ว กรมวิทย พ 2560; 59 (3) : 152-170

การใช้ Accuracy profile ตรวจสอบความถูกต้องของแผ่นทดสอบ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate สำหรับตรวจหาปริมาณยีสต์และราในเครื่องดื่ม

กรุณา ตีรสมิทธ์ ลดาพรรณ แสงคล้าย และนลินี อยู่เพชร

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณทางจุลชีววิทยาตาม ISO 16140 – 2:2016 กำหนดให้ใช้ Accuracy profile ในการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ของวิธีอ้างอิงกับวิธีทางเลือก งานวิจัยนี้ได้นำ Accuracy profile มาใช้ตรวจสอบความถูกต้องของแผ่นทดสอบ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold (3M RYM) ในการตรวจนับปริมาณยีสต์และราในเครื่องดื่มชนิดเหลวเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง US FDA BAM โดยใช้ตัวอย่างเครื่องดื่มที่ปนเปื้อนยีสต์และราตามธรรมชาติและตัวอย่างที่เติมเชื้อที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (1 – 100 CFU/มิลลิลิตร) ระดับกลาง (100 – 1,000 CFU/มิลลิลิตร) และระดับสูง (มากกว่า 1,000 CFU/มิลลิลิตร) ผลทดสอบพบว่าเมื่อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง ผลทดสอบของวิธี 3M และวิธีอ้างอิงสอดคล้องกันเป็นแนวเส้นตรง (Linearity) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) ที่ใช้หาความสัมพันธ์ของ 2 วิธีมีค่าใกล้ 1 เท่ากับ 0.9986, 0.9988, 0.9995 และ 0.9992 ตามลำดับ เมื่อสร้างกราฟ Accuracy profile เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของแผ่นทดสอบ 3M RYM โดยกำหนดให้ช่วงครอบคลุมการกระจายของข้อมูล (β-expectation tolerance intervals, β-ETI) เท่ากับ 80% (β%) และขอบเขตการยอมรับผลทดสอบ (Acceptability limits, AL หรือ λ) เท่ากับ ±0.3 และ ±0.5 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร ผลการประเมินพบว่าเมื่อ λ เท่ากับ ±0.5 $\log_{10}$ วิธี 3M ที่บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง มีช่วงค่าของ β-ETI อยู่ภายในขอบเขตการยอมรับที่ทุกระดับการปนเปื้อน แต่เมื่อ λ เท่ากับ ±0.3 $\log_{10}$ ช่วงค่า β – ETI อยู่ในขอบเขตการยอมรับที่ทุกระดับการปนเปื้อนเมื่อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 72 ชั่วโมงเท่านั้น สรุปได้ว่าช่วงความใช้ได้ของแผ่นทดสอบ 3M RYM ขึ้นกับการกำหนด β% และขอบเขตการยอมรับผลทดสอบ (λ) ของผู้ใช้งาน กล่าวได้ว่าการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีด้วยกราฟ Accuracy profile เป็นเครื่องมือให้ผู้ใช้งานสามารถพิจารณาความเหมาะสมของการนำวิธีไปใช้

Accepted for publication, 18 July 2017

บทนำ

ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่ม จุลินทรีย์ประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อสุขลักษณะการผลิต คือ ยีสต์และรา การตรวจสอบยีสต์และราในอาหารและเครื่องดื่มเป็นปัจจัยสำคัญต่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ปัจจุบันวิธีอ้างอิงที่ใช้ตรวจนับยีสต์และราในอาหารมีมากมายหลายวิธี ตามเอกสารอ้างอิงที่เชื่อถือได้และโดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิคการเพาะเชื้อ (Culturable technique) ตามเอกสาร ISO 21527:2008[1] หรือ U.S. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (US FDA BAM)[2] ซึ่งใช้เวลานานถึง 5 – 7 วัน อาจช้าเกินไปสำหรับอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องการทราบผลวิเคราะห์ภายในเวลารวดเร็วในการนำผลไปใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ วัตถุดิบ หรืออื่นๆ ในกระบวนการผลิตไม่ให้เกิดความเสียหายทางธุรกิจ วิธีทางเลือกที่ได้ผลวิเคราะห์รวดเร็วขึ้นจึงได้ถูกพัฒนาด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น Flow cytometry ชีวโมเลกุล (Molecular) อิมมูโนวิทยา[3] แต่วิธีเหล่านี้ต้องใช้เครื่องมืออัตโนมัติและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ค่อนข้างแพง วิธีการเพาะเชื้อที่ให้ผลที่รวดเร็วกว่าจึงได้ถูกพัฒนาขึ้นเป็นวิธีทางเลือก การใช้แผ่นทดสอบ 3M Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate (3M RYM) ก็เป็นวิธีทางเลือกที่รวดเร็ว โดยอาศัยหลักการเจริญของเชื้อบนแผ่นทดสอบที่มีสารอาหารผสมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล และคลอเตตราซัยคลิน[4] รวมทั้งสารที่ละลายน้ำแล้วทำให้เกิดเจลและอินดิเคเตอร์ที่มีความไวต่อเอนไซม์ฟอสฟาเตสที่มีอยู่ในยีสต์ รา และอาหารบางชนิด[5] แต่การนำวิธีทางเลือกมาใช้อย่างมั่นใจว่าได้ผลทดสอบที่เทียบเท่าวิธีอ้างอิงจำเป็นจะต้องดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ของวิธีทางเลือก (Validation of alternative method) แผ่นทดสอบ 3M RYM ถูกพัฒนาให้อ่านผลได้เร็วขึ้นภายใน 48 – 60 ชั่วโมง และบ่มเพาะเชื้อได้ 2 อุณหภูมิ คือ 25°C และ 28°C หน่วยงาน AOAC และ AFNOR ได้ตรวจสอบความถูกต้องของแผ่นทดสอบ 3M RYM โดยผลการตรวจสอบของ AOAC[6] ที่ดำเนินการภายในหนึ่งห้องปฏิบัติการในอาหาร 10 ชนิด พบว่าเมื่อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 และ 60 ชั่วโมง มีอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ โยเกิร์ต แอปเปิ้ล เนื้อวัวบด และไส้กรอก ที่ผลของแผ่นทดสอบ 3M RYM และวิธีอ้างอิง US FDA BAM หรือ ISO 21527 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 สำหรับครีมเปรี้ยว แซนด์วิช พาย อัลมอนด์ และแป้งโดขนมปังแช่แข็ง มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ส่วนซุปผงแผ่นทดสอบ 3M RYM ตรวจพบเชื้อที่เติมลงไป แต่วิธีอ้างอิงตรวจไม่พบเชื้อ สำหรับหน่วยงาน AFNOR[7] ที่ดำเนินการตรวจสอบภายในหนึ่งห้องปฏิบัติการ โดยเปรียบเทียบการบ่มแผ่นทดสอบ 3M RYM ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 60 และ 72 ชั่วโมง กับวิธีอ้างอิง ISO 21527 และมีการประเมินผลตาม ISO 16140:2003 ได้แก่ การทดสอบความเป็นเส้นตรง การหาความสัมพันธ์ของ 2 วิธีด้วยการวิเคราะห์การถดถอย (Regression analysis) ความแม่นสัมพัทธ์ (Relative accuracy) ความไวสัมพัทธ์ (Relative sensitivity) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (LOQ) ซึ่งสรุปว่าแผ่นทดสอบ 3M RYM เชื่อถือได้ ในปี พ.ศ. 2559 ISO ได้ประกาศใช้ ISO 16140 – 2:2016[8] ซึ่งมีการประเมินผลด้วย Accuracy profile ที่เพิ่มขึ้นจากปี ค.ศ 2003 โดย Boulanger และคณะ[9] ได้ริเริ่มนำหลักการของ Accuracy profile มาใช้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทางเลือกเพื่อลดข้อจำกัดของวิธีแบบเดิมที่ใช้การทดสอบสมมติฐานแบบ null hypothesis ในการตรวจสอบความแตกต่างของสองวิธีที่ความเชื่อมั่นระดับหนึ่ง และให้ข้อคิดเห็นว่าค่าความเที่ยง (Precision) ที่วัดด้วยค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ของผลทดสอบวิธีทางเลือกที่มีค่าต่ำหรือสูงไม่มีผลกระทบกับการทดสอบด้วย null hypothesis ซึ่งอาจทำให้การยอมรับวิธีของผู้ที่จะนำวิธีไปใช้งานไม่ได้คำนึงถึงความเที่ยงของวิธีทางเลือก นอกจากนี้วิธีทดสอบด้วย null hypothesis ไม่สามารถแสดงค่าความถูกต้องได้อย่างสมบูรณ์ เพราะไม่แสดงขอบเขตของการยอมรับได้ของผลวิเคราะห์ แต่การใช้ Accuracy profile สามารถทำได้โดยอาศัยค่าความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ระหว่างผลทดสอบวิธีทางเลือกกับวิธีอ้างอิง Accuracy profile จึงเป็นเครื่องมือทางสถิติที่เหมาะสมสำหรับการแปลผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ได้ดีกว่าการทดสอบ null hypothesis เพราะมีการรวม β-expectation

