

การประเมินความใช้ได้ของตูบเพาะเชื้อที่ใช้ในงานทดสอบทางจุลชีววิทยา

ปรีชา จิงสมานกุล สมภพ วัฒนมณี และลดาวัลย์ จิงสมานกุล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การประเมินความใช้ได้ของตูบเพาะเชื้อที่ใช้ในงานทดสอบทางจุลชีววิทยาจำนวน 4 ตู้ จำนวน 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 22.5°ซ 30°ซ 32°ซ 35°ซ และ 37°ซ ครั้งที่ 1 ประเมินจากการสอบเทียบในสภาวะที่ไม่มีสิ่งของภายในตู้ ครั้งที่ 2 ประเมินในสภาวะจริงที่ใช้บ่มเพาะเชื้อ โดยประเมินจากการสอบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและระหว่างกึ่งกลางของแผ่น petrifilm® ที่ซ้อนกัน 10 แผ่น ผลการประเมินครั้งที่ 1 พบตูบเพาะเชื้อ 2 ตู้ไม่ผ่านการประเมินที่อุณหภูมิ 22.5°ซ 30°ซ และ 32°ซ เพราะความไม่แน่นอนของการวัดมีค่า $\pm 2.8^{\circ}\text{ซ}$ $\pm 2.3^{\circ}\text{ซ}$ และ $\pm 2.2^{\circ}\text{ซ}$ ตามลำดับ ซึ่งเกินเกณฑ์ยอมรับความผิดพลาดที่กำหนดสำหรับวิธีวิเคราะห์และราในอาหาร ($\pm 2.5^{\circ}\text{ซ}$) *Bacillus cereus* ในอาหาร ($\pm 1^{\circ}\text{ซ}$) และปริมาณจุลินทรีย์ในนมและผลิตภัณฑ์ ($\pm 1^{\circ}\text{ซ}$) ส่วนตูบเพาะเชื้ออีก 2 ตู้ที่อุณหภูมิ 35°ซ และ 37°ซ พบบางตำแหน่งภายในตู้มีอุณหภูมิเมื่อรวมกับค่าความไม่แน่นอนของการวัดมีค่าเกินเกณฑ์ยอมรับสำหรับวิธีวิเคราะห์ coliforms ($35 \pm 1^{\circ}\text{ซ}$) และ *Salmonella* spp. ($37 \pm 1^{\circ}\text{ซ}$) ในอาหาร แต่ผลการประเมินครั้งที่ 2 พบตูบเพาะเชื้อผ่านการประเมินทั้ง 4 ตู้ ห้องปฏิบัติการสามารถนำไปใช้งานสำหรับการทดสอบจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้ ดังนั้นการประเมินความใช้ได้ของตูบเพาะเชื้อที่ใช้ในงานทดสอบทางจุลชีววิทยา จึงควรประเมินจากผลการสอบเทียบในสภาวะจริงที่ใช้บ่มเพาะเชื้อ ซึ่งมีความถูกต้องมากกว่าและได้ค่าความไม่แน่นอนของการวัดลดลง ทำให้มีโอกาสผ่านเกณฑ์การประเมินมากขึ้น ไม่จำเป็นต้องซื้อตู้ใหม่ เป็นการประหยัดงบประมาณได้มาก

บทนำ

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทางจุลชีววิทยาเพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ทั้งในด้านปริมาณ (colony forming unit ต่อกรัมหรือ Most Probable Number ต่อกรัม) และด้านคุณภาพ (ตรวจพบหรือไม่พบเชื้อ) จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเพาะเลี้ยง การแยก และการจำแนกเชื้อโดยวิธีต่าง ๆ ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ส่วนใหญ่ต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อในตูบเพาะเชื้อตามอุณหภูมิที่แต่ละวิธีกำหนด เช่น การตรวจนับจำนวนยีสต์และราในอาหารโดยใช้ petrifilm กำหนดให้บ่มที่อุณหภูมิ $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{ซ}$ ⁽¹⁾ การตรวจหา *Bacillus cereus* ในอาหารบ่มที่ $30 \pm 1^{\circ}\text{ซ}$ ⁽²⁾ การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในนมและผลิตภัณฑ์นมบ่มที่ $32 \pm 1^{\circ}\text{ซ}$ ⁽³⁾ ถ้าตรวจโคลิฟอร์มในอาหารให้บ่มที่ $35 \pm 1^{\circ}\text{ซ}$ ⁽⁴⁾ ขณะที่การตรวจ *Salmonella* spp.

