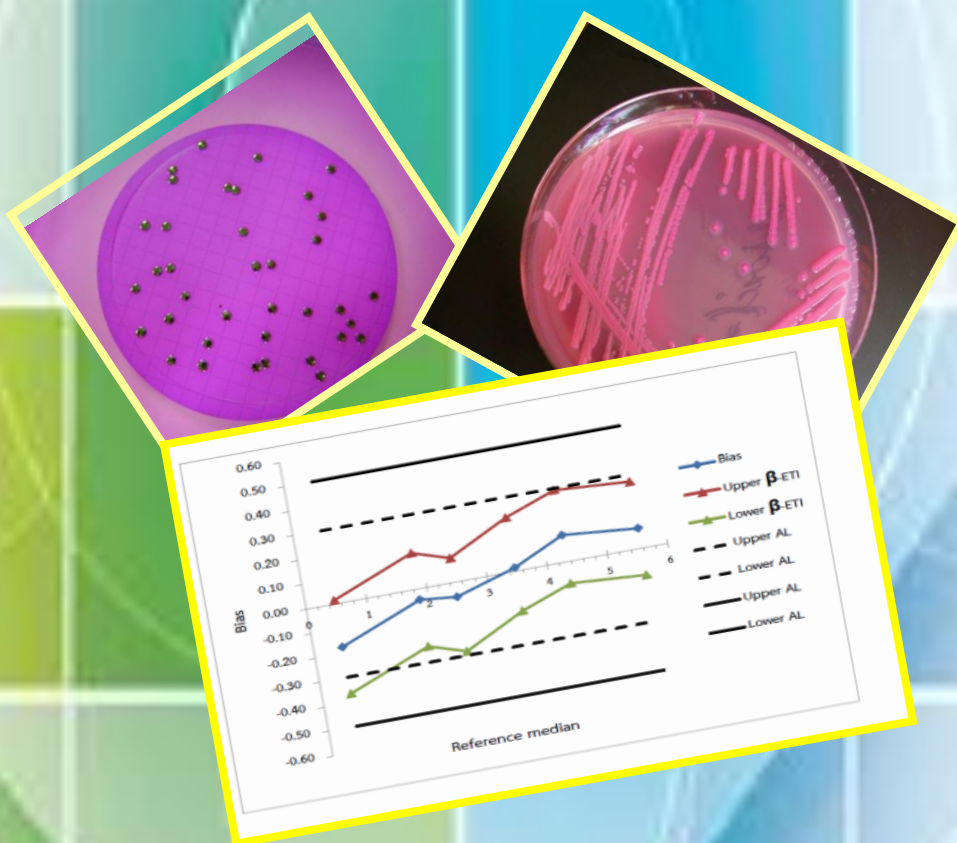


**แนวทางการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ
ทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณภายในห้องปฏิบัติการเดียว
โดยการศึกษาเปรียบเทียบวิธี**

**Practical Guide for Validation of Microbiological
Quantitative Methods in a Single Laboratory
by Method Comparison Study**



**สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**

เอกสารวิชาการ

เรื่อง

แนวทางการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณ
ภายในห้องปฏิบัติการเดียว โดยการศึกษาเปรียบเทียบวิธี

(Practical Guide for Validation of Quantitative Microbiological Methods
in a Single Laboratory by Method Comparison Study)



จัดทำโดย

นางลดาพรรณ แสงคล้าย
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการพิเศษ

และ

นางสาวกรุณา ตีรสมิทธิ์
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

คำนำ

เอกสาร “แนวทางการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณภายในห้องปฏิบัติการเดียวโดยการศึกษาเปรียบเทียบวิธี” ฉบับนี้ถูกจัดทำขึ้นโดยอ้างอิงวิธีมาตรฐาน ISO 16140-2:2016 มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในอาหารที่นักวิจัยได้พัฒนาขึ้น อาจเป็นวิธีดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน วิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ วิธีมาตรฐานที่นำไปใช้นอกขอบข่ายที่กำหนด หรือชุดทดสอบอย่างง่ายและ/หรือให้ผลรวดเร็วซึ่งเป็นนวัตกรรมที่มีการคิดค้นพัฒนาเพิ่มขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน เรียกวิธีที่ต้องการตรวจสอบความถูกต้องเหล่านี้ว่า “วิธีทางเลือก (Alternative method)” สำหรับวิธีที่พัฒนาเป็นชุดทดสอบอย่างง่ายและ/หรือให้ผลรวดเร็ว ใน ISO 16140-2:2016 เรียกว่า Proprietary method หรือ Commercial method ซึ่งหมายถึงวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์ในเชิงพาณิชย์

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณภายในห้องปฏิบัติการเดียวในเอกสาร ISO 16140-2:2016 เป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลทดสอบของวิธีทางเลือกกับวิธีมาตรฐาน (หรือวิธีอ้างอิง) ซึ่งเป็นเอกสารภาษาอังกฤษฉบับล่าสุดที่ออกใหม่ในปี ค.ศ. 2016 และมีการปรับเปลี่ยนวิธีการคำนวณ และการประเมินผลด้วยสถิติแบบใหม่ที่แตกต่างกันจากฉบับเดิม (ISO 16140:2003) คือ การคำนวณข้อมูลผลทดสอบเพื่อสร้างกราฟ accuracy profile ซึ่งผู้วิจัยต้องประเมินผลจากกราฟเพื่อตัดสินใจว่าจะยอมรับผลทดสอบของวิธีทางเลือกหรือไม่ ถ้ายอมรับก็สรุปได้ว่าวิธีทางเลือกมีความเทียบเท่าวิธีอ้างอิง อีกทั้งเอกสารอ้างอิงเป็นภาษาอังกฤษ ทำให้ผู้พัฒนาวิธีที่ไม่คุ้นเคยกับสถิติวิธีใหม่ต้องพยายามศึกษาให้เข้าใจอย่างถ่องแท้ก่อนดำเนินงานวิจัย และอาจต้องใช้เวลานานในการศึกษา

คณะผู้จัดทำได้จัดทำเอกสารฉบับภาษาไทยนี้ขึ้น โดยเรียบเรียงองค์ความรู้ในเอกสาร ISO 16140-2:2016 และอาศัยความรู้ความเข้าใจจากการศึกษาเอกสารวิชาการต่างๆ รวมทั้งประสบการณ์ทำงานด้านการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา การเป็นวิทยากร การเป็นคณะทำงาน และการดำเนินงานโครงการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสถิติแบบใหม่ด้วยกราฟ accuracy profile ซึ่งได้มีโอกาสนำไปเผยแพร่ผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ International Association for Food Protection (IAFP) Annual Meeting, 2015 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา เอกสารวิชาการฉบับนี้จึงอาจเป็นประโยชน์สำหรับนักวิจัยทั่วไป หรือผู้ที่ต้องการศึกษาและนำไปปฏิบัติต่อไป

คณะผู้จัดทำขอขอบคุณนางกนกพร อธิสุข ผู้ทรงคุณวุฒิ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดที่เป็นประโยชน์ จนเอกสารได้ถูกจัดทำจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มกราคม 2560

สารบัญ

	หน้า
วัตถุประสงค์	1
ขอบข่ายการนำไปใช้	1
บทนำ	2
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณ ภายในห้องปฏิบัติการเดียว โดยการศึกษาเปรียบเทียบวิธี	4
1. การศึกษา Relative trueness	5
1.1 การเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ	5
1.2 จำนวนตัวอย่าง	6
1.3 การคำนวณและการแปลผลการศึกษา Relative trueness	6
2. การศึกษา Accuracy profile	10
2.1 หลักการในการใช้ Accuracy profile ตรวจสอบความถูกต้อง ของวิธีทดสอบเชิงปริมาณ	10
2.2 การเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ	13
2.3 จำนวนตัวอย่าง	13
2.4 การทดสอบ คำนวณผล และสร้างกราฟ Accuracy profile	13
3. Limit of quantification (LOQ)	19
3.1 ข้อกำหนดทั่วไป	19
3.2 การเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ	19
3.3 จำนวนตัวอย่าง	19
3.4 การคำนวณและการแปลผลการศึกษา LOQ	19
4. การศึกษา Inclusivity และ Exclusivity ของวิธีทางเลือก	20
4.1 การคัดเลือกและจำนวนสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ	20
4.2 Inclusivity	21
4.3 Exclusivity	21
4.4 การแสดงผลและการแปลผล Inclusivity และ Exclusivity	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์	23
ภาคผนวก ข. การเตรียมตัวอย่างอาหารปนเปื้อนจุลินทรีย์ด้วยวิธี contamination by mixture และ ตัวอย่างที่ไม่ได้ ปนเปื้อนตามธรรมชาติ (artificial contamination)	24
ภาคผนวก ค. ตัวอย่างการคำนวณและสร้างกราฟ Accuracy profile	28
ภาคผนวก ง. การพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับทดสอบ Inclusivity และ Exclusivity	31
เอกสารอ้างอิง	33
ตาราง	
ตารางที่ 1 แสดงวิธีคำนวณค่าความแตกต่าง (Difference) ของผลทดสอบ ระหว่างวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ ความแตกต่างในแต่ละกลุ่ม (S_{Dx}) และกลุ่มรวม (S_{Dall})	8
ตารางที่ 2 ตารางบันทึกข้อมูลผลทดสอบสำหรับการศึกษา Accuracy profile	14
ตารางที่ 3 ผลการคำนวณสำหรับสร้างกราฟ accuracy profile ของตัวอย่างหนึ่งกลุ่ม หรือหนึ่งประเภท	16
ตารางที่ 4 ตารางบันทึกผลทดสอบ Inclusivity	22
ตารางที่ 5 ตารางบันทึกผลทดสอบ Exclusivity	22
ตารางที่ 6 ผลทดสอบและการคำนวณเพื่อสร้างกราฟ accuracy profile ของตัวอย่างประเภทน้ำผลไม้	28
รูป	
รูปที่ 1 Scatter plot ของผลวิธีอ้างอิงกับวิธีทางเลือกสำหรับตัวอย่าง 1 กลุ่ม	7
รูปที่ 2 Bland-Altman difference plot ของข้อมูลผลทดสอบใน กลุ่มตัวอย่างรวม	9
รูปที่ 3 กราฟแสดงช่วงค่า β -ETI และขีดจำกัดการยอมรับผลทดสอบสำหรับ การตรวจสอบความถูกต้องของตัวอย่างหนึ่งชุด	12
รูปที่ 4 ตัวอย่างกราฟ accuracy profile ของตัวอย่างทดสอบ 1 กลุ่ม	17
รูปที่ 5 กราฟ accuracy profile ของตัวอย่างประเภทน้ำผลไม้	30

**แนวทางการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณ
ภายในห้องปฏิบัติการเดียว โดยการศึกษาเปรียบเทียบวิธี
(Practical Guide for Validation of Quantitative Microbiological Methods
in a Single Laboratory by Method Comparison Study)**

วัตถุประสงค์

เอกสารนี้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อให้นักวิจัยใช้เป็นแนวปฏิบัติในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณที่ดำเนินการภายในห้องปฏิบัติการเดียว โดยศึกษาเปรียบเทียบผลทดสอบของวิธีทางเลือก (Alternative method) กับวิธีอ้างอิง (Reference method) ตามขั้นตอนที่ระบุในมาตรฐาน ISO 16140-2:2016

ขอบข่ายการนำไปใช้

ขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในเอกสารนี้ นำไปใช้ได้กับวิธีทดสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ที่ถูกพัฒนาขึ้น อาจเป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน วิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ วิธีมาตรฐานที่ต้องการใช้นอกขอบข่ายที่กำหนดไว้ โดยมุ่งเน้นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์ในเชิงพาณิชย์ (proprietary method) ซึ่งอาจเป็นวิธีทดสอบที่ใช้เครื่องมืออัตโนมัติ หรือวิธีทดสอบ/ชุดทดสอบอย่างง่ายและ/หรือให้ผลรวดเร็ว ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับการบริโภคของมนุษย์ อาหารสัตว์ ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมในพื้นที่ผลิตหรือประกอบอาหาร รวมทั้งตัวอย่างจากขั้นตอนการผลิตเบื้องต้น จุลินทรีย์เป้าหมายที่ตรวจหาในตัวอย่างเป็นชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (culturable microorganisms) เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา แต่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตที่เพาะเลี้ยงไม่ได้ (non-culturable organisms) เช่น ไวรัส โปรโตซัว เป็นต้น