tolerance intervals (β-ETI) และขอบเขตการยอมรับอยู่ภายในกราฟเดียวกัน ซึ่ง β-ETI เป็นช่วงที่คาดว่าผลการทดสอบในอนาคตจำนวน β% จะตกอยู่ในช่วงนี้ การใช้ Accuracy profile ทำให้ผู้นำวิธีไปใช้สามารถพิจารณาความเหมาะสมของวิธี ในการนำไปใช้ตามวัตถุประสงค์ของงาน (Fitness-for-purpose) ได้[10] คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาหลักการและทดลองนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบโดยศึกษากับแผ่นทดสอบ 3M RYM เปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง US FDA BAM ในการตรวจหายีสต์และราในเครื่องดื่มชนิดเหลว

วัสดุและวิธีการ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Plate count agar (PCA) ผสมคลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้น 0.01% (PCA + chlo)
2. แผ่นทดสอบ 3M Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate (3M RYM)
3. Brain heart infusion broth (BHI broth)
4. สารละลาย 0.1% Peptone
5. สารละลาย Phosphate buffered saline + 0.1% Tween 20 (PBS + 0.1% Tween 20)

เครื่องมือและอุปกรณ์

อ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 ± 1°C ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 25 ± 1°C และ 28 ± 1°C เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้อบร้อน เครื่องนับโคโลนี กล้องจุลทรรศน์ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เครื่องผสม (Vortex mixer) เทอร์โมคัปเปิล นาฬิกาจับเวลา ปิเปตอัตโนมัติขนาด 1,000 ไมโครลิตร ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร ขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร หลอดทดลองขนาด 18 × 150 มิลลิเมตร จานเพาะเชื้อขนาด 10 × 90 มิลลิเมตร แผ่นกระจกสไลด์ หลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร สำลี มีดปราศจากเชื้อ ห่วงเขี่ยเชื้อ หลอดหยด (Dropper) และไม้สวอป

จุลินทรีย์มาตรฐาน

ยีสต์มาตรฐาน *Saccharomyces cerevisiae* DMST 22805 และรามาตรฐาน *Aspergillus niger* DMST 15538 ได้จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

วิธีเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐาน

Saccharomyces cerevisiae เพาะยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA + chlo บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 3 วัน แล้วเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ใส่ลงในหลอด BHI broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่ 25°C นาน 3 วัน เจือจางเชื้อด้วยสารละลาย 0.1% Peptone จนได้เชื้อประมาณ 10^5 CFU/มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้เชื้อบาดเจ็บ

Aspergillus niger เพาะราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA + chlo บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 วัน ใช้มีดปราศจากเชื้อ ตัดวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของราที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ PCA + chlo ให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปวางตรงกลางจาน PCA + chlo บ่มเพาะเชื้อที่ 25°C นาน 7 วัน ทำการเก็บสปอร์โดยเติมสารละลาย PBS + 0.1% Tween 20 ประมาณ 5 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อ ใช้ไม้สวอปถูไปมาเบา ๆ บนเส้นใยเพื่อให้สปอร์หลุดออก แล้วใช้หลอดหยดดูดสารละลายสปอร์ใส่ในหลอดทดลองปราศจากเชื้อ เก็บสปอร์ซ้ำอีกหนึ่งครั้ง จากนั้นเทสารละลายสปอร์ทั้งหมดลงในหลอดฉีดยาที่บรรจุสำลีก้อนปราศจากเชื้อแบบหลวม ๆ เพื่อกรองเส้นใยเชื้อราที่อาจติดมากับสปอร์ออก เก็บสารละลายสปอร์ที่ออกมาจากปลายหลอดฉีดยา เจือจางเชื้อด้วยสารละลาย 0.1% Peptone จนได้ระดับปริมาณเชื้อที่ต้องการแล้วนำไปทำให้เชื้อบาดเจ็บ

การทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บ (Injured) นำสารละลายยีสต์และสปอร์ราที่เตรียมได้ ใส่ลงในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 ± 1°C พร้อมกับหลอดที่มีสารละลาย 0.1% Peptone และเทอร์โมคัปเปิลสำหรับวัดอุณหภูมิ เมื่อแสดงอุณหภูมิ 50 ± 1°C แล้วจึงเริ่มจับเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายเชื้อไปใช้ทดสอบต่อไป

ตัวอย่าง

เครื่องดื่มชนิดเหลวจำนวน 8 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างปนเปื้อนยีสต์และราตามธรรมชาติ (Natural contamination) ที่ทราบปริมาณปนเปื้อน ได้แก่ น้ำกระเจี๊ยบ น้ำมะขาม น้ำแอปเปิลผสมว่านหางจระเข้ น้ำลำไย กาแฟเย็น และตัวอย่างที่เติมจุลินทรีย์มาตรฐานที่ทำให้บาดเจ็บ (Artificial contamination) ได้แก่ น้ำลิ้นจี่ น้ำชาเขียว และน้ำผักผลไม้รวม

เตรียมตัวอย่างให้มีการปนเปื้อนยีสต์และรา 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (1 – 100 CFU/มิลลิลิตร) ระดับกลาง (100 – 1,000 CFU/มิลลิลิตร) และระดับสูง (มากกว่า 1,000 CFU/มิลลิลิตร) การเจือจางตัวอย่างใช้ตัวอย่างตั้งต้น 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย 0.1% Peptone ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่า (Tenfold dilution) ทำการเจือจางต่อจนได้ระดับเชื้อที่สามารถนับได้

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

แต่ละตัวอย่างทดสอบ 2 วิธี คือ วิธี 3M และวิธีอ้างอิง US FDA BAM 2001 โดยทดสอบ 5 ซ้ำสำหรับวิธี 3M และทดสอบ 3 ซ้ำสำหรับวิธีอ้างอิง

วิธี 3M[11]

ทดสอบตัวอย่าง 2 ชุด สำหรับแยกบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นำแผ่นทดสอบ 3M RYM วางบนพื้นเรียบ แล้วใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ยกแผ่นฟิล์มด้านบนขึ้น แล้วปล่อยตัวอย่างลงตรงกลางแผ่นทดสอบ ค่อย ๆ วางแผ่นฟิล์มด้านบนลง ใช้ตัวกดแผ่นทดสอบ 3M RYM กดเบา ๆ ให้ตัวอย่างกระจายทั่วพื้นที่วงกลม นำตัวกดออก วางแผ่นทดสอบทิ้งไว้สักครู่ ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นับจำนวนยีสต์และราเมื่อครบเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง และ 72 ± 3 ชั่วโมง รายงานผลเป็น CFU/มิลลิลิตร ลักษณะโคโลนียีสต์ คือ ขนาดเล็ก นูน มีขอบเขตชัดเจน สีน้ำตาลอมชมพู ถึงสีเขียวอมฟ้า ลักษณะโคโลนีรา คือ ขนาดใหญ่ แบน สีเขียวอมฟ้าตรงกลางโคโลนีมีจุดเข้ม ขอบแผ่กระจาย