บ่มที่ $37 \pm 1^{\circ}\text{ซ}$ ⁽⁵⁾ เป็นต้น จะเห็นได้ว่าการตรวจหาเชื้อแต่ละชนิดของแต่ละวิธีการทดสอบมีการกำหนดอุณหภูมิและเกณฑ์การยอมรับความผิดพลาด (permissible error) ที่แน่นอน ค่าของอุณหภูมิเหล่านี้จะถูกนำไปใช้เป็นเกณฑ์กำหนดคุณภาพของตูบเพาะเชื้อ ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบจึงต้องสอบเทียบหรือตรวจสอบว่าอุณหภูมิภายในของตูบเพาะเชื้อเป็นไปตามกำหนดจึงจะสามารถนำไปใช้งานได้⁽⁶⁾ จากประสบการณ์การตรวจประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของคณะผู้วิจัย พบตูบเพาะเชื้อหลายเครื่องมีผลการประเมินความใช้ได้ของเครื่องมือ

ไม่ผ่านเกณฑ์⁽⁷⁾ ทำให้ห้องปฏิบัติการต้องจัดซื้อเครื่องมือใหม่ในราคาค่อนข้างแพงและส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

การประเมินความใช้งานได้ของตู้บเพาะเชื้อประเมินจากการนำอุณหภูมิเฉลี่ยจากทุกตำแหน่งในตู้บเพาะและลบค่าความไม่แน่นอนของการวัดกรณีที่ผลลัพธ์ของการบวกและลบของอุณหภูมิทุกตำแหน่งภายในตู้มีค่าอยู่ในเกณฑ์ แสดงว่าตู้บเพาะเชื่อนั้นสามารถใช้งานได้ แต่ถ้าผลลัพธ์ของการบวกและลบของอุณหภูมิทุกตำแหน่งหรือบางตำแหน่งมีค่าอยู่นอกเกณฑ์ แสดงว่าตู้บเพาะเชื้อไม่สามารถใช้งานได้หรือนำไปใช้งานได้เพียงบางตำแหน่งเท่านั้น⁽⁷⁾ การนำค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ได้จากการสอบเทียบตามวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นการสอบเทียบโดยต้องไม่มีสิ่งของภายในตู้^(8, 9) มาใช้ในการประเมินอาจทำให้ตู้บเพาะเชื้อไม่ผ่านเกณฑ์⁽⁷⁾ ทั้งนี้การประเมินลักษณะดังกล่าวไม่มีผลกระทบโดยตรงต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพราะค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของอากาศภายในตู้ ไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ดังนั้น ห้องปฏิบัติการควรพิจารณาอาหารทางจุลชีววิทยา สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงศึกษาการประเมินความใช้ได้ของตู้บเพาะเชื้อโดยนำค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ได้จากสภาพจริงของการเพาะเลี้ยงเชื้อ (ใน broth หรือในแผ่นฟิล์ม) และมีผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญของเชื้อมาใช้ในการประเมินซึ่งมีความถูกต้องมากกว่าและทำให้ค่าความไม่แน่นอนของการวัดน้อยลง โอกาสที่ตู้บเพาะเชื้อจะผ่านเกณฑ์มากขึ้นส่งผลให้ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาสามารถลดการซื้อเครื่องมือชนิดนี้ ทำให้ประหยัดงบประมาณและไม่เสียเงินตราให้ต่างประเทศโดยไม่จำเป็น

วัสดุและวิธีการ

วิธีการ

ตู้บเพาะเชื้อหมายเลข 1 สอบเทียบที่อุณหภูมิ 22.5°ซ หมายเลข 2 สอบเทียบที่อุณหภูมิ 30°ซ และ 32°ซ ส่วนหมายเลข 3 และหมายเลข 4 สอบเทียบที่อุณหภูมิ 35°ซ และ 37°ซ ตามลำดับ ทั้งนี้สอบเทียบโดยหน่วยงานที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005⁽⁶⁾ แต่ละอุณหภูมิสอบเทียบ 2 ครั้งในเวลาต่อเนื่องกันดังนี้

ครั้งที่ 1 สอบเทียบตามปกติ (เป็นการสอบเทียบตามวิธีมาตรฐานโดยต้องไม่มีสิ่งของในตู้บเพาะเชื้อ)^(8, 9)

