ว กรมวิทย พ 2568; 67 (4): 699-708

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเทคนิค การตรวจเชิงปริมาณทางจุลชีววิทยาในอาหาร

กมลวรรณ กันแต่ง และ อัจฉรา อยู่คง

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ต้องดำเนินการเกี่ยวกับการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามข้อกำหนดที่ 7.6 เพื่อนำมาใช้รายงานร่วมกับผลการทดสอบในกรณีที่เป็นความต้องการของผู้ใช้บริการหรือเมื่อผลการทดสอบให้ค่าคาบเกี่ยวในช่วงเกณฑ์การยอมรับ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ดำเนินการรวบรวมข้อมูลผลการทำซ้ำการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา ระหว่างปี พ.ศ. 2564–2567 เพื่อนำมาหาค่าความไม่แน่นอนเชิงเทคนิค (Technical Uncertainty; u_{tech}) ตาม ISO 19036:2019 จำนวน 203 ตัวอย่าง รวม 11 รายการทดสอบ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ตาม APHA 2015, Chapter 6&8 จำนวนจุลินทรีย์ตาม BAM 2001, Chapter 3 จำนวนยีสต์และราตาม AOAC 2019; 997.02 จำนวนยีสต์และราตาม BAM 2001, Chapter 18 จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรียตาม ISO 15214:1998, Coliforms ตาม BAM 2020, Chapter 4, *Bacillus cereus* ตาม BAM 2020, Chapter 14, *Clostridium perfringens* ตาม BAM 2001, Chapter 16, *Staphylococcus aureus* ตาม BAM 2016, Chapter 12 หน่วยการทดสอบเป็น CFU ต่อกรัม ส่วน Coliforms ตาม BAM 2020, Chapter 4 และ *Escherichia coli* ตาม BAM 2020, Chapter 4 หน่วยการทดสอบเป็น MPN ต่อกรัม ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนเชิงเทคนิค มีค่า u_{tech} เท่ากับ 0.0620, 0.0647, 0.1041, 0.0677, 0.0988, 0.0517, 0.0919, 0.9210, 0.0794, 0.1412 และ 0.1412 ตามลำดับ ทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถนำค่า u_{tech} มาใช้คำนวณหาค่าความไม่แน่นอนรวมเพื่อใช้ในการรายงานร่วมกับผลการทดสอบ และนำไปใช้เปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานเพื่อตัดสินผลการทดสอบได้อย่างมั่นใจ

คำสำคัญ: ความไม่แน่นอนของการวัดทางจุลชีววิทยา, ความไม่แน่นอนของการวัดทางเทคนิค, ความไม่แน่นอนรวม, การทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการ

Corresponding author E-mail: kamonwan.k@dmsc.mail.go.th

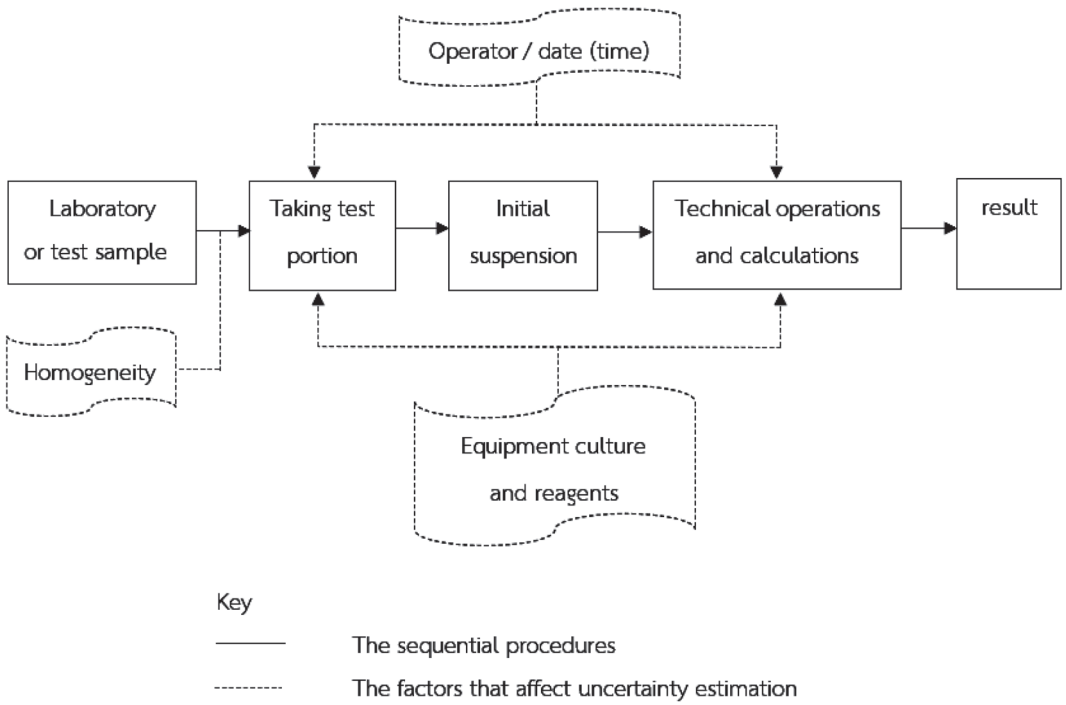
Received: 17 January 2025 *Revised: 18 August 2025* *Accepted: 19 August 2025*