วิธีอ้างอิง US FDA BAM[2]

ปิเปตตัวอย่างใส่จานเพาะเชื้อ 3 จาน จานละ 1 มิลลิลิตรต่อระดับการเจือจาง เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA + chlo ลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 – 7 วัน นับจำนวนยีสต์และรา แล้วหาค่าเฉลี่ยจาก 3 จานเพาะเชื้อ รายงานผลเป็น CFU/มิลลิลิตร

การประเมินผล

นำผลการนับจำนวนโคโลนียีสต์และราของทั้งสองวิธีมาแปลงเป็นค่า $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร แล้วดำเนินการดังนี้

1. การทดสอบการเพิ่มขึ้นของจำนวนโคโลนีของวิธี 3M

ใช้สถิติ Paired t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทดสอบการเพิ่มขึ้นของจำนวนโคโลนีในการทดสอบด้วยวิธี 3M เมื่อใช้เวลาบ่มเพาะเชื้อนานขึ้นจาก 48 ชั่วโมงเป็น 72 ชั่วโมง ถ้าค่า p ที่คำนวณได้น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงว่าการบ่มเพาะเชื้อนาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนโคโลนีมากกว่าการบ่มนาน 48 ชั่วโมง

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) และการหาความสัมพันธ์ของสองวิธี

ใช้ซอฟต์แวร์โปรแกรม EXCEL สร้างกราฟดูความเป็นเส้นตรง (Linearity) พร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีอ้างอิงกับวิธี 3M ที่บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง โดยใช้สถิติการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (Simple linear regression) หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient, r) และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficient) หรือความชัน (Slope)

3. การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) ของวิธี 3M ด้วยกราฟ Accuracy profile

การสร้างกราฟ Accuracy profile[8]

สัญลักษณ์

i = ตัวอย่าง

q = จำนวนตัวอย่าง ($1 \le i \le q$) ในที่นี้ q = 8

j = ตัวอย่างทดสอบทวนซ้ำ (Repeatability)

n = จำนวนการทวนซ้ำของตัวอย่าง ($1 \le j \le n$)
ในที่นี้ วิธี 3M, n = 5 และวิธีอ้างอิง n = 3

alt = วิธีทางเลือก (Alternative method) หมายถึง วิธี 3M

ref = วิธีอ้างอิง (Reference method) หมายถึง วิธีอ้างอิง US FDA BAM

วิธีทำ

1. กำหนดขอบเขตการยอมรับผลทดสอบ (Acceptability limit, λ) เท่ากับ $\pm 0.3 \log_{10}$ และ $\pm 0.5 \log_{10}$
2. แปลงข้อมูลผลวิเคราะห์เป็นค่า $\log_{10}$CFU
3. หาค่ามัธยฐานของผลทดสอบของแต่ละตัวอย่าง i ที่ได้จากวิธีอ้างอิง เรียกค่านี้ว่า ค่าอ้างอิง (X_i)

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

4. หาค่ามัธยฐานของผลทดสอบของแต่ละตัวอย่าง i ที่ได้จากวิธี 3M

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

5. คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากวิธี 3M ($S_{alt,i}$)

$$S_{alt,i} = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{j=1}^{n}(yij - \bar{yi})^2}$$

6. คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวม (Combined standard deviation) ที่ได้จากวิธี 3M (S_{alt})

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

7. คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละตัวอย่าง ($S_{ref,i}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวมที่ได้จากวิธีอ้างอิง (S_{ref})

$$S_{ref,i} = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{j=1}^{n}(xij - \bar{xi})^2}$$

และ

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

ค่า S_{ref} นำมาใช้เมื่อผลทดสอบอยู่นอกขอบเขตการยอมรับ โดยต้องพิจารณาว่าค่า S_{ref} มากกว่า 0.125 หรือไม่ ถ้ามากกว่า ต้องปรับค่าขอบเขตการยอมรับผลทดสอบใหม่ คือ $AL_S = 4.S_{ref}$

8. คำนวณค่าความแตกต่างของค่ามัธยฐานระหว่างสองวิธีของแต่ละตัวอย่าง i เรียกว่า Bias (B_i) หรือเรียกว่า ค่าความเบี่ยงเบนของผลวิธี 3M

$$B_i = Y_i - X_i$$

9. คำนวณขีดจำกัด (Limits) ของช่วงความคลาดเคลื่อนคาดหวัง (β-expectation tolerance interval, β-ETI) ซึ่งเป็นช่วงที่คาดว่าผลทดสอบจำนวน β% ในอนาคตที่ได้จากวิธี 3M จะตกอยู่ในช่วงค่านี้ โดยกำหนดสัดส่วนของผลทดสอบในอนาคตนี้เท่ากับ β

ช่วงค่า β - ETI $= B_i \pm T.S_{alt}\sqrt{1 + \frac{1}{n}}$

เมื่อ $T = T_{\left(\frac{1-\beta}{2}\right);q(n-1)}$ เป็นค่า percentile ของการกระจายแบบ student-t สำหรับความน่าจะเป็น β ซึ่ง ISO 16140 กำหนด β ไว้เท่ากับ 80% และ q (n-1) = degrees of freedom นั่นคือ T เป็นค่า coverage factor ของช่วง β-ETI ของวิธี 3M

จะได้ขีดจำกัดบน (Upper limit, U_i) และขีดจำกัดล่าง (Lower limit, L_i) ของช่วงค่า β-ETI ดังนี้

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

10. สร้างกราฟ Accuracy profile ให้แกน X เป็นค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงที่แปลงเป็นค่า $\log_{10}$ แล้ว และแกน Y เป็นค่า bias, acceptability limit, upper limit และ lower limit ของช่วงค่า β-ETI

ผล

เมื่อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง ผลทดสอบของวิธี 3M กับผลของวิธีอ้างอิงมีความแตกต่างกันไม่เกิน ±0.5 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 1) และพบว่าที่ทุกระดับการปนเปื้อนการทดสอบด้วยวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนโคโลนียีสต์และราเพิ่มขึ้นกว่าเวลาบ่ม 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) จำแนกได้ดังนี้

- ที่การปนเปื้อนเชื้อระดับต่ำ (1 - 100 CFU/มิลลิลิตร) วิธี 3M ที่บ่มอุณหภูมิ 25°C นาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนโคโลนียีสต์และราเพิ่มขึ้น 0.125 ถึง 0.240 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร และที่อุณหภูมิ 28°C มีจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้น 0.085 ถึง 0.176 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร
- ที่การปนเปื้อนเชื้อระดับปานกลาง (100 - 1,000 CFU/มิลลิลิตร) วิธี 3M ที่บ่มอุณหภูมิ 25°C นาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนโคโลนียีสต์และราเพิ่มขึ้น 0.013 ถึง 0.065 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร และ 28°C มีจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้น 0.000 ถึง 0.026 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร
- ที่การปนเปื้อนเชื้อระดับสูง (มากกว่า 1,000 CFU/มิลลิลิตร) วิธี 3M ที่บ่มอุณหภูมิ 25°C นาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนโคโลนียีสต์และราเพิ่มขึ้น 0.000 ถึง 0.066 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร และ 28°C มีจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้น 0.000 ถึง 0.006 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนียีสต์และราโดยวิธี 3M ที่อุณหภูมิบ่มเพาะเชื้อ 25°C และ 28°C กับวิธีอ้างอิง US FDA BAM