ในที่นี้ จะมุ่งเน้นกล่าวถึงกลุ่มตัวอย่างอาหาร

บทนำ

ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ด้านอาหารหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มีการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2005⁽¹⁾ เรื่อง “ข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ” ต้องเลือกวิธีวิเคราะห์ที่เป็นไปตามความต้องการของลูกค้าและเหมาะสมสำหรับตัวอย่างทดสอบ ในกรณีที่ลูกค้าไม่ระบุวิธีทดสอบ ห้องปฏิบัติการต้องเลือกใช้วิธีที่เป็นปัจจุบันในระดับวิธีมาตรฐานระหว่างประเทศ ระดับภูมิภาค หรือระดับประเทศ หรือเป็นวิธีในตำราหรือวารสารทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องซึ่งรับรองโดยหน่วยงานด้านวิชาการที่เชื่อถือได้หรือมีชื่อเสียง ถ้าห้องปฏิบัติการต้องการใช้วิธีที่ไม่เป็นมาตรฐาน (non-standard method) วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเอง วิธีที่มีการขยายหรือดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (modified method) รวมทั้งการใช้วิธีมาตรฐานนอกขอบข่ายที่กำหนดไว้ หรือวิธีที่พัฒนาเป็นชุดทดสอบอย่างง่ายและ/หรือรวดเร็ว ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบนั้นๆ ที่เรียกว่า วิธีทางเลือก (alternative method) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานหรือวิธีอ้างอิง (reference method) ตามขั้นตอนในวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ เพื่อทดสอบยืนยันว่าวิธีทางเลือกนั้นเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ในขอบเขตการยอมรับว่าผลทดสอบมีความถูกต้องเชื่อถือได้ ในปัจจุบัน นักวิจัยนิยมใช้วิธีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาตามเอกสาร ISO 16140 ซึ่งได้ออกเอกสารฉบับใหม่ล่าสุดคือ ISO 16140-2:2016⁽²⁾ แทน ISO 16140:2003⁽³⁾ ฉบับเดิมที่ยกเลิกใช้ วิธีอ้างอิง ISO 16140-2:2016 เป็นเอกสารฉบับหนึ่งในกลุ่มวิธีมาตรฐาน ISO 16140 ภายใต้ชื่อเรื่อง “Microbiology of the food chain - Method validation” โดย ISO 16140-2:2016 มุ่งเน้นการนำไปใช้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบอย่างง่ายหรือวิธีรวดเร็ว (simple or rapid test kits) ที่พัฒนาขึ้นเพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ (commercial or proprietary method) หรือ วิธีทดสอบจากนวัตกรรมการประดิษฐ์เครื่องมืออัตโนมัติที่อำนวยความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ที่ให้ผลเร็วและ/หรือตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละหลายๆ วิธีทดสอบอาหาร โดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. วิธีทดสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative method) เป็นวิธีตรวจหาชนิดหรือกลุ่มของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในตัวอย่าง รายงานผลว่า พบ หรือ ไม่พบ จุลินทรีย์ต่อหน่วยน้ำหนักหรือปริมาตรของอาหาร
2. วิธีทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative method) เป็นวิธีตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนในตัวอย่าง โดยทั่วไป รายงานผลเป็นจำนวนจุลินทรีย์ต่อหน่วยน้ำหนักหรือปริมาตรของอาหาร มีหน่วยเป็น colony forming unit เขียนย่อว่า cfu หรือ CFU

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณมีความยุ่งยากและใช้เวลาดำเนินการมากกว่าวิธีเชิงคุณภาพ เพราะนอกจากการเตรียมเชื้อให้มีสภาวะใกล้เคียงกับตัวอย่างอาหารที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ แล้ว ต้องมีการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการคำนวณและประเมินผลด้วยวิธีทางสถิติที่ซับซ้อนมากกว่าวิธีเชิงคุณภาพ ใน ISO 16140-2:2016 ฉบับปรับปรุงใหม่มีการปรับใช้วิธีการคำนวณและใช้สถิติแบบใหม่ในการประเมินผลที่แตกต่างไปจากฉบับเดิม (ISO 16140:2003) โดยใช้การสร้างกราฟ Accuracy profile ที่อาศัยหลักการทางสถิติสำหรับการแปลผลเพื่อหาความแม่นยำ

(accuracy) ภายใต้ขอบเขตการยอมรับหรือความใช้ได้ของวิธีทางเลือกซึ่งผู้ใช้กำหนดเองได้ ในปี ค.ศ. 2007 Feinberg และคณะ⁽⁴⁾ กล่าวว่าวิธีประเมินผลใน ISO 16140:2003 ฉบับเดิมที่ใช้สถิติการทดสอบสมมติฐานหลัก (null hypothesis) เพื่อทดสอบหาความสัมพันธ์หรือความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่ม ไม่สามารถระบุขอบเขตการยอมรับหรือความใช้ได้ของวิธีทางเลือกที่ระดับการปนเปื้อนหลายระดับ และผลสรุปของสมมติฐานหลักไม่สามารถแสดงความเที่ยง (precision) ของผลทดสอบได้ และต้องใช้ในการคำนวณหรือสถิติอื่นประกอบ แต่การแปลผลจากกราฟ accuracy profile สามารถตอบปัญหานี้ได้ และได้กล่าวสรุปข้อดีว่า การใช้ accuracy profile ทำให้ผู้นำวิธีไปใช้สามารถพิจารณาความเหมาะสมของวิธี ในการนำไปใช้ตามวัตถุประสงค์ของงาน (fitness-for-purpose)

คณะผู้จัดทำได้จัดทำเอกสารฉบับภาษาไทยนี้ขึ้น โดยอาศัยความรู้ความเข้าใจ ประสบการณ์ทำงาน การเป็นวิทยากร การดำเนินงานโครงการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้กราฟ accuracy profile ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณตามวิธีมาตรฐาน ISO 16140-2:2016 และได้มีโอกาสนำผลงานวิจัยนี้ไปเผยแพร่ผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ International Association for Food Protection (IAFP) Annual Meeting, 2015 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา⁽⁵⁾ นอกจากนี้ ในปี 2554 ผู้จัดทำเอกสารหลักได้เข้าร่วมเป็นคณะทำงานร่วมจัดทำหนังสือเรื่อง “แนวปฏิบัติการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา” ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข⁽⁶⁾ และในปี 2558 ได้เป็นคณะทำงานกลุ่มย่อยใน “โครงการพัฒนามาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุดตรวจและเซ็นเซอร์ด้านเกษตรและอาหารที่ได้รับรองตามมาตรฐานสากล”⁽⁷⁾ โดยอาศัยหลักการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทางจุลชีววิทยา ในเอกสารอ้างอิง ISO 16140:2003

โดยสรุป เอกสารฉบับนี้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อให้นักวิจัยทั่วไปได้นำไปใช้ประโยชน์เป็นแนวทางในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณภายในห้องปฏิบัติการ ตามวิธีมาตรฐานสากลฉบับปัจจุบัน และได้เผยแพร่ในสื่ออิเล็กทรอนิกส์ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และใช้เป็นเอกสารประกอบการบรรยายให้ความรู้กับนักวิจัยอื่นทั้งภายในและภายนอกองค์กร

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณ ภายในห้องปฏิบัติการเดียว โดยการศึกษาเปรียบเทียบวิธี

ใน ISO 16140-2:2016 เรียกการศึกษาเปรียบเทียบวิธีทางเลือกและวิธีอ้างอิงภายในห้องปฏิบัติการเดียวว่า “Method comparison study”

ข้อกำหนดทั่วไป

การศึกษาเปรียบเทียบวิธี เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบที่ดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการหลัก (organizing laboratory) ประกอบด้วย 4 ส่วน ดังนี้

1. **การศึกษา Relative trueness** เป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ของวิธีอ้างอิงกับวิธีทางเลือก โดยใช้ตัวอย่างหลากหลายชนิด ทั้งชนิดที่มีการปนเปื้อนเชื้อตามธรรมชาติ (naturally contaminated samples) และ/หรือตัวอย่างที่ไม่ได้ปนเปื้อนเชื้อตามธรรมชาติหรือมีการเติมเชื้อลงไปในตัวอย่างเป็นตัวอย่าง (artificially contaminated samples)
2. **การศึกษา Accuracy profile (AP)** เป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ของวิธีอ้างอิงกับวิธีทางเลือก โดยใช้ตัวอย่างที่ไม่ได้ปนเปื้อนเชื้อตามธรรมชาติมาทดสอบซ้ำหลายๆ ครั้ง (replicates) และเลือกตัวอย่างทดสอบ 1 ชนิดต่อกลุ่ม (a single item per category) ประเมินข้อมูลผลทดสอบของสองวิธีโดยใช้หลักการของ accuracy profile และการสร้างกราฟ
3. **Limit of quantification (LOQ)** เป็นการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจหาเชิงปริมาณของผลทดสอบวิธีทางเลือก โดยใช้ตัวอย่างที่ไม่ได้ปนเปื้อนเชื้อตามธรรมชาติมาทดสอบซ้ำหลายๆ ครั้ง (replicates) และเลือกตัวอย่างทดสอบ 1 ชนิดต่อกลุ่ม ข้อมูลจะถูกใช้ในการคำนวณ LOQ ของวิธีทางเลือก การศึกษานี้ทำเฉพาะวิธีทดสอบที่ใช้เครื่องมือ (instrumentally-based methods) เช่น วิธีที่ไม่ได้อาศัยการนับจำนวนโคโลนี
4. **การศึกษา Inclusivity และ Exclusivity ของวิธีทางเลือก**

ทั้งนี้ ผลทดสอบที่เป็นตารางและการคำนวณของแต่ละส่วน รวมทั้งการแปลผลข้อมูลและความเบี่ยงเบนของข้อมูล ต้องถูกบันทึกในรายงานการศึกษา

1. การศึกษา Relative trueness

การศึกษา Relative trueness เป็นการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างผลวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนเชื้อตามธรรมชาติ และ/หรือไม่ได้ปนเปื้อนเชื้อตามธรรมชาติ โดยทดสอบตัวอย่างในกลุ่ม (categories), ประเภท (types) และ ชนิด (items) ที่แตกต่างกัน

1.1 การเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

การเลือกกลุ่ม และประเภทของตัวอย่างทดสอบขึ้นอยู่กับประเภท หรือกลุ่มของจุลินทรีย์ และขอบข่ายของการตรวจสอบความถูกต้อง

ถ้านำวิธีทางเลือกไปใช้ทดสอบอาหารหลากหลายประเภท ต้องทดสอบอาหารอย่างน้อย 5 กลุ่ม (5 categories) และต้องระบุกลุ่มอาหารไว้ในรายงานการศึกษา แต่ถ้าต้องการใช้วิธีทางเลือกกับกลุ่มอาหารเฉพาะ เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์พร้อมบริโภคหรือที่ต้องอุ่นร้อนก่อนบริโภค อาหารแช่เย็นที่ต้องอุ่นร้อนก่อนบริโภค ผลิตภัณฑ์ผ่านกระบวนการให้ความร้อน เป็นต้น ให้ทดสอบเฉพาะกลุ่มอาหารเหล่านั้นเท่านั้น

แต่ละกลุ่มตัวอย่างที่เลือก ต้องทดสอบอย่างน้อยที่สุด 3 ประเภท (types) ต่อหนึ่งกลุ่ม (สามารถดูตารางการเลือกตัวอย่างทดสอบในภาคผนวก A ในเอกสาร ISO 16140-2:2016 ซึ่งแสดงกลุ่ม ประเภท และชนิดอาหารที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยเป็นข้อเสนอแนะในการเลือก ไม่ใช่เป็นข้อบังคับ)

การเลือกตัวอย่างสำหรับการศึกษา ให้ใช้ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนเชื้อตามธรรมชาติก่อนเป็นลำดับแรก ถ้าจำนวนตัวอย่างไม่เพียงพอ สามารถใช้ตัวอย่างที่ไม่ได้ปนเปื้อนเชื้อตามธรรมชาติ (การเตรียมเชื้อประเภทนี้ดูในภาคผนวก ข.) ถ้าเป็นไปได้ ควรใช้ตัวอย่างทดสอบจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนเชื้อในวงกว้าง เพื่อลดความเอนเอียงในการเลือกตัวอย่างเฉพาะพื้นที่ (bias) และต้องแน่ใจว่ามีการเลือกตัวอย่างที่มีระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ประจำถิ่น (natural background contamination) ที่แตกต่างกันทั้งระดับสูง และต่ำ รวมทั้งตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่มีสภาวะเครียด (stress) จากกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน และตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการ หรืออาหารดิบ

ตัวอย่าง ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีนับปริมาณ *Clostridium perfringens* ในกลุ่มผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์พร้อมบริโภคหรือที่ต้องอุ่นร้อนก่อนบริโภค เลือกทดสอบอาหาร 3 ประเภท (types) ในกลุ่มนี้ ได้แก่

- (1) ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปรุงสุก (ปนเปื้อนจุลินทรีย์ประจำถิ่นระดับต่ำ และจุลินทรีย์มีภาวะเครียดจากความร้อน)
- (2) ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก หรือแห้ง (ปนเปื้อนจุลินทรีย์ประจำถิ่นระดับสูง และจุลินทรีย์มีภาวะเครียดจากความเปรี้ยว-ด่าง หรือ pH)
- (3) ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์รมควัน มีค่า $a_w < 0.92$ (ปนเปื้อนจุลินทรีย์ประจำถิ่นระดับปานกลาง และจุลินทรีย์มีภาวะเครียดจากการทำให้แห้ง)

ในบางกรณี ยกตัวอย่างเช่น ต้องการใช้วิธีทางเลือกกับอาหารในวงกว้างมากขึ้น ก็สามารถรวมกลุ่มอาหารได้ โดยรวมกลุ่มอาหารพร้อมบริโภค (ready-to-eat) กับกลุ่มอาหารดิบ (raw) ของผลิตภัณฑ์เดียวกัน เช่น รวมกลุ่มผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์พร้อมบริโภคกับเนื้อสัตว์ดิบเป็นกลุ่มเดียวกัน อย่างไรก็ตาม การรวมกลุ่มอาหารควรยึดหลักการวิเคราะห์ความเสี่ยง (risk analysis) ด้วย