บทนำ

การตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ได้จะเป็นค่าประมาณของค่าจริงและมีค่าความคลาดเคลื่อนของการวัด เนื่องจากปัจจัยที่ควบคุมได้หรือควบคุมไม่ได้เกิดขึ้นเสมอ ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความไม่แน่นอน การประมาณค่าความไม่แน่นอนอย่างสมเหตุสมผลและถูกต้องตามหลักวิชาการทำให้ค่าที่รายงานนั้นมีความครบถ้วนสมบูรณ์ และน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น ลดข้อโต้แย้งกรณีเกิดความไม่สอดคล้องของผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างเดียวกันโดยห้องปฏิบัติการที่ต่างกัน ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ได้ดำเนินการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางจุลชีววิทยา ตามข้อกำหนดที่ 7.6[1] เพื่อให้มีข้อมูลพร้อมที่จะนำค่าความไม่แน่นอนของการวัดมารายงานร่วมกับผลการวิเคราะห์ ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ซ้ำลดปริมาณงาน แสดงความเสี่ยง และความเหมาะสมของการนำผลการตรวจวิเคราะห์ไปใช้ ทำให้เกิดการพัฒนาและปรับปรุงกระบวนการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงแสดงความสามารถในการสอบกลับได้ของการวัด[2]

เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์จุลชีววิทยาในอาหารเชิงปริมาณ สอบกลับได้ถึงมาตรฐานอ้างอิงที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อผลการทดสอบให้ค่าคาบเกี่ยวในช่วงเกณฑ์การยอมรับ โดยค่าความไม่แน่นอนรวม (Combine Uncertainty) จากรากที่สองของผลรวมของความไม่แน่นอนมาตรฐานยกกำลังสอง (root-sum-of-squares) ตาม ISO 19036:2019[3] มี 3 องค์ประกอบหลัก คือ Technical Uncertainty (u_{tech}), Matrix Uncertainty (u_{matrix}) และ Distributional Uncertainty ($u_{distrib}$) โดย Technique Uncertainty เป็นการหาค่าความไม่แน่นอนด้วยแนวคิดแบบ top-down approach ซึ่งได้จากการประมาณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำได้ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (Intra-laboratory Reproducibility Standard Deviation; S_{IR}) โดยค่า S_{IR} ที่คำนวณได้อาจมีองค์ประกอบของ matrix และความแปรปรวนภายในที่เกี่ยวข้องกับการกระจายของเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่าง (distributional) ทำให้ค่าความไม่แน่นอนของการวัดเกิดการประมาณค่าที่สูงเกินไป (overestimate) ดังนั้นเพื่อลดการทับซ้อนดังกล่าว ห้องปฏิบัติการสามารถเลือกใช้ค่า Intra-laboratory reproducibility standard deviation, corrected by subtraction of matrix and distributional component ($S_{IR:corr}$) คือ ค่า S_{IR} หักลบด้วยส่วนประกอบของเมทริกซ์และส่วนประกอบของการกระจายตัวแทน S_{IR} เมื่อค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของส่วนประกอบที่ไม่พึงประสงค์ยกกำลังสอง (Standard Uncertainty of Unwanted Component[2]; $u^2_{unwanted}$) มีค่าน้อยกว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำได้ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกันยกกำลังสอง (S^2_{IR}) ซึ่งแนวทางนี้ห้องปฏิบัติการสามารถรายงานค่าความไม่แน่นอนของการวัดร่วมกับการรายงานผลได้ ในการนี้จึงได้ดำเนินการรวบรวมข้อมูลการทำซ้ำของการตรวจวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นรายการที่ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ทั้งสิ้นจำนวน 11 รายการทดสอบ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ (APHA 2015, Chapter 6&8)[4] จำนวนจุลินทรีย์ (BAM 2001, Chapter 3)[5] จำนวนยีสต์และรา (AOAC 2019 (997.02))[6] จำนวนยีสต์และรา (BAM 2001, Chapter 18)[7] จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (ISO 15214:1998)[8] Coliforms (BAM 2020, Chapter 4)[9] *Bacillus cereus* (BAM 2020, Chapter 14)[10] *Clostridium perfringens* (BAM 2001, Chapter 16)[11] *Staphylococcus aureus* (BAM 2016, Chapter 12)[12] หน่วยการทดสอบเป็น CFU ต่อกรัม Coliforms (BAM 2020, Chapter 4)[9,13] และ *Escherichia coli* (BAM 2020, Chapter 4)[9,13] หน่วยการทดสอบเป็น MPN ต่อกรัม นำไปคำนวณหาค่า Technical Uncertainty ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนรวม โดยความ