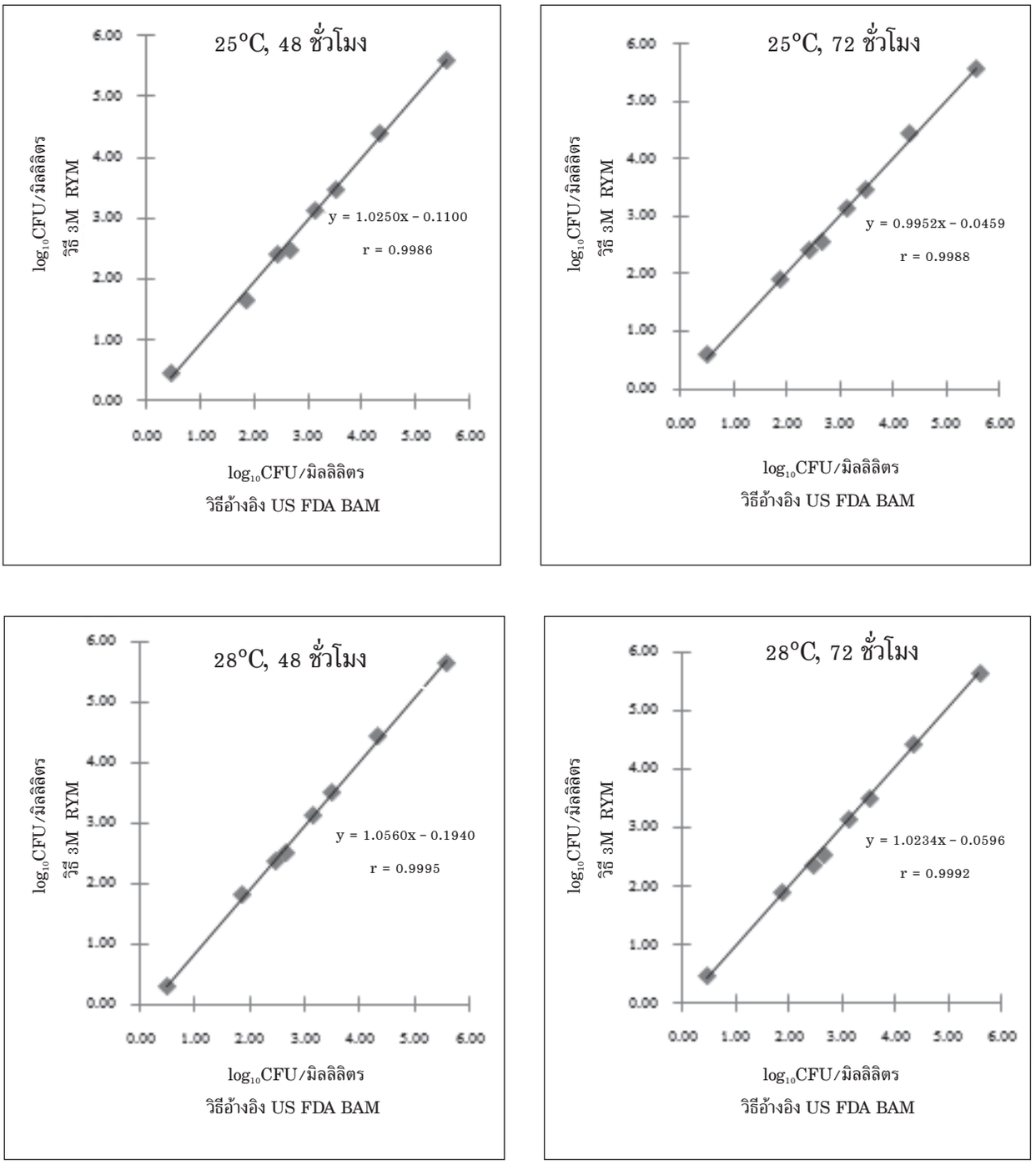
ระดับการปนเปื้อน	วิธีอ้างอิง US FDA BAM	วิธี 3M ที่ 25°C		วิธี 3M ที่ 28°C		ผลต่างของ Median log_{10}CFU/ml ระหว่าง 3M กับวิธีอ้าง US FDA BAM			
	Median	Median log_{10}CFU/ml		Median log_{10}CFU/ml		ที่ 25°C		ที่ 28°C	
CFU/ml	log_{10}CFU/ml	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
ต่ำ	0.477	0.477	0.602	0.301	0.477	0.000	+0.125	−0.176	0.000
(1 – 100)	1.857	1.663	1.903	1.813	1.898	−0.194	+0.046	−0.044	+0.041
ปานกลาง	2.435	2.410	2.423	2.375	2.375	−0.025	−0.012	−0.060	−0.060
(100 – 1,000)	2.650	2.491	2.556	2.505	2.531	−0.159	−0.094	−0.145	−0.119
สูง	3.127	3.134	3.149	3.137	3.143	+0.007	+0.022	+0.010	+0.016
(มากกว่า 1,000)	3.491	3.491	3.491	3.505	3.505	0.000	0.000	+0.014	+0.014
	4.326	4.407	4.473	4.435	4.435	+0.081	+0.147	+0.109	+0.109
	5.572	5.580	5.591	5.653	5.653	+0.008	+0.019	+0.081	+0.081

การทดสอบการเพิ่มขึ้นของจำนวนโคโลนีของวิธี 3M

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า วิธี 3M เมื่อใช้เวลาบ่มเพาะเชื้อนานขึ้นจาก 48 ชั่วโมงเป็น 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C มีค่า p-value เท่ากับ 0.0267 ในขณะที่เมื่อบ่ม 28°C มีค่า p-value เท่ากับ 0.0733

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) และการหาความสัมพันธ์ของสองวิธี

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C (ภาพที่ 1) พบว่า 2 วิธีมีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง เมื่อใช้สถิติการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.9986 และ 0.9988 ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.9995 และ 0.9992 ตามลำดับ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยหรือความชัน ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 1.0250 และ 0.9952 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 1.0560 และ 1.0234 ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ของวิธีอ้างอิง US FDA BAM กับวิธี 3M ที่อุณหภูมิบ่มเพาะเชื้อ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง

การสร้างกราฟ Accuracy profile

นำผลการนับจำนวนโคโลนียีสต์และราของวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง ไปคำนวณหาค่าความเบี่ยงเบน (Bias) ของผลทดสอบวิธี 3M ขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่างของช่วงความคลาดเคลื่อนคาดหวัง (Upper and Lower β-ETI limits) เพื่อสร้างกราฟ Accuracy profile โดยกำหนดค่าเบต้า (β) เท่ากับ 80% และขอบเขตการยอมรับผลทดสอบ (λ) เท่ากับ ±0.3 และ ±0.5 $\log_{10}$ ใน (ตารางที่ 2 – ตารางที่ 5) นำผลคำนวณที่ได้นี้ไปสร้างกราฟ Accuracy profile (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้าง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 48 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6	ตัวอย่างที่ 7	ตัวอย่างที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	4	44	257	350	1180	3200	30900	21000
	2	3	46	234	250	1510	2000	25100	38000
	3	5	65	295	290	1300	3900	29000	55000
	4	3	45	306	310	1510	2150	22000	30000
	5	3	57	163	360	1360	3100	25500	47000
แปลงเป็นค่า $\log_{10}$									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X_i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.602	1.643	2.410	2.544	3.072	3.505	4.490	5.322
	2	0.477	1.663	2.369	2.398	3.179	3.301	4.400	5.580
	3	0.699	1.813	2.470	2.462	3.114	3.591	4.462	5.740
	4	0.477	1.653	2.486	2.491	3.179	3.332	4.342	5.477
	5	0.477	1.756	2.212	2.556	3.134	3.491	4.407	5.672
	Y_i	0.477	1.663	2.410	2.491	3.134	3.491	4.407	5.580
	$S_{alt,i}$	0.101	0.075	0.110	0.064	0.046	0.123	0.058	0.165
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	S_{alt}	0.100							
	$S_{ref,i}$	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	n	3	3	3	3	3	3	3	3
	S_{ref}	0.090							
	$Y_i - X_i$	0.000	-0.195	-0.025	-0.159	0.006	0.000	0.081	0.008
	$S_{alt}.\sqrt{(1+1/n)}$	0.109							
	$T_{(0.1,32)^{(12)}}$	1.3086							
	$T.S_{alt}.\sqrt{(1+1/n)}$	0.143							
	U_i	0.143	-0.051	0.118	-0.016	0.150	0.143	0.224	0.151
	L_i	-0.143	-0.338	-0.168	-0.302	-0.137	-0.143	-0.062	-0.135