1.2 จำนวนตัวอย่าง

ทดสอบตัวอย่างแต่ละกลุ่ม (category) อย่างน้อย 3 ประเภท (types) และแต่ละประเภททดสอบอย่างน้อย 5 ชนิด (items) นั่นคือ ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ น้อยที่สุด = $1 \times 3 \times 5 = 15$ ตัวอย่าง/กลุ่ม ตัวอย่างทดสอบควรมีการปนเปื้อนเชื้อที่เป็นตัวแทนการปนเปื้อนหลากหลายระดับตามธรรมชาติ และตัวอย่างทั้งหมดที่ศึกษาควรครอบคลุมช่วงการปนเปื้อนเชื้อที่พบตามธรรมชาติ ในกรณีที่ตัวอย่างตามธรรมชาติมีปริมาณเชื้อเป้าหมายสูง สามารถเจือจางเชื้อได้ด้วยตัวอย่างชนิดเดียวกันที่ไม่มีเชื้อเป้าหมาย

ต้องทดสอบวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือกด้วยตัวอย่างเดียวกันให้ได้มากที่สุดเท่าที่ทำได้

1.3 การคำนวณและการแปลผลการศึกษา Relative trueness

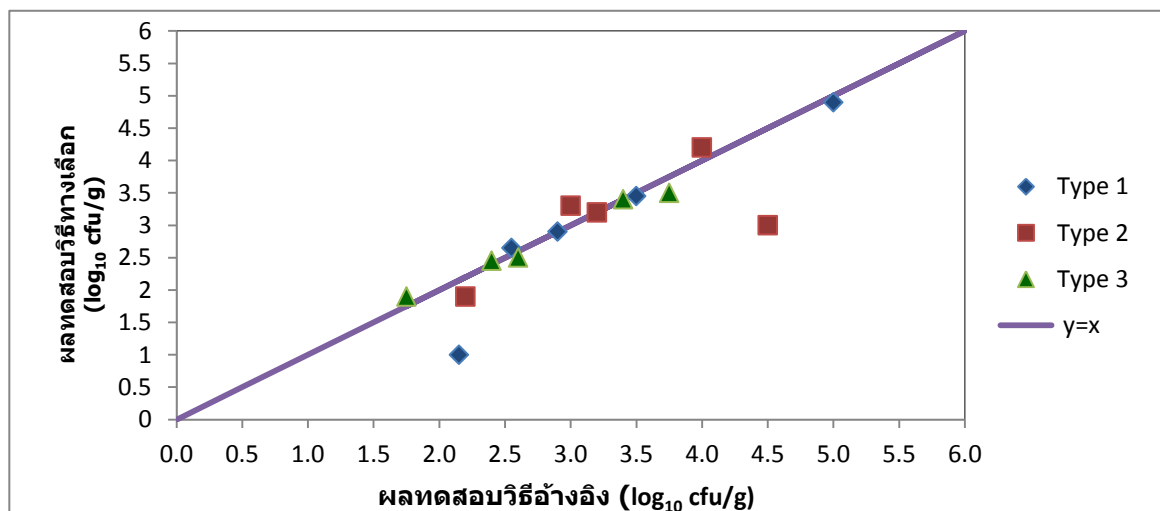
วิเคราะห์ข้อมูลผลทดสอบโดยใช้วิธีของ Bland-Altman

1.3.1 สร้างกราฟ scatter plot ของข้อมูลผลทดสอบแต่ละตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม (each category) และแต่ละตัวอย่างในกลุ่มรวม (all categories) โดยปรับผลทดสอบเป็นค่า $\log_{10}$ units ลากเส้น line of identity ผ่านจุดตัวอย่าง ถ้าวิธีทางเลือกและวิธีอ้างอิงให้ผลแต่ละตัวอย่างที่สอดคล้องกัน ทุกจุดจะอยู่บนเส้นหรืออยู่ใกล้ line of identity ดังตัวอย่างในรูปที่ 1 แสดงผลการ plot ผลทดสอบตัวอย่าง 1 กลุ่ม การ plot ควรแสดงตำแหน่งของตัวอย่างแต่ละประเภท (each type) ด้วยสัญลักษณ์ที่แตกต่างกัน และการ plot ตัวอย่างในกลุ่มรวมก็ควรแสดงตำแหน่งของตัวอย่างแต่ละกลุ่มย่อย (each category) ด้วยสัญลักษณ์ที่แตกต่างกันด้วย การทำเช่นนี้เพื่อช่วยให้สังเกตเห็นได้อย่างรวดเร็วว่าผลทดสอบของสองวิธีมีความสอดคล้องกันหรือไม่

ถ้าผลทดสอบใดๆ ไม่ว่าจะเป็นวิธีอ้างอิงหรือวิธีทางเลือก ได้ค่าต่ำกว่าปริมาณปนเปื้อนต่ำสุดที่ตรวจนับได้ (quantification limit) ในการ plot กราฟ จะปรับแก้ค่านั้นลดลง $1 \log_{10}$ unit ในกรณีที่ผลทดสอบเป็นค่าน้อยกว่า ตัวอย่างเช่น วิธีอ้างอิงให้ผล $2.54 \log_{10}$ CFU/g และวิธีทางเลือกให้ผล $< 2 \log_{10}$ CFU/g จะ plot กราฟด้วยค่า 2.54 สำหรับวิธีอ้างอิง และ 1.0 สำหรับวิธีทางเลือก เช่นเดียวกัน ถ้ามีผลทดสอบใดๆ จากสองวิธีมีค่ามากกว่าปริมาณปนเปื้อนสูงสุดที่ตรวจนับปริมาณได้ (upper limit) จะปรับแก้ค่านั้นเพิ่มขึ้น $1 \log_{10}$ unit เช่น $> 6 \log_{10}$ units จะปรับแก้เป็น $7 \log_{10}$ units

สำหรับค่าที่มีการปรับแก้ จะต้องไม่ใช้ในการคำนวณข้อมูลในตารางที่ 1 ที่จะกล่าวถึงต่อจากนี้ แต่ต้องนำไป plot ในกราฟแสดงความแตกต่างของสองวิธี ที่จะแสดงต่อไปในรูปที่ 2

เมื่อวิธีใดวิธีหนึ่งให้ผลต่ำกว่าค่า quantification limit ผู้วิจัยอาจบันทึกข้อมูลการหาสาเหตุ เช่น การวิเคราะห์รากเหง้าของปัญหา (root cause analysis) พร้อมคำอธิบายในรายงานการศึกษา



รูปที่ 1 Scatter plot ของผลทดสอบวิธีอ้างอิงกับวิธีทางเลือกสำหรับตัวอย่าง 1 กลุ่ม

1.3.2 คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ของผลทดสอบแต่ละคู่ของสองวิธี และหาค่าความแตกต่างของผลทดสอบระหว่างสองวิธี (difference) ในแต่ละกลุ่ม (each category) แทนค่าด้วย D_x และในกลุ่มรวม (all categories) แทนค่าด้วย D_{all} แล้วนำผลคำนวณไป plot กราฟดังแสดงในรูปที่ 2 เพื่อแสดงให้เห็นระดับของความเบี่ยงเบนของผลทดสอบ (the degree of bias) ของวิธีทางเลือก และความไม่สอดคล้องของข้อมูล (lack of agreement of the data)

หมายเหตุ bias (ความเบี่ยงเบน) ในที่นี้หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของผลทดสอบซ้ำของวิธีทางเลือก กับค่าที่กำหนด (หรือผลทดสอบของวิธีอ้างอิง)

ในรูปที่ 2 แสดง line of identity (zero difference), line of bias และ ขีดจำกัดบนและล่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (CL) ของ bias

1.3.3 คำนวณหาขีดจำกัดของความสอดคล้อง (limits of agreement) สำหรับแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และกลุ่มรวม ตามสูตรข้างล่างนี้ โดยคำนวณหาค่าความแตกต่างเฉลี่ยระหว่างผลทดสอบสองวิธี ($\bar{D}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง (S_D) ดังแสดงในตารางที่ 1

$$\text{limits of agreement} = \left[\bar{D} \pm T.S_D \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \right]$$

$\bar{D}$ = ค่าความแตกต่างเฉลี่ยระหว่างผลทดสอบสองวิธี

S_D = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ $\bar{D}$

n = จำนวนคู่ของข้อมูลผลทดสอบ

T = ค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ ของ Student-t distribution ในช่วงความน่าจะเป็น β

= $T_{[(1-\beta)/2]; (n-1)}$ เมื่อ $(n-1)$ = degrees of freedom

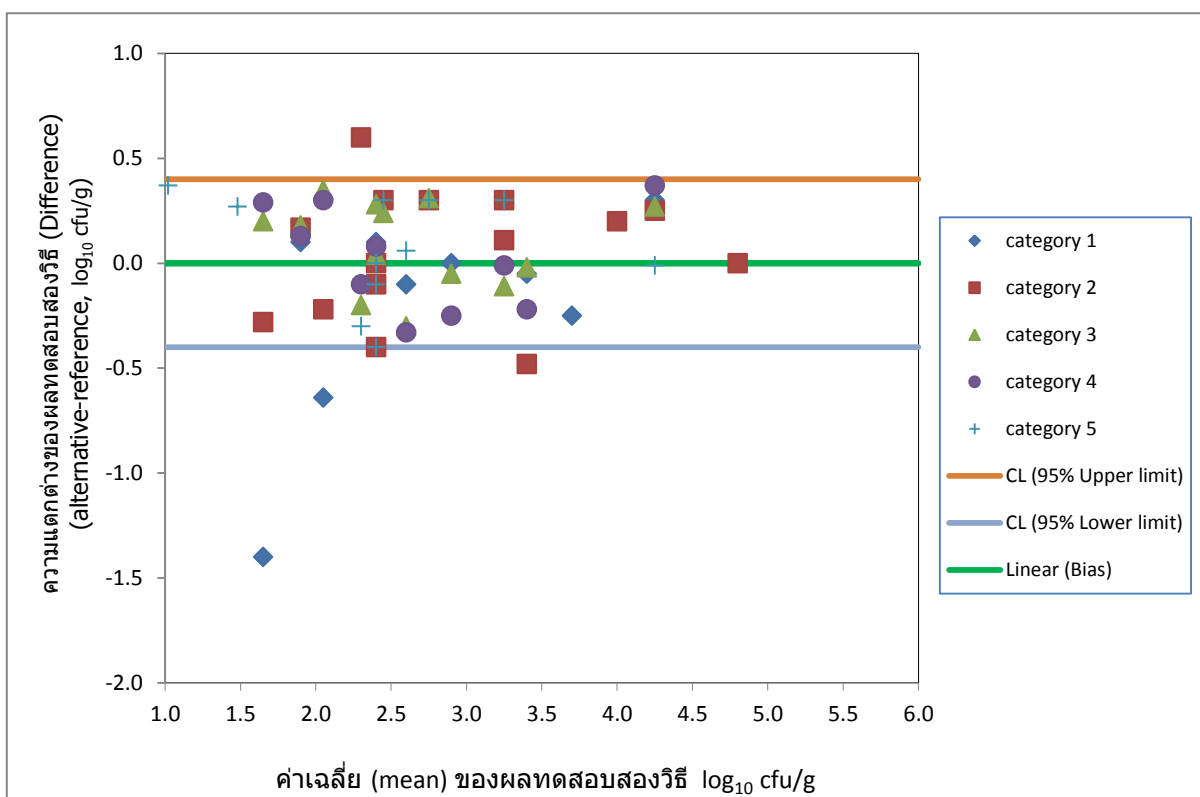
ตารางที่ 1 แสดงวิธีคำนวณค่าความแตกต่าง (Difference) ของผลทดสอบระหว่างวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างในแต่ละกลุ่ม (S_{Dx}) และกลุ่มรวม (S_{Dall})

Category	Type	Sample	Log ₁₀ cfu		Mean	Difference
			Reference method result	Alternative method result		
1	1	1	R1	A1	(R1 + A1)/2	D1 = A1- R1
		2	R2	A2	(R2 + A2)/2	D2 = A2- R2
		3	R3	A3	(R3 + A3)/2	D3 = A3- R3
		4	R4	A4	(R4 + A4)/2	D4 = A4- R4
		5	R5	A5	(R5 + A5)/2	D5 = A5- R5
1	2	6	R6	A6	(R6 + A6)/2	D6 = A6- R6
		7	R7	A7	(R7 + A7)/2	D7 = A7- R7
		8	R8	A8	(R8 + A8)/2	D8 = A8- R8
		9	R9	A9	(R9 + A9)/2	D9 = A9- R9
		10	R10	A10	(R10 + A10)/2	D10= A10- R10
1	3	...	...	...	...	...
Average category 1				$\bar{D}_1$		
Standard deviation category 1				S_{D1}		
...	...	...	...	...	...	...
x			R _x	A _x	(R _x + A _x)/2	D _x = A _x -R _x
Average category x				$\bar{D}_x$		
Standard deviation category x				S_{Dx}		
Average all categories				$\bar{D}_{all}$		
Standard deviation all categories				S_{Dall}		

1.3.4 สร้างกราฟ scatter plot หรือ Bland-Altman difference plot⁽⁸⁾ ดังรูปที่ 2 ด้วยข้อมูลของค่าความแตกต่างระหว่างผลทดสอบของวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก (difference) กับค่าเฉลี่ย (mean) ของผลทดสอบแต่ละคู่ในทุกกลุ่มตัวอย่าง โดยให้แกนแนวตั้งแสดงผลความแตกต่างระหว่างผลทดสอบสองวิธี และ แกนแนวนอนแสดงค่าเฉลี่ยของผลทดสอบของสองวิธี