ครั้งที่ 2 ตู้บเพาะเชื้อหมายเลข 1 สอบเทียบในแผ่น petrifilm โดยนำหัวอ่านอุณหภูมิมาตรฐานแต่ละเส้นวางระหว่างกลางของแผ่น petrifilm 1 ชุด (ซ้อนกัน 10 แผ่น) โดยวางระหว่างแผ่นที่ 5 และแผ่นที่ 6 และนำเทปกาปิดโดยรอบแผ่น petrifilm ทั้งชุด นำ petrifilm แต่ละชุดที่มีหัวอ่านอุณหภูมิมาตรฐานวางที่ตำแหน่งต่างๆ เช่นเดียวกับการสอบเทียบครั้งที่ 1 ส่วนตู้บเพาะเชื้อหมายเลข 2, 3 และ 4 สอบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (lauryl sulphate tryptose broth: LST) โดยนำหัวอ่านอุณหภูมิมาตรฐานแต่ละเส้นจุ่มในแต่ละหลอดของ LST และนำ LST แต่ละหลอดที่มีหัวอ่านอุณหภูมิมาตรฐานวางในตำแหน่งต่างๆ เช่นเดียวกับการสอบเทียบครั้งที่ 1

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- LST จำนวน 9 หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตรต่อการสอบเทียบ 1 ตู้
- Yeast and mold count petrifilm จำนวน 90 แผ่น แบ่งเป็น 9 ชุด แต่ละชุดวางซ้อนกันชุดละ 10 แผ่น ความหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร ซึ่งหนา

เท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar) ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ⁽¹⁰⁾

เครื่องมือ

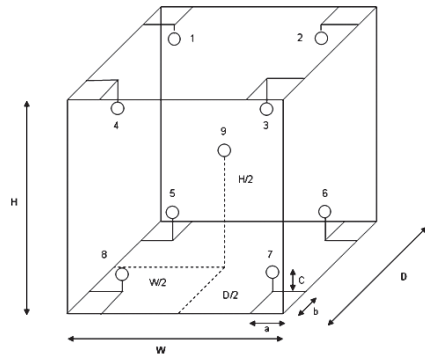
ตู้อบเพาะเชื้อที่มีความละเอียดของการวัด (resolution) 0.1°C จำนวน 4 ตู้ ประกอบด้วย

- หมายเลข 1 และหมายเลข 2 ตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิต่ำ (low temperature incubator) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MIR-151 และ MIR-153
- หมายเลข 3 และ 4 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 800

ชุดหัวอ่านอุณหภูมิมาตรฐาน (standard) ของหน่วยงานสอบเทียบซึ่งได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005⁽⁶⁾ ที่อุณหภูมิ 22.5°C 30°C 32°C 35°C และ 37°C มีความละเอียดของการวัด 0.1°C 0.001°C 0.001°C 0.01°C และ 0.01°C ตามลำดับ

เกณฑ์ที่ใช้ตัดสิน

ค่าความไม่แน่นอนของอุณหภูมิที่ได้จากการสอบเทียบต้องมีค่าไม่เกินเกณฑ์การยอมรับความผิดพลาดของวิธีวิเคราะห์ซึ่งกำหนดไว้ในแต่ละวิธี หรือเมื่อนำอุณหภูมิเฉลี่ยของทุกตำแหน่งภายในตู้บวกลบและลบค่าความไม่แน่นอนของการวัดผลลัพธ์ของการบวกและลบของอุณหภูมิทุกตำแหน่งต้องมีค่าอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่แต่ละวิธีวิเคราะห์กำหนด⁽⁷⁾ ตู้อบเพาะเชื้อนั้นจึงสามารถนำไปใช้งานได้⁽⁶⁾ เช่น การตรวจนับจำนวนยีสต์และราโดยใช้ petrifilm ในอาหารอุณหภูมิต้องผิดพลาดไม่เกิน $\pm 2.5^{\circ}\text{C}$ ⁽¹⁾ ส่วนการตรวจหา *Bacillus cereus* ปริมาณจุลินทรีย์ในนมและผลิตภัณฑ์นม coliforms และ *Salmonella* spp. อุณหภูมิต้องผิดพลาดไม่เกิน $\pm 1^{\circ}\text{C}$ และทุกตำแหน่งภายในตู้ต้องมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง $20 - 25^{\circ}\text{C}$, $29 - 31^{\circ}\text{C}$, $31 - 33^{\circ}\text{C}$, $34 - 36^{\circ}\text{C}$ และ $36 - 38^{\circ}\text{C}$ ^(2,3,4,5) ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ตำแหน่งการวางหัวอ่านอุณหภูมิมาตรฐานในตู้อบเพาะเชื้อ