ตารางที่ 3 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้าง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 72 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6	ตัวอย่างที่ 7	ตัวอย่างที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	4	69	265	390	1180	3200	30900	22000
	2	3	80	237	320	1510	2000	26300	39000
	3	5	99	295	360	1320	4000	32700	56000
	4	3	71	309	340	1510	2230	24200	33000
	5	5	90	172	450	1410	3100	29700	47000
แปลงเป็นค่า Log_{10}									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X_i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.602	1.839	2.423	2.591	3.072	3.505	4.490	5.342
	2	0.477	1.903	2.375	2.505	3.179	3.301	4.420	5.591
	3	0.699	1.996	2.470	2.556	3.121	3.602	4.515	5.748
	4	0.477	1.851	2.490	2.531	3.179	3.348	4.384	5.519
	5	0.699	1.954	2.236	2.653	3.149	3.491	4.473	5.672
	Y_i	0.602	1.903	2.423	2.556	3.149	3.491	4.473	5.591
	$S_{alt,i}$	0.111	0.067	0.101	0.057	0.045	0.123	0.053	0.156
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
	S_{alt}	0.097							
	$S_{ref,i}$	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	N	3	3	3	3	3	3	3	3
	S_{ref}	0.090							
	$Y_i - X_i$	0.125	0.046	-0.011	-0.094	0.022	0.000	0.147	0.019
	$S_{alt}.\sqrt{(1+1/n)}$	0.106							
	T(0.1,32)	1.3086							
	$T.S_{alt}.\sqrt{(1+1/n)}$	0.138							
	U_i	0.263	0.184	0.127	0.044	0.161	0.138	0.286	0.157
	L_i	-0.014	-0.093	-0.150	-0.232	-0.116	-0.138	0.009	-0.120

ตารางที่ 4 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้าง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 48 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6	ตัวอย่างที่ 7	ตัวอย่างที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	2	50	195	340	1250	3700	28000	45000
	2	6	65	283	280	1210	3600	25600	43000
	3	1	71	239	340	1370	3200	27200	49000
	4	2	51	237	310	1430	2730	22100	34000
	5	3	84	237	320	1530	2600	28700	49000
แปลงเป็นค่า Log_{10}									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X_i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.301	1.699	2.290	2.531	3.097	3.568	4.447	5.653
	2	0.778	1.813	2.452	2.447	3.083	3.556	4.408	5.633
	3	0.000	1.851	2.378	2.531	3.137	3.505	4.435	5.690
	4	0.301	1.708	2.375	2.491	3.155	3.436	4.344	5.531
	5	0.477	1.924	2.375	2.505	3.185	3.415	4.458	5.690
	Y_i	0.301	1.813	2.375	2.505	3.137	3.505	4.435	5.653
	$S_{alt,i}$	0.285	0.096	0.057	0.035	0.042	0.069	0.045	0.065
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
	S_{alt}	0.116							
	$S_{ref,i}$	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	N	3	3	3	3	3	3	3	3
	S_{ref}	0.090							
	$Y_i - X_i$	-0.176	-0.044	-0.060	-0.145	0.010	0.014	0.109	0.081
	$S_{alt}.\sqrt{(1+1/n)}$	0.127							
	$T(0.1,32)$	1.3086							
	$T.S_{alt}.\sqrt{(1+1/n)}$	0.166							
	U_i	-0.010	0.122	0.107	0.021	0.176	0.180	0.275	0.247
	L_i	-0.342	-0.211	-0.226	-0.312	-0.157	-0.153	-0.057	-0.085

ตารางที่ 5 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้าง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 72 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6	ตัวอย่างที่ 7	ตัวอย่างที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	2	80	195	350	1250	3800	28100	45000
	2	6	75	283	310	1210	3600	25600	43000
	3	3	79	239	350	1390	3200	27200	49000
	4	2	58	237	340	1430	2740	22100	34000
	5	3	95	237	340	1540	2700	28800	49000
แปลงเป็นค่า Log_{10}									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X_i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.301	1.903	2.290	2.544	3.097	3.580	4.449	5.653
	2	0.778	1.875	2.452	2.491	3.083	3.556	4.408	5.633
	3	0.477	1.898	2.378	2.544	3.143	3.505	4.435	5.690
	4	0.301	1.763	2.375	2.531	3.155	3.438	4.344	5.531
	5	0.477	1.978	2.375	2.531	3.188	3.431	4.459	5.690
	Y_i	0.477	1.898	2.375	2.531	3.143	3.505	4.435	5.653
	$S_{alt,i}$	0.195	0.077	0.057	0.022	0.043	0.067	0.046	0.065
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
	S_{alt}	0.087							
	$S_{ref,i}$	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	N	3	3	3	3	3	3	3	3
	S_{ref}	0.090							
	$Y_i - X_i$	0.000	0.040	-0.060	-0.119	0.016	0.014	0.109	0.081
	$S_{alt}.\sqrt{(1+1/n)}$	0.095							
	T(0.1,32)	1.3086							
	$T.S_{alt}.\sqrt{(1+1/n)}$	0.125							
	U_i	0.125	0.165	0.065	0.006	0.141	0.138	0.234	0.206
	L_i	-0.125	-0.084	-0.184	-0.244	-0.109	-0.111	-0.016	-0.044

จากกราฟ Accuracy profile (ภาพที่ 2) ถ้าส่วนใดของเส้นขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่างของ β-ETI (Upper and Lower β-ETI limits) ซึ่งครอบคลุมผลทดสอบในอนาคต β% ตกอยู่นอกขอบเขตของ λ แสดงว่าผลทดสอบที่ระดับการปนเปื้อนที่ส่วนนั้นจะไม่ถูกยอมรับ หรือไม่สอดคล้องกับผลของวิธีอ้างอิง อีกนัยหนึ่งคือ ผลทดสอบของวิธี 3M จะสอดคล้องหรือเทียบเท่าวิธีอ้างอิง เมื่อเส้นขีดจำกัดบนและล่างของ β-ETI ตกอยู่ในขอบเขตของ λ จึงสรุปผลได้ดังนี้

1. การบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.)

เมื่อ λ เท่ากับ ±0.5 $\log_{10}$ ที่ทุกระดับการปนเปื้อนพบว่า ผลทดสอบขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่างของ β-ETI ของวิธี 3M ตกอยู่ภายในขอบเขตการยอมรับ แต่ถ้า λ เท่ากับ ±0.3 $\log_{10}$ พบตัวอย่างที่ 2 (ระดับปริมาณเชื้อ 1.663 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร) และตัวอย่างที่ 4 (ระดับปริมาณเชื้อ 2.491 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร) มีผลทดสอบตกอยู่นอกขอบเขตการยอมรับ

2. การบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.2)