รูปที่ 2 แสดงระดับความเบี่ยงเบน (the degree of bias) และความไม่สอดคล้องของข้อมูลระหว่างสองวิธี ในกราฟประกอบด้วย line of identity (zero difference), line of bias และ เส้นขีดจำกัดบนและเส้นขีดจำกัดล่างของความสอดคล้องของ bias ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (CLs)

จาก scatter plot ในรูปที่ 2 ให้สังเกตดูค่าเฉลี่ย (mean) ของผลทดสอบสองวิธี ที่เบี่ยงเบนจาก line of identity (zero difference) โดยดูว่าค่าเฉลี่ยอยู่นอกขอบเขตของเส้นขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่างของความสอดคล้องของ bias ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (CLs) หรือไม่ ซึ่งคาดว่า จะมีอัตราของข้อมูลที่ตกอยู่ภายนอกขอบเขต CLs ไม่เกิน 1 ใน 20 ข้อมูล แต่ถ้ามีมากกว่านี้ ควรบันทึกไว้ในรายงานการศึกษาด้วย



รูปที่ 2 Bland-Altman difference plot ของข้อมูลผลทดสอบในกลุ่มตัวอย่างรวม

2. การศึกษา Accuracy profile

การศึกษา accuracy profile เป็นการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างผลที่ได้จากวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก โดยใช้ตัวอย่างที่ไม่ได้ปนเปื้อนเชื้อตามธรรมชาติ (artificially contaminated samples)

ในปี ค.ศ. 2003 Hubert P. และคณะ⁽⁹⁾ ได้นำเสนอหลักการของ accuracy profile มาใช้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทางเลือกเพื่อลดข้อจำกัดของวิธีแบบเดิมที่ใช้การทดสอบสมมติฐานแบบ null hypothesis ในการตรวจสอบความแตกต่างของสองวิธีที่ความเชื่อมั่นระดับหนึ่ง และให้ข้อคิดเห็นว่าคุณค่าความเที่ยง (precision) ที่วัดด้วยค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของผลทดสอบวิธีทางเลือกที่มีค่าต่ำหรือสูงไม่มีผลกระทบกับผลทดสอบที่ได้จาก null hypothesis ซึ่งอาจทำให้การยอมรับวิธีของผู้ที่จะนำวิธีไปใช้งาน ไม่ได้คำนึงถึงความเที่ยงของวิธีทางเลือก นอกจากนี้ Feinberg M. (ค.ศ. 2007)⁽⁴⁾ ได้กล่าวเพิ่มเติมว่า วิธีทดสอบด้วย null hypothesis ไม่สามารถแสดงค่าความถูกต้องได้อย่างสมบูรณ์ เพราะไม่แสดงขอบเขตของการยอมรับได้ของผลวิเคราะห์ แต่การใช้ accuracy profile สามารถทำได้ โดยอาศัยค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของผลทดสอบวิธีทางเลือกกับวิธีอ้างอิง ซึ่งก็คือค่าความเบี่ยงเบน หรือ Bias ที่นำไปสู่ขอบเขตของช่วงค่าความคลาดเคลื่อนที่คาดหวัง (β -Expectation tolerance Interval, β -ETI) ในแต่ละระดับการปนเปื้อน β -ETI เป็นช่วงที่คาดว่าผลการทดสอบในอนาคตจำนวน $\beta\%$ จะตกอยู่ในช่วงนี้ ใน ISO 16140-2:2016 กำหนด β เท่ากับ 80% Feinberg ยังได้กล่าวอีกว่า accuracy profile เป็นเครื่องมือทางสถิติที่เหมาะสมสำหรับการแปลผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ได้ชัดเจนมากกว่าการทดสอบ null hypothesis เพราะมีการรวม β -ETI และขอบเขตการยอมรับอยู่ในกราฟเดียวกัน โดยขอบเขตการยอมรับเป็นความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ของผลการทดสอบระหว่างวิธีทางเลือกกับวิธีอ้างอิง ซึ่งการกำหนดขอบเขตการยอมรับขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของวิธีอ้างอิง ระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหารประเภทจุลินทรีย์ และความต้องการของผู้ใช้งาน ใน ISO 16140-2:2016 กำหนดขีดจำกัดการยอมรับ (Acceptability limits, AL) หรือ เกณฑ์การยอมรับผลทดสอบ (Acceptance criteria, λ) ของวิธีทางเลือก เท่ากับ $\pm 0.5 \log_{10}$ units

2.1 หลักการในการใช้ Accuracy profile ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบเชิงปริมาณ

2.1.1 เกณฑ์การยอมรับผลทดสอบ (Acceptance criteria, λ)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบเชิงปริมาณอยู่บนพื้นฐานข้อคิดที่ว่า ผู้ที่นำวิธีไปใช้งานหรือผู้เลือกใช้วิธี มีความต้องการใช้วิธีทางเลือกที่ให้ผลทดสอบ “Z” มีค่าแตกต่างจากค่ากำหนด “X” (assigned value) น้อยกว่าเกณฑ์การยอมรับ “ λ ” นั่นคือ ผู้ใช้งานได้ใช้วิธีทางเลือกที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้งาน ข้อความที่กล่าวมานี้แสดงได้จากสูตร

$$|Z - X| < \lambda$$

เกณฑ์การยอมรับผลทดสอบ λ แสดงความสอดคล้องระหว่างค่ากำหนด (assigned value) ของวิธีอ้างอิง กับผลทดสอบของวิธีทางเลือกที่ยอมรับได้ วิธีที่ให้ผลทดสอบที่ผู้ใช้งานยอมรับ เรียกว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้ (fit-for purpose) ดังนั้น การกำหนดเกณฑ์ยอมรับ λ จึงขึ้นอยู่กับผู้ใช้ ใน ISO 16140-2:2016 ได้กำหนดเกณฑ์การยอมรับผลทดสอบของวิธีทางเลือก (λ) เป็นค่า $\log_{10}$ units เท่ากับ $\pm 0.5 \log_{10}$ units

หมายเหตุ ในที่นี้ “ค่ากำหนด” หมายถึงผลทดสอบจากวิธีอ้างอิง หรืออาจเรียกว่า ค่าอ้างอิงที่กำหนด (assigned reference value)

2.1.2 ค่าอ้างอิงที่กำหนด (Assigned reference value)

ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ไม่สามารถหาผลทดสอบที่แท้จริง (true value) ได้ ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาเชิงปริมาณโดยใช้ accuracy profile นี้ จึงกำหนดให้ใช้ผลทดสอบที่ได้จากวิธีอ้างอิงแทนค่าที่แท้จริง ค่าอ้างอิงที่กำหนด อาจได้จากการทดสอบครั้งเดียว หรือใช้ค่าเฉลี่ย (average) หรือ ค่ามัธยฐาน (median) จากการทดสอบตัวอย่างเดียวซ้ำหลายครั้ง

2.1.3 ช่วงค่าความคลาดเคลื่อนที่คาดหวัง (β -Expectation tolerance interval or β -ETI)

ในการตัดสินใจยอมรับผลทดสอบจากวิธีทางเลือก มีความจำเป็นที่ต้องพิสูจน์ว่า ผลทดสอบส่วนใหญ่สามารถยอมรับได้ หมายความว่า ผลทดสอบส่วนใหญ่ตกอยู่ในขอบเขตของเกณฑ์การยอมรับ

การคำนวณหาช่วงค่าความคลาดเคลื่อนที่คาดหวัง (β -ETI) เป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นว่าผลทดสอบส่วนใหญ่ในอนาคตกิตเป็นสัดส่วน $\beta\%$ จะอยู่ภายในขอบเขตของช่วงค่า β -ETI นี้ หรืออาจกล่าวได้อีกทางหนึ่งว่า β -ETI เป็นช่วงค่า (intervals) ที่คาดหวังว่าจำนวนผลทดสอบในอนาคตของตัวอย่างที่ใช้วิธีทางเลือก จะตกอยู่ภายในช่วงค่านี้คิดเป็นสัดส่วนเท่ากับ $\beta\%$ ดังแสดงได้ด้วยสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{Prob} (|Z - x| < \lambda) \geq \beta$$

ช่วงค่าความคลาดเคลื่อนที่คาดหวัง β -ETI ไม่เกี่ยวข้องกับช่วงค่าความเชื่อมั่น (confidence interval) ในการทดสอบความแตกต่างทางสถิติ ที่หมายถึงขอบเขตของค่าอ้างอิงที่กำหนดภายใต้ระดับความเชื่อมั่นระดับหนึ่ง (มักใช้ระดับ 95%)

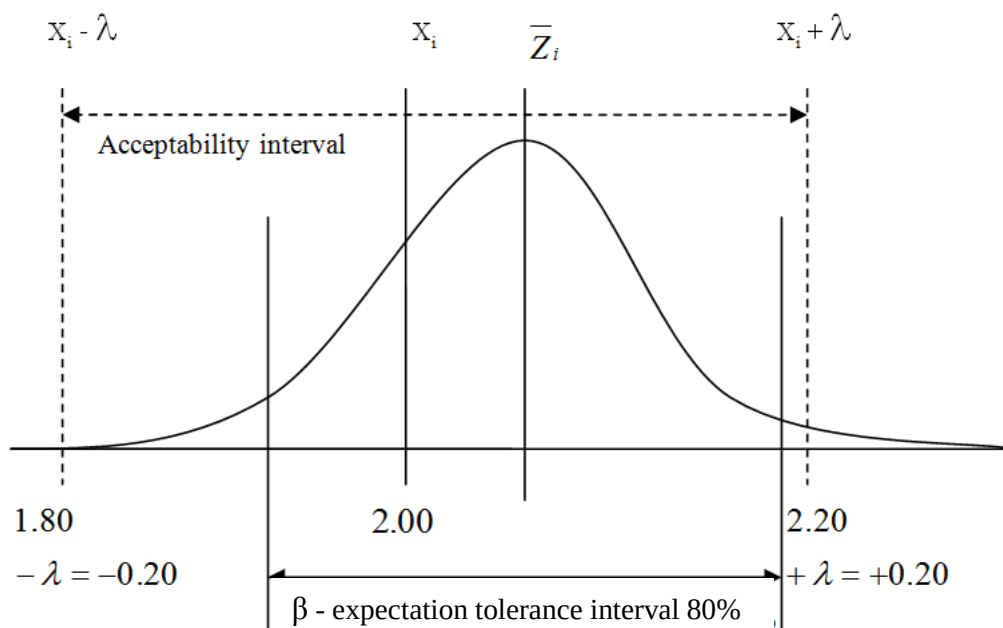
2.1.4 หลักการของ Accuracy profile

ในการทดสอบ accuracy profile เลือกใช้ตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์เป้าหมายครอบคลุมระดับการปนเปื้อนที่คาดว่าจะตรวจพบในตัวอย่างที่ศึกษา แบ่งเป็นหลายระดับต่างๆ กัน แต่ละตัวอย่างทดสอบทั้งวิธี

ทางเลือกและวิธีอ้างอิง แล้วคำนวณหาช่วงค่า β -ETI ของแต่ละชุดตัวอย่างจากข้อมูลผลทดสอบ พร้อมกำหนดขีดจำกัดการยอมรับผลทดสอบ (acceptability limits, λ) ของวิธีทางเลือก ใน ISO 16140-2:2016 กำหนด λ เท่ากับ $\pm 0.5 \log_{10}$ units

ที่การปนเปื้อนระดับหนึ่งๆ ถ้าช่วงค่า β -ETI อยู่ภายในขอบเขตการยอมรับ แสดงว่า ผลทดสอบของวิธีทางเลือกที่การปนเปื้อนระดับนั้นได้ถูกตรวจสอบแล้วว่าใช้ได้

การแปลผลข้อมูล พิจารณาจากกราฟที่แสดงช่วงค่า β -ETI และช่วงการยอมรับผลทดสอบ (acceptability interval, λ) ของวิธีทางเลือก ดังเช่นในรูปที่ 3 เป็นกราฟแสดงช่วงค่า β -ETI และขีดจำกัดการยอมรับผลทดสอบของวิธีทางเลือกสำหรับตัวอย่าง 1 ชุด (one set of sample) ซึ่งอาจเป็นชุดตัวอย่างจาก 1 กลุ่ม (category) หรือ 1 ประเภท (type) ถ้าผลทดสอบของวิธีทางเลือก (Z_i) ที่ระดับการปนเปื้อนใดๆ อยู่ภายในขอบเขตของขีดจำกัดการยอมรับผลทดสอบ ($\pm\lambda$) จะกล่าวได้ว่า ที่ระดับการปนเปื้อนนั้น มีผลทดสอบของวิธีทางเลือกเทียบเท่ากับวิธีอ้างอิง



รูปที่ 3 กราฟแสดงช่วงค่า β -ETI และขีดจำกัดการยอมรับผลทดสอบสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของตัวอย่างหนึ่งชุด (X_i คือ ค่าอ้างอิงที่กำหนด (assigned value) หรือผลทดสอบของวิธีอ้างอิง Z_i คือค่าเฉลี่ยของผลทดสอบซ้ำของตัวอย่างจากวิธีทางเลือก และ $\pm\lambda$ คือ ขีดจำกัดการยอมรับผลทดสอบของวิธีทางเลือก)

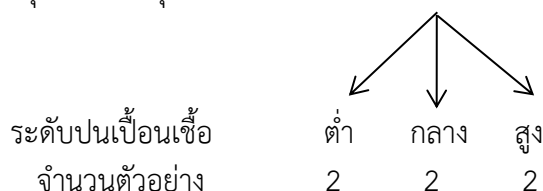
2.2 การเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