ไม่แน่นอนนี้เกิดจากความแปรปรวนที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนทางเทคนิคของกระบวนการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงการแปรปรวนของการเตรียม การเจือจาง การเติมเชื้อ เครื่องมืออาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาที่ใช้การบ่ม การนับจำนวนโคโลนี การตรวจพบการเจริญและการตรวจยืนยันสิ่งต่าง ๆ ดังกล่าวนี้ถือเป็นแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนโดยทั่วไป[14,15] ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แหล่งที่มาหลักของความไม่แน่นอนในการทดสอบทางจุลชีววิทยา (ISO 19036:2019)[3]

วัสดุและวิธีการ

รวบรวมข้อมูลผลการทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2564–2567 ทั้งหมด 11 รายการทดสอบ จำนวนรวม 203 ตัวอย่าง โดยวิธี Colony count technique เลือกเฉพาะผลการนับที่มีจำนวนโคโลนีรวมตั้งแต่ 30 โคโลนี ($\sum C \geq 30$) โดยพิจารณาช่วงของการนับตามข้อกำหนดของแต่ละวิธีทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 1

ส่วนวิธี MPN technique เลือกข้อมูลที่ให้ผลบวกรวมทุกระดับความเจือจางไม่น้อยกว่า 5 หลอด โดยต้องมีข้อมูลอย่างน้อย 10 ตัวอย่าง ($n \geq 10$) ตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ละตัวอย่างแบ่งเป็น 2 ส่วน (Test portion) เพื่อให้นักวิเคราะห์ต่างคนกันเป็นผู้ทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยทุกรายการมีการเติมเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายลงไปในสารละลายเจือจางตั้งต้น (Initial suspension) ยกเว้นรายการทดสอบจำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์เป้าหมายอยู่แล้วในตัวอย่าง โดยกำหนดให้มีสภาวะแตกต่างกันในแต่ละขั้นตอนการวิเคราะห์ เช่น เครื่องชั่ง รุ่นการผลิตของอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายเจือจาง น้ำยา เครื่องผสม เวลาการตรวจวิเคราะห์ ตู้บ่มเพาะเชื้อ เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยต้องมีผลที่ตรวจยืนยันแล้ว (n_c) มากกว่าครึ่งหนึ่งของจำนวนโคโลนีที่ทดสอบ (n_p)($n_c \geq n_p/2$) คำนวณผลการทดสอบตามแต่ละวิธีทดสอบเป็นหน่วย CFU ต่อกรัม หรือ MPN ต่อกรัม และแปลงค่าเป็น $\log_{10}$ ก่อนนำมาคำนวณหาค่า s_{IR}(สมการที่ 1) โดยค่า s_{IR} ที่ได้จากการทดสอบอาจมีการรวมองค์ประกอบของ matrix (u_{matrix}) โดยกำหนดให้ u_{matrix} เท่ากับ 0.1[16] เนื่องจากทุกตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน และ

Distributional Uncertainty ($u_{distrib}$) ทำให้ค่าความไม่แน่นอนของการวัดเกิด overestimate ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดการซ้อนทับดังกล่าว จึงต้องหาค่า Unwanted Uncertainty ($u_{unwanted}$) (สมการที่ 2, 3, 4, 5 และ 6) ซึ่งองค์ประกอบของ $u_{unwanted}$ (Unwanted Uncertainty Component) ขึ้นอยู่กับแต่ละวิธีทดสอบดังนี้