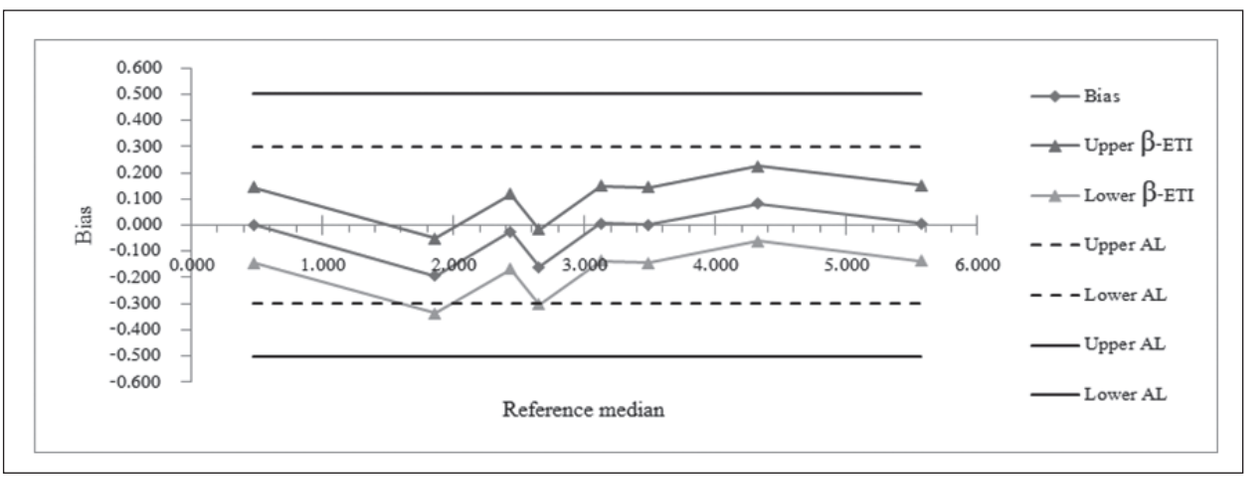
ผลทดสอบของวิธี 3M อยู่ภายในขอบเขตการยอมรับที่ทุกระดับการปนเปื้อน เมื่อ λ เท่ากับ ±0.5 และ ±0.3 $\log_{10}$

3. การบ่มที่อุณหภูมิ 28°C นาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.3)

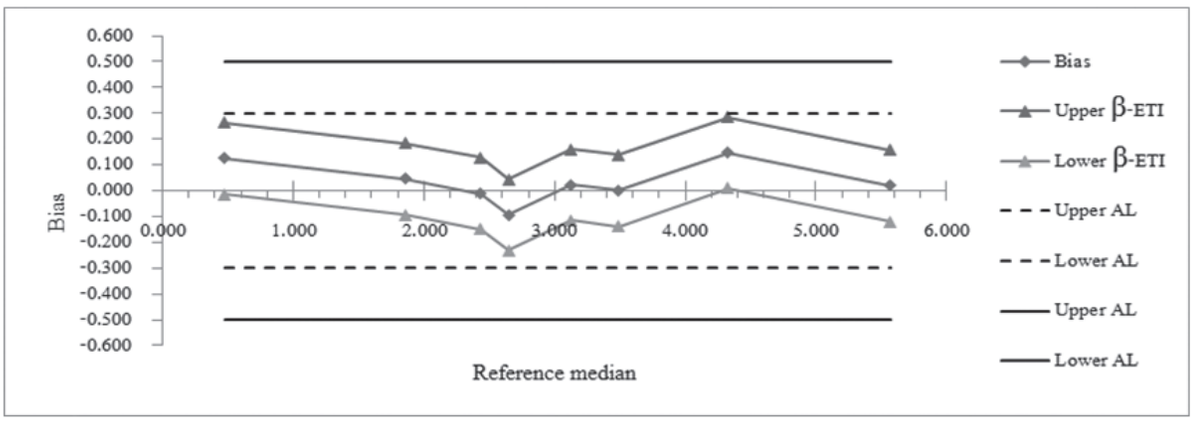
เมื่อ λ เท่ากับ ±0.5 $\log_{10}$ ที่ทุกระดับการปนเปื้อนพบว่า ผลทดสอบขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่างของ β-ETI ของวิธี 3M ตกอยู่ภายในขอบเขตการยอมรับ แต่ถ้า λ เท่ากับ ±0.3 $\log_{10}$ พบตัวอย่างที่ 1 (ระดับปริมาณเชื้อ 0.301 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร) และตัวอย่างที่ 4 (ระดับปริมาณเชื้อ 2.505 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร) มีผลทดสอบอยู่นอกขอบเขตการยอมรับ

4. การบ่มที่อุณหภูมิ 28°C นาน 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.4)

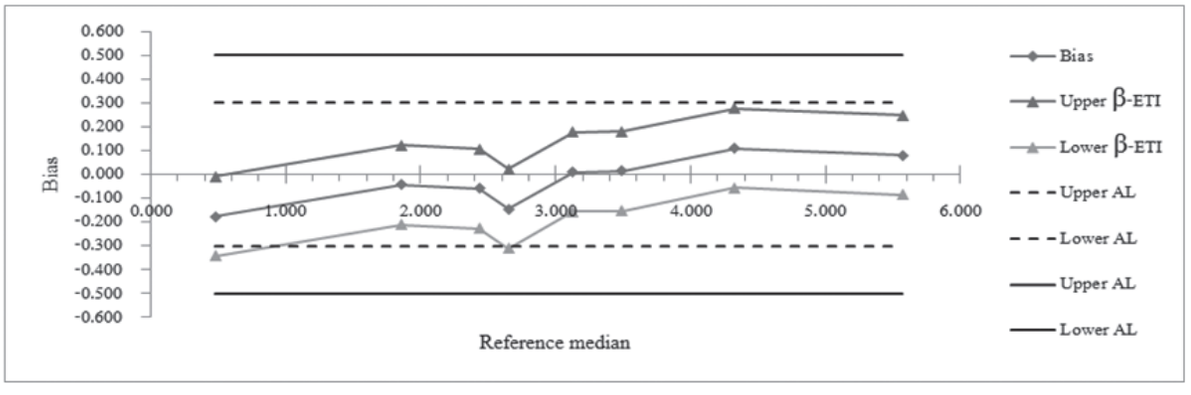
ผลทดสอบของวิธี 3M อยู่ภายในขอบเขตการยอมรับที่ทุกระดับการปนเปื้อน เมื่อ λ เท่ากับ ±0.5 และ ±0.3 $\log_{10}$



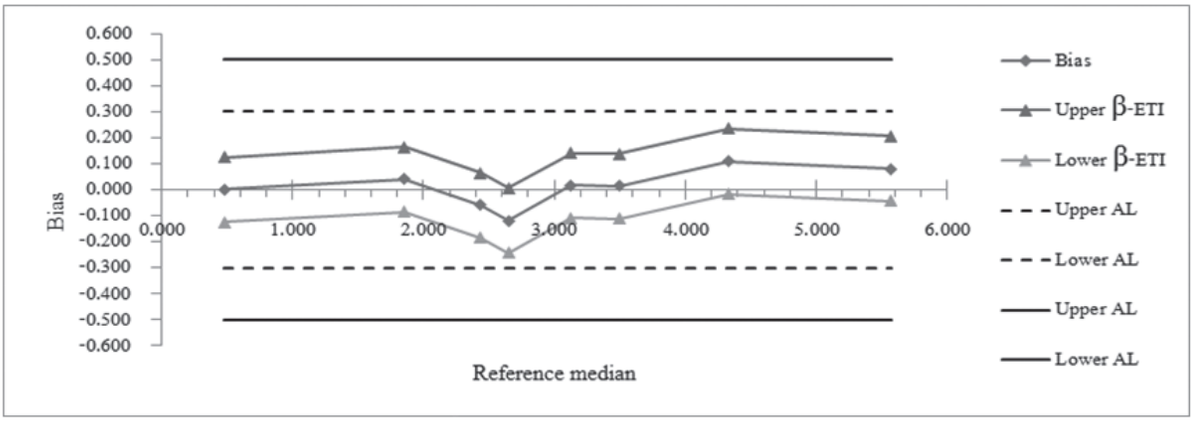
ภาพที่ 2.1 ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 2.2 ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 2.3 ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 2.4 ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 72 ชั่วโมง

ภาพที่ 2 แสดง Accuracy profile ของแผ่นทดสอบ 3M RYM ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