เช่นเดียวกับข้อ 1.1

2.3 จำนวนตัวอย่าง

ตรวจสอบตัวอย่าง อย่างน้อย 1 ประเภท (type) ต่อกลุ่ม (category) และทดสอบ 6 ตัวอย่างต่อประเภท ใน 6 ตัวอย่างควรมีการปนเปื้อนเชื้อที่ระดับต่ำ 2 ตัวอย่าง ระดับปานกลาง 2 ตัวอย่าง และระดับสูง 2 ตัวอย่าง ทุกระดับควรครอบคลุมช่วงของการปนเปื้อนจุลินทรีย์เป้าหมายของประเภทตัวอย่างที่เลือก สำหรับแต่ละตัวอย่างต้องทดสอบ 5 ซ้ำ โดยแยกเตรียมตัวอย่างแต่ละซ้ำจากตัวอย่างเดียวกัน (five different test portions from the same sample)

$$\text{จำนวนตัวอย่าง/กลุ่ม} = 1 \text{ กลุ่ม} \times 1 \text{ ประเภท} \times 6 \text{ ตัวอย่าง} \times 5 \text{ ซ้ำ} = 30$$



หมายเหตุ ตัวอย่างในแต่ละประเภท (type) จำนวน 6 ตัวอย่าง อาจแตกต่างกัน

2.4 การทดสอบ คำนวณผล และสร้างกราฟ Accuracy profile

ดำเนินการทดสอบ คำนวณผล และสร้างกราฟ accuracy profile ดังนี้

- ทดสอบแต่ละตัวอย่างตามที่กำหนดในข้อ 2.3 ทั้ง 2 วิธี ภายใต้สภาวะการทวนซ้ำ (repeatability conditions) บันทึกข้อมูลผลทดสอบสำหรับการศึกษา Accuracy profile ของตัวอย่างแต่ละกลุ่มลงในแบบบันทึกผล ดังตารางที่ 2
- คำนวณข้อมูลผลทดสอบของตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม (category) และแต่ละประเภท (type)
กำหนดให้

i	=	ตัวอย่างทดสอบ
q	=	จำนวนตัวอย่างทดสอบ ($1 \leq i \leq q$)
j	=	หน่วยตัวอย่างที่ทดสอบซ้ำ (test portions or replicates)
n	=	จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบซ้ำ (test portions) ($1 \leq j \leq n$)

ตารางที่ 2 ตารางบันทึกข้อมูลผลทดสอบสำหรับการศึกษา Accuracy profile

กลุ่ม (Category)	ประเภท (Type)	ตัวอย่างที่... (ระดับปนเปื้อน)	วิธีอ้างอิง					วิธีทางเลือก				
			t.p. 1 (x_1) ^b	t.p.2 (x_2)	t.p.3 (x_3)	t.p.4 (x_4)	t.p.5 (x_5)	t.p. 1 (y_1) ^c	t.p.2 (y_2)	t.p.3 (y_3)	t.p.4 (y_4)	t.p.5 (y_5)
Category 1	Type 1	ตัวอย่างที่ 1 (ต่ำ)										
		ตัวอย่างที่ 2 (ต่ำ)										
		ตัวอย่างที่ 3 (ปานกลาง)										
		ตัวอย่างที่ 4 (ปานกลาง)										
		ตัวอย่างที่ 5 (สูง)										
		ตัวอย่างที่ 6 (สูง)										
...	...	...										
Category X	Type X	ตัวอย่างที่ 1- 6										
a t.p. = test portion (หน่วยทดสอบซ้ำ) b (x_a) = $\log_{10}$ ของผลทดสอบจากวิธีอ้างอิง (x) สำหรับ test portion ที่ 1-5 c (y_a) = $\log_{10}$ ของผลทดสอบจากวิธีอ้างอิง (y) สำหรับ test portion ที่ 1-5												

- แปลงผลทดสอบตัวอย่างที่ได้จากวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก เป็นค่า $\log_{10}$ units

x_{ij} = ค่า $\log_{10}$ units ของตัวอย่าง i, test portion ที่ j ทดสอบด้วยวิธีอ้างอิง

y_{ij} = ค่า $\log_{10}$ units ของตัวอย่าง i, test portion ที่ j ทดสอบด้วยวิธีทางเลือก

เมื่อ

- $1 \leq i \leq q$ และ $1 \leq j \leq n$
- ตั้งสมมุติฐานว่าผลทดสอบของวิธีทางเลือก (y_i) มีการกระจายแบบปกติ (normal distribution)
- ช่วงค่าความคลาดเคลื่อนคาดหวัง (β -expectation tolerance interval, β -ETI) ของค่า y_i คำนวณตามวิธีของ Guttman, 1970⁽¹⁰⁾
- ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวม (combined standard deviation) คำนวณจากผลของตัวอย่างทุกชนิด (items)

- กำหนดขีดจำกัดการยอมรับผลทดสอบ (acceptability limit, AL) หรือ λ เท่ากับ $\pm 0.5 \log_{10}$ units ซึ่งแสดงขอบเขตของค่าความแตกต่างระหว่างวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือกที่ยอมรับได้

วิธีคำนวณ

ขั้นตอนที่ 1 แต่ละตัวอย่าง i , แปลงผลทดสอบที่ได้จากวิธีอ้างอิง (x_{ij}) เป็นค่า $\log_{10}$ units แล้วคำนวณหาค่ามัธยฐาน (median) แทนด้วย X_i

$$X_i = \text{median}(x_{ij})$$

ขั้นตอนที่ 2 แต่ละตัวอย่าง i , แปลงผลการทดสอบที่ได้จากวิธีทางเลือก (y_{ij}) เป็นค่า $\log_{10}$ units แล้วคำนวณหาค่ามัธยฐาน (median) แทนด้วย Y_i

$$Y_i = \text{median}(y_{ij})$$

ขั้นตอนที่ 3 แต่ละตัวอย่าง i , คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของวิธีทางเลือก ($S_{alt,i}$)

$$S_{alt,i} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}$$

ขั้นตอนที่ 4 คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวม (combined standard deviation) จากวิธีทางเลือก (S_{alt})

$$S_{alt} = \sqrt{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q S_{alt,i}^2}$$

ขั้นตอนที่ 5 คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละตัวอย่าง ($S_{ref,i}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวมของวิธีอ้างอิง (S_{ref}) เหมือนขั้นตอนที่ 3 และ 4 ตามสูตรดังนี้

$$S_{ref,i} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}$$

และ

$$S_{ref} = \sqrt{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q S_{ref,i}^2}$$

ขั้นตอนที่ 6 แต่ละตัวอย่าง i , คำนวณค่าความแตกต่างของค่ามัธยฐานระหว่างสองวิธี เรียกว่า absolute bias, B_i) ค่านี้คือ ค่าประมาณของ lack of trueness ของวิธีทางเลือก เมื่อเปรียบเทียบกับผลของวิธีอ้างอิง

$$B_i = Y_i - X_i$$

ขั้นตอนที่ 7 แต่ละตัวอย่าง i , คำนวณขีดจำกัด (Limits) ของช่วงค่าความคลาดเคลื่อนคาดหวัง (β -expectation tolerance interval, β -ETI) ซึ่งเป็นช่วงที่คาดว่าผลทดสอบในอนาคตคิดเป็นสัดส่วน $\beta\%$ ที่ได้จากวิธีทางเลือก จะตกอยู่ในช่วงค่านี้ แสดงด้วยสมการ

$$B_i \pm T \cdot S_{alt} \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

T คือ ค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ ของ Student-t distribution ในช่วงความน่าจะเป็น β ซึ่งมี degree of freedom = $q(n - 1)$

$$T = T_{\left(\frac{1-\beta}{2}\right); q(n-1)}$$

ISO 16140-2:2016 กำหนด $\beta = 80\%$ นั่นคือ T เป็นค่า coverage factor ของช่วง β -ETI ของตัวอย่างที่ตรวจสอบความถูกต้อง จะได้ขีดจำกัดบน (upper limit, U_i) และขีดจำกัดล่าง (lower limit, L_i) ของช่วงค่า β -ETI ดังนี้

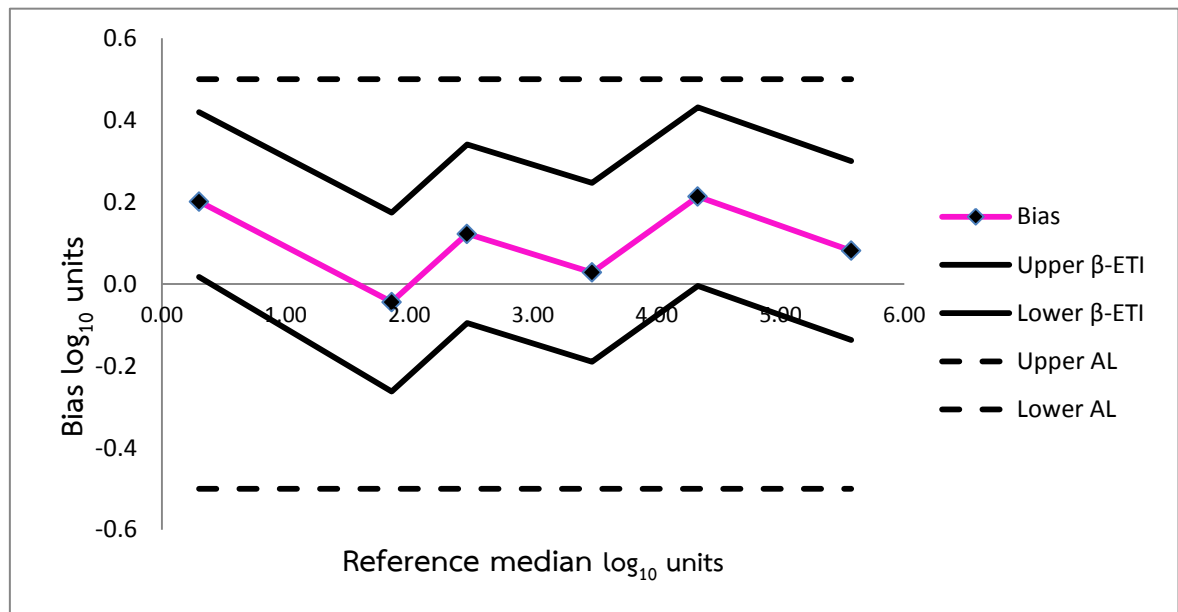
$$U_i = B_i + T \cdot S_{alt} \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \quad \text{และ} \quad L_i = B_i - T \cdot S_{alt} \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

ขั้นตอนที่ 8 สร้างตารางบันทึกผลการคำนวณของตัวอย่างแต่ละกลุ่มดังตารางที่ 3 เพื่อใช้สำหรับสร้างกราฟ accuracy profile โดยกำหนด acceptability limits (AL) = $\pm 0.5 \log_{10}$ units

ตารางที่ 3 ตารางแสดงผลสำหรับสร้างกราฟ accuracy profile ของตัวอย่างหนึ่งกลุ่มหรือหนึ่งประเภท

ผลคำนวณ	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6
X_i						
Bias ($Y_i - X_i$)						
Upper β -ETI						
Lower β -ETI						
Upper AL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Lower AL	- 0.5	- 0.5	- 0.5	- 0.5	- 0.5	- 0.5

- สร้างกราฟ accuracy profile จากผลการคำนวณในตารางที่ 3 ดังตัวอย่างรูปที่ 4



รูปที่ 4 ตัวอย่างกราฟ accuracy profile ของตัวอย่างทดสอบ 1 กลุ่ม (AL = Acceptability limits, Bias = ค่าความเบี่ยงเบนของผลทดสอบวิธีทางเลือก หรือค่าความแตกต่างของผลทดสอบระหว่างสองวิธี และ β -ETI = ช่วงค่าความคลาดเคลื่อนที่คาดหวัง)

ในรูปที่ 4

- แกนแนวนอน เป็นค่าอ้างอิง X_i ในรูปของ log₁₀ units
- แกนแนวตั้ง เป็นค่า bias, acceptability limits (AL) และ tolerance interval limits (U_i และ L_i) ทั้งหมดแสดงในรูป log₁₀ units เป็นค่าความแตกต่างที่สัมพันธ์กับค่าอ้างอิงของตัวอย่าง
- ขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่างของ tolerance interval limits เชื่อมโยงต่อกันด้วยเส้นตรงต่อเนื่องระหว่างระดับการปนเปื้อนต่างๆ เส้นตรงแนวนอนแสดงค่าอ้างอิงที่ได้จากผลทดสอบของวิธีอ้างอิง เรียกว่า horizontal reference line จุดตำแหน่งค่าความแตกต่างของวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือกที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ และถ้าทุกระดับไม่มีความแตกต่าง (no biases exist) ค่านี้จะอยู่บน horizontal reference line ที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ ขีดจำกัดการยอมรับผลทดสอบ (acceptability limits, AL) ของวิธีทางเลือกซึ่งกำหนดไว้ที่ ± 0.5 log₁₀ units แทนด้วยเส้นประ 2 เส้นในแนวนอน และขีดจำกัดของค่าความคลาดเคลื่อนคาดหวัง (β -ETI limits) แสดงเป็นเส้นหัก (broken lines) 2 เส้น คือเส้นขีดจำกัดล่างและขีดจำกัดบน