ประเภทที่ 1 วิธีการนับจำนวนโคโลนีที่ไม่มีการตรวจยืนยันผลใช้ 2 องค์ประกอบ คือ Matrix Uncertainty (u_{matrix}) และ Poission Uncertainty ($u_{poisson}$) ได้แก่ รายการทดสอบจำนวนจุลินทรีย์ (APHA 2015, Chapter 6&8)[4] จำนวนจุลินทรีย์ (BAM 2001, Chapter 3)[5] และจำนวนยีสต์และรา (AOAC 2019 (997.02))[6]

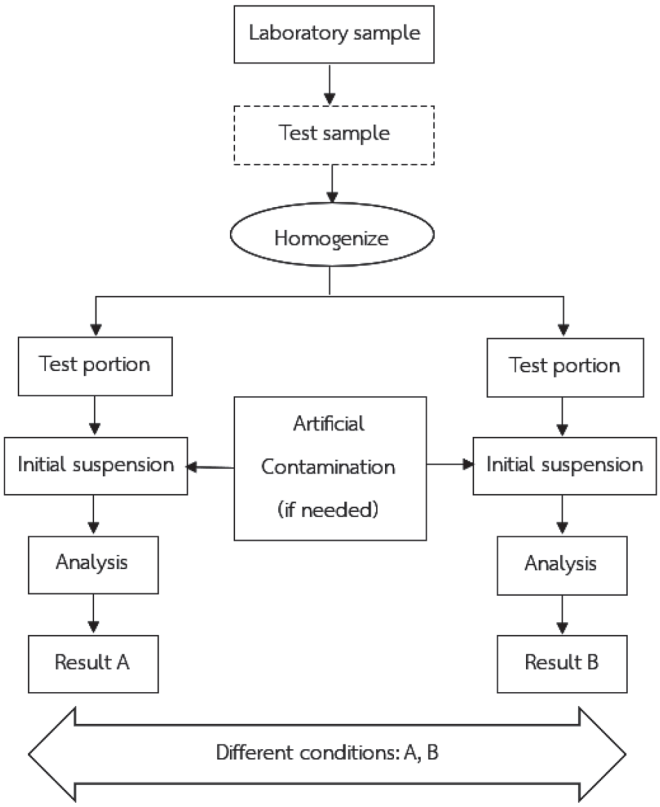
ประเภทที่ 2 วิธีการนับจำนวนโคโลนีที่มีขั้นตอนการตรวจยืนยันผล (Colony count methods, with partial confirmation) ใช้ 3 องค์ประกอบ คือ Matrix Uncertainty (u_{matrix}) Poisson Uncertainty ($u_{poisson}$) และ Confirmation Uncertainty (u_{conf}) ได้แก่ รายการทดสอบจำนวนยีสต์และรา (BAM 2001, Chapter 18)[7] จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (ISO 15214:1998)[8] Coliforms (BAM 2020, Chapter 4)[9] *Bacillus cereus* (BAM 2020, Chapter 14)[10] *Clostridium perfringens* (BAM 2001, Chapter16)[11] และ *Staphylococcus aureus* (BAM 2016, Chapter 12)[12]

ประเภทที่ 3 วิธี Most Probable Number (MPN technique) ใช้ 2 องค์ประกอบ คือ Matrix Uncertainty และ Most Probable Number Uncertainty ได้แก่ รายการทดสอบ Coliforms (BAM 2020, Chapter 4)[9,13] และ *Escherichia coli* (BAM 2020, Chapter 4)[9,13]

จากนั้นคำนวณหาค่า $S_{IR:corr}$ (สมการที่ 7 และ 8) ห้องปฏิบัติการสามารถเลือกใช้ค่า $S_{IR:corr}$ แทนค่า S_{IR} ได้ เมื่อ $u^2_{unwanted}$ มีค่าน้อยกว่า (S^2_{IR})

ตารางที่ 1 รายการทดสอบวิธีวิเคราะห์และข้อมูลต่าง ๆ ที่ใช้ในการหาค่าความไม่แน่นอนเชิงเทคนิคของการวัดทางจุลชีววิทยา