ผล

การประเมินความใช้ได้ของตู้อบเพาะเชื้อจากผลการสอบเทียบตู้อบเพาะเชื้อ 4 ตู้ ครั้งที่ 1 สอบเทียบตามปกติ (ไม่มีสิ่งของในตู้อบเพาะเชื้อ) เป็นการสอบเทียบที่เกิดจากการวัดความเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของอากาศภายในตู้ เมื่อนำผลที่ได้มาประเมินฯ ตามวิธีมาตรฐาน⁽⁷⁾ พบตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 1 และหมายเลข 2 มีความไม่แน่นอนของการวัดบวกลบ 2.8°C , 2.3°C และ 2.2°C ซึ่งมากกว่าเกณฑ์ยอมรับความผิดพลาดของอุณหภูมิตามที่วิธีวิเคราะห์กำหนด (ตารางที่ 1) แสดงว่าตู้อบเพาะเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยีสต์ รา *Bacillus cereus* ปริมาณจุลินทรีย์ในนมและผลิตภัณฑ์นม ส่วนตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 3 และหมายเลข 4 มีความไม่แน่นอนของการวัดไม่เกินเกณฑ์ยอมรับความผิดพลาดของอุณหภูมิที่วิธีวิเคราะห์กำหนด (ตารางที่ 1) จึงต้องนำค่าความไม่แน่นอนของการวัดนี้ไปประเมินกับค่าอุณหภูมิเฉลี่ยของทุกตำแหน่งในตู้อบเพาะเชื้อ⁽⁷⁾ พบตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 3 ตำแหน่งที่ 5 และตำแหน่งที่ 7 (ตารางที่ 2) และตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 4 ตำแหน่งที่ 1, 2, 3 และ 4 (ตารางที่ 3) ประเมินไม่ผ่านเนื่องจากมีค่าอยู่นอกช่วงเกณฑ์ที่วิธีวิเคราะห์กำหนด

สำหรับการประเมินฯ ครั้งที่ 2 ณ อุณหภูมิเดิม แต่เปลี่ยนสภาวะการสอบเทียบ พบตู้อบเพาะเชื้อ หมายเลข 1 ซึ่งสอบเทียบในแผ่น petrifilm และตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 2, 3 และ 4 ซึ่งสอบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LST) มีค่าความไม่แน่นอนของการวัดบวกลบ 1.5°C , 0.58°C , 0.59°C , 0.45°C และ 0.45°C ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งมีความน้อยกว่าที่วิธีวิเคราะห์กำหนด และเมื่อนำมาประเมินความใช้ได้ของตู้อบเพาะเชื้อตามวิธีมาตรฐาน⁽⁷⁾ พบว่าทุกตำแหน่งของตู้อบเพาะเชื้อทุกตู้มีผลผ่านการประเมิน (ตารางที่ 4 – 8) สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้

การที่ค่าความไม่แน่นอนของการวัดจากการสอบเทียบครั้งที่ 2 มีค่าลดลงมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การสอบเทียบครั้งที่ 1 เนื่องจากแหล่งของความไม่แน่นอนของการวัดที่สำคัญคือ ค่าความทนซ้ำได้ (repeatability) ของหัววัดมาตรฐาน (ตารางที่ 9)^(8, 9) มีค่าลดลงมากคือจาก 1.168, 1.043, 1.005, 0.055 และ 0.021 ลดลงเป็น 0.298, 0.061, 0.086, 0.005 และ 0.004 ตามลำดับ นอกจากนี้ความเสถียร (stability) และความเป็นเอกรูป (uniformity) ก็มีค่าลดลงมากเช่นกัน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 1 ผลการสอบเทียบตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิและสภาวะต่าง ๆ

หมายเลข ตู้อบเพาะเชื้อ	อุณหภูมิที่ สอบเทียบ ($^{\circ}\text{C}$)	เกณฑ์ยอมรับ ความผิดพลาด $\pm$ ($^{\circ}\text{C}$)	ค่าความไม่แน่นอน ($^{\circ}\text{C}$)	
			สอบเทียบครั้งที่ 1 ในอากาศ	สอบเทียบครั้งที่ 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
1	22.5	2.5	2.80	1.50
2	30	1	2.30	0.58
	32	1	2.20	0.59
3	35	1	0.50	0.45
4	37	1	0.50	0.45

ตารางที่ 2 การประเมินความใช้ได้ของตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 3 จากผลการสอบเทียบครั้งที่ 1

