,000	74,340	20	100	ผ่าน
13	620,600	74,942	20	100	ผ่าน

ตัวอย่าง no.	Mean result (cells/ml)	เกณฑ์ค่า R จาก Interpolation	ผลทดสอบซ้ำในแล็บ intralaboratory reproducibility		
			จำนวนค่าความแตกต่างระหว่าง ซ้ำที่ 1 และซ้ำที่ 3 ที่น้อยกว่า เกณฑ์ค่า R จาก Interpolation	คิดเป็นร้อยละที่ ผ่านเกณฑ์ ยอมรับ	ผลการ ประเมิน
14	699,900	80,493	20	100	ผ่าน
15	707,600	81,032	20	100	ผ่าน
16	766,500	85,848	20	100	ผ่าน
17	818,675	91,692	20	100	ผ่าน
18	825,825	92,492	20	100	ผ่าน
19	893,500	100,072	20	100	ผ่าน
20	903,625	101,206	20	100	ผ่าน

หมายเหตุ เกณฑ์การยอมรับของ intralaboratory reproducibility คือ ร้อยละที่ผ่านเกณฑ์ต้องไม่น้อยกว่า 95

สรุปผลการศึกษา

พารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบโดยเทคนิค Flow cytometry ตามมาตรฐานวิธีทดสอบ ISO13366-2: 2006 และมาตรฐาน ISO 8196-3: 2009 ประกอบด้วย การตรวจสอบการไม่มีอยู่ของโซมาติกเซลล์ การปนเปื้อนข้ามระหว่างตัวอย่าง ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ความแม่นยำ ซีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่าง ความเที่ยงประจำวันและความเสถียรระยะสั้น และความเที่ยง โดยผลการดำเนินการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ โดยใช้พารามิเตอร์และแนวทางที่กำหนดไว้ในตารางที่ 1 พบว่าผลทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด สรุปได้ว่าวิธีทดสอบดังกล่าวเป็นวิธีที่เหมาะสมสามารถนำไปใช้ทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์เป็นไปตามวัตถุประสงค์การใช้งาน ทั้งนี้ยังสามารถใช้ข้อมูลผลการทวนสอบในการขอรับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2017 ได้ และแนวทางการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคดิบที่กำหนดไว้ในตารางที่ 1 สามารถนำไปใช้กับห้องปฏิบัติการอื่นของกรมปศุสัตว์ได้โดยเป็นไปตามหลักการทางวิชาการ

ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมของกรมปศุสัตว์รวมถึงภาคเอกชนโดยเป็นข้อมูลในการขอรับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2017 เพื่อให้ได้รับการยอมรับในระดับสากล และสามารถนำหลักการไปใช้ในการควบคุมคุณภาพภายในของห้องปฏิบัติการได้

ในการศึกษานี้ตัวอย่างน้ำนมโคดิบเป็นตัวอย่างจากธรรมชาติโดยไม่มีการเติมสารใดๆ เพื่อเก็บรักษาสภาพตัวอย่าง และในการเตรียมตัวอย่างทดสอบทั้งหมดต้องคำนึงถึงความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง วัสดุอ้างอิงที่ใช้ในการทวนสอบต้องมีความคงตัว เป็นเนื้อเดียวกัน และมีปริมาณเพียงพอ รวมถึงเครื่องมือที่มีผลกระทบกับผลการทดสอบต้องผ่านการสอบเทียบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายเลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่สนับสนุนการศึกษาครั้งนี้ นางสาวเนาวรัตน์ กำภูศิริ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม นางสาวทัศนีย์ แว่นแก้ว นางสาวอุทร เบ้าช้างเผือก รวมถึงเจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมทุกท่านที่ช่วยให้งานชิ้นนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2553. มาตรฐานของน้ำนมโคดิบในมาตรฐานสินค้าเกษตร. มกษ.6003-2553. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร.
- AOAC International. 2007. How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Validation. Available source. :https://members.aoac.org/AOAC_Docs/lptp/alacc_guide_2008.pdf, April 5, 2021
- Berger, T.F.H. and W. Luginbuhl. 2016. Probabilistic comparison and assessment of proficiency testing schemes and laboratories in the somatic cell count of raw milk. Accred. Qual. Assur. 21:175–183.
- EURL MMP document. 2013. Criteria for the validation of instrumental (epifluorescent) methods for the enumeration of somatic cells in raw cow's milk. Available source: <https://eurl-fmd.anses.fr/en/minisite/lait/criteria-validation-instrumental-epifluorescent-methods-enumeration-somatic-cells-ra-0>. April 5, 2021
- Gonzalo, C., J.A. Baro, J.A. Carriedo and F.S. Primitivo. 1993. Use of the Fossomatic Method to Determine Somatic Cell Counts in milk . Journal Dairy Sci 76:115-119
- ISO 8196-3|IDF 128-3:2009 Milk - Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis - Part 3: Protocol for the evaluation and validation of alternative quantitative methods of milk analysis. Geneva: International Organization for Standardization. 45 pp.
- ISO 13366-2|IDF 148-1:2006 Milk - Enumeration of somatic cells - Part 2: Guidance on the operation of fluoro-optoelectronic counters. Geneva: International Organization for Standardization. 13 pp.
- ISO/IEC 17025: 2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization. 30 pp.
- Li, N., R. Richoux, M. Boutinaud, P. Martin and V. Gagnaire. 2014. Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. Dairy Sci & Technol. 94:517-538

- Ma, Y., C.Ryan, D.M. Barbano, D.M. Galton, M.A. Rudan, and K.J. Boor. 2000. Effects of Somatic Cell Count on Quality and Shelf-Life of Pasteurized Fluid Milk. *J.Dairy Sci.* 83 : 293-280.
- Marzo, L.D., K. L. Wojciechowski and D.M. Barbano. 2016. Preparation and stability of milk somatic cell reference materials. *Journal of Dairy Science.* 99:7679 – 7689.
- Miller, J.N. and J.C. Miller. 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry.* Sixth Ed. Ashford Colour Press Ltd, Gosport ,UK.
- NATA General Accreditation Guidance. 2018. Validation and verification of quantitative and qualitative test methods. Available source : <https://nata.com.au/files/2021/05/Validation-and-Verification-of-Quantitative-and-Qualitative-Test-Methods.pdf>, May 15, 2021
- Orlandini, S. and H.V.D Bijgaart. 2011. Reference system for somatic cell counting in milk. *Accred Qual Assur.* 16:415–420