ลำดับที่	รายการทดสอบ	วิธีวิเคราะห์	จำนวนข้อมูล (n)	ช่วงการนับ	ประเภทของวิธี
1	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU ต่อกรัม)	APHA 2015 (Chapter 6&8)[4]	23	25–250	1
2	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2001 (Chapter 3)[5]	23	25–250	1
3	จำนวนยีสต์และรา (CFU ต่อกรัม)	AOAC 2019 (997.02)[6]	16	1–150	1
4	จำนวนยีสต์และรา (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2001 (Chapter 18)[7]	20	10–150	2
5	จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (CFU ต่อกรัม)	ISO 15214:1998[8]	11	15–300	2
6	Coliforms (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2020 (Chapter 4)[9]	19	25–250	2
7	*Bacillus cereus* (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2020 (Chapter 14)[10]	21	15–150	2
8	*Clostridium perfringens* (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2001 (Chapter 16)[11]	17	20–200	2
9	*Staphylococcus aureus* (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2016 (Chapter 12)[12]	21	20–200	2
10	Coliforms (MPN ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2020 (Chapter 4)[9,13]	16	$n_c \geq 5$	3
11	*Escherichia coli* (MPN ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2020 (Chapter 4)[9,13]	16	$n_c \geq 5$	3



ภาพที่ 2 วิธีปฏิบัติในการทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการของการตรวจทางจุลชีววิทยา (ISO 19036:2019)[3]

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n}\sum_{i=1}^{n}(y_{iA} - y_{iB})^2} \qquad \text{สมการที่ 1}$$

$$u_{poisson} = \frac{0.4343}{\sqrt{\sum C}} \qquad \text{สมการที่ 2}$$

$$u_{conf} = \frac{1}{2.303}\sqrt{\frac{(n_c + 0.5)(n_p - n_c + 0.5)n_p^2}{(n_p + 1)^2\,(n_p + 2)n_c^2}} \qquad \text{สมการที่ 3}$$

$$u_{\mathrm{MPN}} = \frac{1/\ln(10)}{\mu\sqrt{\sum_{i=1}^{k}\frac{x_i \times m_i^2 \exp(-m_i \times \mu)}{(1 - exp(-m_i \times \mu))^2}}} \qquad \text{สมการที่ 4}$$

$$s_{unwanted} = u_{matrix}^2 + u_{distrib}^2 \qquad \text{สมการที่ 5}$$

$$u_{unwanted}^2 = \frac{s_{unwanted}}{N} \qquad \text{สมการที่ 6}$$

$$s_{IR:corr}^2 = s_{IR}^2 - u_{unwanted}^2$$ สมการที่ 7

$$s_{IR:corr} = \sqrt{s_{IR}^2 - u_{unwanted}^2}$$ สมการที่ 8

เมื่อ i คือ จำนวนของตัวอย่าง, i = 1 ถึง n เมื่อ ($n \geq 10$)

$y_{iA,}\ y_{iB}$ คือ ผลการทดสอบที่แปลงค่าเป็น $\log_{10}$

n_p คือ จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นำมาตรวจยืนยัน

n_c คือ จำนวนโคโลนีของที่ยืนยันแล้ว

μ คือ ค่า MPN/g หรือ ml จากผลทดสอบ ไม่อยู่ในรูป $\log_{10}$

m_i คือ จำนวนของระดับการเจือจาง

x_i คือ ปริมาณตัวอย่าง (กรัมหรือมิลลิลิตร) ที่เติมในระดับการเจือจาง i

N คือ จำนวนของ test portions

ผล

ผลการทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2564–2567 ทั้งหมด 11 รายการทดสอบ จำนวนรวม 203 ตัวอย่าง โดยวิธี Colony Count Technique และ MPN Technique ของแต่ละรายการทดสอบได้ดังนี้ จำนวนจุลินทรีย์ (APHA 2015, Chapter 6&8) จำนวนจุลินทรีย์ (BAM 2001, Chapter 3) จำนวนยีสต์และรา (AOAC 2019; 997.02) จำนวนยีสต์และรา (BAM 2001, Chapter 18) จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (ISO 15214:1998) Coliforms (BAM 2020, Chapter 4) *Bacillus cereus* (BAM 2020, Chapter 14) *Clostridium perfringens* (BAM 2001, Chapter 16) *Staphylococcus aureus* (BAM 2016, Chapter 12) หน่วยการทดสอบเป็น CFU ต่อกรัม ส่วน Coliforms (BAM 2020, Chapter 4) และ *Escherichia coli* (BAM 2020, Chapter 4) หน่วยการทดสอบเป็น MPN ต่อกรัม มีค่า s_{IR}^2, $u_{unwanted}^2$ และ s_{IR} ดังแสดงในตารางที่ 2 ส่วนค่า $s_{IR:corr}$ ไม่สามารถคำนวณได้เนื่องจาก s_{IR} มีค่าน้อยกว่า $u_{unwanted}^2$