ผลการสอบเทียบ			วิธีการประเมิน นำอุณหภูมิเฉลี่ย		ผลการประเมินเทียบกับ เกณฑ์กำหนด (34-36 °ซ)	
ตำแหน่ง	อุณหภูมิ เฉลี่ย (°ซ)	ความ ไม่แน่นอน ± (°ซ)	ลบความ ไม่แน่นอน (°ซ)	บวกความ ไม่แน่นอน (°ซ)	ผ่าน	ไม่ผ่าน
1	35.38	0.50	34.88	35.88	✓	-
2	35.42		34.92	35.92	✓	-
3	35.33		34.83	35.83	✓	-
4	35.52		35.02	36.02	✓	-
5	34.17		33.67	34.67	-	✓
6	34.73		34.23	35.23	✓	-
7	34.09		33.59	34.59	-	✓
8	34.61		34.11	35.11	✓	-
9	34.60		34.10	35.10	✓	-

ตารางที่ 3 การประเมินความใช้ได้ของตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 4 จากผลการสอบเทียบครั้งที่ 1

ผลการสอบเทียบ			วิธีการประเมิน นำอุณหภูมิเฉลี่ย		ผลการประเมินเทียบกับ เกณฑ์กำหนด (36-38 °ซ)	
ตำแหน่ง	อุณหภูมิ เฉลี่ย (°ซ)	ความ ไม่แน่นอน ± (°ซ)	ลบความ ไม่แน่นอน (°ซ)	บวกความ ไม่แน่นอน (°ซ)	ผ่าน	ไม่ผ่าน
1	37.75	0.50	37.25	38.25	-	✓
2	37.86		37.36	38.36	-	✓
3	37.66		37.16	38.16	-	✓
4	37.80		37.30	38.30	-	✓
5	36.58		36.08	37.08	✓	-
6	36.97		36.47	37.47	✓	-
7	36.54		36.04	37.04	✓	-
8	36.87		36.37	37.37	✓	-
9	36.92		36.42	37.42	✓	-

ตารางที่ 4 การประเมินความใช้ได้ของตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 1 จากผลการสอบเทียบครั้งที่ 2

ผลการสอบเทียบ			วิธีการประเมิน นำอุณหภูมิเฉลี่ย		ผลการประเมินเทียบกับ เกณฑ์กำหนด (20-25 °C)	
ตำแหน่ง	อุณหภูมิ เฉลี่ย (°C)	ความ ไม่แน่นอน ± (°C)	ลบความ ไม่แน่นอน (°C)	บวกความ ไม่แน่นอน (°C)	ผ่าน	ไม่ผ่าน
1	22.4	1.50	20.9	23.9	✓	-
2	22.3		20.8	23.8	✓	-
3	22.6		21.1	24.1	✓	-
4	22.5		21.0	24.0	✓	-
5	22.3		20.8	23.8	✓	-
6	22.3		20.8	23.8	✓	-
7	22.5		21.0	24.0	✓	-
8	22.3		20.8	23.8	✓	-
9	22.4		20.9	23.9	✓	-

ตารางที่ 5 การประเมินความใช้ได้ของตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 2 จากผลการสอบเทียบครั้งที่ 2

ผลการสอบเทียบ			วิธีการประเมิน นำอุณหภูมิเฉลี่ย		ผลการประเมินเทียบกับ เกณฑ์กำหนด (29-31 °C)	
ตำแหน่ง	อุณหภูมิ เฉลี่ย (°C)	ความ ไม่แน่นอน ± (°C)	ลบความ ไม่แน่นอน (°C)	บวกความ ไม่แน่นอน (°C)	ผ่าน	ไม่ผ่าน
1	29.970	0.58	29.390	30.550	✓	-
2	30.174		29.594	30.754	✓	-
3	30.283		29.703	30.863	✓	-
4	30.176		29.596	30.756	✓	-
5	30.078		29.498	30.658	✓	-
6	30.351		29.771	30.931	✓	-
7	30.261		29.681	30.841	✓	-
8	30.317		29.737	30.897	✓	-
9	30.255		29.675	30.835	✓	-

ตารางที่ 6 การประเมินความใช้ได้ของตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 2 จากผลการสอบเทียบครั้งที่ 2

ผลการสอบเทียบ			วิธีการประเมิน นำอุณหภูมิเฉลี่ย		ผลการประเมินเทียบกับ เกณฑ์กำหนด (31-33 °C)	
ตำแหน่ง	อุณหภูมิ เฉลี่ย (°C)	ความ ไม่แน่นอน ± (°C)	ลบความ ไม่แน่นอน (°C)	บวกความ ไม่แน่นอน (°C)	ผ่าน	ไม่ผ่าน
1	31.818	0.59	31.228	32.408	✓	-
2	32.038		31.448	32.628	✓	-
3	32.128		31.538	32.718	✓	-
4	32.031		31.441	32.621	✓	-
5	32.041		31.451	32.631	✓	-
6	32.234		31.644	32.824	✓	-
7	32.094		31.504	32.684	✓	-
8	32.034		31.444	32.624	✓	-
9	32.015		31.485	32.665	✓	-