วิจารณ์

โดยทั่วไปในงานทดสอบเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างเดียวกันแบบเชิงปริมาณทางจุลชีววิทยา ถ้าค่าความแตกต่างของผลซ้ำต่างกันไม่เกิน ±0.5 $\log_{10}$CFU ถือว่ายอมรับได้[13] จากตารางที่ 1 ผลทดสอบจำนวนโคโลนียีสต์และราในเครื่องดื่มชนิดเหลวระหว่างวิธี 3M กับวิธีอ้างอิง US FDA BAM ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันไม่เกิน ±0.5 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร จึงถือว่ายอมรับได้หากผู้นำวิธี 3M ไปใช้ยอมรับเกณฑ์ตัดสินนี้ ตามคู่มือการใช้งานของแผ่นทดสอบ 3M RYM[11] ระบุให้บ่มเพาะเชื้อนาน 48 ± 2 ชั่วโมง แต่ถ้าเห็นโคโลนีไม่ชัดเจนให้บ่มเพิ่ม 12 ชั่วโมง เป็น 60 ชั่วโมง และถ้าไม่สะดวกในการอ่านผลในห้องปฏิบัติการสามารถขยายเวลาบ่มเป็น 72 ชั่วโมงได้ งานวิจัยนี้จึงบ่มนาน 72 ชั่วโมง จากผลทดสอบพบว่าเมื่อบ่มแผ่นทดสอบ 3M RYM ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 72 ชั่วโมง พบมีจำนวนโคโลนียีสต์และราเพิ่มขึ้นจากการบ่ม 48 ชั่วโมง (0.00 – 0.24 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร) จากการทดสอบทางสถิติพบว่าการบ่มแผ่นทดสอบ 3M RYM นาน 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C มีจำนวนโคโลนีมากกว่าการบ่มนาน 48 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อาจเป็นเพราะโคโลนียีสต์และราที่เจริญช้ายังไม่สามารถสังเกตเห็นได้เมื่อครบ 48 ชั่วโมง แต่สามารถตรวจพบได้ที่เวลา 72 ชั่วโมง ส่วนที่อุณหภูมิ 28°C การบ่มนาน 72 ชั่วโมงมีจำนวนโคโลนีมากกว่าการบ่มนาน 48 ชั่วโมงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จึงอาจสรุปได้ว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 28°C นาน 48 ชั่วโมง สามารถอ่านผลได้ โดยไม่ต้องบ่มนานขึ้นถึง 72 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาของ Hans และคณะ[14] ที่เติมเชื้อยีสต์และราในตัวอย่างแป้งและมอซซาเรลลาชีสแล้วพบว่าต้องบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C นาน 60 ชั่วโมง จึงจะเห็นการเจริญของยีสต์และราชัดเจน ในขณะที่งานวิจัยของ Bird และคณะ[15] พบว่าการใช้แผ่นทดสอบ 3M RYM ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อบดแช่แข็งบ่มที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 ชั่วโมง เมื่อบ่มต่ออีกจนครบ 60 ชั่วโมง จำนวนยีสต์และราไม่เพิ่มขึ้น และได้สรุปว่าจากการทดสอบทางสถิติด้วย Paired t-test ผลทดสอบจำนวนยีสต์และราด้วยแผ่นทดสอบ 3M RYM กับวิธีอ้างอิง US FDA BAM แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดสอบความเป็นเส้นตรงทำเพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับวิธีทางเลือก เพราะมีผลกระทบกับความแม่น (Accuracy) โดยตรง[9] จากภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่าข้อมูลผลทดสอบของวิธี 3M กับวิธีอ้างอิงที่บ่มทั้งสองอุณหภูมิมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงมากและไปในทิศทางเดียวกัน เพราะค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) ใกล้เคียง 1 มาก (0.9986 – 0.9995) สอดคล้องกับข้อมูลการตรวจสอบความถูกต้องของ ADRIA Developpement, 2014[7] ที่เปรียบเทียบวิธี 3M กับวิธีมาตรฐาน ISO 21527 ในการตรวจนับยีสต์และราในอาหารน้ำผลไม้ และน้ำผ่านกระบวนการบำบัด นอกจากนี้ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Slope) เท่ากับ 1 (0.995 – 1.056) แสดงว่าวิธี 3M ให้ผลการทดสอบที่เทียบเท่าวิธีอ้างอิง

ในงานวิจัยนี้กำหนด β เท่ากับ 80% ตามข้อกำหนดของ ISO 16140-2:2016 โดยปกติขอบเขตการยอมรับเป็นความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ของผลการทดสอบระหว่างวิธีทางเลือกกับวิธีอ้างอิงซึ่งการกำหนดขอบเขตการยอมรับขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของวิธีอ้างอิง ระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหาร ประเภทจุลินทรีย์ หรือตามความต้องการของผู้ใช้งาน[10] ใน ISO 16140-2:2016 กำหนดขอบเขตการยอมรับ (Acceptability limit, AL) ของวิธีทางเลือก เท่ากับ ±0.5 $\log_{10}$ การยอมรับผลทดสอบของวิธี 3M ดูจากขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่าง (Upper and lower limits) ของช่วงค่า β – ETI ที่ไม่ออกนอกขอบเขตการยอมรับที่แต่ละระดับการปนเปื้อน ดังนั้นในภาพที่ 2 ถ้ากำหนด AL (λ) เท่ากับ ±0.5 $\log_{10}$ จึงสามารถกล่าวได้ว่า วิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิงสำหรับการทดสอบตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดเหลวที่ระดับการปนเปื้อนที่ทดสอบตั้งแต่ 0.477 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร ถึง 5.572 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร (3 CFU/มิลลิลิตร ถึง 373,330 CFU/มิลลิลิตร) ถ้าช่วงค่า β-ETI อยู่ในขอบเขตการยอมรับ (λ) ที่แคบลง เช่น λ = ±0.3 หรือ ±0.4 $\log_{10}$ จะแสดงว่าผลทดสอบของวิธีทางเลือกกับวิธีอ้างอิงมีความสอดคล้องหรือ

ใกล้เคียงกันมากยิ่งขึ้น นั่นคือวิธีทางเลือกมีความแม่นมากขึ้น ซึ่งเป็นประโยชน์กับผู้ใช้ในการตัดสินใจที่จะนำวิธีทางเลือกไปใช้โดยสามารถเลือกระดับความแม่นของวิธีได้ด้วยการกำหนดช่วงการยอมรับ อีกประการหนึ่งถ้ามีบางระดับการปนเปื้อนที่ช่วงค่า β-ETI อยู่นอกขอบเขตการยอมรับ ผู้ใช้ก็ยังสามารถเลือกใช้วิธีทางเลือกเฉพาะที่ช่วงค่า β-ETI อยู่ในขอบเขตการยอมรับได้ เช่น ในงานวิจัยนี้ เมื่อกำหนด λ เท่ากับ ±0.3 $\log_{10}$ ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 72 ชั่วโมง วิธี 3M จะให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิง (ภาพที่ 2.2 และ 2.4) แต่ที่อุณหภูมิ 28°C นาน 48 ชั่วโมง วิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิงยกเว้นที่ระดับการปนเปื้อนของตัวอย่างที่ 1 และ 4 (ภาพที่ 2.3) ในขณะที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง วิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิงยกเว้นที่ระดับการปนเปื้อนของตัวอย่างที่ 2 และ 4 (ภาพที่ 2.1) นอกจากความแม่นแล้วผู้ใช้ยังสามารถดูความเที่ยง (Precision) ของวิธีทางเลือกจากกราฟ Accuracy profile ด้วยการพิจารณาช่วงค่า β-ETI ที่คำนวณจาก $B_i \pm T.S_{alt}\sqrt{1+\frac{1}{n}}$ ซึ่งมีการนำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของวิธีทางเลือกจากการทดลองตัวอย่างซ้ำหลายครั้งมาใช้ โดยถ้าวิธีทางเลือกมีความเที่ยงน้อยช่วงค่า β-ETI จะกว้าง การแปลผลจากกราฟ Accuracy profile เช่นนี้ ทำให้ผู้ใช้วิธีสามารถตัดสินใจเลือกใช้วิธีทางเลือกได้ตามขอบเขตการยอมรับที่กำหนดและเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้กับตัวอย่าง