- จากรูปที่ 4 แปลผลว่า
 - ถ้าผลทดสอบของทุกตัวอย่างจากวิธีทางเลือกในกราฟ accuracy profile ตกอยู่ภายในขอบเขตการยอมรับ ($\pm 0.5 \log_{10}$ units) นั่นคือ $U_i \leq AL$ และ $L_i \geq -AL$ แสดงว่า ผลทดสอบของวิธีทางเลือกสามารถยอมรับได้ และมีความเทียบเท่าวิธีอ้างอิงสำหรับกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา
 - ถ้าขีดจำกัดบนหรือขีดจำกัดล่างของ β -ETI ที่ระดับการปนเปื้อนใด ตกอยู่นอกขอบเขตการยอมรับผลทดสอบ ($\pm 0.5 \log_{10}$ units) และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของวิธีอ้างอิง $S_{ref} > 0.125$ ให้ประเมินผลเพิ่มเติม โดยคำนวณขอบเขตการยอมรับผลทดสอบใหม่ตามขั้นตอนที่ 9

หมายเหตุ การศึกษา accuracy profile ต้องพิจารณาและอธิบายเมื่อพบว่า วิธีทางเลือกไม่เทียบเท่าวิธีอ้างอิง

ขั้นตอนที่ 9 คำนวณขอบเขตการยอมรับผลทดสอบใหม่ ในรูปของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน AL_s

$$AL_s = 4 \cdot S_{ref}$$

ถ้าทุกระดับการปนเปื้อนในกราฟ accuracy profile แสดงขีดจำกัดบนหรือขีดจำกัดล่างของ β -ETI อยู่ภายในขอบเขตการยอมรับผลทดสอบที่คำนวณใหม่ นั่นคือ $U_i \leq AL_s$ และ $L_i \geq -AL_s$ แสดงว่า ผลทดสอบของวิธีทางเลือกสามารถยอมรับได้ และมีความเทียบเท่าวิธีอ้างอิงสำหรับแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และกลุ่มรวม

การยอมรับว่าวิธีทางเลือกใดมีความเทียบเท่ากับวิธีอ้างอิง ผลทดสอบของวิธีนั้นต้องถูกยอมรับทั้งการทดสอบสำหรับตัวอย่างแต่ละกลุ่ม และตัวอย่างในกลุ่มรวม

ตัวอย่างการคำนวณและสร้างกราฟ accuracy profile แสดงในภาคผนวก ค.

ควรดำเนินการสอบสวนหาสาเหตุ เช่น วิเคราะห์หารากเหง้าของปัญหา (root cause analysis) และอธิบายผล เมื่อพบว่าตัวอย่างกลุ่มใดๆ หรือกลุ่มรวมให้ผลทดสอบของวิธีทางเลือกไม่เทียบเท่าวิธีอ้างอิง รวมทั้งบันทึกผลการประเมินไว้ในรายงานการศึกษา หลังการพิจารณาผลการสอบสวนหาสาเหตุ จึงจะตัดสินได้ว่าวิธีทางเลือกมีความเทียบเท่าวิธีอ้างอิงหรือไม่

การคำนวณ accuracy profile สามารถใช้ Excel[®] spreadsheet ช่วยในการคำนวณได้ โดยดาวน์โหลดได้ที่ <http://standards.iso.org/iso/16140> ในหน้าเว็บไซต์ เลือกไฟล์ AP สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบวิธี (method comparison study)

3. Limit of quantification (LOQ)

LOQ คือ ปริมาณการปนเปื้อนน้อยที่สุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจนับได้

3.1 ข้อกำหนดทั่วไป

วิธีการตรวจนับจำนวนโคโลนีเป้าหมายที่อ่านผลจากการมองเห็นด้วยตา ไม่จำเป็นต้องหาค่า LOQ แต่ควรหา LOQ เมื่อใช้วิธีหาปริมาณจุลินทรีย์โดยใช้เครื่องมือวัด เช่น เครื่องตรวจหาปริมาณแบคทีเรียด้วยการวัดค่า ATP (adenosine triphosphate) เป็นต้น

3.2 การเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

เลือกกลุ่ม และประเภทตัวอย่างเดียวกันกับที่ใช้ศึกษา accuracy profile

3.3 จำนวนตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่าง 1 ประเภท (type) ต่อกลุ่ม เตรียมตัวอย่าง blank samples ที่ไม่ปนเปื้อนจุลินทรีย์เป้าหมาย จำนวนอย่างน้อย 10 หน่วยทดสอบ (test portions) ที่มาจากตัวอย่างเดียวกัน ดำเนินการตรวจวิเคราะห์แต่ละหน่วยทดสอบด้วยวิธีทางเลือก

3.4 การคำนวณและการแปลผลการศึกษา LOQ

ใช้ผลทดสอบอย่างน้อย 10 ข้อมูลต่อประเภทต่อกลุ่มตัวอย่าง เพื่อประมาณค่า baseline threshold standard deviation, S_0 ของ n ข้อมูล ด้วยสูตรดังนี้

$$S_0 = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2}$$

เมื่อ

n = จำนวนหน่วยทดสอบ (test portions) ทั้งหมด

y_j = ผลของหน่วยทดสอบที่ j แปลงเป็นค่า $\log_{10}$ units

$\bar{y}$ = ค่าเฉลี่ยของผลของหน่วยทดสอบทั้งหมด แปลงเป็นค่า $\log_{10}$ units

$$\text{Limit of quantification, LOQ} = 10 S_0$$

4. การศึกษา Inclusivity และ Exclusivity ของวิธีทางเลือก

ผู้วิจัยไม่ต้องทดสอบ inclusivity และ exclusivity สำหรับวิธีการนับปริมาณทั่วไป เช่น วิธีตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count, TPC) และยีสต์รา แต่จำเป็นต้องทดสอบสำหรับวิธีนับปริมาณจุลินทรีย์จำเพาะ เช่น *Staphylococcus aureus*

4.1 การคัดเลือกและจำนวนสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ต้องใช้จุลินทรีย์ที่อยู่ในขอบเขตของสายพันธุ์ (range of strains) หลักเกณฑ์การคัดเลือกสายพันธุ์ดูในภาคผนวก ง. สายพันธุ์ที่ใช้ควรคำนึงถึงหลักการในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ของวิธีทางเลือก เช่น วิธีการเพาะเชื้อ วิธีการภูมิคุ้มกันวิทยา และ วิธีการชีวโมเลกุล เป็นต้น หลักการในการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ต่างกัน อาจใช้สายพันธุ์จุลินทรีย์ต่างกัน แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ต้องมีรายละเอียดคุณสมบัติทางชีวเคมี และ/หรือ ทางน้ำเหลืองวิทยา (serologically) และ/หรือ ทางพันธุกรรม (genitically) ของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ควรเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากอาหารคน อาหารสัตว์ หรือจากสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตอาหาร หรือการผลิตตั้งต้น (primary production) โดยคำนึงถึงขอบข่ายการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ทางพยาธิคลินิก สิ่งแวดล้อม และจากศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ก็สามารถใช้ได้ นอกจากนี้ ควรรู้แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ และควรเก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ในระดับท้องถิ่น (local) ที่เป็นห้องปฏิบัติการที่เชี่ยวชาญ ในระดับประเทศ หรือระดับสากล เพื่อสามารถนำจุลินทรีย์กลับมาทดสอบได้อีกในอนาคตถ้าจำเป็น การพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับทดสอบ Inclusivity และ Exclusivity ดูในภาคผนวก ง.

สำหรับการทดสอบ Inclusivity ต้องใช้เชื้อบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย จำนวนอย่างน้อย 50 สายพันธุ์

สำหรับการทดสอบ Exclusivity ต้องใช้เชื้อบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย จำนวนอย่างน้อย 30 สายพันธุ์

จุลินทรีย์บางชนิดอาจเพาะเชื้อได้ยาก เช่น ไวรัส หรือ โปรโตซัว ควรใช้สารละลายจุลินทรีย์บริสุทธิ์เดิมลงในขั้นตอนแรกสุดที่เหมาะสม (the earliest appropriate step) ของวิธีที่ใช้

จุลินทรีย์บางชนิด อาจหาได้ยากและไม่ครบจำนวนที่ต้องการ ทีมผู้วิจัยที่เกี่ยวข้องควรทำความตกลงกันเพื่อกำหนดจำนวนที่เหมาะสมเองได้

หมายเหตุ แนวทางสำหรับการเก็บและการรักษาจุลินทรีย์ในระดับท้องถิ่น (local) ศึกษาได้จากเอกสาร ISO 11133:2014⁽¹¹⁾

4.2 Inclusivity

เป็นการทดสอบจุลินทรีย์เป้าหมาย

ทดสอบด้วยจุลินทรีย์เป้าหมายบริสุทธิ์ (pure culture) เพียงครั้งเดียว ด้วยวิธีทางเลือกและวิธีอ้างอิง พร้อมกับเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดแบบไม่จำเพาะ (non-selective agar) โดยไม่เติมตัวอย่างอาหารที่ศึกษาลงไปผสม ระดับความเข้มข้นจุลินทรีย์ที่ใช้เติม (inoculum level) อย่างน้อยที่สุดต้องเป็นระดับที่สูงกว่า 100 เท่าของระดับต่ำสุดในการหาปริมาณโดยวิธีทางเลือก ถ้าใช้ plate method เป็นวิธีทางเลือก ระดับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เติมควรนับปริมาณได้บนจานเพาะเชื้อ ถ้าผลทดสอบจุลินทรีย์เป้าหมายเป็นลบ สามารถพิจารณาการทดสอบซ้ำด้วยการเติมอาหาร (food item) ลงไปผสมด้วย

4.3 Exclusivity

เป็นการทดสอบจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย

ทดสอบเพียงครั้งเดียวด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายบริสุทธิ์ (pure culture) ด้วยวิธีทางเลือกและวิธีอ้างอิง ระดับความเข้มข้นจุลินทรีย์ที่ใช้เติม (inoculum level) ควรเทียบเคียงกับระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่คาดว่าจะตรวจพบในกลุ่มตัวอย่างอาหาร (categories) ที่ศึกษา โดยไม่เติมตัวอย่างอาหารลงไปผสม จุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ใช้ทดสอบควรเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดไม่จำเพาะ (non-selective broth) ที่เหมาะสมภายใต้สภาวะที่เอื้อต่อการเจริญอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางเชื้อจนถึงระดับที่เหมาะสมก่อนเริ่มการทดสอบ

ถ้าไม่สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ ควรเจือจางสารละลายเชื้อที่เก็บไว้ (stock suspension) จนถึงระดับที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้

4.4 การแสดงผลและการแปลผล Inclusivity และ Exclusivity

บันทึกผลดังตารางที่ 4 สำหรับการทดสอบ inclusivity และตารางที่ 5 สำหรับการทดสอบ exclusivity การแปลผลต้องทำโดยห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเปรียบเทียบวิธี และการรายงานผลควรระบุความผิดปกติจากผลที่ไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง

ตารางที่ 4 ตารางบันทึกผลทดสอบ Inclusivity

จุลินทรีย์ (Microorganisms)	วิธีอ้างอิง (Reference method)	วิธีทางเลือก (Alternative method)	อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่จำเพาะ (Non-selective agar)
1			
2			
3			
ฯลฯ			

ตารางที่ 5 ตารางบันทึกผลทดสอบ Exclusivity

จุลินทรีย์ (Microorganisms)	วิธีอ้างอิง (Reference method)	วิธีทางเลือก (Alternative method)
1		
2		
3		
ฯลฯ		

ถึงแม้การแปลผลข้อมูล inclusivity สำหรับวิธีทางเลือกที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อจะเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ อย่างไรก็ตาม ถ้ามีข้อมูลเชิงปริมาณจะช่วยให้การแปลผลข้อมูลด้วย

ภาคผนวก ก.

คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์

a_w หมายถึง ปริมาณน้ำอิสระ (water activity)

$<$ หมายถึง น้อยกว่า

$>$ หมายถึง มากกว่า

$\leq$ หมายถึง น้อยกว่า หรือ เท่ากับ

$\geq$ หมายถึง มากกว่า หรือ เท่ากับ

$^{\circ}\text{C}$ หมายถึง องศาเซลเซียส

cfu/g หมายถึง colony forming units ต่อกรัม

cfu/ml หมายถึง colony forming units ต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ สามารถศึกษาคำศัพท์และนิยามที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation) จากเอกสาร ISO 16140-1:2016⁽¹²⁾

ภาคผนวก ข.