ตารางที่ 2 ค่า Technical Uncertainty; u_{tech} (s_{IR}) ของแต่ละรายการทดสอบทางจุลชีววิทยา ระหว่างปี พ.ศ. 2564–2567 จำนวน 11 รายการทดสอบ

ลำดับที่	รายการทดสอบ	s_{IR}^2	$u_{unwanted}^2$	$u_{tech(s_{IR})}$
1	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU ต่อกรัม) (APHA)	0.0039	0.0120	0.0647
2	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0042	0.0120	0.0620
3	จำนวนยีสต์และรา (CFU ต่อกรัม) (AOAC)	0.0046	0.0150	0.0677
4	จำนวนยีสต์และรา (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0108	0.0138	0.1041
5	จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (CFU ต่อกรัม) (ISO)	0.0034	0.0134	0.0988
6	Coliforms (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0029	0.0129	0.0517
7	*Bacillus cereus* (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0085	0.0130	0.0919
8	*Clostridium perfringens* (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0105	0.0116	0.9210
9	*Staphylococcus aureus* (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0094	0.0151	0.0794
10	Coliforms (MPN ต่อกรัม) (BAM)	0.0199	0.1171	0.1412
11	*Escherichia coli* (MPN ต่อกรัม) (BAM)	0.0199	0.1171	0.1412

วิจารณ์

การเลือกใช้ค่า u_{tech} จากการหาค่า $s_{IR:corr}$ เพื่อลดการประมาณค่าที่สูงเกินไป (overestimate) แต่พบค่า s_{IR}^2 มีค่าน้อยกว่า $u_{unwanted}^2$ ส่งผลให้ไม่สามารถคำนวณค่า $s_{IR:corr}$ ได้เนื่องจากจะทำให้ค่าผลต่างติดลบ จึงไม่สามารถหารากที่สองของผลต่างออกมาได้ ซึ่งอาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่นำมาคำนวณน้อยเกินไป ตามทฤษฎีค่า s_{IR}^2 ไม่ควรน้อยกว่า $u_{unwanted}^2$ เพราะจะส่งผลให้ $s_{IR:corr}$ กลายเป็นค่าลบ หากพบว่า s_{IR}^2 ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า $u_{unwanted}^2$ แสดงว่าความไม่แน่นอนมาตรฐานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ u_{tech} และ u_{matrix} มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับความไม่แน่นอนที่ไม่พึงประสงค์ ($u_{unwanted}$) ดังนั้นสามารถกำหนดค่าเหล่านี้เป็นศูนย์ได้ในการประเมินความไม่แน่นอนรวม

ค่า u_{tech} ที่คำนวณได้ส่วนใหญ่มีค่าน้อยกว่า 0.1 ซึ่งต่ำกว่าค่าความไม่แน่นอนของเมทริกซ์ (u_{matrix}) โดยทั่วไปแล้วค่า u_{tech} ควรมีค่าสูงที่สุด[3] เนื่องจากความไม่แน่นอนเชิงเทคนิคมักเกิดจากกระบวนการทดสอบที่ซับซ้อนและมีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อผลลัพธ์ อย่างไรก็ตามสาเหตุที่ค่า u_{tech} มีค่าต่ำอาจเนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้อยเกินไปหรือช่วงค่าการปนเปื้อนแคบ นอกจากนี้ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกันสูง (homogeneous) และมีการปนเปื้อนต่ำ ซึ่งช่วยลดผลกระทบจากเมทริกซ์ของตัวอย่าง (matrix effect) ได้ดีอยู่แล้ว วิธีทดสอบที่ใช้เทคนิค Most Probable Number (MPN) พบค่า u_{tech} มีค่ามากกว่า 0.1 ซึ่งโดยเทคนิคของวิธีแล้วมีหลักการ คือ จุลินทรีย์จะมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในสารละลายเจือจาง แล้วแบ่งออกเป็นส่วน ๆ เท่า ๆ กัน แต่ละส่วนจะมีปริมาณจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน โดยใช้ระดับความเจือจางละ 3 หลอดอย่างน้อย 3 ระดับความเจือจางต่อเนื่อง ซึ่งจะแสดงผลบวกจากการเกิดแก๊สในหลอดทดลอง จากนั้นทดสอบยืนยันตามแต่ละวิธี แล้วใช้ตาราง Table 1: For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPN per gram and 95 percent confidence interval ตาม BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions[13] เพื่ออ่านค่าจากในตาราง หน่วยเป็น MPN ต่อกรัม ซึ่งค่าที่ได้ในแต่ละค่ามีความห่างกัน ทำให้เมื่อนำข้อมูลมาคำนวณหาค่า s_{IR} จะมีค่ามากกว่าเป็นแบบ Colony Count Technique ที่เป็นการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะในการเจริญ หน่วยในการรายงานผลเป็น Colonies Forming Unit (CFU) ซึ่งวิธีที่ห้องปฏิบัติการใช้มี 2 วิธี คือ แบบ spread plate และ pour plate ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับค่า Target Standard Deviation (σ_{pt})[17] ที่ใช้ในการประเมินค่า z-score ในงานทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาที่กำหนดค่า σ_{pt} ของการทดสอบแบบ Colony Count Technique เป็น 0.25 หรือ 0.35 ส่วนการทดสอบแบบ MPN Technique แบบ 3-3-3 กำหนดค่าเป็น 0.43 ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าเพื่อให้สามารถประเมินค่า z-score ได้เหมาะสมกับเทคนิคของแต่ละวิธี ส่วนค่า Robust Standard Deviation (s*) จากการที่ห้องปฏิบัติการได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญในรอบการทดสอบแบบ MPN Technique จะมีค่ามากกว่า Colony Count Technique เช่น รอบ NFI-PTM 36-2024: Enumeration of Coliforms (MPN/g)[18] มีค่า s* เท่ากับ 0.408 ส่วนรอบ NFI-PTM 08-2024: Total Plate Count (CFU/g)[19] และ NFI-PTM 03-2024: Enumeration of *Staphylococcus aureus* (CFU/g)[20] มีค่า s* เท่ากับ 0.318 และ 0.149 เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากวิธี MPN จะมีค่ามากที่สุด