ตารางที่ 7 การประเมินความใช้ได้ของตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 3 จากผลการสอบเทียบครั้งที่ 2

ผลการสอบเทียบ			วิธีการประเมิน นำอุณหภูมิเฉลี่ย		ผลการประเมินเทียบกับ เกณฑ์กำหนด (34-36 °C)	
ตำแหน่ง	อุณหภูมิ เฉลี่ย (°C)	ความ ไม่แน่นอน ± (°C)	ลบความ ไม่แน่นอน (°C)	บวกความ ไม่แน่นอน (°C)	ผ่าน	ไม่ผ่าน
1	35.24	0.45	34.79	35.69	✓	-
2	35.33		34.88	35.78	✓	-
3	35.24		34.79	35.69	✓	-
4	35.39		34.94	35.84	✓	-
5	35.52		34.07	35.97	✓	-
6	34.77		34.32	35.22	✓	-
7	34.54		34.09	34.99	✓	-
8	34.78		34.33	35.23	✓	-
9	34.87		34.42	35.32	✓	-

ตารางที่ 8 การประเมินความใช้ได้ของตู้บเพาะเชื้อหมายเลข 4 จากผลการสอบเทียบครั้งที่ 2

ผลการสอบเทียบ		วิธีการประเมิน		ผลการประเมินเทียบกับ	
		นำอุณหภูมิเฉลี่ย		เกณฑ์กำหนด (36-38 °C)	
ตำแหน่ง	อุณหภูมิเฉลี่ย (°C)	ความไม่แน่นอน ± (°C)	ลบความไม่แน่นอน (°C)	บวกความไม่แน่นอน (°C)	
1	37.24		36.79	37.69	✓ -
2	37.19		36.74	37.64	✓ -
3	37.14		36.69	37.59	✓ -
4	37.32		36.77	37.67	✓ -
5	36.53	0.45	36.08	36.98	✓ -
6	36.65		36.20	37.10	✓ -
7	36.51		36.06	36.96	✓ -
8	36.66		36.21	37.11	✓ -
9	36.81		36.36	37.26	✓ -

ตารางที่ 9 แหล่งความไม่แน่นอนของการวัดของตู้บเพาะเชื้อที่อุณหภูมิสอบเทียบ 30 °C

Symbol	Source of uncertainty	Value ± (°C)	Probability Distribution	Divisor	Ci	Ui ± (°C)	Vi or Veff
U_1	Calibration of STD	0.250	Normal	2	1	0.12500	α
U_2	Drift of STD	0.4000	Rectangular	1.73	1	0.23094	α
U_3	Resolution of STD	0.001/2	Rectangular	1.73	1	0.00029	α
U_4	Resolution of UUC*	0.1/2	Rectangular	1.73	1	0.02887	α
U_5	Temperature Coefficient	0.060	Triangular	2.45	1	0.0245	α
U_6	Loading Effect of STD	0.228	Rectangular	1.73	1	1.1315	α
U_7	Radiation Effect of STD	0.030	Rectangular	1.73	1	0.0173	α
U_8	Repeatability of STD	1.043	Normal	1	1	1.0429	29
U_9	Repeatability of UUC	0.073	Normal	1	1	0.0731	29
U_c	Combined Uncertainty	1.087	Normal				34
U	Expanded Uncertainty	2.3	Normal $k = 2.09$				

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่าต่างๆ ที่ได้จากการสอบเทียบครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

การสอบเทียบครั้งที่	อุณหภูมิ (°ซ)	ค่าที่ได้จากการสอบเทียบ		
		Repeatability of standard	Stability ± (°ซ)	Uniformity (°ซ)
1	22.50	1.168	1.80	1.06
2		0.298	0.40	0.60
1	30	1.043	1.50	1.60
2		0.061	0.13	0.54
1	32	1.005	1.50	1.50
2		0.086	0.15	0.53
1	35	0.055	0.09	1.53
2		0.005	0.02	0.87
1	37	0.021	0.05	1.36
2		0.004	0.01	0.74