การเตรียมตัวอย่างอาหารปนเปื้อนจุลินทรีย์ด้วยวิธี contamination by mixture และ ตัวอย่างที่ไม่ได้ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (artificial contamination)

ข.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติด้วยวิธี Contamination by mixture

นำตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติจำนวน X กรัม ผสมกับตัวอย่างที่ไม่ได้ปนเปื้อนจุลินทรีย์จำนวน Y กรัม เตรียมให้ได้ระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ต้องการ แล้วเก็บตัวอย่างที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์โดยการผสมนี้ไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับอาหารชนิด (item) นั้น ทิ้งไว้ให้จุลินทรีย์ในอาหารปรับตัวสู่สภาวะสมดุลอย่างน้อย 1 วันก่อนนำไปทดสอบ

ข.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารที่ไม่ได้ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (artificial contamination)

ข.2.1 ข้อกำหนดทั่วไป

การเตรียมตัวอย่างอาหารที่ไม่ได้ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ไม่ได้จำกัดให้ใช้เฉพาะวิธีที่แสดงไว้ในที่นี้ การเตรียมตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ไม่เป็นไปตามธรรมชาติ แบ่งได้ 2 แบบ คือ แบบเก็บเชื้อไว้ก่อนนำไปใช้ เรียกว่าวิธี Seeding และแบบเติมเชื้อลงในตัวอย่าง เรียกว่าวิธี Spiking ขั้นตอน seeding เป็นการนำตัวอย่างธรรมชาติที่ไม่มีจุลินทรีย์มาเติมเชื้อที่เจือจางไว้ แล้วนำตัวอย่างไปเก็บในสภาวะแวดล้อมเดียวกับอาหาร เป็นระยะเวลาที่จะทำให้จุลินทรีย์ที่เติมลงไปสามารถปรับตัวกับตัวอย่างอาหาร สำหรับขั้นตอน spiking เป็นการนำจุลินทรีย์ที่เจือจาง ไปทำให้เกิดสภาวะเครียด (stress) แล้วจึงนำไปเติมในตัวอย่างอาหาร

ข.2.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอาหารที่ไม่ได้ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติโดยวิธี Seeding

ขั้นตอน seeding มุ่งเน้นการตรวจพบเชื้อเป้าหมายคิดเป็นสัดส่วนของปริมาณเชื้อที่เติม (fractional recovery)

ข.2.2.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารชนิดความชื้นสูงที่ไม่ได้ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

เป็นการเตรียมตัวอย่าง โดยเติมจุลินทรีย์ในอาหารตัวอย่างเดียว (single sample inoculation)

- a) การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป้าหมาย (Culture target strain): นำจุลินทรีย์ที่ต้องการใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพิ่มปริมาณเชื้อชนิดไม่จำเพาะ (non-selective enrichment broth) บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ แล้วนับปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น (starting culture)
- b) การปรับระดับจุลินทรีย์โดยการเจือจาง (Adjust level by dilution): ถ้าจำเป็น หลังการบ่มเพาะเชื้อเจือจางจุลินทรีย์เริ่มต้นด้วยสารละลายเจือจางที่เหมาะสมจนได้ระดับจุลินทรีย์ที่ต้องการ ระดับการเจือจางขึ้นอยู่กับชนิดอาหาร จุลินทรีย์ที่คัดเลือก ระดับจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ต้องการ ปริมาณจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะมีอยู่ในอาหาร (background microbial flora) และสภาวะการเก็บรักษาอาหาร
- c) การทำให้จุลินทรีย์เกิดภาวะเครียดด้วยความร้อน (Thermal stress): จุลินทรีย์ที่ใช้เติมในอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน ควรทำให้เกิดสภาวะเครียดด้วยความร้อน เช่น ใช้อุณหภูมิ 50°C นาน 15 นาที ก่อนนำจุลินทรีย์ไปเติมในอาหาร
- d) การเติมจุลินทรีย์ในอาหาร (Inoculation of the food): ปิเปตหรือพ่นจุลินทรีย์ที่ระดับเจือจางที่เลือกไว้ และทราบปริมาตรของสารละลายเชื้อที่เติมลงไป ในอาหาร โดยอาจแยกเติมจุลินทรีย์ลงในตัวอย่าง หรือเติมจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างรวม แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาตรของจุลินทรีย์ที่เติมควรน้อยที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ เพื่อไม่ให้มีผลกระทบกับค่า a_w ในอาหาร โดยทั่วไปใช้ปริมาตรเชื้อ 0.25 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 25 กรัม (1%)
- e) การผสมจุลินทรีย์ให้เป็นเนื้อเดียวกันกับอาหาร (Mix to ensure homogeneity): หลังการเติมเชื้อลงในตัวอย่าง ผสมและคลุกเคล้าอาหารให้ทั่วถึงจนแน่ใจว่าเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าเติมเชื้อในหลายขั้นตอน ควรผสมและคลุกเคล้าตัวอย่างภายหลังแต่ละขั้นตอน
- f) การทำให้จุลินทรีย์ในตัวอย่างคงตัวภายใต้สภาวะเครียด (Sample stabilization/stress): เก็บตัวอย่างอาหารที่อุณหภูมิปกติที่ใช้เก็บอาหารนั้น การเจริญเติบโตหรืออยู่รอดของจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บ เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิที่ใช้เก็บ เก็บอาหารที่เติมเชื้อแล้วนานอย่างน้อยตามระยะเวลาต่อไปนี้
 - 1) อาหารแช่แข็ง: อย่างน้อย 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ -20°C
 - 2) เก็บแช่เย็น: อย่างน้อย 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ $2 - 8^{\circ}\text{C}$
 - 3) เก็บอุณหภูมิห้อง: อย่างน้อย 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ $20 - 25^{\circ}\text{C}$

ตัวอย่าง เช่น nutmeat ควรเก็บที่อุณหภูมิห้อง น้ำส้มเก็บที่อุณหภูมิ $2 - 8^{\circ}\text{C}$ และไอศกรีมเก็บที่อุณหภูมิ -20°C
- g) การทวนสอบระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ (Verification of contamination): ถ้าจำเป็น ให้ตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์หลังจากเก็บตัวอย่างในเวลาที่เหมาะสมสำหรับการคงตัว

ข.2.2.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารชนิดความชื้นต่ำที่ไม่ได้ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ โดยใช้ จุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็ง (lyophilized culture)

- การเตรียมจุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็ง (prepare a lyophilized culture): เติมจุลินทรีย์ที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพิ่มปริมาณเชื้อชนิดไม่จำเพาะ (non-selective enrichment broth) บ่มเพาะเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม หลังการบ่ม ทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียด้วยการนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifugation) และล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ปราศจากเชื้อ ทั้งส่วนที่เป็นของเหลวและตะกอนเชื้อด้วย 10% NFDM (non-fat dried milk) หรือ นมผงไม่มีไขมันปราศจากเชื้อ ใส่สารละลายเชื้อในภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการทำจุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็ง
- การประเมินระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เป้าหมาย (Assess level of target organism): ใส่จุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็งในภาชนะปราศจากเชื้อ ทำการบดเชื้อให้เป็นผงละเอียดและเป็นเนื้อเดียวกัน ตรวจหาระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ด้วยวิธีที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่จำเพาะ และบ่มจนเพาะเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญ
- การเติมจุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็งในอาหารให้ได้ระดับที่ต้องการ: ผสมจุลินทรีย์แห้งแช่เยือกแข็ง 0.1 กรัม กับตัวอย่างอาหารที่ไม่ปนเปื้อนเชื้อเป้าหมายจำนวน 10 กรัมในภาชนะ เช่น ถังพลาสติกปราศจากเชื้อ เขย่าจนจุลินทรีย์กระจายในอาหารทั่วถึงกัน ทำการเจือจางเชื้อแบบ 10-fold dilutions โดยใช้ตัวอย่างอาหาร (เช่น ใช้ 1 กรัมจากขั้นตอนแรกรวมกับอาหาร 9 กรัม เป็นต้น) เพื่อให้ได้ระดับการปนเปื้อนที่เหมาะสม ต้องแน่ใจว่าได้ผสมเชื้อกับอาหารอย่างเหมาะสมในแต่ละระดับการเจือจาง
- การเก็บตัวอย่างอาหารที่อุณหภูมิเหมาะสม (ควรเก็บที่อุณหภูมิปกติที่ใช้เก็บอาหารนั้น) ปั่นทิ้งไว้เพื่อให้จุลินทรีย์ในอาหารเข้าสู่สภาวะสมดุลนานอย่างน้อย 2 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้
- การทวนสอบระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ (Verification of contamination): ถ้าจำเป็น การตรวจสอบระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์สามารถทำได้หลังจากตัวอย่างผ่านการเก็บไว้ในเวลาที่เหมาะสม

ข.2.3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอาหารที่ไม่ได้ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติโดยวิธี Spiking

- การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป้าหมาย (Culture target strain): นำจุลินทรีย์ที่ต้องการใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพิ่มปริมาณชนิดไม่จำเพาะ (non-selective enrichment broth) บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์
- การปรับระดับจุลินทรีย์โดยการเจือจาง (Adjust level by dilution): หลังการบ่ม เจือจางจุลินทรีย์เริ่มต้นด้วยสารละลายเจือจางที่เหมาะสม จนได้ระดับจุลินทรีย์ที่ต้องการ ในขั้นตอนการทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บปกติใช้เชื้อบริสุทธิ์เข้มข้น $10^4 - 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- ขั้นตอนการทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บ (Apply an injury protocol): ใช้วิธีการที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ดังตัวอย่างต่อไปนี้
ตัวอย่างที่ 1 การใช้ความร้อน (เช่น เวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 50°C) โดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

ตัวอย่างที่ 2 การแช่แข็ง (เช่น เก็บนาน 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ -20°C)

ตัวอย่างที่ 3 การใช้สารเคมี (เช่น ใช้ความเข้มข้นเกลือสูง หรือ pH ต่ำ)

ตัวอย่างที่ 4 การเก็บที่อุณหภูมิ 4°C (เช่น เก็บนานอย่างน้อย 1 สัปดาห์)

สถานะที่ใช้ในการทำให้จุลินทรีย์เครียดขึ้นอยู่กับประเภทจุลินทรีย์ และสายพันธุ์ที่เลือก การเลือกขั้นตอนการทำให้จุลินทรีย์เครียด ควรเลียนแบบสภาวะความเครียดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารที่ใช้ทดสอบ

- d) การวัดอาการบาดเจ็บของจุลินทรีย์ (Injury measurement): ประเมินโดยการนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดจำเพาะ กับชนิดไม่จำเพาะ ถ้าจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดแตกต่างกันมากกว่า $0.5 \log_{10}\text{CFU/ml}$ แสดงว่าจุลินทรีย์มีสถานะเครียดเพียงพอที่จะนำไปใช้ทดสอบ
- e) การปรับระดับจุลินทรีย์โดยการเจือจาง (Adjust level by dilution): ถ้าจำเป็น เจือจางจุลินทรีย์ด้วยสารละลายเจือจางที่เหมาะสม จนได้ระดับจุลินทรีย์ที่ต้องการให้ปนเปื้อนในอาหาร
- f) การเติมจุลินทรีย์ในอาหาร (Inoculation of the food): โดยปิเปตหรือพ่นจุลินทรีย์ที่ระดับการเจือจางที่เลือกไว้และทราบปริมาตรของเชื้อที่เติมลงไปในการอาหาร ควรแยกเติมจุลินทรีย์ลงในแต่ละตัวอย่าง ปริมาตรของจุลินทรีย์ที่เติมควรน้อยที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ เพื่อไม่ให้มีผลกระทบกับค่า a_w ในอาหาร โดยทั่วไปใช้ปริมาตรเชื้อ 0.25 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 25 กรัม (1%)
- g) การผสมจุลินทรีย์ให้เป็นเนื้อเดียวกันกับอาหาร (Mix to ensure homogeneity): หลังการเติมเชื้อผสมและคลุกเคล้าอาหารให้ทั่วถึงจนแน่ใจว่าเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าเติมเชื้อในหลายขั้นตอน ควรผสมและคลุกเคล้าตัวอย่างภายหลังแต่ละขั้นตอน

ภาคผนวก ค.

ตัวอย่างการคำนวณและสร้างกราฟ Accuracy Profile

ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทางเลือกที่พัฒนาขึ้น เพื่อตรวจหาปริมาณยีสต์และราในกลุ่มตัวอย่างเครื่องดื่มเหลวไม่มีแอลกอฮอล์ ประเภทน้ำผลไม้ โดยคัดเลือกตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่าง ที่มีปริมาณยีสต์และราปนเปื้อนในระดับต่ำ ปานกลาง และสูง ได้แก่

ตัวอย่างที่ 1, 2 ปนเปื้อนยีสต์และราระดับต่ำ (<10 ถึง 100 cfu/ml)

ตัวอย่างที่ 3, 4 ปนเปื้อนยีสต์และราระดับปานกลาง (>100 – 10,000 cfu/ml) และ

ตัวอย่างที่ 5, 6 ปนเปื้อนยีสต์และราระดับสูง (>10,000 – 500,000 cfu/ml)

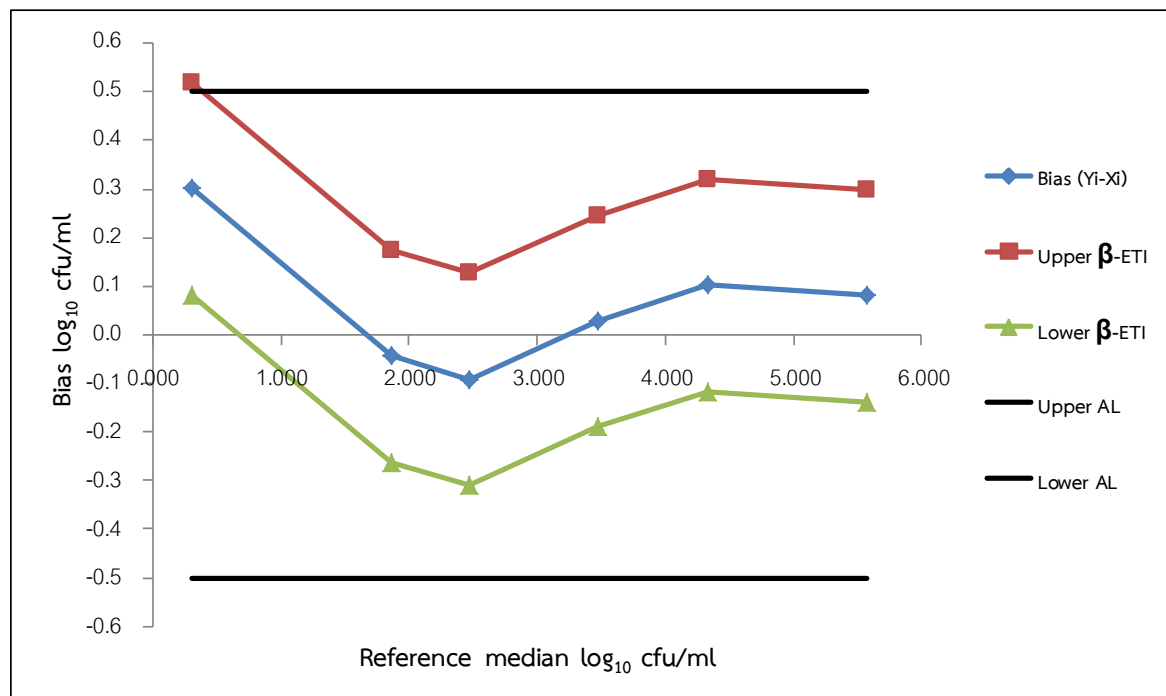
แต่ละตัวอย่างทดสอบ 5 ซ้ำ ด้วยวิธีอ้างอิงและวิธีทางเลือก ได้ผลดังตารางที่ ค.1