เมื่อนำค่า Intra-laboratory Reproducibility Standard Deviation; s_{IR} เท่ากับ 0.1041 ของรายการทดสอบ Yeasts and molds count ด้วยวิธี AOAC 997.02[6] มาเปรียบเทียบกับค่า Reproducibility Standard Deviation; S_R จากการศึกษา inter-laboratory study ในแต่ละ product ทั้งหมด 6 กลุ่ม พบค่าต่ำสุด คือ 0.17 ในผลิตภัณฑ์ orange juice และค่าสูงสุด คือ 2.61 ในผลิตภัณฑ์ ketchup พบว่าค่า s_{IR} ที่ห้องปฏิบัติการคำนวณได้มีค่าน้อยกว่า ซึ่งการทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการเดียวกันควรมีค่าน้อยกว่าการทำซ้ำของระหว่างห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจมาจากภายในประเทศเดียวกันหรือต่างประเทศ

สรุป

ค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเทคนิค (u_{tech}) ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้มาจากค่า s_{IR} ทุกรายการทดสอบ โดยพิจารณาการเกิด Overestimate จากการหาค่า $s_{IR:corr}$ แต่ไม่สามารถคำนวณได้ ค่า u_{tech} ต้องนำไปรวมกับองค์ประกอบความไม่แน่นอนอื่น ๆ เช่น $u_{poisson}$, u_{conf} และ u_{MPN} เพื่อคำนวณเป็นค่าความไม่แน่นอนรวม (Combined Standard Uncertainty) ก่อนรายงานผลการทดสอบ เมื่อลูกค้าร้องขอหรือเมื่อผลการทดสอบอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับเกณฑ์กำหนด เพื่อช่วยในการตัดสินใจ ตีความผลอย่างถูกต้อง ค่า u_{tech} สะท้อนถึงความแปรปรวนภายในห้องปฏิบัติการ จึงสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิงสำหรับการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีการทดสอบ กรณีค่า u_{tech} สูงผิดปกติ อาจบ่งชี้ถึงความจำเป็นในการปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์หรือควบคุมปัจจัยก่อความแปรปรวน การคำนวณค่า u_{tech} ปฏิบัติตามมาตรฐานซึ่งสอดคล้องกับข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025:2017 และ ISO 19036:2019 ช่วยเสริมความน่าเชื่อถือของห้องปฏิบัติการในการรายงานผลเชิงปริมาณทางจุลชีววิทยา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยนี้ให้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
2. เพ็ญศรี รอดมา, และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดเชิงปริมาณทางจุลชีววิทยา. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2553.
3. ISO 19036:2019. Microbiology of the food chain – Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2019.
4. Chapter 6, Culture methods for enumeration of microorganisms; Chapter 8, mesophilic aerobic plate count. In: APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 5th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2015.
5. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 3, Aerobic plate count. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2001; [cited 2022 Dec 1]. Available from: URL: http://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-aerobic-plate-count.
6. Chapter 17.2.09. AOAC official method 997.02 yeast and mold counts in foods. In: Latimer GW Jr, editor. Official method of analysis of AOAC international. 22nd ed. Rockville, MD: AOAC International; 2023. p. 19-21.
7. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 18, Yeasts, molds and mycotoxins. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2001; [cited 2023 Jun 19]. Available from: URL: https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins.
8. ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria-Colony-count technique at 30°C. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 1998.
9. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 4, Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2020; [cited 2022 Nov 1]. Available from: URL: https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria.

10. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 14, *Bacillus cereus*. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2001; [cited 2022 Oct 20]. Available from: URL: https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-14-bacillus-cereus.
11. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 16, *Clostridium perfringens*. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2001; [cited 2023 Oct 30]. Available from: URL: https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-16-clostridium-perfringens.
12. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 12, *Staphylococcus aureus*. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2016; [cited 2022 Nov 24]. Available from: URL: https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-staphylococcus-aureus.
13. U.S. Food and Drug Administration. Appendix 2: Most probable number from serial dilutions. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2023; [cited 2023 Nov 1]. Available from: URL: https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions.
14. Ellison SLR, Williams A, editors. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. London: Eurachem; 2012.
15. Weissfeld AS. Estimation of uncertainty of measurement in microbiology. Clin Microbiol Newsl 2010; 32(22); 171-5.
16. Ah Soon C, Cornu M. Report of 2003/2004, ISO Trials about uncertainty measurement. [online]. 2004; [cited 2021 Oct 6]. Available from: URL: https://sitesv2.anses.fr/en/system/files/Report%20ISO%202003-2004%20trials%20on%20MU.pdf.
17. ISO 22117:2019. Microbiology of the food chain – Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2024.
18. National Food Institute. Final report NFI-PTM 36-2024: Enumeration of coliforms (MPN/g) in lyophilized cultures. [online]. 2024; [cited 2025 Apr 10]; [31 screens]. Available from: URL: https://pt.nfi.or.th/DocFile/20241226091206.pdf.
19. National Food Institute. Final report NFI-PTM 08-2024: NFI-PTM 08-2024: Total plate count (CFU/g) in freeze dried shrimp. [online]. 2024; [cited 2025 Apr 10]; [31 screens]. Available from: URL: https://pt.nfi.or.th/DocFile/20240531050558.pdf.
20. National Food Institute. Final report NFI-PTM 03-2024: Enumeration of *Staphylococcus aureus* (CFU/g) in lyophilized cultures. [online]. 2024; [cited 2025 Apr 10]; [30 screens]. Available from: URL: https://pt.nfi.or.th/DocFile/20240322050312.pdf.

Estimation of Measurement Uncertainty in Food Quantitative Microbiological Techniques

Kamonwan Kantaeng and Atchara Ukong

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

ABSTRACT Accredited laboratories, as per ISO/IEC 17025:2017, must estimate measurement uncertainty under the requirements of clause 7.6 to report measurement uncertainty values alongside test results, when requested by clients or when test results overlap within the acceptance range. The Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Thailand, has collected intra-laboratory reproducibility of food microbiological test results from 2021 to 2024 to derive technical uncertainty (u_{tech}) of microbiological tests according to ISO 19036:2019. A total of 203 samples covering 11 test items were analyzed, including aerobic plate count (APHA 2015, Chapter 6&8), aerobic plate count (BAM 2001, Chapter 3), yeasts and molds (BAM 2001, Chapter 18), yeasts and molds (AOAC 2019; 997.02), lactic acid bacteria (ISO 15214:1998), Coliforms (BAM 2020, Chapter 4), *Bacillus cereus* (BAM 2020, Chapter 14), *Clostridium perfringens* (BAM 2001, Chapter 16), *Staphylococcus aureus* (BAM 2016, Chapter 12), of which the units of measurement are CFU per gram, except Coliforms (BAM 2020, Chapter 4) and *Escherichia coli* (BAM 2020, Chapter 4) are MPN per gram. The results of the measurement uncertainty estimation were 0.0620, 0.0647, 0.1041, 0.0677, 0.0988, 0.0517, 0.0919, 0.9210, 0.0794, 0.1412, and 0.1412, respectively. Therefore, the laboratories can use these u_{tech} values to calculate the combined standard uncertainty in reporting, along with the test results, which can be compared with the standard criteria to assess the test results confidently.

Keywords: Measurement uncertainty in food microbiological tests, Technical measurement uncertainty, Combined standard uncertainty, Intra-laboratory reproducibility