วิจารณ์

การประเมินความใช้ได้ของตู้อบเพาะเชื้อจากผลการสอบเทียบครั้งที่ 1 ของตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 1 และหมายเลข 2 พบทุกตำแหน่งภายในตู้ประเมินไม่ผ่าน ทำให้ไม่สามารถใช้งานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ยีสต์ รา *B.cereus* ในอาหารและปริมาณจุลินทรีย์ในนมและผลิตภัณฑ์นม ส่วนตู้อบเพาะเชื้อหมายเลข 3 และหมายเลข 4 ประเมินไม่ผ่านบางตำแหน่ง จึงนำไปใช้งานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ coliforms และ *Salmonella* spp. ได้เพียงบางตำแหน่งภายในตู้ ทำให้การใช้งานมีข้อจำกัดและเกิดความไม่สะดวก ดังนั้นหากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยานำผลการสอบเทียบครั้งนี้มาใช้ ห้องปฏิบัติการฯ ต้องซื้อ

ตู้อบเพาะเชื้อใหม่จำนวน 2 ถึง 4 ตู้ ซึ่งเป็นจำนวนเงินหลายแสนบาท ส่วนการประเมินฯ จากผลการสอบเทียบครั้งที่ 2 เป็นการสอบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นสถานะเหมือนจริงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบทุกตำแหน่งภายในตู้อบเพาะเชื้อทั้ง 4 ตู้ สามารถนำไปใช้งานสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ ที่เป็นเช่นนี้เพราะการสอบเทียบครั้งที่ 2 ได้ค่าความไม่แน่นอนของการวัดลดลงมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การสอบเทียบครั้งที่ 1 การที่ค่าความไม่แน่นอนของการวัดมีค่าลดลงมาก เพราะความทวนซ้ำได้ (repeatability) ของห้วัดมาตรฐานซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของความไม่แน่นอนของการวัด (ตาราง

ที่ 9) มีค่าลดลงมาก (ตารางที่ 10) การที่ค่านี้ลดลงสอดคล้องกับหลักอุณหพลศาสตร์หรือหลักการเปลี่ยนแปลงความร้อน (thermodynamic) เมื่อพลังงานความร้อนในตู้อบเพาะเชื้อเปลี่ยนแปลง (ขึ้นหรือลงสลับกันตามการทำงานของตู้) อุณหภูมิของอากาศในแต่ละตำแหน่ง (ที่วางหัววัดมาตรฐาน) ภายในตู้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงตามอย่างรวดเร็ว ในขณะที่อุณหภูมิของเหลวหรือของแข็งจะเปลี่ยนแปลงช้าหรือแทบไม่เปลี่ยนแปลง⁽¹¹⁾ ดังนั้นความเบี่ยงเบนมาตรฐานของอุณหภูมิในของเหลวหรือของแข็งจากการสอบเทียบครั้งที่ 2 จึงมีค่าน้อยกว่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของอุณหภูมิในอากาศจากการสอบเทียบครั้งที่ 1 ขณะเดียวกันยังมีผลให้ค่าความเสถียรและค่าความเป็นเอกรูปลดลงมากไปด้วย (ตารางที่ 10)

การประเมินความใช้ได้ในภาพรวมของตู้อบเพาะเชื้อควรนำค่าความไม่แน่นอนของระบบ (ของตู้อบเพาะเชื้อ) ซึ่งมีค่ามากที่สุด (มากกว่าค่าความไม่แน่นอนของแต่ละตำแหน่งภายในตู้) มาใช้ในการประเมิน ซึ่งห้องปฏิบัติการสอบเทียบต้องรายงานค่าความไม่แน่นอนของระบบในใบรับรอง⁽⁶⁾ กรณีที่นำค่านี้มาบวกและลบอุณหภูมิเฉลี่ยของทุกตำแหน่งและผลผ่าน จึงไม่จำเป็นต้องนำค่าความไม่แน่นอนของแต่ละตำแหน่งมาใช้บวกและลบอุณหภูมิเฉลี่ยในตำแหน่งนั้น ซึ่งเป็นเรื่องค่อนข้างยุ่งยากสำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบเพราะต้องขอข้อมูลการสอบเทียบเพื่อนำมาคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนของแต่ละตำแหน่ง

สรุป

กรณีที่ห้องปฏิบัติการทดสอบทางจุลชีววิทยาจะนำผลการสอบเทียบตามวิธีมาตรฐาน^(8,9) ซึ่งต้องไม่มีสิ่งของภายในตู้อบเพาะเชื้อได้ของตู้อบเพาะเชื้อ⁽⁷⁾ แล้วพบว่าผลไม่ผ่าน ห้องปฏิบัติการยังไม่ควรซื้อตู้อบเพาะเชื้อใหม่ แต่ควรประเมินใหม่

โดยนำผลการสอบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้แทน ซึ่งการประเมินความใช้งานได้ของตู้อบเพาะเชื้อวิธีนี้สอดคล้องกับสถานะการเลี้ยงเชื้อจึงมีความถูกต้องมากกว่าและมีโอกาสผ่านเกณฑ์มากขึ้นไม่จำเป็นต้องซื้อตู้อบเพาะเชื้อใหม่ซึ่งส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาค่อนข้างสูง ทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถประหยัดงบประมาณได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางเพ็ญศรี รอดมา ที่สนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ และนางดวงดาว วงศ์สมมาตร ที่ให้คำแนะนำและตรวจทานต้นฉบับ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาทุกคนที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. AOAC Official Method 997.02. In: Horwitz W, editor. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International; 2005. P 19-21.
2. Rhodehamel EJ, Harmon SM. *Bacillus cereus*. In: Bacteriological Analytical Manual. [online] 2001 [cited 2009 Dec. 18]; Available from: URL:<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html>.
3. Laird DT, Gambrel-Lenarz SA, Scher FM, Graham TE, and Reddy R. Microbiological Count Methods. In: Michael Wehr H, Frank Joseph F, editors. Standard methods for the examination of dairy products. 17th ed. Washington DC: American Public Health Association; 2004. p.153-174.
4. Feng P., Weagant S.D., Grant M.A.. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. In: Bacteriological Analytical Manual.

- [online] September 2002 [cited 2009 Dec. 25]; Available from: URL:<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4html>.
5. International Organization for Standardization. ISO 6579/Cor.1. Microbiological of food and animal feeding stuffs–Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 1st ed. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2002/2004.
 6. International Organization for Standardization. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2nd ed. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2005.
 7. International Organization for Standardization. ISO 14253–1. Geometrical Product Specifications (GPS) – Inspection by measurement of workpieces and measurement equipment – Part 1: Decision rules for proving conformance or non conformance with specifications. 1st ed. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 1998.
 8. Thai Laboratory Accreditation Scheme. Publication Reference G–20. Guidelines for Calibration and Checks of Temperature Controlled Enclosures. 2008.
 9. Standards Association of Australia. AS 2583. Enclosures–Temperature–controlled–Performance testing and grading. Standards Australia. NSW 1986.
 10. International Organization for Standardization. ISO 7218. Microbiological of food and animal feeding stuffs– General requirements and guidance for microbiological examinations. 3rd ed. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2007.
 11. Lienhard JHIV, Lienhard JHV. A Heat Transfer Textbook. 3rd ed. Massachusetts. Phlogiston Press. 2008. p.1–10.

Evaluation of incubator performance for microbiological testing

Preecha Chungsamakool Sompob Wattanamanee Ladawan Chungsamakool

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

ABSTRACT Four incubators for microbiological testing were evaluated to ensure their performance by being calibrated twice at 22.5 °C, 30 °C, 32 °C 35 °C, and 37 °C. The first calibration was conducted by measuring the temperatures under unloaded condition and the second under loaded condition, in culture broth and in the middle of 10 pieces of petrifilm® agar stack. Results of the first calibration of two incubators at 22.5 °C, 30 °C, and 32 °C did not comply with the acceptance criteria. These due to the uncertainty of measurement, $\pm 2.8^{\circ}\text{C}$, $\pm 2.3^{\circ}\text{C}$, and $\pm 2.2^{\circ}\text{C}$ respectively, beyond the maximum permissible error (MPE) for the analysis of yeasts/molds in foods ($\pm 2.5^{\circ}\text{C}$), *Bacillus cereus* in foods ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), and total plate count in milk and milk products ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) respectively. Also, the results of the other two incubators at 35 °C and 37 °C which included their uncertainty of measurement, beyond the MPE for the analysis of coliforms ($35 \pm 1^{\circ}\text{C}$) and *Salmonella* spp. in foods ($37 \pm 1^{\circ}\text{C}$) in some positions. The second calibration revealed that every incubator passed the evaluation which indicates that they can be used for the analysis of the above-mentioned microbiological test items. Therefore, the performance evaluation of incubator calibrated under loaded condition is preferable because of its higher accuracy and lower uncertainty of measurement. It is likely that the evaluation of incubator will pass. So, there is no need to buy the new incubators and this help save a lot of budget.

Keywords : incubator, calibration, performance, microbiological testing