ตารางที่ ค.1 ผลทดสอบและการคำนวณเพื่อสร้างกราฟ accuracy profile ของตัวอย่างประเภทน้ำผลไม้

วิธี	หน่วยทดสอบซ้ำ (Repeat or test portion)	ผลทดสอบ (cfu/ml)					
		ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6
วิธีอ้างอิง (Reference)	1	2	89	235	3000	20100	360000
	2	3	72	337	3333	21167	440000
	3	2	58	272	3100	24667	373330
	4	5	65	293	2610	21500	326000
	5	2	84	314	2520	25500	450000
วิธีทางเลือก (Alternative)	1	4	50	195	3700	28000	450000
	2	6	65	283	3600	25600	430000
	3	1	71	239	3200	27200	490000
	4	2	51	237	2730	22100	340000
	5	6	84	237	2600	28700	490000
แปลงผลทดสอบเป็นค่า log 10							
วิธีอ้างอิง (Reference)	1	0.301	1.949	2.371	3.477	4.303	5.556
	2	0.477	1.857	2.528	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	3.491	4.392	5.572
	4	0.699	1.813	2.467	3.417	4.332	5.513
	5	0.301	1.924	2.497	3.401	4.407	5.653
ขั้นตอนที่ 1	X_i	0.301	1.857	2.467	3.477	4.332	5.572

วิธี	หน่วยทดสอบซ้ำ (Repeat or test portion)	ผลทดสอบ (cfu/ml)					
		ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6
วิธีทางเลือก (Alternative)	1	0.602	1.699	2.290	3.568	4.447	5.653
	2	0.778	1.813	2.452	3.556	4.408	5.633
	3	0.000	1.851	2.378	3.505	4.435	5.690
	4	0.301	1.708	2.375	3.436	4.344	5.531
	5	0.778	1.924	2.375	3.415	4.458	5.690
ขั้นตอนที่ 2	Y_i	0.602	1.813	2.375	3.505	4.435	5.653
ขั้นตอนที่ 3	$S_{alt,i}$	0.337	0.096	0.057	0.069	0.045	0.065
	N	5	5	5	5	5	5
ขั้นตอนที่ 4	S_{alt}	0.151					
ขั้นตอนที่ 5	$S_{ref,i}$	0.176	0.077	0.060	0.051	0.045	0.060
	S_{ref}	0.090					
ขั้นตอนที่ 6	$Y_i - X_i$ (bias)	0.301	-0.044	-0.092	0.028	0.102	0.081
ขั้นตอนที่ 7	$S_{alt} \cdot \sqrt{1 + 1/n}$	0.166					
	$T(0.10;24)^a$	1.318					
	$T \cdot S_{alt} \cdot \sqrt{1 + 1/n}$	0.218					
	U_i (upper β -ETI)	0.519	0.174	0.126	0.246	0.320	0.299
	L_i (lower β -ETI)	0.083	-0.263	-0.310	-0.190	-0.116	-0.137
a คำนวณค่า β-ETI โดยกำหนดให้ $\beta = 80\%$ จะได้ $T_{\left(\frac{1-\beta}{2}\right);q(n-1)} = T(0.10;24) = 1.318$ เป็นค่า t- value จากตารางสถิติ two-tail student t- distribution							
ขั้นตอนที่ 8	X_i	0.301	1.857	2.467	3.477	4.332	5.572
	Bias ($Y_i - X_i$)	0.301	-0.044	-0.092	0.028	0.102	0.081
	Upper β -ETI	0.519	0.174	0.126	0.246	0.320	0.299
	Lower β -ETI	0.083	-0.263	-0.310	-0.190	-0.116	-0.137
	Upper AL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Lower AL	-0.5	-0.5	-0.5	-0.5	-0.5	-0.5
	กำหนดขีดจำกัดหรือขอบเขตการยอมรับ (Upper AL, Lower AL) = $\pm 0.5 \log_{10}$ units						

- นำผลการคำนวณในขั้นตอนที่ 8 ไปสร้างกราฟ accuracy profile ดังแสดงในรูปที่ 5 ข้างล่างนี้



รูปที่ 5 กราฟ accuracy profile สำหรับตัวอย่างกลุ่มตัวอย่างเครื่องดื่มเหลวไม่มีแอลกอฮอล์

การแปลผล

- ที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อต่ำ พบว่า ตัวอย่างที่ 1 ซึ่งมีเชื้อปนเปื้อน <10 cfu/ml มีขีดจำกัดบนของค่าความคลาดเคลื่อนคาดหวัง (upper β -ETI) เท่ากับ 0.519 ซึ่งมากกว่าขอบเขตการยอมรับที่กำหนด คือ มากกว่า $+0.5 \log_{10}$ cfu/ml จึงสรุปได้ว่า ไม่ยอมรับผลทดสอบของวิธีทางเลือกที่ระดับการปนเปื้อนนี้นี้ และเนื่องจากวิธีอ้างอิงมีค่า S_{ref} เท่ากับ 0.090 ซึ่งไม่เกิน 0.125 จึงไม่จำเป็นต้องคำนวณหาขอบเขตการยอมรับใหม่
- ที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อต่ำ ตัวอย่างที่ 2 ซึ่งมีเชื้อปนเปื้อน >10 ถึง 100 cfu/ml และที่ระดับปนเปื้อนปานกลางและสูง ตัวอย่างที่ 3-6 ซึ่งมีเชื้อปนเปื้อน >100 ถึง 500,000 cfu/ml มีขีดจำกัดบนและล่างของค่าความคลาดเคลื่อนคาดหวัง (upper and lower β -ETI) อยู่ภายในขอบเขตการยอมรับ $\pm 0.5 \log_{10}$ cfu/ml จากผลทดสอบสรุปได้ว่า สามารถยอมรับผลทดสอบของวิธีทางเลือก หรือ ผลทดสอบของวิธีทางเลือกมีความเทียบเท่าวิธีอ้างอิง ที่ระดับการปนเปื้อนในช่วง >10 ถึง 500,000 cfu/ml

สรุป วิธีทางเลือกที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบเทียบเท่าวิธีอ้างอิง หรือสามารถยอมรับวิธีทางเลือกในการตรวจตัวอย่างเครื่องดื่มเหลวประเภทน้ำผลไม้ เมื่อมีการปนเปื้อนปริมาณยีสต์และราในช่วง >10 ถึง 500,000 cfu/ml

ภาคผนวก ง.

การพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับทดสอบ Inclusivity และ Exclusivity

ง.1 ข้อกำหนดทั่วไป

ภาคผนวกนี้กล่าวถึงข้อกำหนดขั้นต่ำสุดสำหรับใช้คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ เชื้อที่คัดเลือกส่วนใหญ่ต้องมาจากกลุ่มตัวอย่าง (categories) ที่ทดสอบ และครอบคลุมขอบเขตของจุลินทรีย์เป้าหมายที่กำหนด ได้แก่ ความหลากหลายของคุณลักษณะของเชื้อ เช่น คุณลักษณะทางชีวเคมี ซีโรไทป์ ชนิด phage, การกระจายทางภูมิศาสตร์ การอุบัติของเชื้อ และการกล่าวอ้าง (claims) ของผู้พัฒนาวิธีทางเลือก

ง.2 กลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมาย

- กลุ่มที่ไม่ระบุชนิดจุลินทรีย์ เช่น total count, coliforms, yeast, lactic acid bacteria
- Family เช่น Enterobacteriaceae
- Genus เช่น *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Listeria*
- Species เช่น *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*
- Sero หรือ phage type เช่น *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

ง.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์เป้าหมายสำหรับทดสอบ Inclusivity

- a) สำหรับกลุ่มที่ไม่ระบุชนิดจุลินทรีย์ ควรคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ (strains) ในกลุ่ม (group) ที่แสดงลักษณะของ typical growth ในวิธีอ้างอิง
- b) สำหรับ families: ใช้สายพันธุ์ ต่างๆ ใน genera ของ family นั้นๆ และหากเป็นไปได้ ให้เลือกหนึ่งสายพันธุ์เป็นตัวแทนของแต่ละ genera ใน family นั้น
- c) สำหรับ genera: ใช้จุลินทรีย์ species ต่างๆ ใน genera นั้นๆ และหากเป็นไปได้ ให้คัดเลือก species ในแต่ละ genus ให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้
- d) สำหรับ species: ใช้สายพันธุ์ (strains) ต่างๆ ใน species นั้นๆ และการคัดเลือกสายพันธุ์ให้พิจารณาถึง subtyping ด้วย เช่น *Salmonella* ที่ถูกจำแนก serotype ย่อย และ *Listeria* ที่ถูกจำแนก phage type ย่อย และในอนาคตอาจมีการคัดเลือกตามพันธุกรรม (genetic) ของเชื้อด้วย ในการกำหนดสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ให้ผลบวก ห้องปฏิบัติการหลัก (organizing laboratories) ควรใช้ข้อมูลที่เป็นปัจจุบันเพื่อให้มั่นใจว่าสายพันธุ์ที่เลือกใช้ มีความเกี่ยวข้องกับกลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมาย ในช่วงเวลาที่ศึกษา
- e) สำหรับ sero หรือ phage specific strains: เลือกตามขอบเขตของแหล่งที่มา

ง.4 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายสำหรับทดสอบ Exclusivity

- a) กลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย (non-target group) คือ คาดว่าให้ผลลบ และใช้สำหรับการทดสอบ ปฏิกริยาข้าม (cross reactivity) ควรกำหนดตามกลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมาย (target group)
- b) ถ้ากลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมายอยู่ใน 1 family: สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายต้องมาจาก families อื่นที่มีความเกี่ยวข้องกันสูง
- c) ถ้ากลุ่มเป้าหมายอยู่ใน 1 genus: สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายต้องรวมอยู่ใน genera อื่นที่พิจารณาแล้วว่ามีคุณลักษณะทางชีวเคมี หรือทางพันธุกรรมที่คล้ายกับ genus เป้าหมาย
- d) ถ้าจุลินทรีย์เป้าหมายอยู่ใน 1 species: สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายต้องรวมอยู่ใน species อื่นที่อยู่ใน genus เป้าหมาย
- e) ถ้ากลุ่มเป้าหมายเป็น sero หรือ phage specific: สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายต้องรวม sero หรือ phage type อื่นๆ ที่อยู่ใน species เดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva; 2005.
2. ISO 16140-2:2016 (E). Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva; 2016.
3. ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods. Geneva; 2003.
4. Feinberg M. Validation of analytical methods based on accuracy profile. Journal of Chromatography A. 2007;1158(1-2):173-183.
5. International Association for Food Protection (IAFP). Evaluation of 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate for Enumeration of Yeasts and Molds in Beverages. P3-24 Poster presentation at IAFP Annual Meeting on July 28, 2015 [online]. Available from: URL G:_3 M\Abstract Evaluation of 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate for Enumeration of Yeasts and Molds in Beverages (2015 Annual Meeting (July 25 - 28, 2015)).htm.
6. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา (Practical guide for microbiological method validation). กรุงเทพฯ: หจก. อรุณการพิมพ์; 2554.
7. สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีขั้นสูงและสมาคม เอ โอ เอ ซี ประเทศไทย. หลักการตรวจสอบความถูกต้องของชุดทดสอบทางจุลชีววิทยา (วิธีทางเลือก) และขั้นตอนการรับรอง. กรุงเทพฯ: บริษัท พรินท์เอเบิล จำกัด; 2558.
8. Bland JM, Altman DG. Statistical Methods for Assessing Agreement between Two Methods of Clinical measurement. Lancet 1986;1:307-310.

9. Hubert P, Nguyen-Huu B, Boulanger E, Chapuzet P, Chiap, N, Cohen, *et. al.* The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis. STP Pharma Techniques Pratiques Reglementations. 2003;13(3):101-138.
10. Guttman I. Statistical Tolerance Regions. Classical and Bayesian. Daresin: Hafner Publishing, CT.ISO; 1970.
11. ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feeding and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media. Geneva; 2014.
12. ISO 16140-1:2016. Microbiology of the food chain - Method validation - Part 1: Vocabulary. Geneva; 2016.



**สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**

เลขที่ 88/7 ซอยบำรุงราชนราดูร ถนนติวานนท์

ตำบลดลัดชวัญ อำเภอเมือง จังหวัदनนทบุรี 11000

โทรศัพท์ / โทรสาร 0 2951 1021

<http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/index.htm>