การทดสอบความเป็นเส้นตรงกับการใช้ Accuracy profile ให้ผลสอดคล้องกัน คือ วิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิง ยกเว้นเมื่อกำหนด λ เท่ากับ ±0.3 $\log_{10}$ ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 ชั่วโมง วิธี 3M ให้ผลไม่เทียบเท่าวิธีอ้างอิงที่บางระดับการปนเปื้อนยีสต์และรา ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดสอบความเป็นเส้นตรงที่วิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิง เนื่องจาก Accuracy profile มีการคำนวณช่วงที่คาดว่าผลทดสอบจำนวน β% ในอนาคตที่ได้จากวิธี 3M จะตกอยู่ในช่วงค่านี้ ซึ่งเป็นข้อดีของการใช้ Accuracy profile

สรุป

จากการตรวจสอบความถูกต้องของแผ่นทดสอบ 3M RYM ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง กับวิธีอ้างอิง US FDA BAM สำหรับการตรวจหาปริมาณยีสต์และราในเครื่องดื่มเหลว โดยใช้การสร้างกราฟ Accuracy profile พบว่าวิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิงที่ทุกระดับการปนเปื้อน เมื่อกำหนดขอบเขตการยอมรับเท่ากับ ±0.5 $\log_{10}$ ตาม ISO 16140-2:2016 แต่เมื่อกำหนดขอบเขตการยอมรับแคบลงเท่ากับ ±0.3 $\log_{10}$ วิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C เวลา 72 ชั่วโมง เท่านั้นที่ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิงที่ทุกระดับการปนเปื้อน ดังนั้นแผ่นทดสอบ 3M RYM สามารถนำมาใช้นับจำนวนยีสต์และราโดยให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิง US FDA BAM ทั้งนี้ช่วงความใช้ได้ของแผ่นทดสอบ 3M RYM ขึ้นกับการกำหนด β% และขอบเขตการยอมรับของผู้ใช้งาน สำหรับระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการนำวิธีไปใช้สามารถพิจารณาจากกราฟ Accuracy profile ที่ผู้ใช้พิจารณาความเที่ยงและความแม่นได้ การศึกษานี้ช่วยให้ผู้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หรือนำวิธีทางเลือกมาใช้ด้านอาหาร สามารถนำขั้นตอนที่ผู้วิจัยดำเนินการไปใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี รวมทั้งวิธีการแปลผลและการตั้งเกณฑ์การยอมรับตามวัตถุประสงค์ของงานได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบุคลากรในฝ่ายน้ำและเครื่องดื่มกลุ่มจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความร่วมมือจนงานวิจัยสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. International Organization for Standardization. ISO 21527: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- horizontal method for the enumeration of yeasts and molds. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2008.
2. Tournas V, Stack ME, Mislivec PB, Kock HA, Bandler R. Bacteriological analytical manual Chapter 18 yeasts, molds and mycotoxin [Online]. U.S. Food and Drug Administration; 2001 [cited 2014 May 10]. Available from: https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071435.htm.
3. Rapidmicrobiology. Rapid detection of yeasts and moulds in food [online]. County Cork: Rapid Test Methods; 2001. [cited 2015 Sep 21]; [6 screens]. Available from: URL: http://www.rapidmicrobiology.com/test-method/rapid-detection-of-yeasts-and-moulds-in-food.
4. AOAC® official method 2014.05 enumeration of yeast and mold in food 3M™ petrifilmT™ rapid yeast and mold count plate first action 2014 [online]. 3M; 2015 [cited 2015 Sep 21]. Available from: URL: http://www.trafalgarscientific.co.uk/index.php?route=product/download/download&did=50
5. Knight MT, Newman MC, Benzinger MJ Jr, Neufang KL, Agin JR, McAllister JS, et al. Comparison of the petrifilm dry rehydratable film and conventional culture methods for enumeration of yeasts and molds in foods: collaborative study. J AOAC Int 1997; 80(4): 806-23.
6. Boyle M, Benzinger MJ Jr, Bedinghaus P, Crowley E, Bird P, Agin J, et al. Method comparison of the 3MTM petrifilmTM rapid yeast and mold count plate method for the enumeration of yeast and mold [online]. Cincinnati, OH: Q Laboratories, Inc.; 2014. [cited 2015 Sep 21]. Available from: URL: http://multimedia.3m.com/mws/media/934836O/3m-petrifilm-rapid-yeast-mold-case-study.pdf
7. ADRIA Developpement. EN ISO 16140 validation of 3M™ rapid yeast and mold petrifilm™ plate for yeasts and molds enumeration in food, environmental sample, pet food and animal feed [online]. 2014 [cited 2015 Sep 21]. Available from: URL: http://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/10/Synt-3M-01-13-07-14_en.pdf
8. International Organization for Standardization. ISO 16140-2: Microbiology of the food chain-Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2016.
9. Feinberg M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. J Chromatogr A 2007; 1158(1-2): 174-83.
10. Feinberg M, Sohier D, David JF. Validation of an alternative method for counting Enterobacteriaceae in foods based on accuracy profile. J AOAC Int 2009; 92(2): 527-37.
11. 3M Science Applied to Life. Product instructions 3M™ petrifilm™ rapid yeast and mold count plate. USA: 3M; 2014.
12. StatsToDo. Tables of critical values of t for probabilities. [online]. 2016 [cited 2016 Sep 5]; [1 screen]. Available from: URL: http://www.stststodo.com/TTest_Tab.php
13. International Organization for Standardization. ISO/TS 22117: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2010.

14. Froder H, Tsuhako V, Goularte L. Performance evaluation of 3M™ petrifilm™ rym to fast enumeration of yeasts and molds. [online]. 2014 [cited 2016 Sep 5]; [2 screens]. Available from: URL: http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/foodscienceproceedings/microal/261.pdf.
15. Bird P, Flannery J, Crowley E, Agin J, Goins D, Jechorek R. Evaluation of the 3M™ petrifilm™ rapid yeast and mold count plate for the enumeration of yeast and mold in food: collaborative study, first action 2014.05. J AOAC Int 2015; 98(3): 767-83.

Use of Accuracy Profile for Validation of Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate for Enumeration of Yeast and Mold in Beverage

Karuna Teerasamit Ladapan Saengklai and Nalinee Yoophet

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Validation of quantitative method in microbiology according to ISO 16140 – 2:2016 specifies use of accuracy profile to compare the result of reference and alternative methods. The accuracy profile was used to validate the Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate (3M RYM) by comparing yeast and mold counts in liquid beverages with the US FDA BAM procedure recognized as reference method. The test samples were naturally and artificially contaminated at low level (1 – 100 CFU/ml), medium level (100 – 1,000 CFU/ml), and high level (>1,000 CFU/ml). When incubated at 25°C and 28°C for 48 h and 72 h, the results of the two methods showed relationship as linear and the Petrifilm 3M RYM gave Pearson's correlation coefficient scores close to 1, i.e. 0.9986, 0.9988, 0.9995 and 0.9992, respectively. The accuracy profile for validation of Petrifilm 3M RYM was accomplished by setting the β-expectation tolerance intervals (β-ETI) at 80% (β%) and the acceptability limits, AL (λ) at ±0.3 and ±0.5 $\log_{10}$ CFU/ml. For a λ of ±0.5 $\log_{10}$, the 3M method incubated at 25°C and 28°C for 48 h and 72 h, the β-ETI limits were within the acceptability limits at all contamination levels. When λ was ±0.3 $\log_{10}$, only at 25°C and 28°C, 72 h that the β-ETI limits fell inside the acceptability limits at all contamination levels. It can be concluded that the validity of Petrifilm 3M RYM depends on defined β% and acceptability limits (λ) specified by the users. Use of accuracy profile assists the users to choose an analytical method appropriately.

Keywords: Accuracy profile, Validation, Petrifilm 3M RYM, Beverage